



Casa abierta al tiempo

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

Tesis de Maestría.

“EFECTO NEUROGÉNICO DE LA COPAXONA EN UN MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL CON REPERFUSIÓN”

P R E S E N T A:

BIOL. EXP. MA. YOLANDA CRUZ MARTÍNEZ

CO-DIRECTORES DE TESIS:

DR. JUAN ANTONIO IBARRA ARIAS, UNIVERSIDAD ANÁHUAC- MÉXICO NORTE

DRA. HERLINDA BONILLA JAIME, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-IZTAPALAPA

ASESORA:

DRA. GABRIELA MORALÍ DE LA BRENA, UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN FARMACOLOGÍA IMSS



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00109

Matrícula: 208383014

EFFECTO NEUROGENICO DE LA COPAXONA EN UN MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL CON REPERFUSION.

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 5 del mes de abril del año 2013 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. GABRIELA MORALI DE LA BRENA
DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ
DRA. EDNA ELISA GARCIA VENCES
DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA



MARIA YOLANDA CRUZ MARTINEZ
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: MARIA YOLANDA CRUZ MARTINEZ

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

Aprobada

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

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

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. RUBEN ROMAN RAMOS

PRESIDENTA

DRA. GABRIELA MORALI DE LA BRENA

VOCAL

DR. FAUSTO SANCHEZ MUÑOZ

VOCAL

DRA. EDNA ELISA GARCIA VENCES

SECRETARIA

DRA. MARCELA ARTEAGA SILVA

COMITÉ TUTORAL

Co-Director: Dr. José Juan Antonio Ibarra Arias.

Investigador Nacional tipo 2

Departamento de Neuroinmunología

Universidad Anáhuac- México Norte

Co-Directora: Dra. Herlinda Bonilla Jaime

Investigadora Nacional tipo II

Departamento de Biología de la Reproducción. D.C.B.S.

Área Biología Conductual y Reproductiva

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Asesora: Dra. Gabriela Morali de la Brena

Investigador Nacional tipo 1

Unidad de Investigación Médica en Farmacología

Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (CMN SXXI-IMSS)

Este trabajo fue realizado en:

Los laboratorios de investigación de la Universidad Anáhuac-México Norte y en el servicio de Cirugía Experimental y Bioterio de Centro Médico Nacional Siglo XXI bajo la dirección y asesoría de la Dra, Herlinda Bonilla Jaime, el Dr. José Juan Antonio Ibarra Arias y la Dra. Gabriela Morali De La Brena.

El programa de la Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, pertenece al Padrón de Posgrado de Excelencia de CONACYT PIFOP-CONACYT-SEP y cuenta con apoyo del mismo consejo a través del *registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020.*

Durante la realización de la maestría, recibí apoyo de CONACYT, con número de registro 268527.

MIEMBROS DEL JURADO

Los miembros del jurado fueron designados por el Posgrado en Biología Experimental, los abajo firmantes aprobaron la tesis “**Efecto neurogénico de la copaxona en un modelo de isquemia cerebral focal con reperusión**” realizada por la alumna **María Yolanda Cruz Martínez** con fecha de presentación para obtener el grado de maestría el día 05 de abril del 2013 en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

Dra. Gabriela Morali de la Brena
Presidenta

Dra. Marcela Arteaga Silva
Secretaria

Dra. Edna Elisa García Vences
Vocal

Dr. Fausto Sánchez Muñoz
Vocal

AGRADECIMIENTOS.

A mi familia, por su apoyo incondicional y compañía; principalmente 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.

Al Dr. Ibarra por permitirme trabajar en su laboratorio, por tenerme confianza y por darme palabras de aliento y serenidad en el momento indicado. A la Dra. Herlinda y a la Dra. Morali 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: Elisa, Jonathan, Adrian, Judith, Dany, Giorgio, Raúl, Eliza, Jenny y Bety.

A las personas que trabajan en la Universidad Anáhuac por apoyarme siempre que necesité algo, especialmente a: Mauricio, Jorge y Martín. A la Dra. Inesita y al Dr. Chava del bioterio de Centro Médico por su gran ayuda y valiosos consejos.

A mis amigas Gina y Érica, que siempre han estado presentes en todo momento.

Mil gracias.

INDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	
1.1	Etiología de las enfermedades cerebrovasculares	1
1.2	Epidemiología de las enfermedades cerebrovasculares	3
1.3	Fisiopatología de la isquemia cerebral	6
1.3.1	Zona de infarto y de penumbra	6
1.3.2	Cascada isquémica	8
1.3.3	Inflamación post-isquémica	16
1.4	Neurogénesis	19
1.4.1	Zona subventricular	21
1.4.2	Zona subgranular del giro dentado hipocampal	24
1.4.3	Regulación de la neurogénesis	27
1.5	Estrategias farmacológicas empleadas en la isquemia cerebral	29
1.6	Autorreactividad protectora	34
1.7.1	Copaxona	37
2	JUSTIFICACIÓN	41
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42
4	HIPÓTESIS	42
5	OBJETIVOS	43
5.1	Objetivo general	43

5.2	Objetivos particulares	43
6	MATERIAL Y MÉTODO	44
6.1	Diseño experimental	45
6.1.1	Dosis	46
6.1.2	Modelo quirúrgico de isquemia cerebral	46
6.1.3	Evaluación neurológica	48
6.1.4	Determinación de la neurogénesis	48
6.1.4.1	Inmunofluorescencia con BrdU/DCX	51
6.1.5	Determinación de las variables	52
7	RESULTADOS	54
7.1	Evaluaciones neurológicas	54
7.2	Neurogénesis en la Zona Subventricular	59
7.3	Neurogénesis en la Zona Subgranular	67
7.4	Neurogénesis en la Corteza Cerebral	74
8	DISCUSIÓN	82
9	CONCLUSIÓN	90
10	PERSPECTIVAS	90
11	ABREVIATURAS	91
12	REFERENCIAS	94

RESUMEN

Las enfermedades cerebro-vasculares son un conjunto de patologías causadas por alteraciones en la irrigación sanguínea ya sea de manera transitoria o permanente, desencadenando una serie de eventos como la excitotoxicidad, apoptosis, inflamación etc.; que conducen a la muerte neuronal.

La inmunización con péptidos neurales modificados, como la copaxona, ha demostrado tener efecto neuroprotector en el modelo de isquemia cerebral preservando el tejido y promoviendo una mayor recuperación motora; esto se debe a que la copaxona modula la respuesta inmune induciendo un cambio en el fenotipo Th-2 de los linfocitos activados durante el desarrollo de la patología. Este cambio induce la secreción de citocinas anti-inflamatorias y factores neurotróficos que a su vez modulan el microambiente cerebral. Es por ello que nosotros investigamos si el cambio inducido por copaxona promueve la neurogenesis en el mismo modelo.

Para probarlo, utilizamos un doble marcaje específico para neuronas de nueva formación (BrdU/DCX) en la zona subventricular (ZSV), en el giro dentado hipocampal (GD) y en la corteza cerebral del hemisferio lesionado y del sano a los 7 días y a los 2 meses después de la lesión. Los resultados obtenidos mostraron que hay una mayor proliferación neuronal en todas las zonas cerebrales analizadas principalmente en la ZSV lesionada y durante la fase aguda. Lo que sugiere que la inmunización con copaxona a través de la modulación del sistema inmune promueve una mayor neurogénesis en el modelo de isquemia cerebral con reperfusión.

ABSTRACT

Cerebrovascular diseases (CVD) consist of a group of pathologies caused by alterations in the blood flow, either in a transitory or permanent manner. These alterations cause excitotoxicity, apoptosis, inflammation, etc. which lead to neuronal death.

It has been demonstrated that the immunization with modified neural peptides like copaxone can induce neuroprotection in the cerebral ischemia model, preserving tissue and promoting greater motor recovery. Copaxone modulates the immune response by inducing a change in the Th-2 phenotype of the active lymphocytes during the development of the pathology. This change induces the secretion of anti-inflammatory cytokines and neurotrophic factors that modulate the cerebral microenvironment. Therefore, we investigated if the change created by the copaxone promotes neurogenesis in the cerebral ischemia model.

In order to prove it, we utilized a double marking specific for newly formed neurons (BrdU/DCX) in the subventricular zone (SVZ), in the dentate gyrus of the hippocampus (DG), and in the cerebral cortex of the injured and healthy hemisphere, 7 days and 2 months after the lesion. The results demonstrated that there is greater neuronal proliferation in all of the cerebral zones previously mentioned; especially in the lesioned SVZ during the acute phase. Thus, these results suggest that the immunization with copaxone, by modulating the immune system, does promote greater neurogenesis in the cerebral ischemia model with reperfusion.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ETIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES

Las enfermedades cerebrovasculares (ECV) comprenden a un conjunto de trastornos clínicos con manifestaciones súbitas debido a un aporte insuficiente de sangre al tejido cerebral (Cabrera y cols. 2008). Según su naturaleza pueden ser de tipo isquémicas o hemorrágicas; la mayor parte del ictus (término que representa en forma genérica a los trastornos que incluyen infarto cerebral, hemorragia cerebral y hemorragia subaracnoidea) (Díez-Tejedor y cols. 2001) son de tipo isquémico ya que se presentan en un 85% de los casos; el resto, el 15% son de origen hemorrágico (Torregrosa y cols. 2008).

La isquemia focal, puede afectar a una región bien localizada del encéfalo (isquemia focal) como cuando se ocluye una arteria cerebral o bien comprometer al encéfalo completo de forma simultánea (isquemia global) como cuando sucede en un paro cardíaco o hipotensión grave; el tipo más frecuente es el isquémico focal y según la duración del evento se presentará como accidente isquémico transitorio (AIT) o como infarto cerebral en función de que el déficit isquémico se revierta o no antes de 24 h (Díez-Tejedor y cols. 2001).

Convencionalmente, se considera un AIT al episodio isquémico focal de duración inferior a 24 h, es reversible y no existe déficit neurológico permanente tras su finalización, regularmente dura entre 2 y 15 min. El infarto cerebral se produce cuando la isquemia es lo suficientemente prolongada en el tiempo como para

producir un área de necrosis tisular, y convencionalmente se considera como tal, cuando el déficit neurológico tiene una duración superior a 24 h (Bamford, 2001).

Los mecanismos por los que se puede desarrollar un infarto cerebral son (Díez-Tejedor y cols. 2001):

Trombótico: Ocurre generalmente cuando un trombo crece sobre una placa aterosclerótica u otra lesión vascular o porque existe una condición hipercoagulable.

Embólico: Se presenta cuando una arteria se ocluye por un émbolo de origen distal. Éstos pueden tener origen en alguna arteria ó en la circulación venosa que pasa por el corazón.

Hemodinámico: Estos ocurren cuando la perfusión global cerebral está críticamente disminuida debido a una hipotensión arterial y además existe un flujo compensatorio colateral insuficiente.

El cuadro clínico está determinado por la localización y el tamaño de la lesión cerebral; el territorio regularmente afectado es el de la arteria cerebral media ya que la región de la arteria cerebral anterior puede recibir perfusión colateral a través de la comunicante anterior (Montaner, 2008). Cuando se ocluye la arteria cerebral media y fallan los mecanismos compensatorios de la circulación colateral se tiene un infarto principalmente en las zonas de la región lateral del caudo putamen y la corteza somatosensorial; la áreas de penumbra isquémica comprenden a la corteza entorrinal, la neocorteza y la zona medial del caudo putamen (Lipton P. 1999). Por lo que se origina parálisis de la mitad del cuerpo (hemiplejia), disminución de la

sensibilidad de la mitad del cuerpo (hemihipoestesia), visión disminuida de un sólo ojo (hemianopsia), ausencia parcial de movimiento voluntario (paresia) y falta de comprensión del lenguaje (afasia), ya que todas las áreas afectadas se modulan a través de las actividades de la corteza somatosensorial.

1.2 EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES

Por su incidencia, las ECV son un grave problema de salud pública a nivel internacional porque representan la tercera causa de muerte en países industrializados, presentándose de 1.5 a 4 casos por cada 1,000 habitantes (Ramiro y cols. 2008.) La Organización Mundial de la Salud (OMS), ha considerado que para el año 2030 las muertes por ECV se van a mantener en el mismo sitio pese a las mejoras en los servicios de salud ya que los factores de riesgo, entre los que se incluyen el tabaquismo, la hipertensión, la diabetes mellitus tipo II y el aumento en la longevidad de la población se seguirán incrementando (Figura 1).

Este hecho, mantiene preocupadas a las instancias de salud ya que además de las muertes ocasionadas por las ECV, los costos de estos padecimientos son cuantiosos pues ascienden a 53,600 millones de dólares en atención a 4.8 millones de pacientes en países como Estados Unidos (American Heart Association, 2011).

En México, la incidencia se ha registrado en 22 casos de cada 10,000 habitantes en individuos de 45 a 54 años de edad y aumenta a 83 por cada 10,000 habitantes de 64 a 74 años de edad. En cuanto al índice de mortandad, ocupan el tercer lugar de

mueres en mujeres alcanzando valores de 14,000 defunciones al año; en hombres alcanzan el cuarto lugar registrándose 12,896 defunciones (Figura 2) (Secretaria de Salud, 2007).

PRINCIPALES CAUSAS DE MUERTE, COMPARACIÓN ENTRE 2004 Y 2030					
2004			2030		
Enfermedad o lesión	Muertes (%)	Puesto	Puesto	Muertes (%)	Enfermedad o lesión
Cardiopatía isquémica	12,2	1	1	14,2	Cardiopatía isquémica
Enfermedad cerebrovascular	9,7	2	2	12,1	Enfermedad cerebrovascular
Infecciones de las vías respiratorias bajas	7,0	3	3	8,6	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	5,1	4	4	3,8	Infecciones de las vías respiratorias bajas
Enfermedades diarreicas	3,6	5	5	3,6	Accidentes de tránsito
VIH/SIDA	3,5	6	6	3,4	Cánceres de tráquea, bronquios, pulmón
Tuberculosis	2,5	7	7	3,3	Diabetes mellitus
Cánceres de tráquea, bronquios, pulmón	2,3	8	8	2,1	Cardiopatía hipertensiva
Accidentes de tránsito	2,3	9	9	1,9	Cáncer de estómago
Prematuridad y bajo peso al nacer	2,0	10	10	1,8	VIH/SIDA
Infecciones neonatales y otras*	1,9	11	11	1,6	Nefritis y nefrosis
Diabetes mellitus	1,9	12	12	1,5	Lesiones autoinfligidas
Malaria	1,7	13	13	1,4	Cáncer de hígado
Cardiopatía hipertensiva	1,7	14	14	1,4	Cáncer de colon y rectoe
Asfixia del nacimiento y traumatismo en el nacimiento	1,5	15	15	1,3	Cáncer de esófago
Lesiones autoinfligidas	1,4	16	16	1,2	Violencia
Cáncer de estómago	1,4	17	17	1,2	Alzheimer y otras demencias
Cirrosis hepática	1,3	18	18	1,2	Cirrosis hepática
Nefritis y nefrosis	1,3	19	19	1,1	Cáncer de mama
Cáncer de colon y rectoe	1,1	20	20	1,0	Tuberculosis
			21	1,0	Infecciones neonatales y otras*
Violencia	1,0	22	22	0,9	Prematuridad y bajo peso al nacer
Cáncer de mama	0,9	23	23	0,9	Enfermedades diarreicas
			29	0,7	Asfixia del nacimiento y traumatismo en el nacimiento
Cáncer de esófago	0,9	24			
Alzheimer y otras demencias	0,8	25			
			41	0,4	Malaria

*Comprende las infecciones neonatales graves y otras causas no infecciosas que aparecen en el periodo perinatal.

Figura 1. La OMS prevé que para el año 2030 las enfermedades cerebrovasculares seguirán manteniendo el segundo lugar de causas de muerte a nivel mundial (OMS, 2008).

Se ha reportado que el promedio de días de estancia hospitalaria de pacientes que han sufrido algún evento vascular cerebral es de 9.87 días y la tasa de mortalidad intrahospitalaria es del 29 %; del 71% de los pacientes que sobreviven al evento

vascular 25% de ellos permanecerá con alguna discapacidad crónica y con un alto riesgo de recidivas (Cabrera y cols. 2008), lo que afecta seriamente la economía de las familias y del Estado mismo.

Cuadro II. Principales causas de muerte en mujeres, México 2005		
Causa	Defunciones	%
Diabetes mellitus	36,280	16.3
Enfermedades isquémicas del corazón	23,570	10.6
Enfermedad cerebro-vascular	14,500	6.5
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	9,087	4.1
Cardiopatía hipertensiva	7,552	3.4
Infecciones respiratorias agudas bajas	7,076	3.2
Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	6,720	3
Nefritis y nefrosis	5,269	2.4
Desnutrición calórico-poteica	4,303	1.9
Tumor maligno del cuello del útero	4,273	1.9
Tumo maligno de la mama	4,234	1.9
Asfixia y trauma al nacimiento	4,209	1.9
Tumor maligno del hígado	2,545	1.1
Tumor maligno del estómago	2,524	1.1
Accidentes de vehículo de motor (ocupantes)	2,365	1.1
Fuente: DGIS, Secretaria de Salud (datos propios no publicados)		
Cuadro II. Principales causas de muerte en hombres, México 2005		
Causa	Defunciones	%
Diabetes mellitus	30,789	11.3
Enfermedades isquémicas del corazón	29,843	10.9
Cirrosis y otras enfermedades crónicas del hígado	20,864	7.6
Enfermedad cerebro-vascular	12,896	4.7
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	11,183	4.1
Agresiones (homicidios)	8,610	3.2
Accidentes de vehículo de motor (ocupantes)	8,450	3.1
Infecciones respiratorias agudas bajas	7,912	2.9
Nefritis y nefrosis	6,135	2.2
Asfixia y trauma al nacimiento	5,560	2
Enfermedades hipertensivas	5,336	2
Tumor maligno de tráquea, bronquios y pulmón	4,817	1.8
Tumor maligno de próstata	4,800	1.8
Desnutrición calórico-proteica	4,139	1.5
Peatón lesionado en accidente de vehículo de motor	3,998	1.5
Fuente: DGIS, Secretaria de Salud (datos propios no publicados)		

Figura 2. Tasas de mortandad en México en hombres y mujeres (Secretaria de Salud, 2007).

1.3 FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL

La fisiopatología de la isquemia cerebral es compleja, algunos sucesos tienen lugar durante el evento, otros durante la recirculación sanguínea (reperusión) y otros ocurren días o semanas después. Las consecuencias sobre la integridad anatomofuncional del sistema nervioso central (SNC) se han relacionado con la duración de la isquemia, la vulnerabilidad de las diferentes regiones cerebrales ante este fenómeno y de factores hemodinámicos y metabólicos como: la temperatura corporal, presión arterial, glucemia, pH y presiones parciales de oxígeno y dióxido de carbono y, sí es el caso, con la aplicación oportuna de procedimientos efectivos contra el daño neural (Sarraf-Yazdi y cols. 1999).

Todos los eventos inician con la obstrucción de alguna de las grandes arterias que irrigan el tejido cerebral, esta obstrucción origina un gradiente de presiones en el órgano afectado lo que produce zonas con diferentes niveles de perfusión sanguínea; dependiendo del nivel de perfusión vamos a encontrar diferentes grados de daño en el tejido cerebral.

1.3.1 ZONA DE INFARTO Y DE PENUMBRA

La irrigación sanguínea cerebral en condiciones normales es de 50 a 55ml/100g/min de tejido cerebral, en un sistema regulado que provee de oxígeno, glucosa y otros nutrientes a todas las células cerebrales (Castillo y cols. 2003); la disminución del flujo sanguíneo cerebral (FSC) en una superficie determinada del tejido por debajo de 10ml/100g/min produce una rápida muerte celular, esta área es llamada zona de

infarto, allí es donde se produce el mayor daño ya que es una área que depende estrictamente de la arteria afectada (Montaner, 2008).

Alrededor del área de infarto existe una región moderadamente hipoperfundida, cuya extensión depende de la eficacia de la circulación colateral (anastomosis leptomeníngicas de Heubner) ya que cuanto mayor sea el número y el diámetro de estas anastomosis, más eficiente será el aporte colateral desde los territorios vasculares adyacentes no ocluidos (Torregrosa y cols. 2008). En esta zona hipoperfundida, existen dos regiones bien diferenciadas: la zona de oligoemia, que se caracteriza por mantener un FSC mayor de 22ml/100g/min y en la que la transformación a infarto sólo sucede en circunstancias especialmente adversas; y la zona de penumbra, que se distingue por tener una perfusión cerebral críticamente disminuida menor a 22ml/100g/min, en esta área el consumo de oxígeno es suficiente para preservar la sobrevivencia celular pero existen alteraciones que afectan el funcionamiento de las mismas (Figura 3).

En la zona de penumbra más próxima al corazón isquémico se desarrollan eventos bioquímicos producto de la respuesta abrupta del área ya en infarto, dando lugar a un fenómeno relativamente progresivo debido a la excitotoxicidad en curso o a eventos nocivos secundarios como despolarización expansiva, inflamación post-isquémica, apoptosis o necrosis tardía (Sweeney y cols. 1995). Es por ello que esta área depende del tiempo y de algún tipo de terapia o mecanismo que impida la expansión o progresión a tejido infartado.

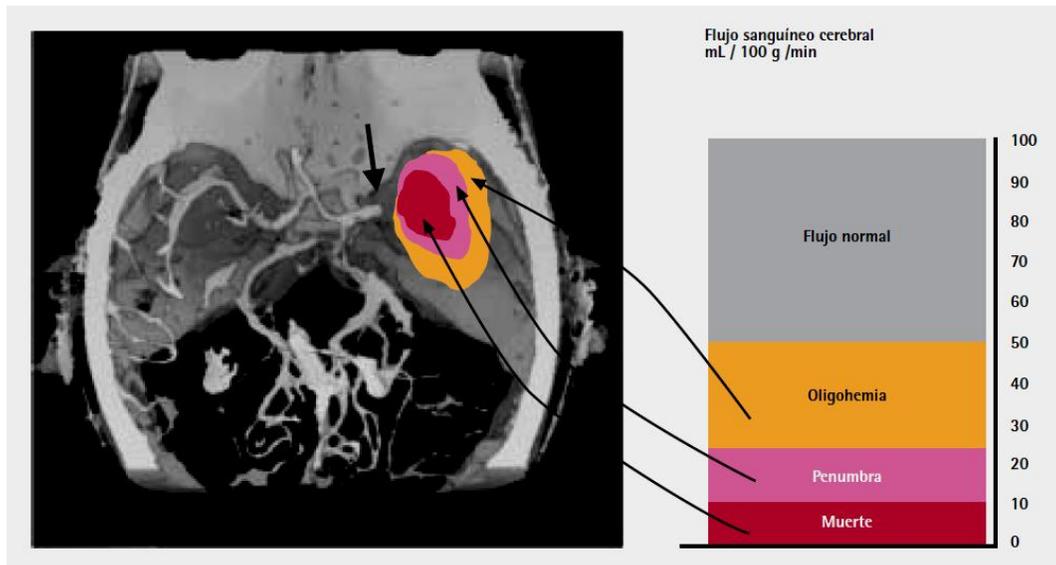


Figura 3. Zonas generadas por la disminución del FSC después de un evento isquémico (Castillo y cols. 2003).

1.3.2 CASCADA ISQUÉMICA

El cerebro requiere un suministro continuo de oxígeno y glucosa para mantener su viabilidad y funcionamiento normal ya que no cuenta con grandes reservas energéticas. Durante el tiempo en que la arteria está ocluida, las células del tejido afectado por la isquemia utilizan rápidamente sus reservas, principalmente el glucógeno almacenado en los astrocitos (Rossi y cols. 2007) y la fosfocreatina contenida en las células, (Torregrosa y cols. 2008) retrasando así la disminución drástica de glucosa y por lo tanto de los niveles de ATP (Adenosin Trifosfato). El hecho de mantener glucosa en ausencia de oxígeno (O_2) promueve la vía anaerobia de la glucólisis y como resultado se obtiene un incremento contundente en la producción de lactato y por ende la acidificación del medio. Estudios recientes han reportado que el lactato se incrementa aproximadamente en tres minutos y alcanza un nivel máximo horas después de haber iniciado la isquemia, lo que provoca:

desnaturalización proteica, alteración del funcionamiento enzimático (actividades pH-dependientes), recaptura de neurotransmisores y apertura de canales iónicos sensibles a ambientes ácidos (Cross y cols. 2010).

Por otro lado, ante el incremento de la acidosis y la carencia de oxígeno y glucosa se interrumpe la fosforilación oxidativa, pero específicamente el complejo IV produce la fuga de electrones que conducen al incremento de especies reactivas de oxígenos (ERO) (Abramov y cols. 2007).

Con el descenso de ATP, se interrumpen todas las reacciones y mecanismos que dependen de él, entre las que se encuentran las bombas intercambiadoras de iones (ATPasas). El fallo de las bombas de Na^+ y K^+ originan una rápida disminución de K^+ intracelular y un aumento extracelular, lo que origina la despolarización de las neuronas (Castillo y cols. 2003). Esto condiciona la apertura de canales de Ca^{2+} voltaje dependientes, el desbloqueo de algunos canales de Ca^{2+} receptores dependientes, perturbación de los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la membrana celular y de la membrana mitocondrial, y el deterioro de las bombas de Ca^{2+} tanto de la membrana celular como de las del retículo endoplásmico (Cross y cols. 2010).

A estos mecanismos de permeabilidad alterada y como consecuencia de los mismos, se produce un incremento radical de los niveles de calcio intracelular, alcanzando valores de hasta 30 μM cuando los valores de concentración de Ca^{2+} en condiciones fisiológicas normales son de 70 nM (Figura 4). Esto provoca la liberación masiva de neurotransmisores al espacio extracelular entre los que se encuentran la

noradrenalina, adenosina y principalmente el glutamato (Torregrosa y cols. 2008). La noradrenalina y la adenosina, activan la adenilato ciclasa unida a la membrana y hacen que los niveles de AMPc y la permeabilidad de la membrana de las células gliales aumenten, a estas células penetran Na^+ , Cl^- y agua y de esta forma contribuyen a que se desarrolle el edema astrocítico perivascular y perineuronal (Kermer y cols.1999).

Los efectos celulares del glutamato están mediados por sus receptores y sus transportadores específicos que son los que recapturan este neurotransmisor tanto en neuronas como en astrocitos; sus transportadores en condiciones fisiológicas normales, co-transportan Na^+ e H^+ con ácido glutámico por K^+ y son dependientes de ATP (Castillo y cols. 2003). Tras la caída del ATP los transportadores dejan de recapturarlo lo que provoca un incremento sostenido de los niveles de glutamato extracelular pues se sigue liberando este neurotransmisor al espacio sináptico ya que las neuronas están en una despolarización permanente.

El glutamato liberado, estimula sus receptores ionotrópicos de membrana N-metil-D-aspartato (NMDA) y ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA). La estimulación del receptor AMPA consigue una mayor despolarización de la membrana al aumentar los niveles de Na^+ intracelular, induciendo la liberación de más glutamato, ocasionando edema celular y la apertura de nuevos canales voltaje dependientes permeables a Ca^{2+} (Castillo y cols. 2003).

Por otro lado, la despolarización de la membrana libera al Mg^{2+} que se encuentra bloqueando el poro del receptor NMDA, al ser activado, permite la entrada tanto de Na^+ y Ca^{2+} exacerbando la despolarización de la membrana y las concentraciones de Ca^{2+} , de hecho, a este receptor se le atribuye el notable aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular (Castillo y cols. 2003).

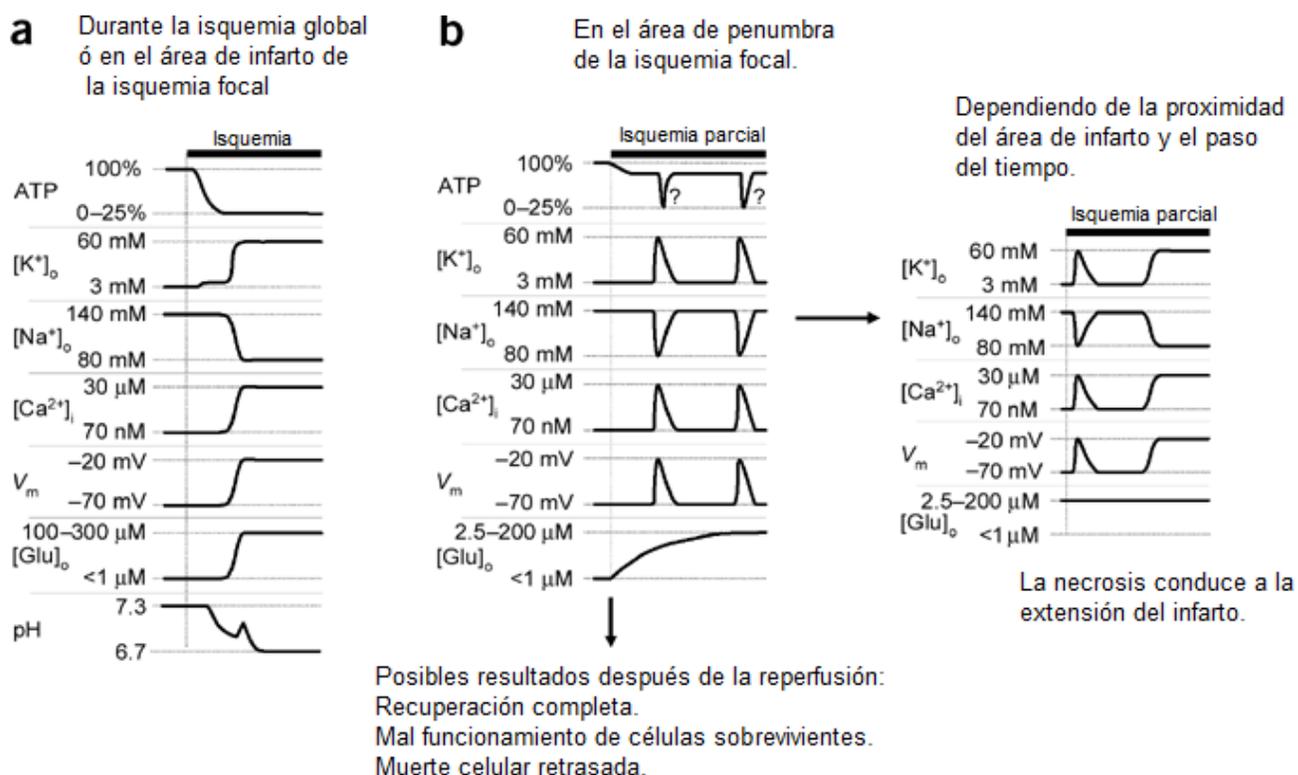


Figura 4. Alteraciones iónicas que sufren las células durante el desarrollo de la isquemia cerebral, A) En el área de infarto se presenta una disminución drástica de los niveles de ATP, un incremento de K^+ , disminución extracelulares de Na^+ , incremento exponencial de Ca^{2+} , disminución en el voltaje de la transmisión eléctrica, incremento drástico de glucosa después de la reperfusión y una acidificación del medio. B) en el área de penumbra hay una disminución en picos de ATP, incrementos en pico de forma inconstante de K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , voltaje en la transmisión eléctrica y un incremento de glucosa sostenida. C) en la isquemia parcial hay alteraciones inconstantes de los iones y del voltaje; estas dependen de la cercanía al área del infarto. Tomada y modificada por Rossi y cols. 2007.

La elevación prolongada de Ca^+ intracelular y la presencia de O_2 , provocada por la reperfusión, activa a toda una serie de enzimas que intervienen en procesos

catabólicos que conducen a muerte neuronal (Figura 5) (Seok y cols. 2002) entre las que se encuentran:

- Calpains: estas son proteasas dependientes de Ca^{2+} , que al ser activadas catalizan la hidrólisis de péptidos que conducen a necrosis y apoptosis (Harwood y cols. 2005). La activación de la calpaina da lugar a la conversión de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa, esta enzima cataliza la oxidación de la hipoxantina y xantina en ácido úrico produciendo también radicales superóxidos (Seok y cols. 2002).
- Fosfolipasas A2, al ser activadas por el incremento de Ca^{2+} intracelular, hidrolizan a los glicerolfosfolípidos de las membranas y se obtiene ác. araquidónico y lisofosfolípidos. El ácido araquidónico a través de las ciclooxigenasas (COX) produce prostaglandinas y leucotrienos acompañados con la producción de radicales superóxido (O_2^-), éstos actúan como señales para iniciar el proceso inflamatorio (Seok y cols. 2002).
- Proteincinasas dependientes de Ca^{2+} , como la calmodulina, al ser activada media procesos inflamatorios y apoptóticos.
- Endonucleasas, la principal es la DNAsa II que corta la región del DNA que se une al nucleosoma, este proceso de fragmentación está implicado en la condensación de la cromatina que se lleva a cabo durante la apoptosis (Woo y cols. 1998)

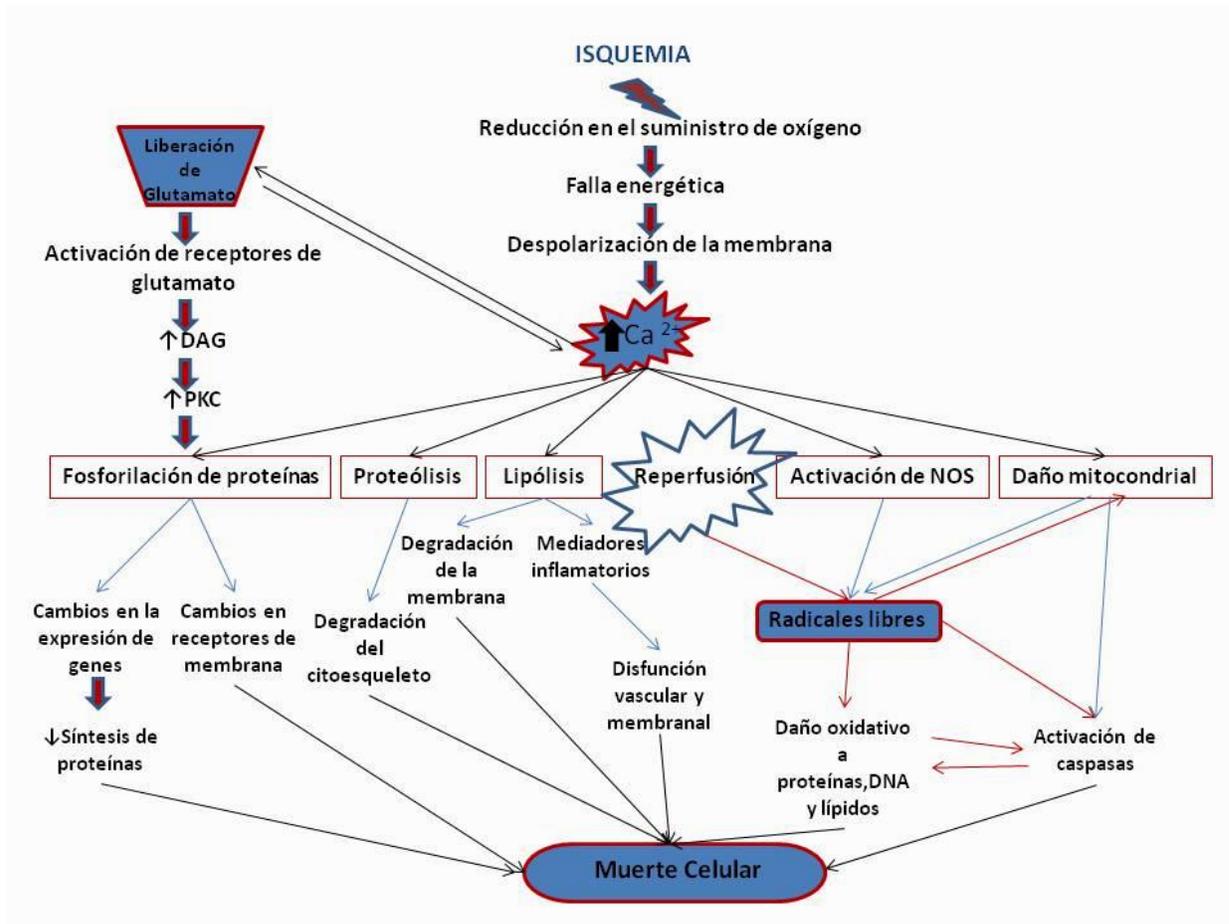


Figura 5. Diferentes mecanismos que conducen a la muerte celular. Tomada y modificada de Crack y Taylor 2005.

Al activarse las enzimas anteriormente mencionadas muchas de ellas producen radicales libres y otras especies oxidantes que provocan alteraciones en lípidos, ADN y proteínas, contribuyendo a la rotura de la barrera hematoencefálica (BHE) y la propagación del edema cerebral (Crack y Taylor 2005).

En muchos tipos celulares a partir de la L-arginina y O₂ se sintetiza óxido nítrico (ON) en una reacción catalizada por la óxido nítrico sintasa (NOS); existen tres isoformas de NOS: la neuronal (nNOS ó NOS1) que se localiza en la neuronas, la endotelial

(eNOS ó NOS3) que se encuentra en las células endoteliales y la inducible (iNOS ó NOS2) que se ubica en las células gliales; aunque recientemente se ha observado que tanto las células endoteliales como las neuronas pueden presentar iNOS y nNOS en astrocitos y en el endotelio (Crack y Taylor. 2005).

Tanto la nNOS como la eNOS están reguladas por los niveles de Ca^{2+} intracelular, al estar incrementado se activan y como consecuencia producen grandes cantidades de ON (Hurtado y cols. 2008). El ON, también es sintetizado por iNOS cuya actividad no depende de los niveles de Ca^{2+} , esta enzima es activada por citocinas en un contexto inflamatorio (Crack y Taylor. 2005).

El ON sintetizado provoca la nitrosilación de enzimas (como la fosfocinasa C y la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa) o mediante la interacción con el hierro asociado con enzimas presentes en grupos hemo como el citocromo P450. También son nitrosiladas enzimas localizadas en la vía apoptótica, como p21^{RAS} en las células T humanas y algunos miembros de la familia de las caspasas (Torregrosa y cols. 2008). El ON, también inhibe enzimas fundamentales como la glutatión peroxidasa (antioxidante) y la citocromo c oxidasa mitocondrial, esto favorece la liberación de O_2^- , los cuales dispararan la activación de factores de transcripción como en NFkB o forman peroxinitrito (ONOO-) en presencia de ON. Tanto el ON como el ONOO- ocasionan que disminuyan los niveles de ATP a través de la inhibición de la respiración mitocondrial (Stewart y cols. 2003).

El $O_2^{\cdot-}$ actúa sobre enzimas dependientes de O_2 como la prolil hidroxilasa, la cual censa los niveles de O_2 existentes en el medio, cuando el radical $O_2^{\cdot-}$ actúa sobre esta enzima provoca que no se detecte la carencia de O_2 y por lo tanto no activa al factor de transcripción HIF- α que promueve la expresión de genes asociados con la glucólisis, el factor de crecimiento endotelial y la eritropoyetina (Aguilera y cols. 2007).

Finalmente la mayoría de las especies oxidantes activan a un gran número de vías de señalización, tanto vías que promueven la muerte celular como JNK, p53, JAK/STAT y ATM, como vías que promueven la sobrevivencia y protección celular como Akt y HSF1 (Figura 6) (Crack y Taylor 2005).

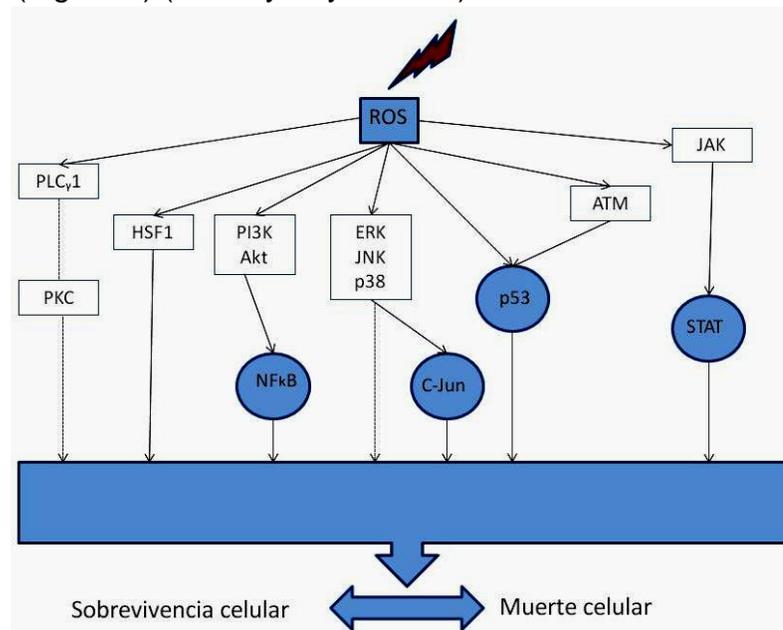


Figura 6. Vías de señalización activadas por radicales libres u otras especies oxidantes. Tomada y modificada de Crack y Taylor. 2005.

1.3.3 INFLAMACIÓN POST-ISQUÉMICA

Hay eventos bioquímicos y fisiológicos que activan la respuesta inmune durante la isquemia cerebral como el incremento de Ca^{2+} intracelular, la consecuente activación de la fosfolipasa A2, de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y de la lipólisis, así como también la producción de radicales libres, la activación de la enzima iNOS de la microglía y otras moléculas inducibles por hipoxia que también participan como factores implicados en la señalización de la activación del proceso inflamatorio que ocurre horas después del daño inicial (Cuenca-López y cols. 2010).

En las células dañadas de la astrogliá, la microglía, las células endoteliales y las células del sistema inmune, se induce la expresión de genes de respuesta temprana que producen un aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias y quimiocinas (Iadecola y Alexander, 2001). El factor nuclear kappa B (NF- κ B) activa la expresión del factor de necrosis tumoral (TNF- α) y las interleucinas IL-1 α , IL-1 β , y la IL-6. El factor de transcripción HIF-1 α , activa la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), debilita la barrera hematoencefálica (BHE) y produce edema (Zhang y Choop. 2002).

La producción de citocinas induce la expresión de moléculas de adhesión como las ICAM-1 (del inglés, intercellular adhesion molecule 1), PECAM-1 (del inglés, Platelet endothelial cell adhesion molecule) y ELAM (del inglés, endothelial-leukocyte adhesion molecule 1); esto hace que los neutrófilos en primera instancia se unan a las células endoteliales y migren hacia el parénquima cerebral guiados por las quimiocinas de las células dañadas, principalmente por la IL-8 y RANTES (del inglés,

regulated upon activation normal T cell expressed and secreted,)(Krupinski y Turu., 2008). Se ha reportado que este reclutamiento ocurre entre 6 a 12h después del evento isquémico alcanzando un pico a las 24h (Cuenca-López y cols. 2010); la migración de los neutrófilos es seguida por los monocitos que alcanzan sus niveles máximos entre las 12 a 24h después de la isquemia, transformándose rápidamente en macrófagos capaces de fagocitar los residuos celulares causados por la misma. Los linfocitos llegan al parénquima cerebral en periodos más tardíos, entre las 24 a 96 h después del evento, alcanzando su pico máximo entre los 3 a 7 días post isquemia (Stevens y cols. 2002).

Aproximadamente 24h después del accidente isquémico, un gran número de células aparecen alrededor del infarto, en particular en el área de penumbra (Figura 7); desde allí contribuyen a exacerbar el daño cerebral mediante la obstrucción de los microvasos y por la producción de mediadores neurotóxicos que incluyen ON, citocinas y especies oxidantes (Cuenca-López y cols. 2010).

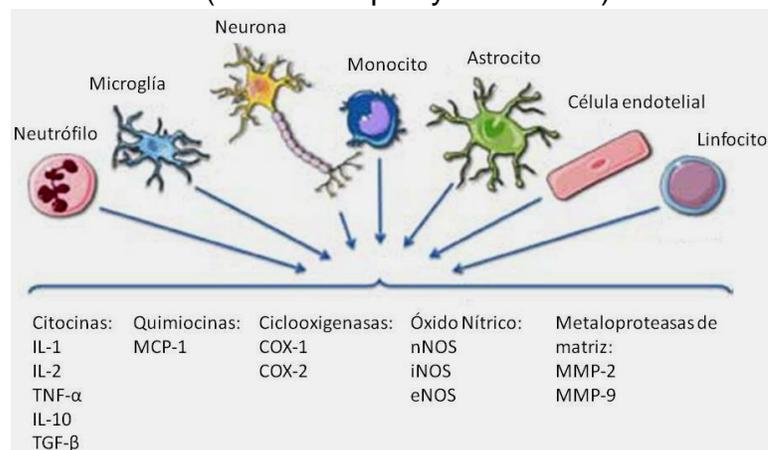


Figura 7. Respuesta celular y mediadores inflamatorios liberados después del evento isquémico. IL, interleucina; TNF- α , factor de necrosis tumoral α ; TGF- β , factor de crecimiento transformante β ; MCP-1, proteína quimiotáctica de monocitos-1; COX, ciclooxigenasas; nNOS, óxido nítrico sintasa neuronal; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible; eNOS, óxido nítrico sintasa endotelial; MMP, metaloproteasa de matriz. Tomada y modificada de Cuenca-López y cols. 2010.

Los linfocitos T también están implicados en la exacerbación del daño en el tejido cerebral; sin embargo, tienen la capacidad de modular la respuesta inflamatoria y su microambiente; y son capaces de producir factores de crecimiento, como el factor de crecimiento neurotrófico, (NGF, del inglés Neurotrophic growth factor), factor neurotrófico derivado del cerebro, (BDNF, del inglés, Brain derived neurotrophic factor), el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés epidermal growth factor), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés Vascular endothelial growth factor), neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4 (NT-4) y neurotrofina 5 (NT-5), factores que están implicados en la neuroprotección, restauración y neurogénesis.

Por otra parte, los astrocitos tras la isquemia, cambian a un fenotipo activado llamado astrogliosis reactiva en el cual desarrollan cambios morfológicos, de tamaño y muestran un aumento de la proteína fibrilar ácida glial (GFAP). Se ha reportado que la astrogliosis forma una cicatriz glial, que consiste en la acumulación de astrocitos reactivos en el área de la lesión formando un obstáculo para el restablecimiento de nuevas conexiones neurales (Sobrado y cols. 2008). Participan en la inflamación y neuromodulación debido a su capacidad para expresar antígenos del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) y moléculas coestimuladoras (B7 y CD40) que son importantes para la presentación de antígenos y la activación de las células T helper 2. Además, como ya se mencionó tienen la capacidad de secretar citocinas como la IL-1 β , la IL-6 y el TNF- α , de sobreexpresar iNOS y la proteína

TWEK (del inglés, Tumor necrosis factor-like weak), que induce a la apoptosis (Krupinski y Turu, 2008).

También, los astrocitos son el tipo celular con mayor poder antioxidante del cerebro lo que les da la capacidad de protegerse a sí mismos y a las neuronas de la muerte por especies oxidantes (Dringen 2000). Pero al igual que los linfocitos T, también son capaces de producir factores de crecimiento que favorecen como ya se mencionó, la neuroprotección, la restauración cerebral y la neurogénesis.

Cabe mencionar, que ante la importancia de la participación del sistema inmune tanto en la protección como en el deterioro celular, se considera fundamental utilizarlo como posible mecanismo terapéutico, no sólo en patologías como la isquemia cerebral sino en otras enfermedades del mismo carácter neurodegenerativo.

1.4 NEUROGÉNESIS

La neurogénesis en el estado adulto, se define como el proceso de formación de nuevas neuronas que comprende desde las señales que inducen la división de la célula precursora hasta su diferenciación y su establecimiento definitivo en los circuitos funcionales ya existentes (Lledo y cols. 2005). En los años sesentas, Joseph Altman demostró la existencia de la neurogénesis adulta utilizando técnicas de autorradiografía; pero fue hasta finales de los años noventas que varios grupos de investigación demostraron que la neurogénesis persiste en mamíferos superiores (Arias-Carrión y Druker-Colín, 2007).

Las áreas del cerebro capaces de producir nuevas neuronas se conocen como regiones neurogénicas. En el cerebro adulto existen dos zonas bien definidas: la zona subventricular (ZSV) y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado hipocampal (GD), las regiones fuera de estas dos sitios neurogénicos se han denominado zonas “No neurogénicas”, sin embargo, existe toda una polémica ya que en condiciones patológicas se ha demostrado que las células precursoras de neuronas (CPNs) son capaces de producir neuronas y glía en otras áreas del cerebro adulto (Arias-Carrion, y Druker-Colín, 2007; Emsley y cols. 2005).

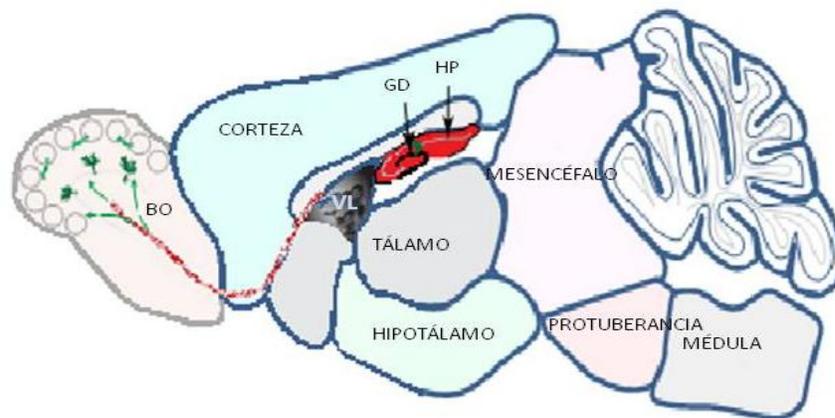


Figura 8. Zonas neurogénicas en el cerebro adulto, la ZSV se muestra en el borde anterior del ventrículo lateral (LV). En la ZSG del GD se muestra en el botón verde en el HP. ZSV, zona subventricular. ZSG, zona subgranular. GD, giro dentado. HP, hipocampo, BO, bulbo olfatorio. Tomado y modificado de Ming y Song 2011.

Las CPNs, son células multipotenciales, es decir poseen la capacidad de dar origen a varios tipos celulares específicos (astrocitos, oligodendrocitos y neuronas), su origen es toda una controversia ya que existen grupos de investigadores que consideran que provienen de células endoteliales y hay algunos otros que piensan que es de tipo astrocítico (Doetsch y cols. 1999).

1.4.1 ZONA SUBVENTRICULAR.

La ZSV, es una región localizada debajo de las células ependimales ubicadas en los ventrículos laterales del cerebro adulto; allí se encuentran las CPNs adultas conocidas como células B (astrocitos radiales); este tipo celular se caracteriza por poseer un cilio único y corto que está en contacto con el ventrículo y un proceso basal que está en contacto con vasos sanguíneos, el conjunto de procesos basales de estas células contribuyen a formar los túbulos gliales por los que más tarde migrarán los neuroblastos (Mirzadeh y cols. 2008).

Las células B expresan de manera característica marcadores como la proteína acidica fibrilar glial (GFAP, del inglés glial fibrillary acidic protein) y el transportador de glutamato específico de astrocitos (GLAST, del inglés astrocyte-specific glutamate transporter) entre otros marcadores gliales, además poseen receptores para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés platelet derived growth factor), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2, del inglés fibroblast growth factor 2), EGF, que son quienes regulan su proliferación, diferenciación y supervivencia (Figura 9) (Mudó y cols. 2009).

Las células B dan lugar a células precursoras altamente proliferativas conocidas como células C debido a que tienen una tasa de proliferación diez veces superior a los demás tipos celulares (Arias-Carrión y Druker-Colín, 2007). Estas células poseen varios nucléolos reticulares y se unen fuertemente entre ellas y los neuroblastos en migración mediante uniones intercelulares (Doetsch y cols. 1999). Debido a que estas células permanecen en su sitio, forman cúmulos que se dividen rápidamente

para dar lugar a muchos neuroblastos que iniciarán después su migración (Álvarez-Buylla y García-Verdugo, 2002). Este tipo de células expresan el factor de transcripción Pax6 que no es exclusivo de este tipo celular y también presentan receptores para PDGF y EGF (Figura 9) (Kriegstein y Alvarez-Buylla, 2009).

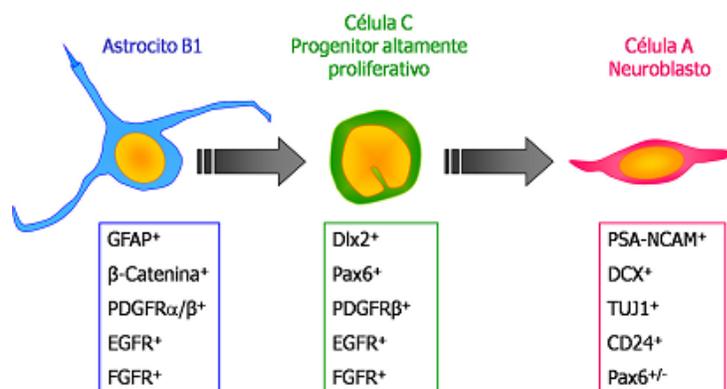


Figura 9. Algunos tipos celulares presentes en la zona subventricular y algunos marcadores que se expresan (González G. 2010).

Los neuroblastos o células tipo A provienen de la división de las células C; son el tipo celular más abundante en la ZSV y se caracterizan por tener un núcleo de gran tamaño, eucromático y un cuerpo celular alargado de forma bipolar (Doetsch y cols. 1999). Estas células viajan grandes distancias, alrededor de 5mm en roedores y hasta 20 mm en primates durante un periodo de seis a quince días para alcanzar el bulbo olfatorio (Arias-Carrión y Druker-Colín, 2007). Su tránsito lo realizan a través de la vía rostral migratoria (VRM) formando cadenas entre ellas, estas cadenas de neuroblastos se desplazan entre estructuras tubulares integradas por células gliales, las cuales secretan factores de crecimiento que favorecen su migración. Los túbulos de las células gliales sirven de soporte direccional y contribuyen a la supervivencia de los neuroblastos evitando que salgan prematuramente de las rutas de migración

(Lim y cols. 1999). Los neuroblastos en migración continúan dividiéndose en el camino (Menezes y cols. 1995) aunque la proliferación es menor que en la ZSV y el ciclo celular es más largo (Smith y Luskin, 1998).

Una vez que los neuroblastos alcanzan la parte media del bulbo olfatorio las células se separan de las cadenas y de manera individual y radial migran hacia la capa granular ó periglomerular del bulbo olfatorio. Ahí llegan como neuronas inmaduras, las cuales extienden ramificaciones dendríticas y más adelante se diferencian en interneuronas GABAérgicas y dopaminérgicas (Alvarez-Buylla y García Verdugo 2002). Durante el proceso de migración de los neuroblastos se expresan marcadores de neuronas inmaduras como la proteína doblecortina (DCX), ésta es una proteína asociada a microtúbulos, la cual se expresa inmediatamente después de la mitosis y permanece expresándose hasta que las neuronas en migración llegan a su destino (Gleeson y Cols. 1999); la tubulina β clase III específica de neuronas (TUJ1), el factor de transcripción Pax6 y las moléculas de adhesión celular neural polisializadas (PSA-NCAM) (Figura 10) (Arias-Carrión y Druker-Colín,. 2007).

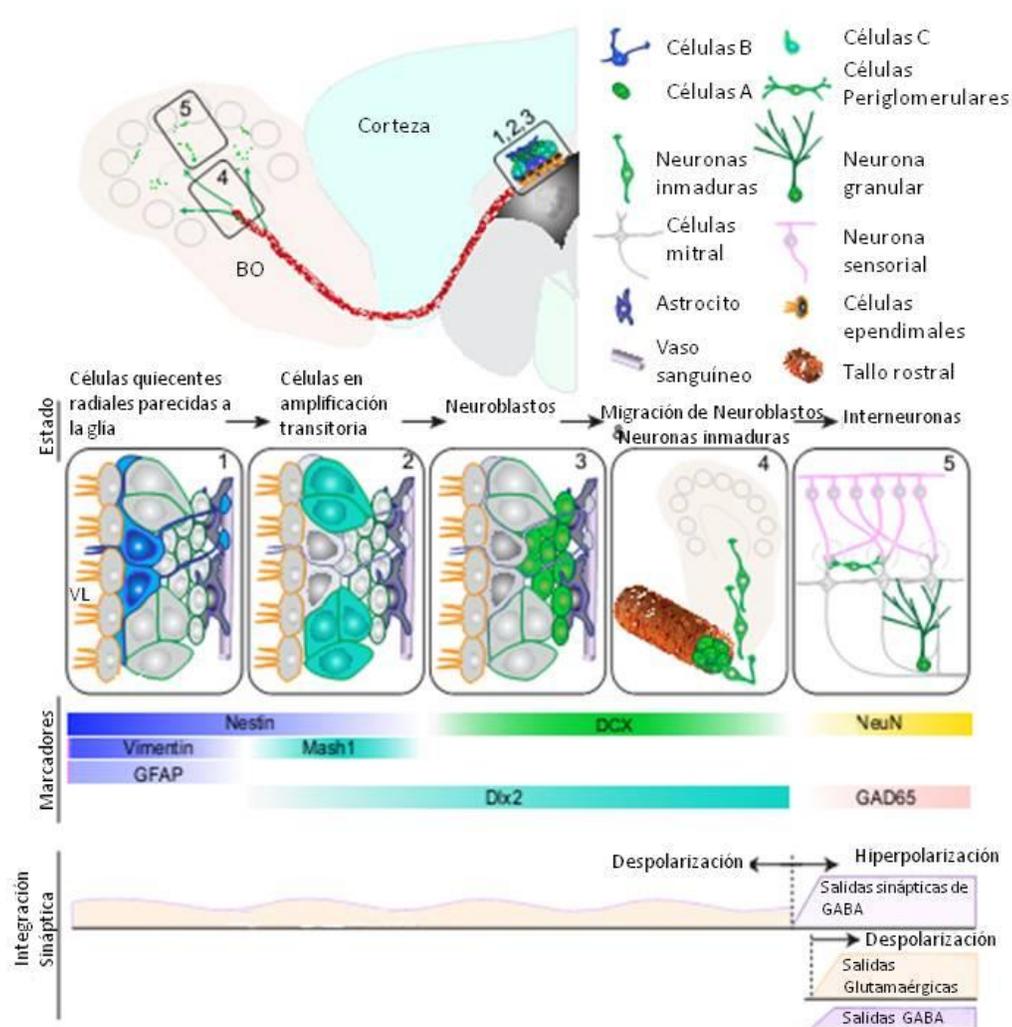


Figura 10. Características fundamentales durante el proceso de neurogénesis en la zona subventricular Tomada y modificada de Ming y Song 2011.

1.4.2 ZONA SUBGRANULAR DEL GIRO DENTADO HIPOCAMPAL

La ZSG se encuentra en la región granular del GD del hipocampo y está localizado en la interfase de la capa celular granular y el hilus (Figura 11) (Arias-Carrión y Drucker-Colín, 2007). En esta zona las CPNs dan origen a células gliales y neuronas que se incorporarán a la región CA3 del hipocampo.

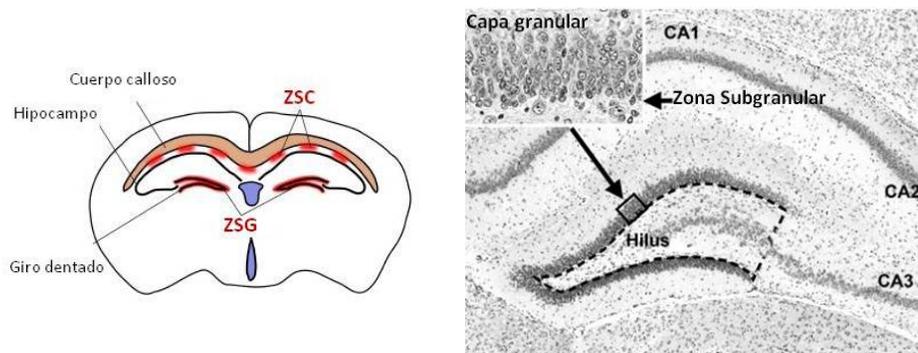


Figura 11. Ubicación de la zona subgranular del giro dentado hipocampal en un corte coronal. Tomada y modificada de Yukie y col, 2010.

Las CPNs de la ZSG también son células B (en esta zona son también llamadas células progenitoras tipo I) que expresan marcadores como GFAP, nestina (proteína de filamentos intermedios implicada en el crecimiento radial y en la organización estructural de las células) y receptores para diferentes factores de crecimiento ya previamente mencionados. Las células B proliferan y dan lugar a los primeros precursores intermedios también nombrados células D (ó células progenitoras tipo II) y a precursores no radiales también conocidos como astrocitos horizontales que son los que darán origen a los oligodendrocitos (Arias-Carrión y Druker-Colín, 2007).

Las células D, son las células que darán origen a neuronas granulares o células G también llamadas neuroblastos, éstas se caracterizan por poseer procesos prominentes que atraviesan las capas de células granulares y procesos pequeños orientados de manera horizontal a lo largo de la ZSG, expresan marcadores como PSA-NCAM, que ayuda a dirigir a las células nerviosas en crecimiento y a controlar la formación de sinápsis, y el factor de transcripción Tbr2 (Ming y Song 2011).

Durante la migración de las neuronas inmaduras ocurre su proceso de diferenciación en el que se extienden dendritas entre la capa molecular y proyectan axones a través del hilus hacia la región CA3 del hipocampo donde se incorporan a los circuitos neurales existentes. Inicialmente estas neuronas son activadas por el ambiente GABAérgico. Comparadas con las células maduras, exhiben una mayor hiperexcitabilidad y una aumentada plasticidad sináptica; durante esta fase presentan marcadores característicos como la DCX y el factor de transcripción Tbr2 (Fig. 12); ya en su fase madura, expresan marcadores como Prox1, que es una proteína específica de células granulares del GD (Lavado y cols. 2010) y NeuN que es una proteína nuclear específica de neuronas (Figura12) (Ming y Song 2011).

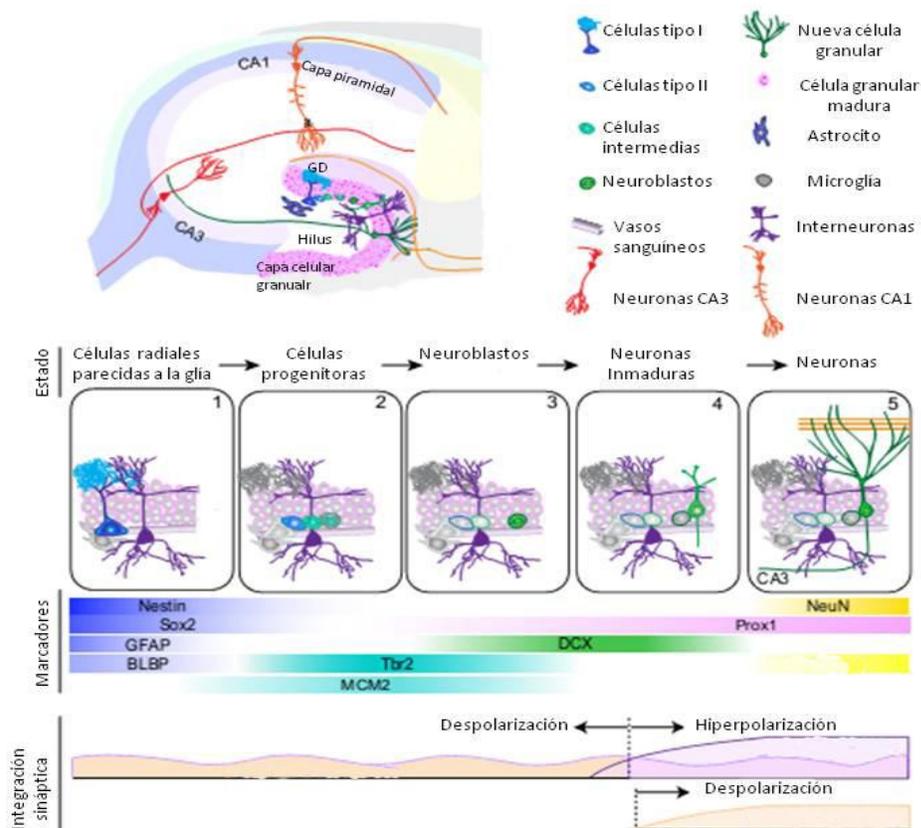


Figura 12. Características fundamentales durante el proceso de neurogénesis en la zona subgranular Tomada y modificada de Ming y Song 2011.

1.4.3 REGULACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS

Existe una gran variedad de elementos tanto internos como externos que participan en los mecanismos reguladores de la neurogénesis, ya sea durante la proliferación de las CPNs, la migración, diferenciación y la sobrevivencia de las neuronas nuevas. Dentro de los componentes internos que la regulan se encuentran la expresión de genes, factores de crecimiento, hormonas y neurotransmisores (Arias-Carrión y Druker-Colín, 2007).

Algunos de los genes que participan en la proliferación y diferenciación celular en las zonas neurogénicas son: *Notch*, *BPM* (del inglés Bone morphogenetic protein), *Noggin*, *Wnt* y *Shh*. Los genes *Notch*, intervienen en la autorrenovación de las células multipotenciales de las zonas neurogénicas, en el desarrollo de neuritas y en el destino específico de las células nuevas (Wang y cols. 2009). Los genes *BPM* y *Noggin* intervienen en la activación del ciclo celular y en la diferenciación de astrocitos y/o neural (Lim. y cols. 2000). Los genes *Wnt*, participan en la proliferación de las CPNs, en las interacciones celulares durante la migración y en la orientación de los axones durante la misma (Nusse, 2008).

Entre los factores de crecimiento que intervienen en la regulación de la neurogénesis se encuentran: el BDNF, EGF, VEGF, NT-3, etc. En el caso del BDNF, va a actuar dependiendo del tipo de receptor al que se una, si se une a sus receptores TrkB activará al factor de transcripción CREEB, éste media la transcripción de genes esenciales para la sobrevivencia y diferenciación de neuronas; si se une a receptores $p75^{\text{NRT}}$ puede activar la vía JNK que conduce principalmente a la apoptosis ó al

factor de transcripción NF- κ B que induce la expresión de genes de supervivencia (Cunha y cols. 2010). Se ha demostrado que el BDNF es necesario para mantener los niveles normales de neurogénesis en el hipocampo de ratones adultos (Lee J. y cols. 2002) y que aumenta la supervivencia de las neuronas nuevas en la misma región. El EGF estimula el crecimiento, proliferación y diferenciación de las neuronas tanto en la ZSV y la ZSG (Arias-Carrión y Druker-Colín, 2007). El VEGF interviene en la vasculogénesis y en la angiogénesis, además de que estimula la producción de nuevas neuronas tanto in vitro como in vivo (Lee y Son, 2009). La NT-3 al igual que el BDNF tiene receptores tipo TrkB que promueven la supervivencia y diferenciación de las neuronas nuevas además incrementa la expresión de BDNF y modula la señalización inducida por éste (Lee y Son, 2009).

Varios neurotransmisores también están implicados en la regulación de la neurogénesis, entre ellos se encuentra el glutamato y la serotonina. Más que el glutamato, son sus receptores a los que se les adjudica dicha función, primordialmente a sus receptores NMDA ya que se ha demostrado que la activación de éstos, inhibe la neurogénesis (Cameron y cols. 1995). Para demostrar la participación de la serotonina en la modulación de la neurogénesis Brezun y sus colaboradores inhibieron el sistema serotoninérgico obteniendo una disminución considerable en la proliferación del CPNs tanto en la ZSV como en la ZSG (Brezun y Daszuta, 2000).

Los factores externos que regulan la neurogénesis son la actividad física, los ambientes enriquecidos y la restricción energética entre otros, que actúan

promoviendo la producción de nuevas neuronas; por otro lado la exposición al estrés crónico actúa de manera negativa sobre la misma (Arias-Carrión y Druker-Colín, 2007). Por otra parte las patologías o traumas en el encéfalo también inducen una mayor proliferación de neuronas nuevas no sólo en las zonas neurogénicas si no también en áreas afectadas como la corteza cerebral.

Pese a que la neurogénesis es un proceso activo en el adulto, los estudios cuantitativos demuestran que el 50% de las neuronas de nueva generación muere unas semanas después de haber alcanzado la madurez (Petreanu y Álvarez-Buylla, 2002; Winner y cols. 2002). Se desconoce si este tiempo de supervivencia es suficiente para que esas células jueguen un papel significativo en su función.

El descubrimiento de la neurogénesis adulta, se ha considerado en los últimos años como un nuevo componente en la recuperación funcional de los pacientes que han sufrido de algún evento isquémico, este hecho podría modificar la terapéutica actual que se utiliza en los pacientes afectados.

1.5 ESTRATEGIAS FARMACOLÓGICAS EMPLEADAS EN LA ISQUEMIA CEREBRAL.

Las terapias empleadas para el tratamiento de la isquemia cerebral se pueden clasificar en tres categorías: recanalización, neuroprotección y neurorestauración; la primera, tiene como objetivo el restablecimiento del flujo sanguíneo utilizando agentes mecánicos o trombolíticos; la segunda, pretende proteger el área de penumbra isquémica por lo tanto busca evitar que el corazón del infarto aumente

(Durukan y Tatlisumak, 2007); y la tercera busca reconstruir los circuitos neurales afectados a través de la neuroplasticidad o bien a través de la neurogénesis (Parris, 2009).

El factor activador del plasminógeno tisular recombinante (rT-PA), es el único fármaco, hasta ahora aprobado por la FDA (del inglés Food and Drug Administration) como trombolítico para el tratamiento de la isquemia cerebral en su fase aguda. Su finalidad es restablecer el flujo sanguíneo lo más rápido posible, para así, preservar el tejido neuronal dañado de manera reversible en la zona de penumbra isquémica, ya que el menor daño neuronal indica menor discapacidad funcional (Pérez, 2009). Sin embargo, menos del 10% de los pacientes tienen acceso a esta terapia ya que sólo ofrece una ventana terapéutica hasta de 4.5 h después de iniciado el evento vascular (Ahmed y cols. 2010).

Existen varios tratamientos que se encuentran en diferentes fases de experimentación clínica que buscan principalmente la recanalización como: la combinación de la embolectomía mecánica, que consiste en colocar un dispositivo que abre el vaso ocluido, y la trombólisis con t-PA (activador del plasminógeno tisular) (Durukan y Tatlisumak, 2007). El desmoteplase, es un activador del plasminógeno salival de murciélago, es un trombolítico específico dirigido hacia la fibrina, en su etapa experimental había tenido muy buenos resultados, sin embargo en la fase clínicas no ha mostrado resultados alentadores (Hacke y cols. 2012).

Dentro de los tratamientos que buscan la neuroprotección, encontramos una gran variedad de fármacos como puntos clave que pueden funcionar de blanco terapéutico dentro de la cascada isquémica; entre ellos encontramos antagonistas de glutamato, antagonistas de Ca^{2+} , quelantes, capturadores de radicales libres, inhibidores de citocinas, inhibidores de radicales libres, estabilizadores de membrana, antioxidantes y factores de crecimiento (Tabla 1). Entre los que destacan el NXY-059, es un capturador de radicales libres que se encuentra en la fase III de investigación, aunque en el último estudio publicado por Shuaib en el 2006 fué inefectivo cuando se administra 6 h después del evento isquémico. La citicolina, es un estabilizador de la membrana celular, este fármaco en estudios clínicos no ha mostrado resultados satisfactorios cuando se administra dentro de las primeras 24 h después de haber sufrido el evento vascular (Dávalos y cols. 2002). A pesar de que son vastos los fármacos que han mostrado su capacidad neuroprotectora en modelos animales han mostrado limitaciones en la fase clínica de investigación (Durukan y Tatlisumak, 2007).

Mecanismo y compuesto	Prueba*	Tamaño**	Resultado
Antagonistas de glutamato			
Aptiganel (Cerestat)	Prueba de infarto agudo de Aptiganel	628	No hay beneficio
Gravestinel	GAIN internacional	1804	No hay beneficio
	GAIN americas	1367	No hay beneficio
Dextrorfano	Fase II		No hay beneficio
CGS 19755 (Selfotel)	ASSIST (abandonado)	567	No hay beneficio, hay efecto adverso
Eliprodil	Eliprodil fase III (abandonado)		No hay resultados publicados
ACEA 1021	Fase II		Seguro con dosis baja
YM872	2 fase II		En seguimiento
ZK-200775	Fase II (abandonado)		Efectos secundarios

			intolerables
Magnesio	FAST-MAG	1298	En seguimiento
<i>Inhibidores de la liberación de glutamato</i>			
Sipatrigina	Fase II		Efectos secundarios intolerables
Fosfenitoína	Fosfenitoína fase II	462	No hay beneficio
<i>Barrido de radicales libres</i>			
NXY-059 (Cervovive)	SAINT I	1722	Efectivo
Ebselen	Prueba Ebselen fase III	394	En seguimiento
Mesilato de tirilazad	RANTTAS	556	No hay beneficio
Edaravone	EAIS, fase II		Seguro y efectivo
<i>Antagonistas de calcio</i>			
Nimodipina	VENUS	459	No hay beneficio
	TRUST	1215	No hay beneficio
Flunarizina	Tratamiento de Flunarizina para infarto	331	No hay beneficio
<i>Quelación de calcio</i>			
DP-b99	Fase II		En seguimiento
<i>Activación de canal de potasio</i>			
BMS-204352	Prueba de apertura de canal de Potasio	1978	No hay beneficio
<i>Antagonistas GABA</i>			
Clometiazol	Estudio de Clometiazol de infarto agudo	1360	No hay beneficio
Diazepam	EGASIS	843	Resultados iniciales, no hay beneficio
<i>Antagonistas de Serotonina</i>			
Bay x 3702 (Repinotan)	RECT	660	En seguimiento
SUN N4057 (Piclozotan)	Fase II		En seguimiento
<i>Antagonistas de Opioides</i>			
Nalmefene (Cervene, ReVex)	Estudio de infarto de Cervene	368	No hay beneficio
Naloxona	Fase II		Efectivo
<i>Inhibidores de la adhesión de leucocitos</i>			
Anticuerpo anti-ICAM-1 (Enlimomab)	EAST (abandonado)	625	Efecto adverso
HU23F2G	HALT	310	No hay beneficio
<i>Inhibidor de citocinas</i>			
Antagonista de receptor IL-1	Fase II		Seguro y efectivo
<i>Estabilizador de membrana</i>			
Citolina	ICTUS	2600	En seguimiento
<i>Modulador de neutrófilos</i>			
Factor inhibidor de neutrófilo	Fase II		No hay beneficio

Tabla 1. Sustancias neuroprotectoras que actualmente se están probando en la fase clínica. Tomado y modificado de Durukan y Tatlisumak, 2007.

Con el objetivo de restaurar los circuitos neuronales afectados tras un evento isquémico cerebral, se están desarrollando alternativas terapéuticas innovadoras basadas en el trasplante de células madre ó a través de la inducción de la neurogénesis utilizando ya sea algún agente que la promueva o bien utilizando factores de crecimiento que favorezcan las condiciones para que se desarrollen y logren sobrevivir e incorporarse a los circuitos neurales. Actualmente, se realizan investigaciones que prueban el efecto de diferentes tipos de terapia celular (Tabla. 2) de las cuales ya está en etapa pre-clínicas el trasplante de células mesenquimales autólogas (Parris, 2009).

Dentro de los factores de crecimiento que se están probando a nivel experimental se encuentran, el BDNF, NT-3, NT-4, NT-5, NT-6, y factores de crecimiento hematopoyéticos, de estos ya se encuentran en la fase clínica la eritropoyetina y el factor estimulante de colonias de granulocitos, (G-CSF, del inglés Granulocyte Colony-Stimulating Factor).

A pesar de que existen una gran cantidad de fármacos en fases avanzadas de investigación, lamentablemente aún no existe una terapia eficaz con una ventana terapéutica apropiada para la neuroprotección; ni tampoco algún fármaco que promueva de manera eficiente la neurorestauración de los pacientes afectados; es por ello apremiante y justificada la necesidad de continuar la búsqueda de nuevas alternativas eficientes para el manejo de las consecuencias de la isquemia cerebral.

TIPO CELULAR	SEGURIDAD	CONSIDERACIONES ÉTICAS	RESULTADOS
Células madre mesenquimales (autólogas)	Excelente (pruebas en fase I)	Ninguna	Pobres
Células madre mesenquimales (alogénicas)	Muy bueno. Posible rechazo al trasplante	Ninguna	Excelentes
Células madre del cordón umbilical	Muy bueno	Ninguna	Muy bueno
Células progenitoras adultas	Muy bueno	Ninguna	Excelente
Células madre neurales	Bueno pero en gran parte desconocido.	Menor (depende del origen)	Moderado

Tabla 2. Diferentes terapias celulares que se encuentran en investigación. Tomado y modificado de Parris, 2009.

1.6 AUTORREACTIVIDAD PROTECTORA

El sistema inmune (SI) normalmente defiende al organismo en contra de agentes invasores ó extraños (antígeno) que ponen en riesgo la integridad del individuo y que son capaces de originar una respuesta inmune. Para realizar dicha función es importante que identifique de manera específica al tipo de patógeno o sustancia extraña que lo está poniendo en riesgo; para ello las células T son las únicas capaces de identificar o reconocer a estos antígenos. Para poder identificarlos de manera adecuada, durante la ontogenia de las células T se desarrolla un proceso de selección tímica en el cual se capacita a los linfocitos T para que sean capaces de

identificar antígenos extraños (Roitt y cols. 2003). Durante el mecanismo de selección los linfocitos T que son capaces de identificar antígenos propios (autoantígenos) con gran afinidad ó aidez son conducidos a apoptosis; los linfocitos T que fueron capaces de escapar de este proceso son inactivados en la periferia ya sea por anergia (ausencia de reactividad funcional), eliminación ó supresión a través de los linfocitos T reguladores (Abbas, 2009).

A pesar de la existencia de los mecanismos de autotolerancia (tolerancia a los antígenos propios) anteriormente mencionados, podemos encontrar células autorreactivas en el organismo que no fueron eliminadas o inactivadas, esta autorreactividad o autoinmunidad presente en individuos sanos debe considerarse normal y es perfectamente compatible con la homeostasis (Moreno, 1996).

En este sentido podemos considerar que la autorreactividad en un estado controlado no es dañina, sin embargo, cuando es excesiva y existe suficiente disponibilidad y concentración del autoantígeno, se desarrolla una enfermedad autoinmune (Moreno, 1996). Tal es el caso de enfermedades como lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad de Graves, artritis reumatoide y la esclerosis múltiple que es una afección inflamatoria desmielinizante del SNC en la que existe una respuesta autoinmune contra la proteína básica de la mielina (MBP) (Revesz y cols. 1994).

Tradicionalmente hablar de autoinmunidad siempre se asociaba al desarrollo de enfermedades autoinmunes, pero en los últimos años, la Dra. Michal Schwartz y su grupo de trabajo, han propuesto el concepto autorreactividad protectora, la cual se

desarrolla justamente por la presencia de linfocitos T autorreactivos, los cuales ejercen o impulsan propiedades protectoras o restauradoras ante alguna agresión al SNC (Hauben y cols. 2000a).

Bajo esta premisa, la Dra. Schwartz y sus colaboradores han realizado numerosos trabajos experimentales donde demuestran que la respuesta fisiológica de los linfocitos T autorreactivos juegan un papel crucial en la neuroprotección después de una lesión en el SNC (Hauben y cols. 2000b; Yoles y cols. 2001).

Utilizando varios modelos entre los que destacan: lesión parcial en nervio óptico (Schwartz y Kipnis, 2005), contusión en médula espinal (Ibarra y cols. 2004), y trauma craneoencefálico (Kipnis y cols. 2003); quienes demostraron que si inyectan de manera sistémica linfocitos T específicos para el autoantígeno PBM se observa neuroprotección, misma que fue confirmada bajo criterios morfológicos, anatómicos y funcionales (Schwartz y Kipnis, 2005; Hauben y cols. 2000a).

En este contexto, se puede sugerir que estas células participan de manera importante en el fenómeno de neuroprotección, aunque recientemente también se les ha implicado en el funcionamiento normal del cerebro. Kipnis y sus colaboradores (2004) demostraron en un modelo de esquizofrenia en ratones, que la presencia de linfocitos T autorreactivos son necesarios para mantener el equilibrio químico y que su alteración facilita el desarrollo de la patología. Además se demostró que cuando son activados producen factores de crecimiento como el BDNF (Ziv y cols. 2006). También se ha demostrado que este tipo de linfocitos T son indispensables para

desarrollar las habilidades cognitivas hipocampo-dependientes, incluyendo la memoria y aprendizaje espacial y la expresión de genes que codifican para proteínas relacionadas con la actividad presináptica. (Wolf y cols. 2009; Ron-Harel y cols. 2008).

Aunque los mecanismos por los que los linfocitos T autorreactivos contribuyen a reparar el tejido del SNC no son claros, los resultados de diversos experimentos sugieren que estos linfocitos cambian el fenotipo de la microglia/macrófagos así como de los astrocitos reactivos a un fenotipo neuroprotector no citotóxico (Schwartz y Shechter, 2010).

Es importante mencionar que la regulación de las células T autorreactivas en la periferia está a cargo de los linfocitos T reguladores; varios experimentos han confirmado que este tipo de linfocitos que presentan marcadores CD4⁺ y CD25⁺ son fundamentales para suprimir o permitir la autorreactividad protectora cuando es necesaria, por lo tanto se considera que además debe existir un mecanismo fisiológico que afecte selectivamente a este tipo de linfocitos ya que determina el rumbo de su actividad (Schwartz y Kipnis, 2005).

1.6.1 COPAXONA

Bajo los principios de autoinmunidad protectora, se ha empleado la inmunización con derivados no encefalitogénicos de péptidos asociados a la mielina como el copolímero-1 (COP-1), también llamado acetato de glatiramer (Copaxona ó AG); éste es un polímero sintético compuesto por: L-alanina, L-lisina, L-ácido glutámico y L-

tirosina (6:2:5:1) (Kipnis y Schwartz; 2002), el cual fue sintetizado con el objetivo de determinar las características químicas mínimas necesarias para crear una molécula inmunogénica compuesta por aminoácidos hallados en la PBM que fuera capaz de inducir EAE (modelo experimental de la esclerosis múltiple en roedores) (Scheindlin, 2004), pero que al ser probado mostró un efecto supresor de la enfermedad (Gran y cols. 2000).

La copaxona compite por la unión al complejo principal de histocompatibilidad (MHC) ya que presenta una alta, rápida y eficiente unión a varias moléculas de MHC en células presentadoras de antígeno murinas y humanas sin necesidad de ser procesado. Es un antagonista del epítipo 82-100 de la proteína básica de la mielina (PBM) que presenta una fuerte reacción cruzada con esta molécula compitiendo así con ella por el sitio de unión del MHC, esto conduce a la inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias y al desarrollo de una inflamación exacerbada (Figura 13) (Fridkis-Hareli y cols. 2002).

La copaxona ha mostrado la capacidad de reducir la degeneración secundaria de neuronas y promover una mejor recuperación motora en animales con lesión en el SNC (Kipnis y Schwartz; 2002; Kipnis y cols. 2003; Ibarra y cols. 2007) ya que promueve el desarrollo de células T cooperadoras tipo 2 (Th2) e incrementa la producción de la IL-10, IL-4, IL-5, IL-6, y TGF beta a través de la modulación de las células dendríticas (Fig.13). Esta modulación en las células presentadoras de antígeno (CPA's) es un paso muy importante para llevar a cabo la modulación benéfica en la respuesta inmune dañina causada por varios antígenos (Arnon y Aharoni, 2004).

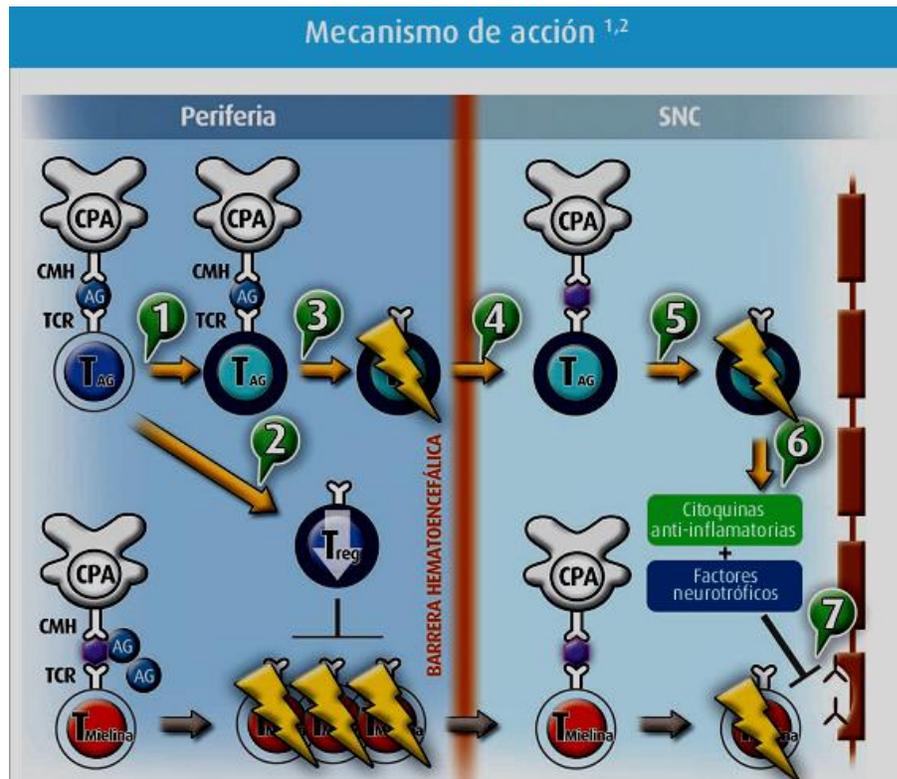


Figura 13. Mecanismo de acción de la copaxona. En el punto 1.- Se muestra cómo existe una mayor afinidad por AG que por la PBM. 2.- Inducción de los linfocitos T reguladores a contrarrestar el balance alterado de los linfocitos T específicos contra la PBM. 3.- los linfocitos Th2 específicos contra AG se activan y se dirigen hacia el SNC. 4.- Estos linfocitos migran y atraviesan la barrera hematoencefálica. 5.- Hay una reactivación con la presencia de antígenos del SNC. 6.- Esto favorece la secreción de citoquinas antiinflamatorias y factores neurotróficos. 7.- Factores que favorecen la neuroprotección y restauración del tejido afectado. AG, Acetato de glatiramer. PBM, Proteína básica de la mielina. Tomado y modificado de Ziemssen y Schrempf, 2007.

La capacidad de inducir la liberación de citoquinas con un fenotipo Th2 le otorga la capacidad neuroprotectora, misma que se ha probado en patologías como la isquemia cerebral donde mostró una reducción significativa del tamaño del infarto (Ibarra y cols. 2007). Por otra parte, también presenta la cualidad de inducir la liberación de factores neurotróficos como el BDNF en modelos como la EAE (Aharoni y cols. 2003) y esquizofrenia (Kipnis y cols. 2004).

Además, recientemente ha mostrado que incrementa la proliferación de CPNs, la migración de neuronas nuevas a diferentes regiones del cerebro y la maduración de esas neuronas en animales que presentaban EAE (Aharoni y cols. 2005). Esta capacidad de inducir tanto la producción de factores neurotróficos, que bien se sabe, son fundamentales para la neurogénesis como la inducción de la proliferación de CPNs, la convierte en una buena alternativa para restaurar el tejido dañado después de un evento isquémico.

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 para tratar de corregir dichos trastornos. Sin embargo, hasta el momento los resultados obtenidos han sido muy limitados y no existen tratamientos satisfactorios que disminuyan el daño neural y restauren el tejido, por lo que es muy importante estudiar nuevas alternativas terapéuticas.

La inmunización con péptidos neurales modificados (activación de la autoreactividad protectora) como la copaxona, ha brindado resultados alentadores ya que se basa en la estimulación y modulación de una respuesta propia del organismo que por sus características, puede ser capaz de restaurar el tejido neural después de una lesión.

La copaxona ha sido capaz de reducir de manera importante el tamaño del área del infarto en un modelo de isquemia cerebral, además de proveer una mayor recuperación motora (Ibarra y cols. 2007). Por otra parte ha demostrado que induce la neurogénesis en otros modelos, lo que sugiere que también pueda inducirla en animales con isquemia cerebral focal.

Con base en los resultados anteriores, hemos decidido realizar el presente proyecto; el cual ofrece la posibilidad de brindar una nueva terapia con una amplia aplicación a nivel clínico y de proporcionar esperanza para mejorar la calidad de vida de los pacientes con isquemia cerebral.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿La inmunización con copaxona promoverá una mayor neurogénesis en ratas sometidas a isquemia cerebral con reperfusión?

4. HIPÓTESIS

Dadas las características inmunomoduladoras de la copaxona en las que induce la expresión de un fenotipo Th2 de las células T y su actividad estimulante sobre las células precursoras de neuronas, promoverá una mayor neurogénesis en ratas sometidas a isquemia cerebral focal con reperfusión a nivel crónico y agudo misma que provocará una mejor y más rápida recuperación neurológica.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la inmunización con copaxona sobre la neurogénesis durante la fase aguda y crónica en ratas con isquemia cerebral focal con reperfusión.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Cuantificar la recuperación funcional ejercida por la inmunización con copaxona en ratas sometidas a isquemia cerebral.
2. Determinar si la inmunización con copaxona promueve la neurogénesis en diferentes áreas del cerebro durante la fase aguda o crónica de la isquemia cerebral focal.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

Población objetivo: Ratas Sprague Dowley (cepa en donde la inmunidad protectora se desarrolla de manera más eficiente ya que ha demostrado ser resistente a desarrollar EAE) (Kipnis y cols. 2001).

Muestra: Ratas Sprague Dowley, machos con un peso aproximado entre 320-350 g.

Consideraciones éticas: Para la realización del presente proyecto, se tomaron en cuenta los lineamientos establecidos por el reglamento de la ley general de salud en materia de investigación para la salud (Título séptimo: De la investigación que incluye la utilización de animales de experimentación) (1990).

Tamaño de la muestra: Se utilizaron 32 ratas macho para cada experimento, 8 ratas por cada grupo.

El tamaño de la muestra se determinó mediante la fórmula (Young 1983), 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%.

6.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizaron 2 experimentos, en el primero se evaluó el efecto neurogénico de la inmunización con copaxona en animales sometidos al evento isquémico durante la fase aguda (7 días posteriores a la isquemia); y en el segundo, se evaluó el mismo efecto durante la fase crónica (2 meses después de la isquemia). Por cada experimento se formaron 4 grupos con una n=8 por grupo:

Grupo 1: Ratas con isquemia cerebral sin tratamiento.

Grupo 2: Ratas con isquemia cerebral + administración de Copaxona + solución salina fisiológica (SS).

Grupo 3: Ratas con isquemia cerebral focal + inmunización activa con Copaxona + adyuvante completo de Freund (CFA).

Grupo 4: Ratas con isquemia cerebral focal + inmunización activa con CFA + Manitol.

Nota: Al grupo 3 y 4 se les aplicó la inmunización acompañada con CFA, el cual contiene 5 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*, con la finalidad de exacerbar la respuesta inmune; al grupo 4 se le aplicó Manitol, ya que es el vehículo que contiene la copaxona y el CFA.

6.1.1 DOSIS Y TRATAMIENTO

Se utilizó una dosis de 250µg de copaxona en un volumen total de 150µL para cada rata. Tanto la SS, CFA y manitol se aplicaron en igual volumen que la copaxona. Las emulsiones fueron inyectadas en la región interescapular vía subcutánea (sc) inmediatamente después de la reperfusión (Ibarra y cols. 2007).

6.1.2 MODELO QUIRÚRGICO DE ISQUEMIA CEREBRAL

A las ratas se les anestesió inicialmente con isofluorano al 3% (con una mezcla de oxígeno y óxido nítrico) hasta alcanzar un estado de anestesia profundo (3-5 min. aproximadamente) posteriormente el anestésico se redujo al 1.5% con el fin sólo de mantener la anestesia (Kelsen y cols. 2006). 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, coaguló y cortó (Peña-Tapia y cols. 2004). Se flameó por un segundo uno de sus extremos de una sutura de nylon calibre 3-0 para engrosar el mismo y así introducirlo en el lumen de la arteria carótida externa en dirección de la arteria carótida interna. La sutura avanzó 18 mm aproximadamente dentro de la arteria carótida interna sin resistencia de paso en el lumen vascular, hasta llegar al émbolo donde la carótida interna se convierte en la arteria cerebral media, provocando así la obstrucción de la arteria cerebral media (MCAO, del inglés

middle cerebral artery occlusion) (Figura 14); posteriormente se suturó al animal manteniendo ocluida la arteria por un tiempo de 90 min libre de anestesia; después de transcurrido este tiempo, se anestesió de igual forma al animal con la finalidad de extraer la sutura de nylon y así permitir la reperfusión sanguínea (Peña-Tapia y cols. 2004). El camino seguido por la sutura de nylon se ilustra en la siguiente figura. Una vez realizadas las cirugías, los animales fueron colocados en cajas con condiciones controladas de temperatura y humedad y se les mantuvo *ad-libitum*. Posteriormente se les realizaron los métodos de evaluación, de acuerdo a su calendarización.

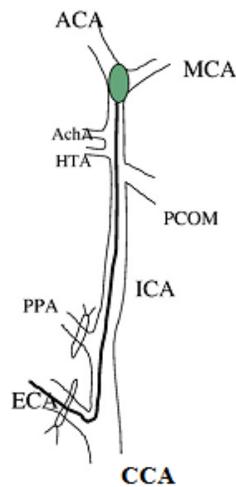


Figura 14. Obstrucción de la arteria cerebral media. CCA, arteria carótida común. ICA, arteria carótida interna. PPA, arteria pterigopalatina. PCOM, arteria comunicante anterior. MCA, arteria cerebral media (Peña-Tapia y cols. 2004).

6.1.3 EVALUACIÓN NEUROLÓGICA

Estas pruebas se realizaron el primer día posterior a la isquemia y el día del sacrificio en el caso del experimento en fase aguda (7 días post-isquemia), en el experimento de fase crónica, se evaluaron a las 24 h post isquemia, a los 7 días y cada 15 días hasta la fecha de sacrificio (2 meses post-isquemia). Se utilizó la escala de evaluación funcional descrita por Zea L. (1989) 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 DETERMINACIÓN DE LA NEUROGÉNESIS

Se evaluó la neurogénesis (neuronas de neo-formación), mediante la incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU), utilizando un doble marcaje inmunofluorescente (anti-BrdU y anti-DCX) a los 7 días y 2 meses post-isquemia. A las 24h y 2h antes del sacrificio a los animales se les inyectó 50 mg / Kg de peso de la rata del marcador BrdU de manera intraperitoneal (Hoehn y Cols. 2005).

Con el fin de observar si las neuronas de nueva formación eran capaces de migrar hasta el sitio de lesión, se hizo doble marcaje inmunofluorescente BdrU/NeuN, a 4

ratas de cada grupo del experimento de fase crónica, estas recibieron una dosis de BrdU el día 28 y 29 post isquemia y a las 24 h y 2 h antes 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. Las inyecciones de BrdU son un método ampliamente utilizado para estudiar la proliferación y la formación de nuevas células durante el desarrollo como en la edad adulta.

Dos horas después de la última inyección de BrdU, los animales fueron anestesiados 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, primero con SS (250 ml) seguida de solución de paraformaldehído al 4% en PB 0.1 M, pH 7.4 (350 ml). 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.

Posteriormente, se realizaron cortes coronales por congelación de 40 μm de grosor espaciadas cada 200 μm , las cuales fueron colocadas en placas de 24 pozos con solución de PB correctamente clasificadas, se utilizaron 3 pozos para cada zona cerebral, para la ZSV, ZSG y la corteza cerebral para evaluar neurogénesis, y en

cada pozo se colocaron 3 cortes. Para evaluar las células positivas BrdU/NeuN se establecieron 3 pozos de la corteza cerebral, con tres cortes en cada pozo (Fig. 15)

Los cortes se iniciaron a partir de la Comisura Anterior (CA) situada en el plano interaural 10.44 mm y 1.44 mm de Bregma; en esta región se ubican las ZSV y la corteza cerebral. Los cortes de la ZSG, se obtuvieron a partir de la Comisura Hipocampal (CH) situada en las coordenadas 6.00mm interaural y -3.00 en Bregma (Fig. 15) (Paxinos y Watson, 2004).

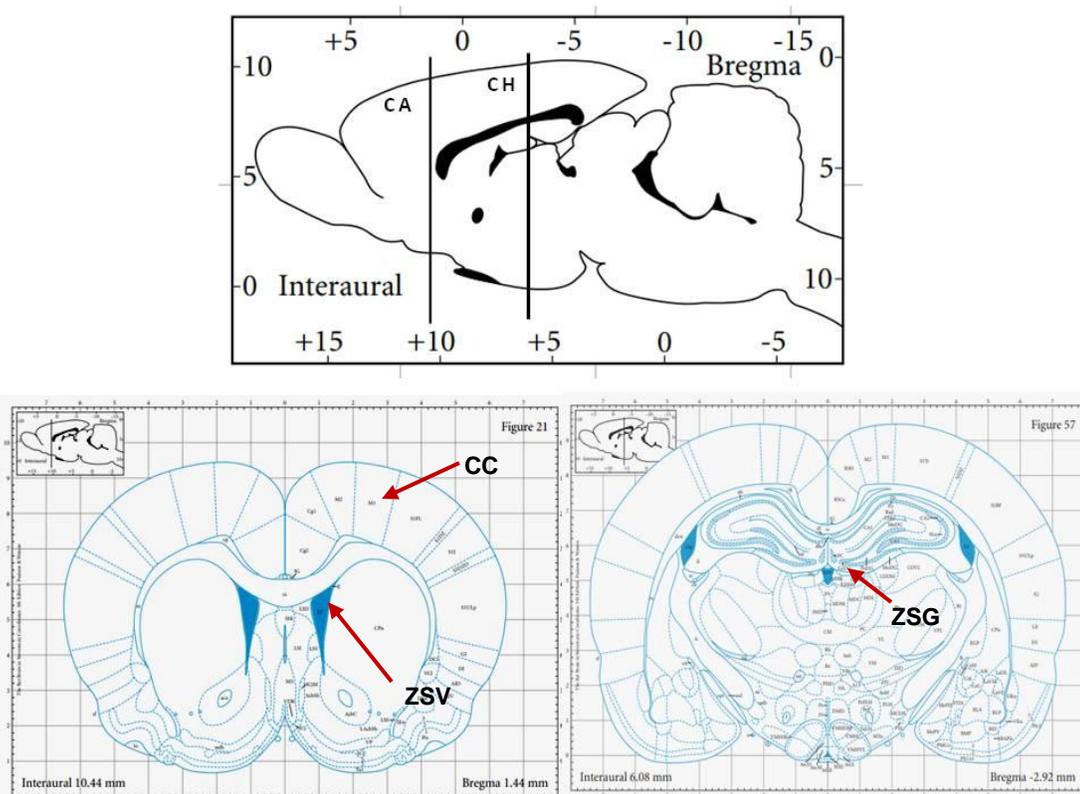


Fig 15.- Regiones cerebrales donde se evaluó la neurogénesis. Se muestra la zona subventricular (ZSV), zona subgranular (ZSG) y la corteza cerebral (CC) con sus coordenadas correspondientes (Paxinos y Watson, 2004).

6.1.4.1 Inmunofluorescencia con BrdU

A los cortes se les realizaron 2 lavados de 10 min con PBT (buffer de fostafo-tritón), se dejaron incubar en immunoRetriver por 30 min a 65° C, al terminar se les realizaron 2 lavados de 5 minutos con PB (buffer de fosfatos) y posteriormente se incubaron 30 minutos en HCl (ácido clorhídrico) 1N a 37°C, enseguida se dejaron incubar 10 minutos en Borato de Sodio 0.1M. y se lavaron por 3 ocasiones con PBT, después se dejaron incubar en solución de bloqueo por 30 min.

Se incubaron con el anticuerpo primario contra BrdU a una concentración de 1:250 y el anticuerpo primario contra DCX a la misma concentración en solución de bloqueo durante 16 h (Tabla 3) ó con el anticuerpo contra NeuN.

REACTIVO	MARCA	DILUCIÓN
Anticuerpos Primarios:		
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
Anti NeuN hecho en ratón	MILLIPORE (cat MAB 377)	1:250
Anticuerpos Secundarios		
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
Alexa Fluor 594 anti ratón IgG hecho en burro	Invitogen (cat. A21203)	1:500
Otros		
20X immuno/DNA Retriver	Bio SB (cat BSB 0023)	1:1

Tabla 3.- Características de las sustancias empleadas en las inmunofluorescencias.

Después se les realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBT y se les dejó incubando por 2 horas en anticuerpo secundario contra IgG de ratón 1:500 en solución de bloqueo y contra IgG de cabra 1:500 ó con el anticuerpo secundario contra IgG de ratón para el marcaje de NeuN. Al terminar, se lavaron por 3 ocasiones durante 10 min con PB, se les tiñó con sudán black por 5 min a oscuras. Se lavaron en 10 ocasiones con PB y contratiñeron con DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol), se lavaron en 2 ocasiones por 5 min con PBS y montaron utilizando vectaShield.

Una vez obtenidas las muestras, fotografiamos las áreas cerebrales utilizando un aumento de 10X para mostrar las áreas en general y de 20X para realizar los conteos celulares positivos al marcaje, la cámara utilizada fue una olympus DP72 incorporada al microscopio de epifluorescencia olympus BX41. Finalmente se contaron las células positivas al marcaje con la ayuda del software de imágenes (Image-Pro 3D Discovery®).

6.1.5 DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES

Variables independientes

Isquemia cerebral con reperusión: Episodio en el que se provocó la isquemia durante 90 min con un monofilamento (3-0) colocado en el lumen de la ACM, para después retirarlo y llevar a cabo el fenómeno de reperusión.

Inmunización activa: Fue la inyección interescapular de copaxona (250µg vía sc) realizada inmediatamente después de la reperusión.

Variables dependientes

Evaluación neurológica: La evaluación se llevó a cabo a las 24 horas de la cirugía y a los 7 días para las ratas del experimento de fase aguda; para la fase crónica, además, se evaluó a los 14, 28, 42 y 60 días post-isquemia. La escala neurológica utilizada fue la propuesta por Zea L. (Zea y cols. 1989); en la que 0, no se observa déficit neurológico; 1, flexión del miembro podálico anterior contralateral a la lesión; 2, vueltas continuas unidireccionales; 3, caída hacia el lado contra-lateral; 4, Disminución ó ausencia del estado de conciencia y 5, muerte.

Neurogénesis: Formación de neuronas nuevas, las cuales se contaron utilizando el software Image-Pro 3D Discovery®. Se reportó el número de células positivas al doble marcaje (BrdU+/DCX+).

Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism 5.00. Se realizó un análisis descriptivo de todos los grupos y se expresaron como media \pm error estándar (EE). Se verificó la distribución de los datos bajo la curva de normalidad utilizando la prueba de Shapiro Wilks. Los datos que no mostraron una distribución normal se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis con grados de libertad (gl)= 3 y una prueba post hoc de Dunns. Los datos normales se analizaron con un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con gl totales = 31, dentro de los grupos= 28 y entre los grupos = 3, seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer

(Daniel, 2005) Se consideró diferencia estadística significativa cuando se obtuvo un valor de $p \leq 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 EVALUACIONES NEUROLÓGICAS

Un día después de realizada la Isquemia cerebral se evaluó el déficit neurológico a todos los animales utilizando la escala de Zea L. (1989). A las 24h en el experimento de fase aguda se observaron déficits locomotores severos en todos los grupos sin encontrar diferencias significativas entre ellos (Figura 16 A). En el experimento de fase crónica se encontraron resultados similares al de la fase aguda, sin diferencias significativas (Figura 16 B).

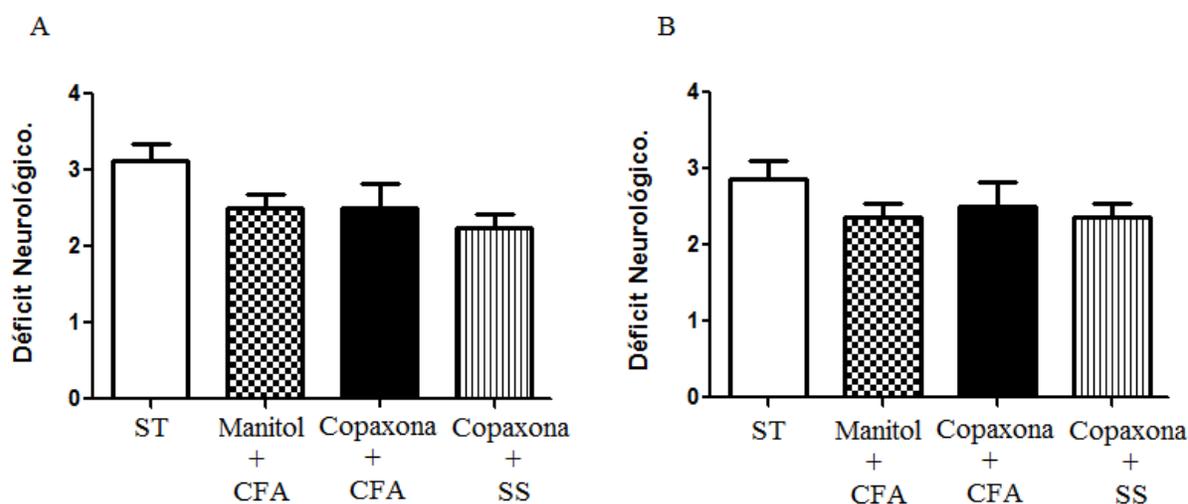


Figura 16. Déficit neurológico después de 24h de la isquemia cerebral. A) Fase aguda; B) Fase crónica, n=8. Media \pm EE. Kruskal Wallis. ST, sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina.

En la segunda evaluación a los 7 días post-isquemia, en el experimento de fase aguda se observó que el grupo de Manitol+CFA mostraba un déficit neurológico de 1.75 ± 0.16 (media \pm EE), Copaxona+CFA de 1.75 ± 0.09 y Copaxona+SS de 1.75 ± 0.12 , los cuales mostraron mejoría significativa comparados con el grupo ST que obtuvo un déficit de 2.62 ± 0.18 , con una $p=0.0052$ en Kruskal Wallis y un valor de 11.50 en Dunn's (Figura 17 A).

En el experimento de fase crónica, las evaluaciones neurológicas arrojaron resultados parecidos obteniendo valores de 2.37 ± 0.18 para el grupo ST, 1.5 ± 0.18 para el grupo Manitol+CFA, 1.5 ± 0.26 para Copaxona+CFA y de 1.75 ± 0.16 para el Copaxona+SS; observando diferencia significativa sólo entre el grupo tratado con Manitol+CFA y el grupo ST, con una $p=0.023$ en Kruskal Wallis y un valor de 11.31 en Dunn's (Figura 17 B).

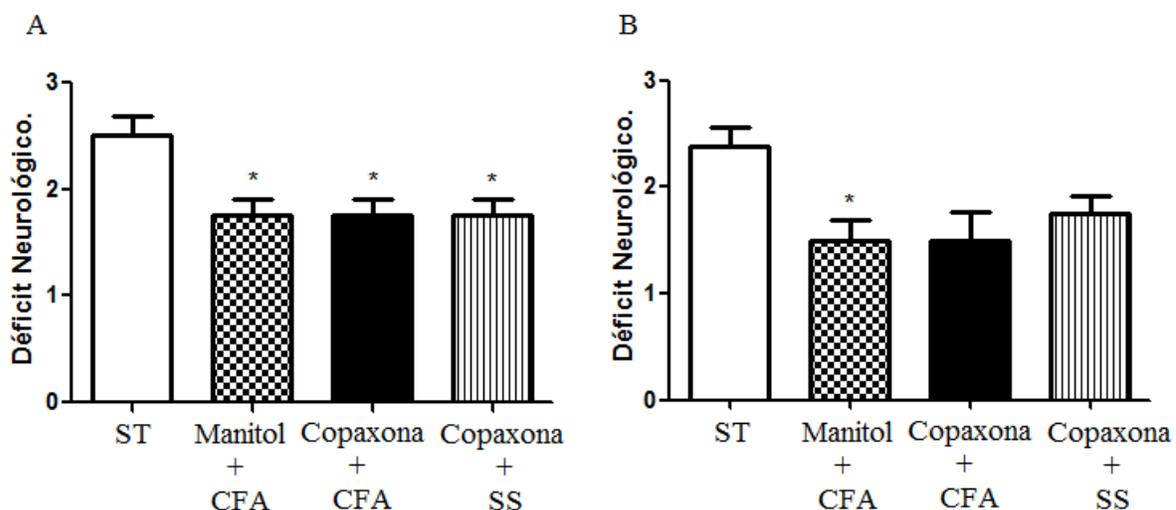


Figura 17. Déficit neurológico a los 7 días después de la isquemia. A) Fase aguda; B) Fase crónica, n=8. Media \pm EE. * $p < 0.05$ vs ST. Kruskal Wallis seguida de Dunns. ST, sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina.

A los 14 días post-isquemia, no se encontraron diferencias significativas pero si una tendencia a la recuperación a excepción del grupo ST (Figura 18 A). Sin embargo, al día 28 se observó que el grupo ST obtuvo un déficit neurológico de 1.62 ± 0.18 , el grupo Manitol+CFA de 1.5 ± 0.19 , Copaxona+CFA de 0.75 ± 0.25 y Copaxona+SS de 0.85 ± 0.12 exhibiendo una mejoría significativa en los grupos tratados con Copaxona con una $p=0.018$ en Kruskal Wallis y 11.13 en la prueba de Dunn's (Figura 18 B). Esto indica neurológicamente que los animales aún presentaban problemas para extender el miembro superior contralateral a la lesión.

A los 42 días, los déficits neurológicos mostraron una recuperación significativa en los grupos tratados con Copaxona; obteniendo para el grupo ST un valor de 1.37 ± 0.18 , para Manitol+CFA de 1.0 ± 0.19 , para Copaxona+CFA 0.5 ± 0.18 y para Copaxona+SS 0.5 ± 0.18 con una $p=0.0125$ en Kruskal Wallis y un valor de 11.31 en la prueba de Dunn's (Figura 18 C).

A los 60 días post-isquemia se obtuvieron los siguientes valores de déficit neurológico: el grupo ST obtuvo 1.0 ± 0.18 ; Manitol+CFA 0.75 ± 0.16 ; el grupo Copaxona+CFA se recuperó completamente consiguiendo un valor de cero en la escala de Zea L., además mostró mejoría significativa no sólo comparado con el grupo ST sino también comparado con el grupo Manitol+CFA. Por último el grupo Copaxona+SS obtuvo 0.12 ± 0.12 ; $p=0.004$ en la prueba de Kruskal Wallis. En la prueba pos hoc de Dunn's se obtuvieron los siguientes valores: 14.44 grupo ST & Copaxona+CFA; 12.5 Copaxona+SS & ST y 11.63 en la comparación entre Manitol+CFA y Copaxona+CFA (Figura 18 D).

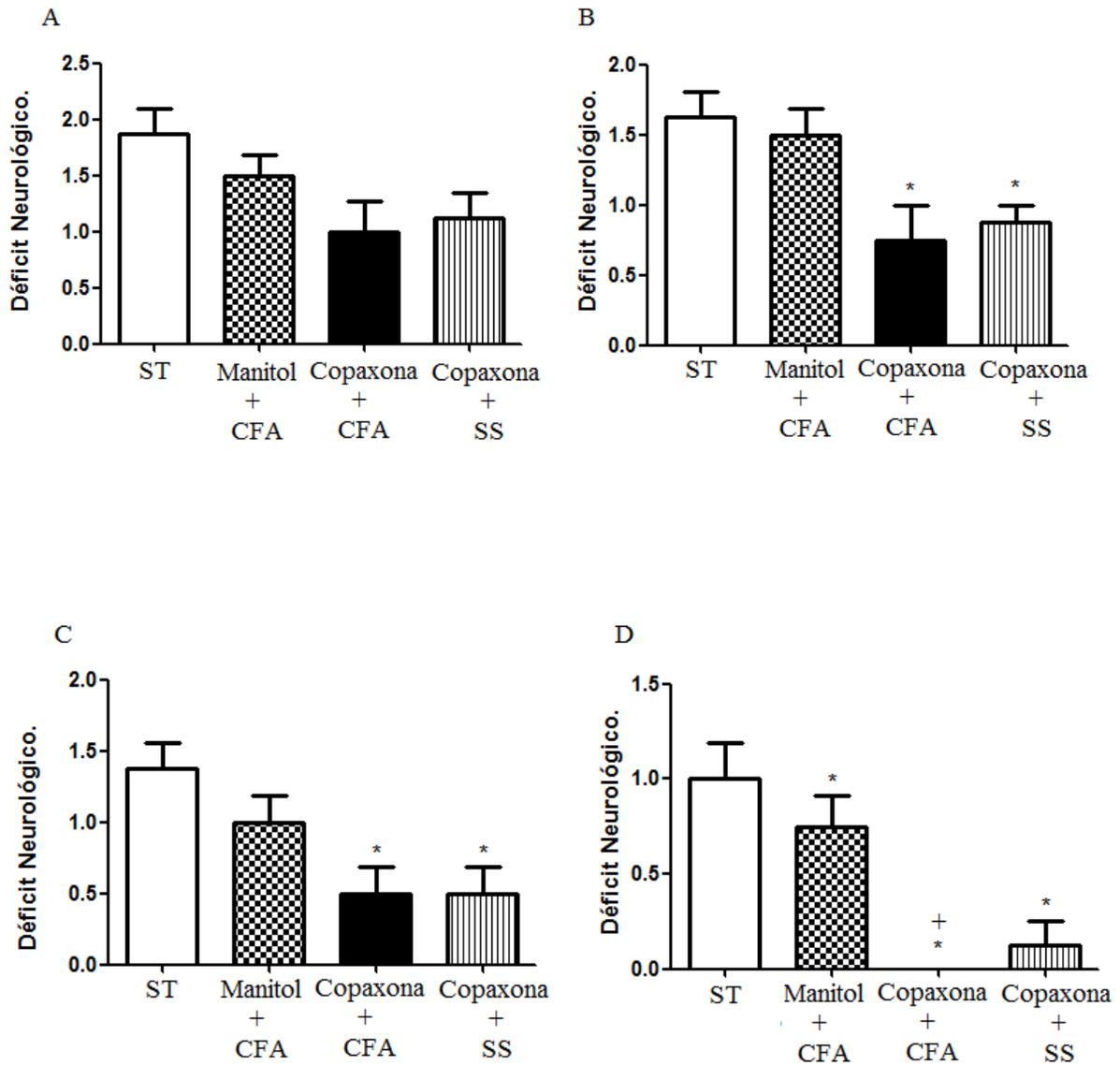


Figura 18. Déficit neurológico en la fase crónica. A) 14 días post-isquemia; B) 28 días post-isquemia; C) 42 días post-isquemia; D) 60 días post-isquemia. n=8. Media \pm EE. * $p < 0.05$ vs ST, + $p < 0.05$ vs Manitol+CFA. Kruskal Wallis seguida de Dunss. ST, sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina.

Al comparar la recuperación neurológica de los cuatro grupos experimentales de fase crónica; es evidente que existe una recuperación más rápida en las ratas a las que se les administró Copaxona, ya sea con CFA o con SS, alcanzando incluso una recuperación motora del 100%, los otros grupos también mostraron recuperaron neurológica pero más lenta (Figura 19). (Los datos de comparaciones estadísticas se mostraron en las gráficas anteriores).

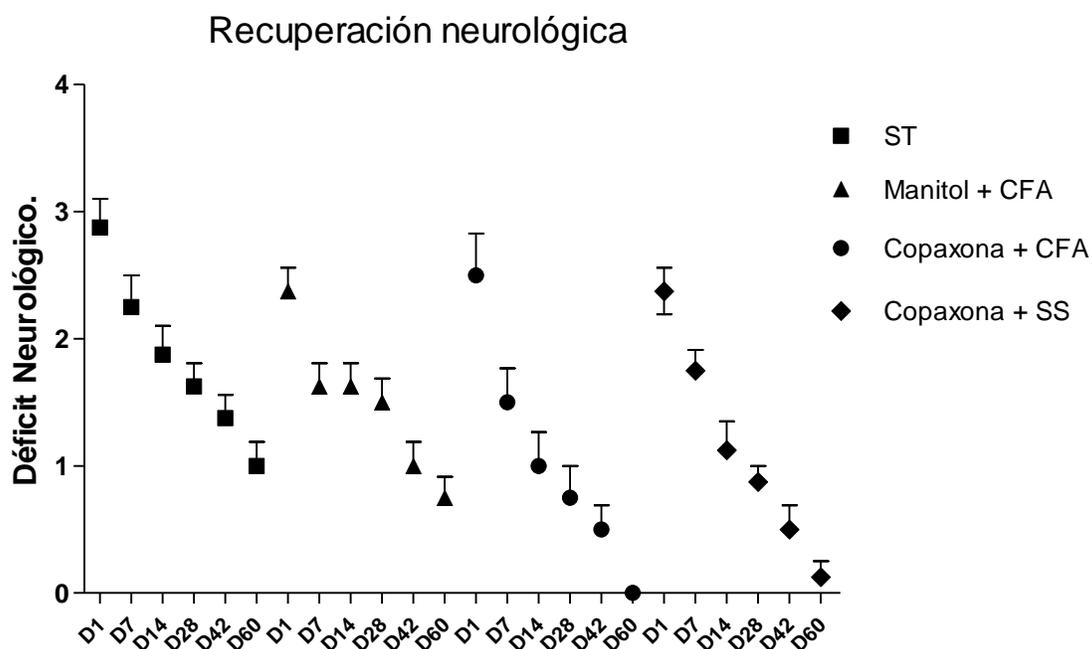


Figura 19. Comparación neurológica entre los cuatro grupos experimentales desde el día 1 hasta el día 60 post-isquemia. ST, sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina. Se utilizó la escala de Zea Longa en donde el valor de 0, no observa déficit neurológico; 1, flexión del miembro podálico anterior contralateral a la lesión; 2, vueltas continuas unidireccionales; 3, caída hacia el lado contra-lateral; 4, Disminución ó ausencia del estado de conciencia y 5, muerte.

7.2 NEUROGÉNESIS EN LA ZONA SUBVENTRICULAR

Una vez concluidas las evaluaciones motoras y con el fin de evaluar el efecto de la inmunización con Copaxona sobre la neurogénesis, a los animales se les aplicaron dos inyecciones de BrdU, 2 h y 24 h antes del sacrificio. Posteriormente se perfundieron y se les extrajo el cerebro por la técnica descrita en materiales y métodos. Durante la extracción de los cerebros se notó claramente la zona que sufrió el infarto (Figura 20), mostrando una diferencia notable en el tamaño y la severidad de la lesión en ratas a los 7 días post-isquemia y ratas a los 60 días post-isquemia.

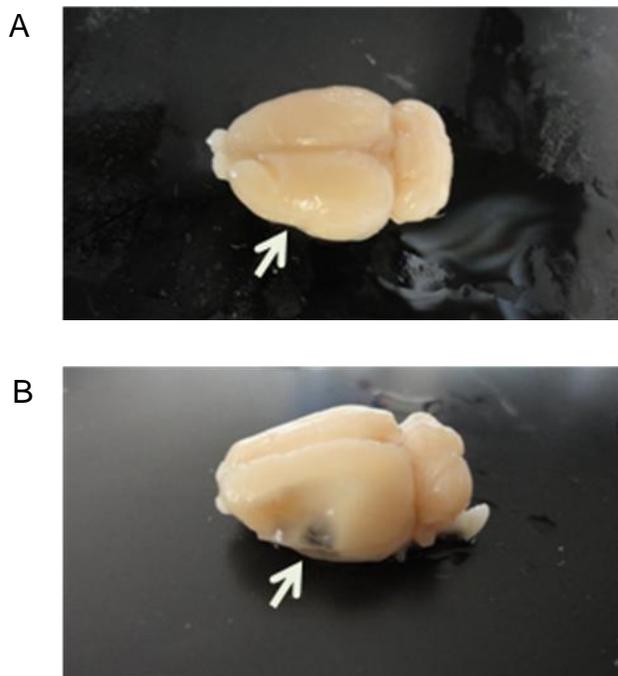


Figura 20. Lesiones cerebrales post-isquemia. A) Lesión observada a las 7 días post-isquemia, B) Lesión sufrida a las 60 días post-isquemia.

A los cerebros se les realizaron cortes coronales de 40 μm para realizar la inmunodetección de células positivas para BrdU, DCX y BrdU/DCX. Se cuantificaron las células para cada uno de ellos tanto en la zona ipsilateral a la lesión como en la zona contralateral.

Para células BrdU⁺ en la zona ipsilateral de la ZSV, se encontraron los siguientes valores: en el grupo ST se contaron 455.125 \pm 77.36 (media \pm EE) células positivas, para Manitol+CFA se obtuvieron 625.62 \pm 68.33, Copaxona+CFA 774.8 \pm 48.23 y para Copaxona+SS se cuantificaron 747.37 \pm 75.50. Los grupos tratados con Copaxona mostraron un incremento significativo de células BrdU⁺ con una $p=0.009$ en la prueba de Kruskal Wallis, se obtuvo un valor de -13.50 al comparar los grupos ST & Copaxona+CFA y -13.13 entre el grupo ST & Copaxona+SS en la prueba de Dunn's (Figura 21 M).

En cuanto al conteo de DCX⁺, se obtuvieron diferencias significativas entre los mismos grupos con una $p=0.0009$, exhibiendo el grupo ST un número total de 183.3 \pm 23.9, Manitol+CFA de 363.3 \pm 44.56, Copaxona+CFA 492.5 \pm 61.37 y el grupo Copaxona+SS 498.5 \pm 66.23. La prueba post hoc de Dunn's arrojó los siguientes valores. ST & Copaxona+CFA -15.50 y ST & Copaxona+SS -16.88 (Figura 21 N).

Al cuantificar el número de células con doble marcaje (BrdU⁺/DCX⁺) se encontró un incremento significativo en la proliferación de neuronas de nueva formación en el grupo tratado con Copaxona+CFA (288.9 \pm 35.32) con respecto al grupo ST (167.9 \pm 17.19); $p=0.0342$ Kruskal Wallis seguida por Dunn's -12.81; mientras que en

el grupo tratado con Manitol+CFA (224.8 ± 32.8) y Copaxona+SS (260.4 ± 28.68) no muestran incremento estadísticamente significativo (Figura 21 O).

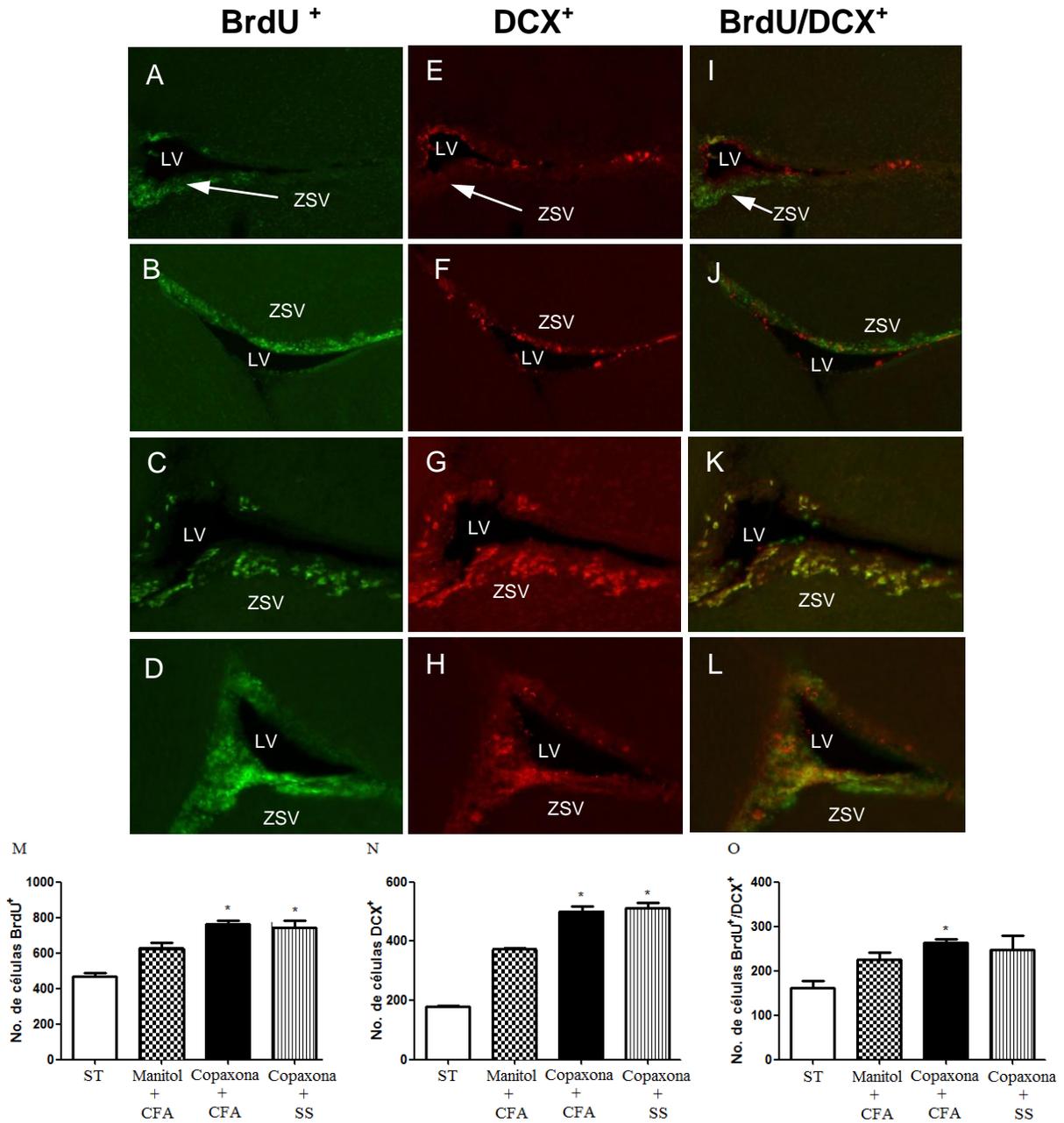


Figura 21. Zona subventricular ipsilateral a la lesión en la fase aguda. A-D) Microfotografías de células BrdU⁺; E-H) Microfotografías de células DCX⁺; I-L) Doble marcaje BrdU⁺/DCX⁺; M) Cuantificación de células BrdU⁺; N) Cuantificación de células DCX⁺; O) Cuantificación de células BrdU⁺/DCX⁺. n=8. Media ± EE. * $p < 0.05$ vs ST; M y N, Kruskal Wallis seguida de Dunns. ST, sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina; LV, luz del ventrículo; ZSV, zona subventricular. Las microfotografías tienen un aumento de 10X.

En la ZSV contralateral a la lesión no se observaron diferencias significativas para ninguno de los diferentes marcajes (Figura 21).

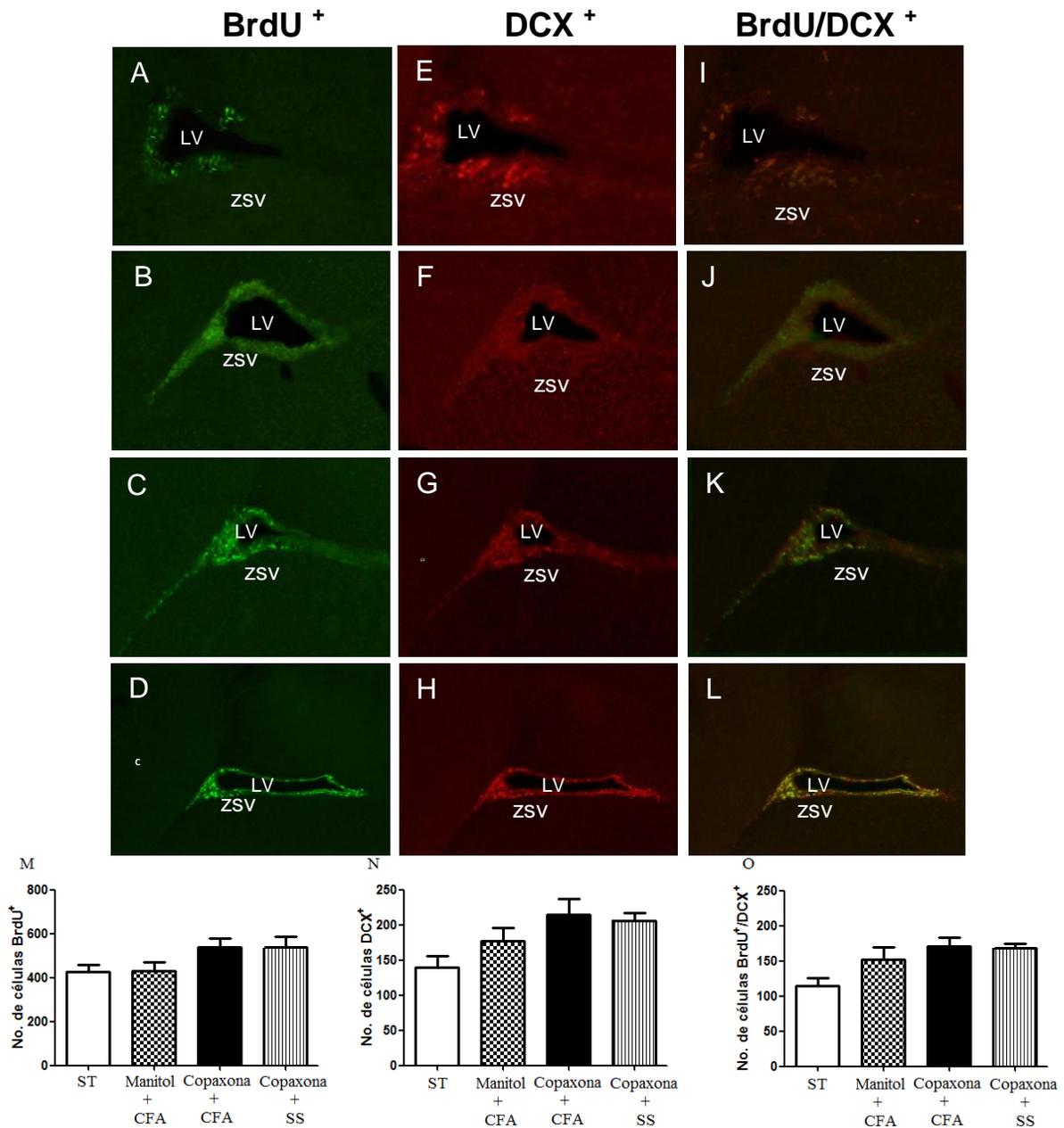


Figura 22. Zona subventricular contralateral a la lesión en la fase aguda. A-D) Microfotografías de células BrdU⁺; E-H) Microfotografías de células DCX⁺; I-L) Doble marcaje BrdU⁺/DCX⁺; M) Cuantificación de células BrdU⁺; N) Cuantificación de células DCX⁺; O) Cuantificación de células BrdU⁺/DCX⁺. n=8. Media ± EE. *p<0.05 vs ST. Kruskal. ST, sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina; LV, luz del ventrículo; ZSV, zona subventricular. Las microfotografías tienen un aumento de 10X.

Sesenta días post-isquemia, en el lado ipsilateral a la lesión, se mostraron los siguientes valores para el conteo de células BrdU⁺: el grupo ST presentó 328.8±48.06, Manitol+CFA 429.5±50.75, Copaxona+CFA 552.8±53.93 y el grupo Copaxona+SS 549.8±55.06. Nuevamente los grupos tratados con Copaxona mostraron un incremento significativo de células positivas para este marcaje ($p=0.0048$, Kruskal Wallis y, -14.88 al comparar al grupo ST & Copaxona+SS y -13.25 para ST & Copaxona+CFA en Dunn's; Figura 22 M).

En el conteo de células DCX⁺ se observaron los siguientes valores: el grupo ST mostró la cantidad de 132.9±25.93 células positivas, el grupo Manitol+CFA alcanzó 258.4±37.65, Copaxona+CFA 317.3±34.46 y el grupo Copaxona+SS presentó 304.6±39.66; se mostró un incremento significativo en el grupo Copaxona+CFA ($p=0.0227$; Kruskal Wallis, -12.94 para ST & Copaxona+CFA en Dunn's, Figura 22N).

En el caso del doble marcaje BrdU⁺/DCX⁺, se obtuvo 125.4±24.82 para el grupo ST, 155.6±22.40 para Manitol+CFA, 250.4±28.72 para el grupo Copaxona+CFA y 234.8±44.57 para Copaxona+SS. Estos valores muestran un incremento significativo en la neurogénesis del grupo Copaxona+CFA ($p=0.0327$, Kruskal Wallis y -12.50 en la comparación ST & Copaxona+CFA en Dunn's; Figura 22 O).

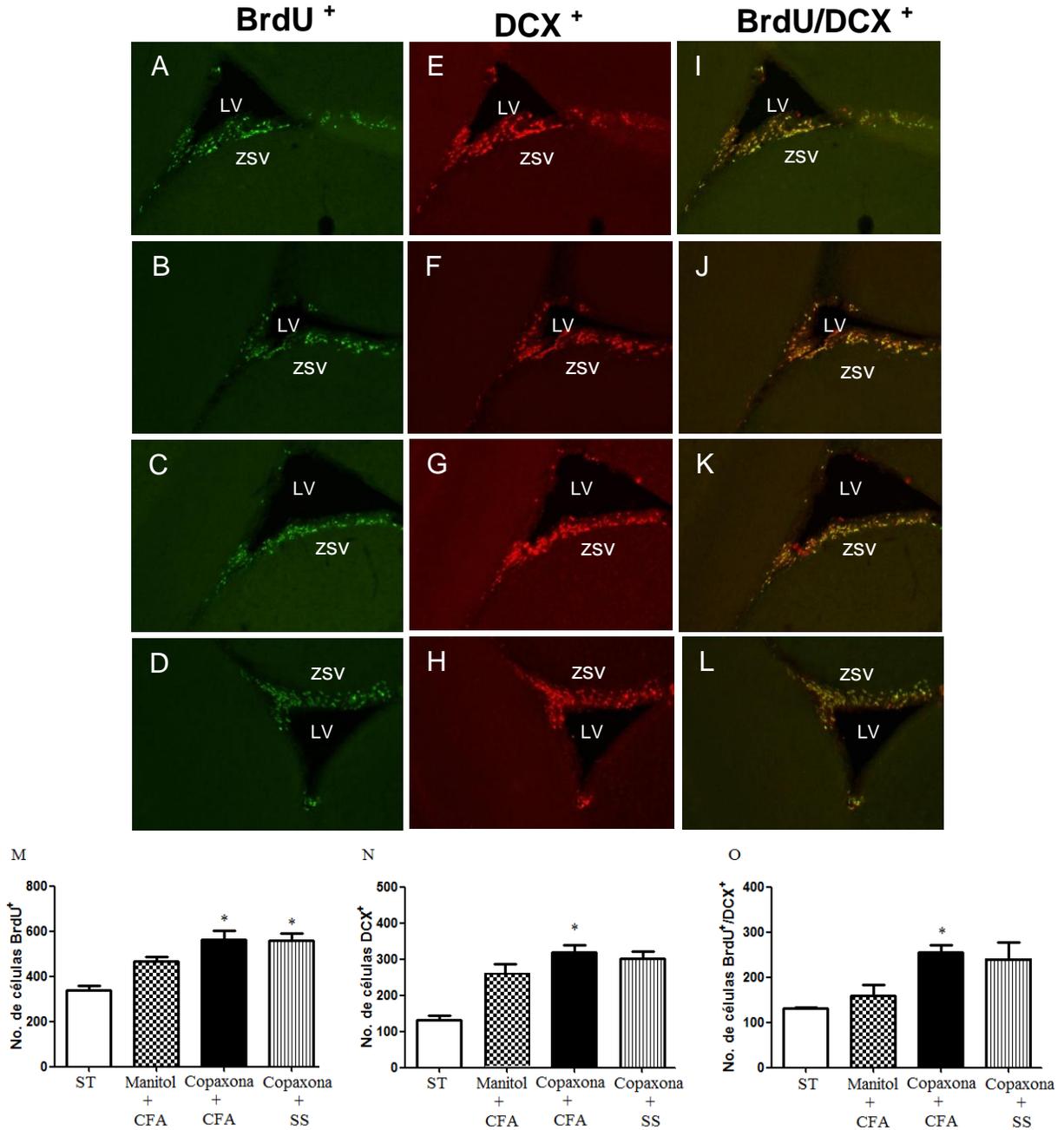


Figura 23. Zona subventricular ipsilateral a la lesión en la fase crónica. A-D) Microfotografías de células BrdU⁺; E-H) Microfotografías de células DCX⁺; I-L) Doble marcaje BrdU⁺/DCX⁺; M) Cuantificación de células BrdU⁺; N) Cuantificación de células DCX⁺; O) Cuantificación de células para BrdU⁺/DCX⁺. n=8. Media ± EE. **p*<0.05 vs ST. Kruskal Wallis seguida de Dunns. ST, sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina; VL, ventrículo lateral; ZSV, zona subventricular. Las microfotografías tienen un aumento de 10X.

En la zona contralateral a la lesión no se encontró ninguna diferencia significativa en ninguno de los marcajes realizados (Figura 23).

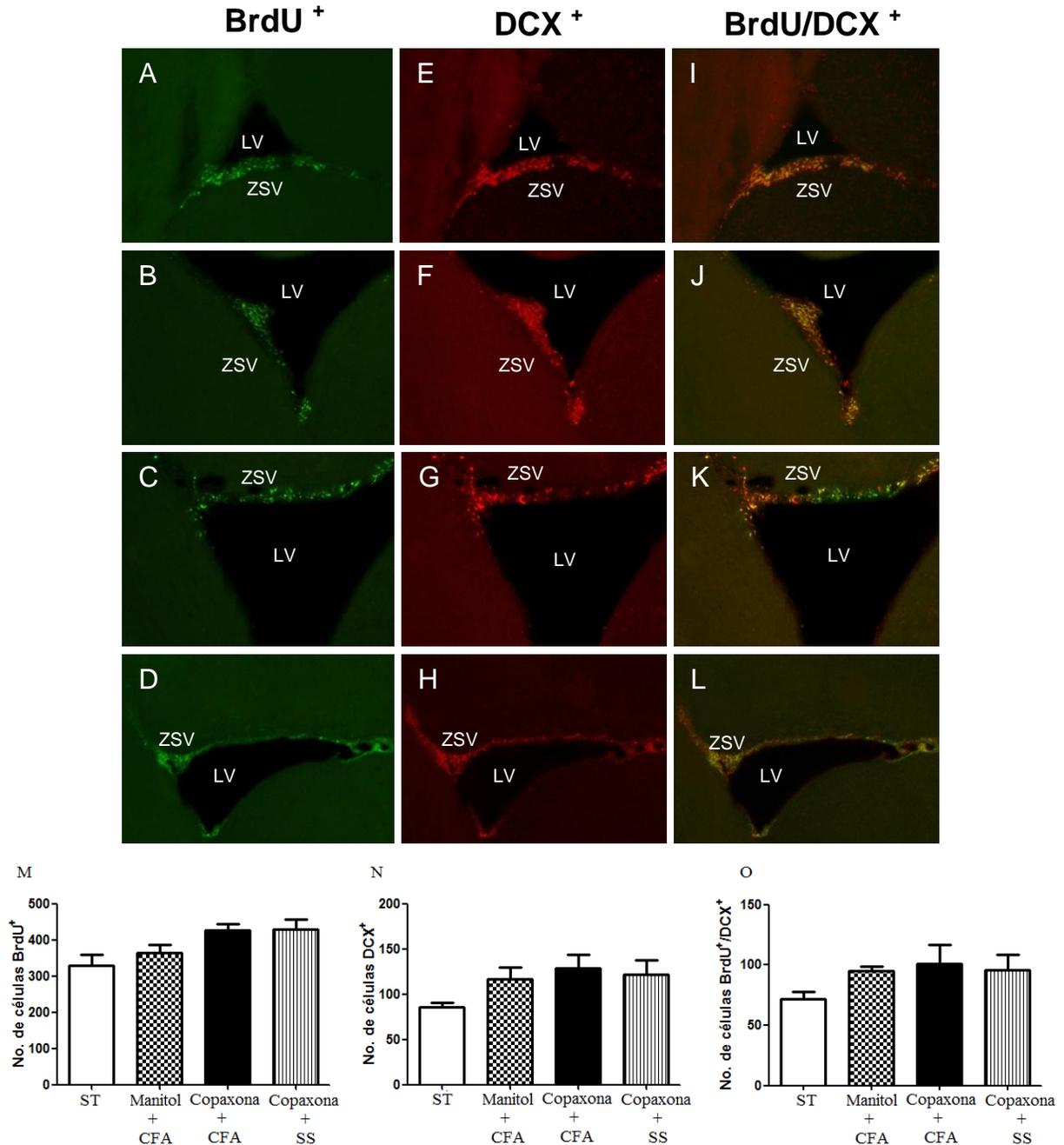


Figura 24. Zona subventricular contralateral a la lesión en la fase crónica. A-D) Microfotografías de células BrdU⁺; E-H) Microfotografías de células DCX⁺; I-L) Doble marcaje BrdU⁺/DCX⁺; M) Cuantificación de células BrdU⁺; N) Cuantificación de células DCX⁺; O) Cuantificación de células BrdU⁺/DCX⁺. n=8. Media ± EE. *p<0.05 vs ST. ST, sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina; VL, ventrículo lateral; ZSV, zona subventricular. Las microfotografías tienen un aumento de 10X.

Al comparar la cantidad de células doble marcadas (BrdU⁺/DCX⁺), es decir neuronas de nueva formación, entre la fase aguda y crónica después de la isquemia, se observó en general una disminución en la fase crónica misma que sólo fue significativa en el caso de los animales ST y aquellos tratados con Manitol. Para el grupo ST los valores de fase aguda fueron de 167.9±17.19 y en la fase crónica de 125.4±24.82 ($p=0.010$; Mann Whitney). En el grupo de Manitol+CFA en la fase aguda se cuantificaron 224.8±32.8 y en la crónica 155.6±22.40 ($p=0.024$; T de Student). Los grupos tratados con Copaxona no mostraron diferencias significativas (Figura 24).

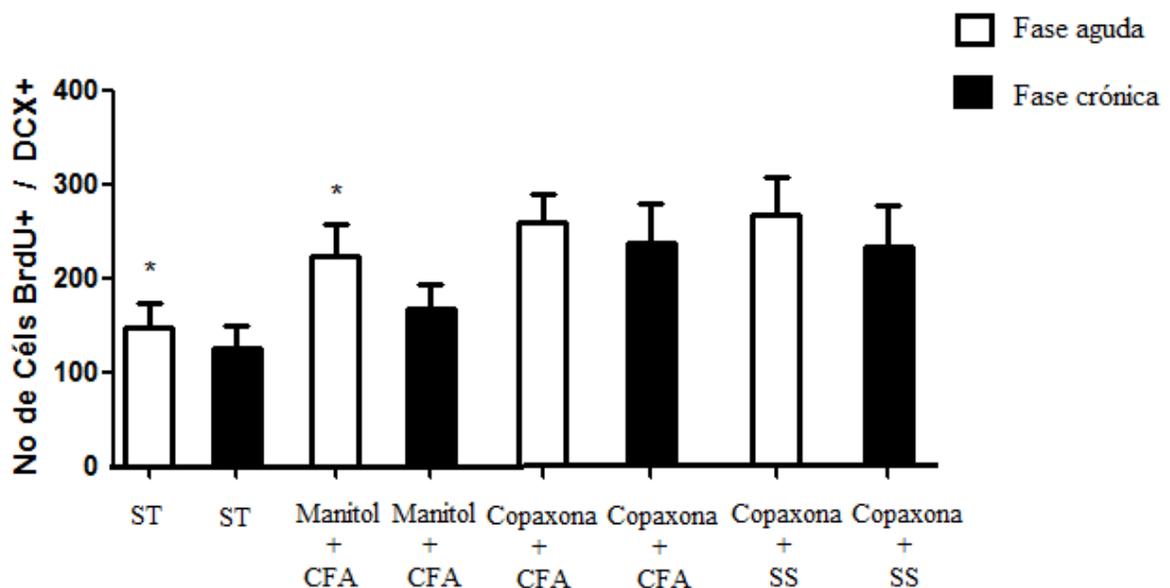


Figura 25. Comparación entre los mismos grupos en los experimentos fase aguda/fase crónica de la zona subventricular ipsilateral a la lesión. Cuantificación de células BrdU⁺/DCX⁺. n=8. Media ± EE. * $p<0.05$ Fase aguda vs Fase crónica. Kruskal Wallis seguida de Mann Whitney. ST, sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina.

7.3 NEUROGÉNESIS EN LA ZONA SUBGRANULAR

Además de la ZSV, también fue analizado el efecto de la inmunización con Copaxona sobre la neurogénesis en la ZSG del giro dentado hipocampal tanto en fase aguda como en fase crónica. En la fase aguda del lado ipsilateral a la lesión, las células BrdU⁺ se incrementaron en forma significativa en los grupos tratados con Copaxona en comparación con el grupo ST: éste obtuvo 43.13±3.6; Manitol+CFA 67.25±4.44; Copaxona+CFA 85.38±1.84 y Copaxona+SS 79.25±2.74 con una $p=0.001$, Kruskal Wallis y un valor de -21.13 en la comparación del grupo ST & Copaxona+CFA, -15.94 en ST & Copaxona+SS y -13.44 al comparar Manitol+CFA y Copaxona+CFA en las pruebas de Dunn's (Figura 26 M).

En el caso de las células DCX⁺ se notó un incremento estadísticamente significativo de las ratas tratadas con Copaxona+CFA (68.50±3.27) y Copaxona+SS (64.25±3.04) respecto a las ratas ST (30.63±1.9) $p=0.012$; Kruskal Wallis (Figura 26 N). La prueba estadística de Dunn's registró un valor de -20.44 al comparar al grupo ST & Copaxona+CFA, -18.31 en los grupos ST & Copaxona+SS y -13.69 al comparar al grupo Manitol+CFA y Copaxona+CFA.

Para el doble marcaje (BrdU⁺/DCX⁺) se contaron para el grupo ST 28.25±3.41 células positivas; Manitol+CFA 38.75±2.3; Copaxona+CFA 49.25±2.8 y Copaxona+SS 44.50±2.8. En este caso nuevamente, se observó un incremento significativo de la neurogénesis en los grupos tratados con copaxona ($p=0.018$; Kruskal Wallis y -17.31 para ST & Copaxona+CFA y -12.56 ST & Copaxona+SS; en Dunn's Figura 26 O).

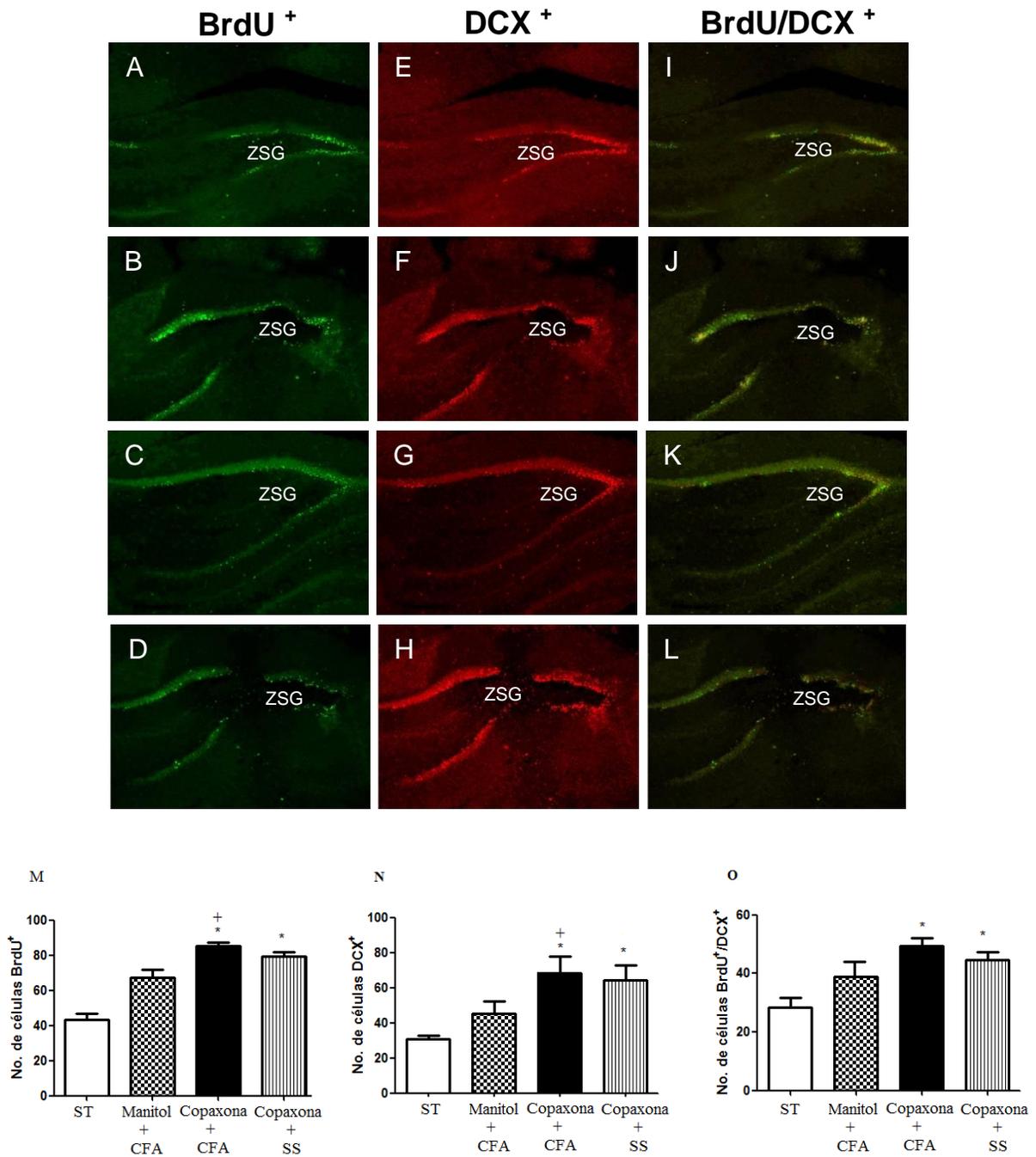


Figura 26. Zona subgranular ipsilateral a la lesión en la fase aguda. A-D) Microfotografías de células BrdU⁺; E-H) Microfotografías de células DCX⁺; I-L) Doble marcaje BrdU⁺/DCX⁺; M) Cuantificación de células BrdU⁺; N) Cuantificación de células DCX⁺; O) Cuantificación de células BrdU⁺/DCX⁺. n=8. Media ± EE. **p*<0.05 vs ST, +*p*<0.05 vs Manito+CFA. Kruskal Wallis seguida de Dunns. ST, sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina; ZSG, zona subgranular. Las microfotografías tienen un aumento de 10X.

En el conteo de las células BrdU⁺, DCX⁺ y BrdU⁺/DCX⁺ en la zona ZSG del área contralateral a la lesión no se observaron diferencias significativas (Figura 27).

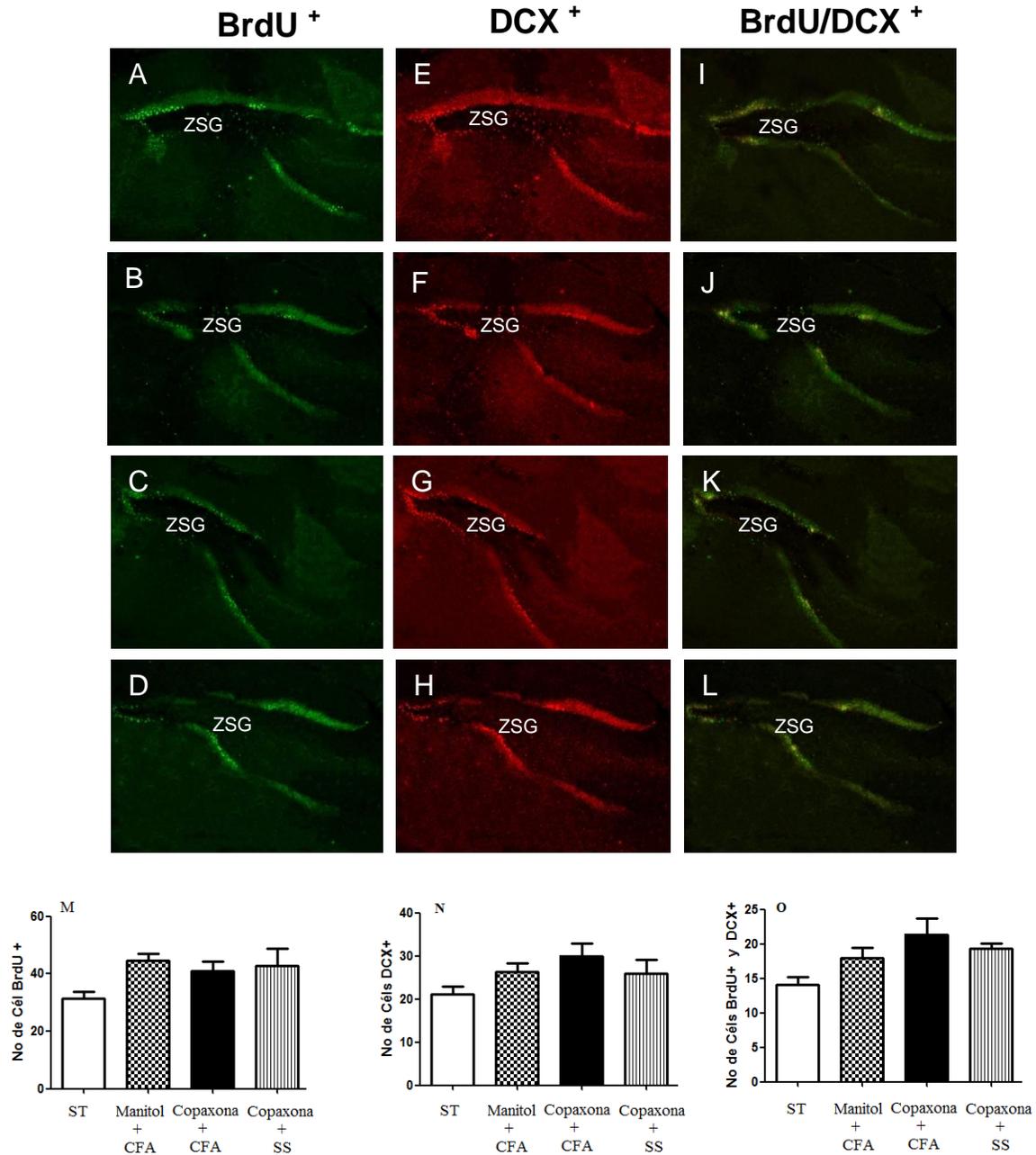


Figura 27. Zona subgranular contralateral a la lesión en la fase aguda. A-D) Microfotografías de células BrdU⁺; E-H) Microfotografías de células DCX⁺; I-L) Doble marcaje BrdU⁺/DCX⁺; M) Cuantificación de células BrdU⁺; N) Cuantificación de células DCX⁺; O) Cuantificación de células BrdU⁺/DCX⁺. n=8. Media ± EE. *p<0.05 vs ST, Kruskal Wallis. ST, sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina; ZSG, zona subgranular. Las microfotografías tienen un aumento de 10X.

A los dos meses post-isquemia, los valores obtenidos para las células BrdU⁺ fueron: ST 31.25±3.6; Manitol+CFA 43.25±1.74; Copaxona+CFA 52.13±3.83 y Copaxona+SS 49.50±3.11. Se observó un incremento significativo en los grupos tratados con Copaxona en comparación con el grupo ST ($p=0.004$, ANOVA; $q=6.54$ para el grupo ST & Copaxona+CFA y $q=5.7$ para ST & Copaxona+SS en Tukey Kramer; Figura 28M).

El marcaje para células DCX⁺ mostró para el grupo ST la cantidad de 20.25±1.8 células; para Manitol+CFA 34.88±4.11; para Copaxona+CFA 40.63±2.3 y Copaxona+SS 38.25±3.99. Notándose un incremento significativo de estas células en los grupos tratados con el péptido ($p=0.019$, ANOVA; $q=4.39$ para ST & Copaxona+CFA y $q=3.82$ en Tukey Kramer; Figura 28N).

Para el doble marcaje (BrdU⁺/DCX⁺) se observó 17.25±2.03 para el grupo ST; Manitol+CFA 32.50±3.6; Copaxona+CFA 43.15±7.5 y Copaxona+SS 38.63±4.7. Los últimos 3 grupos mostraron una mayor cantidad de neuronas en comparación con el grupo ST ($p=0.12$ ANOVA; para ST & Manitol $q=4.34$, ST & Copaxona+CFA $q=7.65$ y ST & Copaxona+SS $q=6.14$ en Tukey Kramer; Figura 28 O).

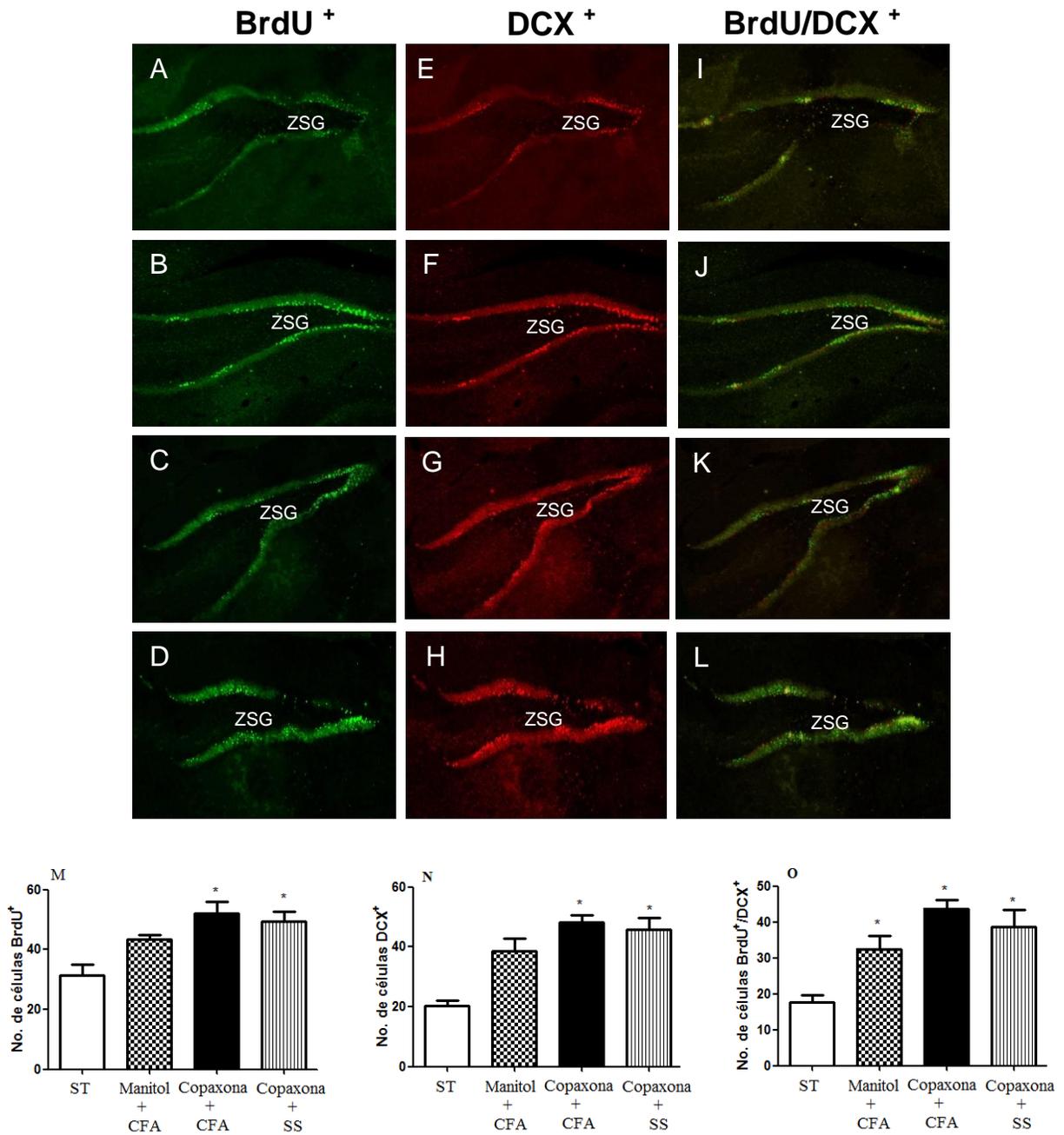


Figura 28. Zona subgranular ipsilateral a la lesión en la fase crónica. A-D) Microfotografías de células BrdU⁺; E-H) Microfotografías de células DCX⁺; I-L) Doble marcaje BrdU⁺/DCX⁺; M) Cuantificación de células BrdU⁺; N) Cuantificación de células DCX⁺; O) Cuantificación de células BrdU⁺/DCX⁺. n=8. Media ± EE. *p<0.05 vs ST, ANOVA de una vía seguida de Tukey Kramer. ST, sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina; ZSG, zona subgranular. Las microfotografías tienen un aumento de 10X.

A diferencia de la zona ipsilateral, en la zona contralateral no se observaron diferencias significativas en ninguno de los marcajes realizados (Figura 29).

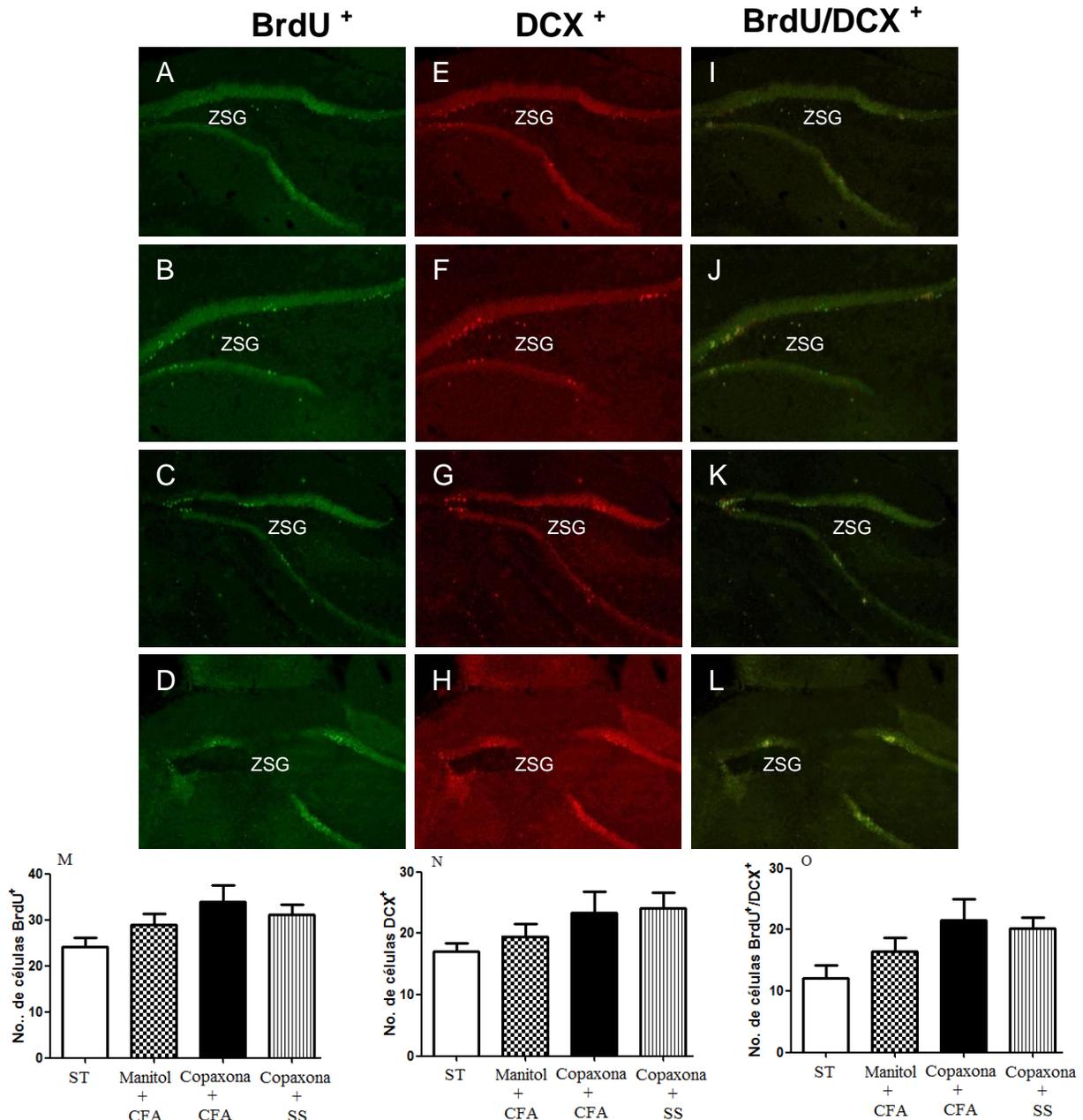


Figura 29. Zona subgranular contralateral a la lesión en la fase crónica. A-D) Microfotografías de células BrdU⁺; E-H) Microfotografías de células DCX⁺; I-L) Doble marcaje BrdU⁺/DCX⁺; M) Cuantificación de células BrdU⁺; N) Cuantificación de células DCX⁺; O) Cuantificación de células BrdU⁺/DCX⁺. n=8. Media ± EE. Kruskal Wallis. ST, sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina; ZSG, zona subgranular. Las microfotografías tienen un aumento de 10X.

Al comparar la cantidad de células positivas para BrdU⁺/DCX⁺ durante la fase aguda y la crónica en la zona ipsilateral a la lesión, se observó una disminución significativa en la neurogénesis en todos los grupos. En el grupo ST: fase aguda 28.25±3.41; fase crónica 17.75±2.03 ($p=0.015$, Mann Whitney). El grupo Manitol+CFA: fase aguda 38.75±2.3; fase crónica 32.50±3.6 ($p=0.05$; T de Student). En el grupo inmunizado con Copaxona+CFA: fase aguda 49.25±2.8; fase crónica 43.75±7.5 ($p=0.049$; T de Student). Finalmente para el grupo tratado con Copaxona+SS: fase aguda 44.50±2.8; fase crónica 38.63±4.7 ($p=0.027$; T de Student, Figura 30).

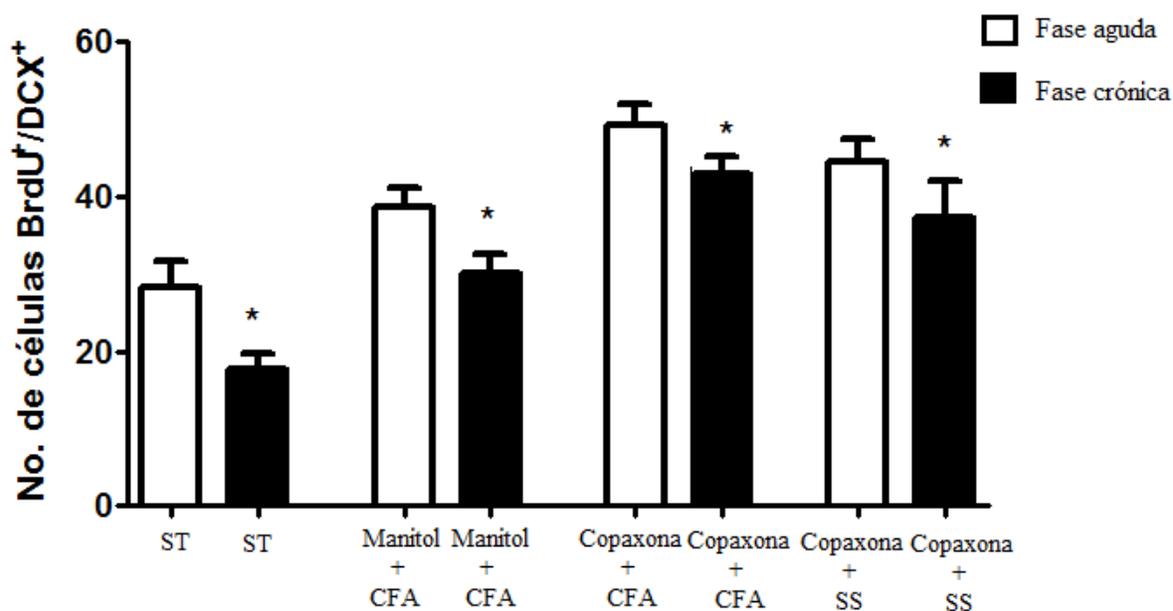


Figura 30. Comparación entre los mismos grupos de los experimentos fase aguda/fase crónica de la zona subgranular ipsilateral a la lesión. Cuantificación de células BrdU⁺/DCX⁺. n=8. Media ± EE. * $p < 0.05$ vs Fase aguda. ST, Mann Whitney, el resto T de Student. ST, sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina.

7.4 NEUROGÉNESIS EN LA CORTEZA CEREBRAL

En la corteza cerebral también logramos observar células BrdU⁺ en la periferia del área infartada, al comparar los grupos en el experimento de fase aguda se observó lo siguiente: para el grupo ST se obtuvo un promedio de 40.63±5.26 células positivas; para el grupo Manitol+CFA 64.75±5.93; Copaxona+CFA 72.50±2.96 y para Copaxona+ SS 70.13±6.7. El número de células en los grupos con Copaxona fue significativamente mayor al compararlos con el grupo ST ($p=0.0009$ ANOVA, obteniendo valores de $q=4.46$ para el grupo Manitol+CFA, $q=5.90$ para el grupo Copaxona+CFA y $q=5.46$ para el grupo Copaxona+SS en la prueba de Tukey Kramer; Figura 31 M).

En el caso del conteo de células DCX⁺ no se observaron diferencias significativas entre los 4 grupos analizados (Figura 31 N).

Para el doble marcaje BrdU⁺/DCX⁺ se obtuvieron los siguientes resultados: ST 15.25±3.02; Manitol+CFA 27.50±4.7; Copaxona+CFA 35.25±4.88 y Copaxona+SS 29.75±6.3. La diferencia fue significativa sólo para el grupo tratado con Copaxona+CFA contra el grupo ST ($p=0.41$ ANOVA, con una $q=4.19$ Tukey Kramer; Figura 31 O).

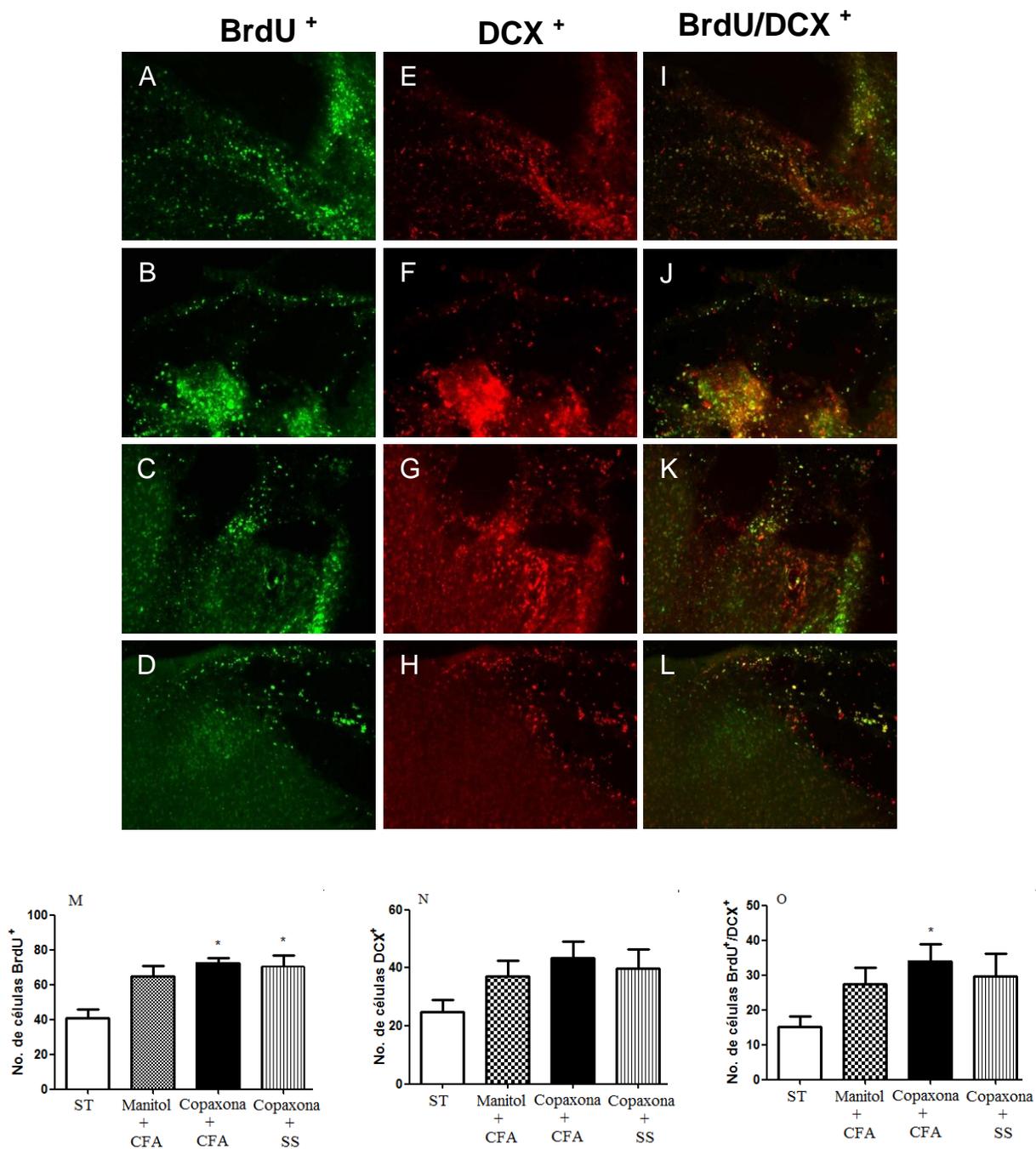


Figura 31. Corteza cerebral ipsilateral a la lesión en la fase aguda. A-D) Microfotografías de células BrdU⁺; E-H) Microfotografías de células DCX⁺; I-L) Doble marcaje BrdU⁺/DCX⁺; M) Cuantificación de células BrdU⁺; N) Cuantificación de células DCX⁺; O) Cuantificación de células BrdU⁺/DCX⁺. n=8. Media ± EE. *p<0.05 vs ST. ANOVA de una vía seguida de Tukey Kramer. ST, sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina. Las microfotografías tienen un aumento de 10X.

En el conteo del lado contralateral a la lesión en el experimento de fase aguda, no encontramos diferencias entre ningún grupo, de hecho la cantidad de células con marcaje positivo para los diferentes tipos celulares fue muy pobre (Figura 32).

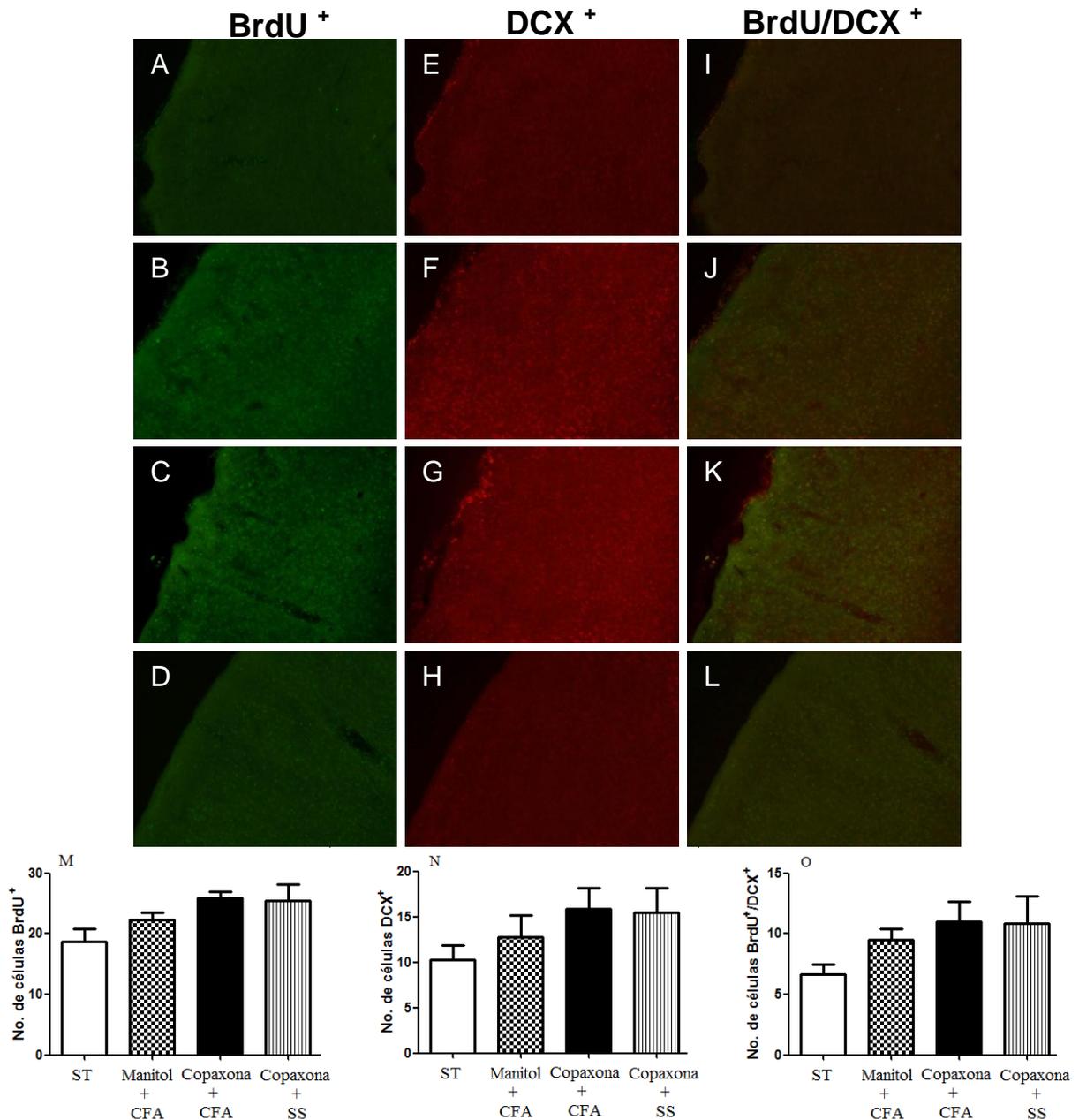


Figura 32. Corteza cerebral contralateral a la lesión en la fase aguda. A-D) Microfotografías de células BrdU⁺; E-H) Microfotografías de células DCX⁺; I-L) Doble marcaje BrdU⁺/DCX⁺; M) Cuantificación de células BrdU⁺; N) Cuantificación de células DCX⁺; O) Cuantificación de células BrdU⁺/DCX⁺. n=8. Media ± EE. Kruskal Wallis. ST,

sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina. Las microfotografías tienen un aumento de 10X.

En el caso del experimento de fase crónica en el área ipsilateral a la lesión, se obtuvieron los siguientes resultados para el marcaje Brdu+: ST 28.50 ± 2.80 ; Manitol+CFA 43.88 ± 2.17 ; Copaxona+CFA 56.13 ± 2.53 y Copaxona+SS 55.88 ± 1.2 . Se observó un incremento significativo en la proliferación celular en los grupos tratados con Copaxona ($p=0.001$, Kruskal Wallis; en la prueba de comparaciones múltiples de Dunn's se obtuvo -18.69 para la comparación entre el grupo ST & Copaxona+CFA y -18.75 para ST & Copaxona+SS; Figura 33 M).

Para las células DCX⁺ se obtuvo: ST 25.0 ± 3.57 ; Manitol+CFA 38.63 ± 2.04 ; Copaxona+CFA 47.63 ± 2.74 y Copaxona+SS 48.25 ± 3.69 . Los últimos 3 grupos mostraron un incremento significativo de este marcador con respecto al grupo ST ($p=0.001$, ANOVA y con los siguientes valores de $q= -4.41, 7.33$ y 7.53 Tukey Kramer; Figura 33 N).

Para el doble marcaje (BrdU⁺ y DCX⁺), se obtuvieron los siguientes valores: ST 7.87 ± 0.39 ; Manitol+CFA 23.0 ± 3.45 ; Copaxona+CFA 26.75 ± 3.7 y Copaxona+SS 27.75 ± 2.6 . El número total de neuronas de nueva formación fue significativamente mayor en los últimos 3 grupos con respecto al grupo ST ($p=0.001$, ANOVA y con Tukey Kramer se obtuvieron $q= 5.27, 6.57$ y 6.92 respectivamente; Figura 33 O).

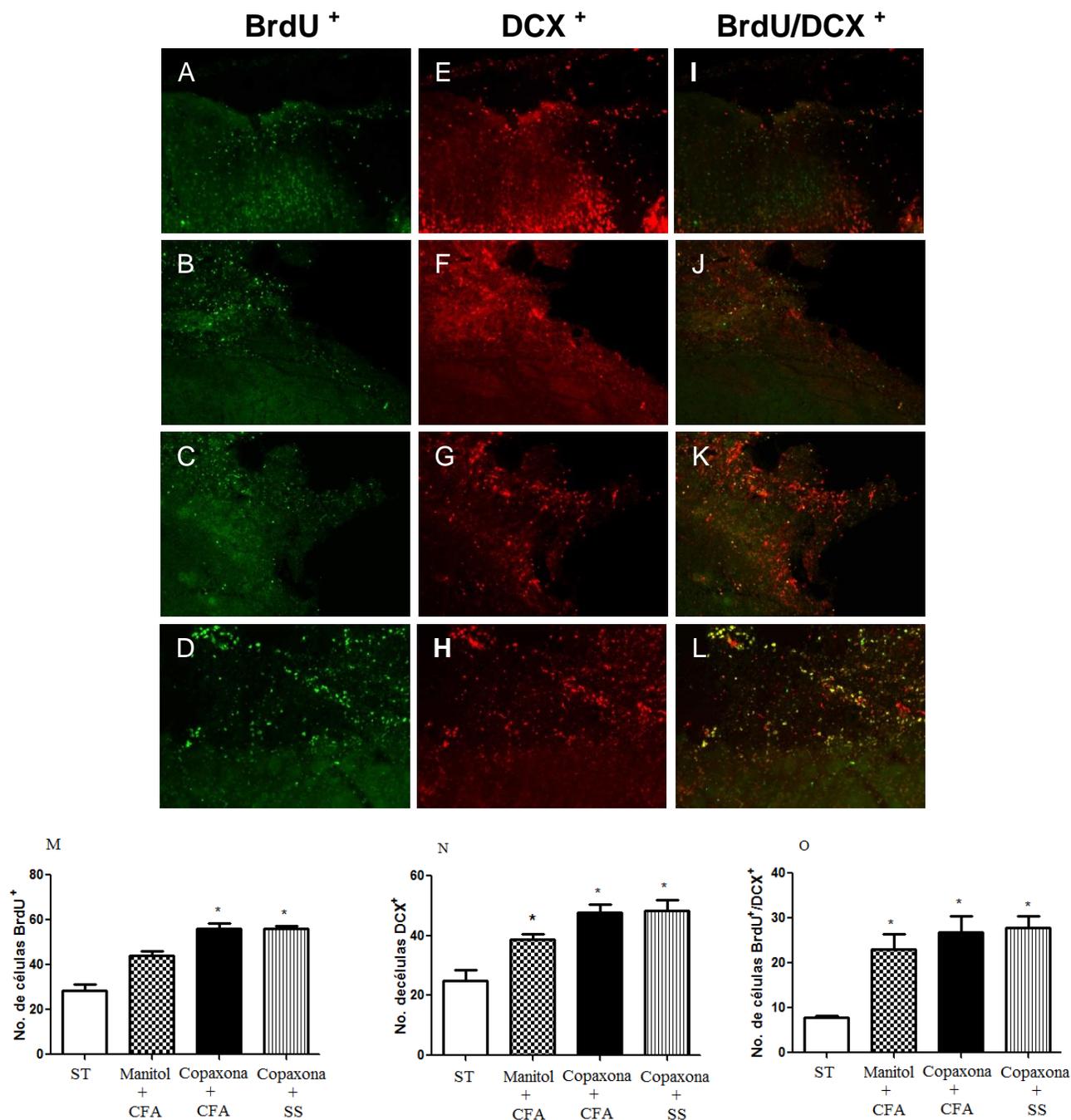


Figura 33. Corteza cerebral ipsilateral a la lesión en la fase crónica. A-D) Microfotografías de células BrdU⁺; E-H) Microfotografías de células DCX⁺; I-L) Doble marcaje BrdU⁺/DCX⁺; M) Cuantificación de células BrdU⁺; N) Cuantificación de células DCX⁺; O) Cuantificación de células BrdU⁺/DCX⁺. n=8. Media ± EE .M, Kruskal Wallis seguida de Dunn's; N y O, Anova de 1 vía seguida de Tukey Kramer. ST, sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina. Las microfotografías tienen un aumento de 10X.

En la zona contralateral a los 60 días no se muestra ninguna diferencia entre los grupos, pero sí una disminución en el conteo de células positivas para todos los marcajes (Figura 33).

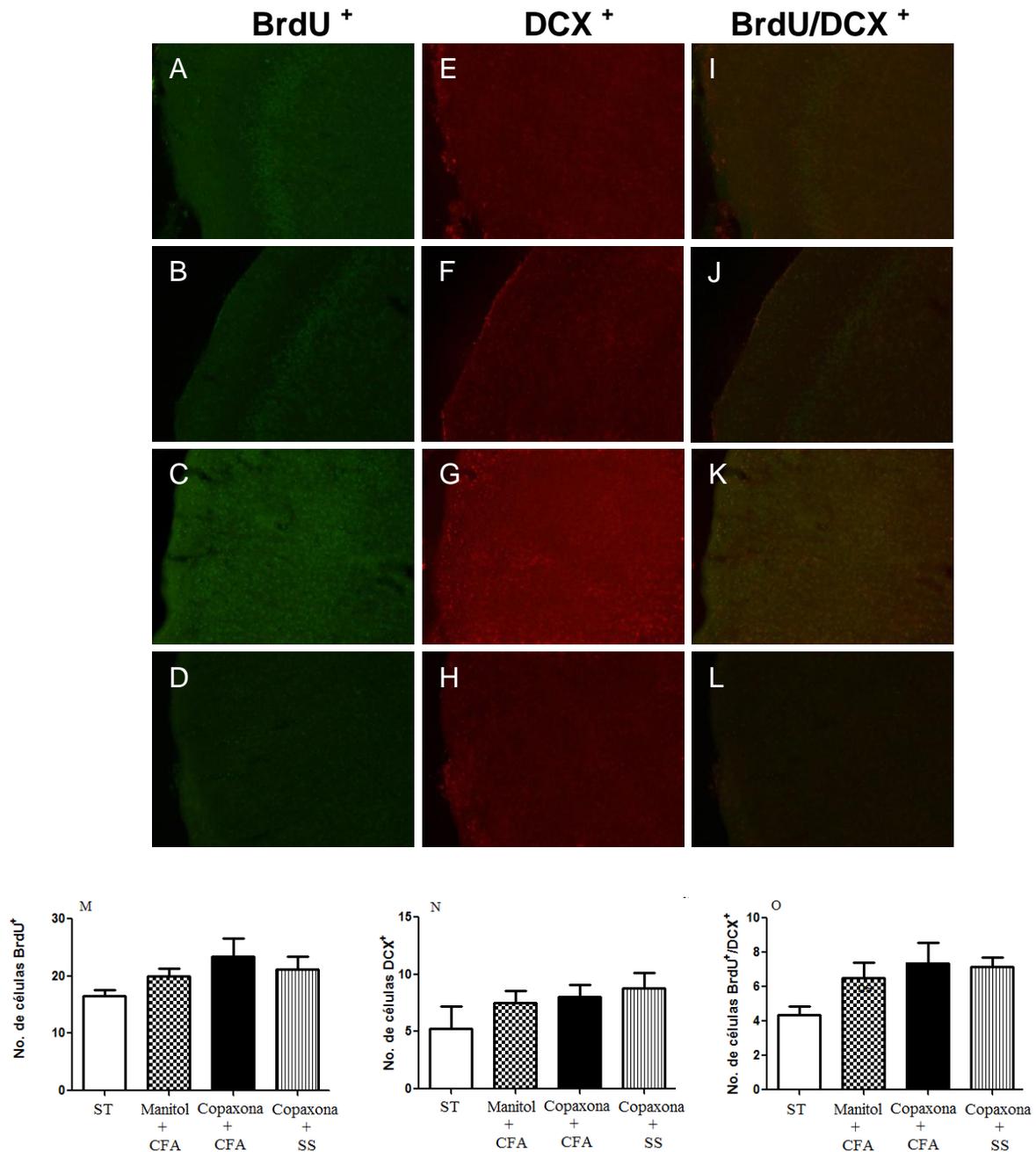


Figura 34. Corteza cerebral contralateral a la lesión en la fase crónica. A-D) Microfotografías de células BrdU⁺; E-H) Microfotografías de células DCX⁺; I-L) Doble marcaje BrdU⁺/DCX⁺; M) Cuantificación de células BrdU⁺; N) Cuantificación de células DCX⁺; O) Cuantificación de células BrdU⁺/DCX⁺. n=8. Media ± EE. Kruskal Wallis. ST, sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina. Las microfotografías tienen un aumento de 10X.

Al realizar la comparación del número promedio de células BrdU⁺/DCX⁺, entre la fase aguda y la crónica, observamos una disminución significativa solamente en el grupo ST con valores de 15.25±3.02 en fase aguda y de 7.87±0.39 en fase crónica ($p=0.0297$, T de Student. figura 35).

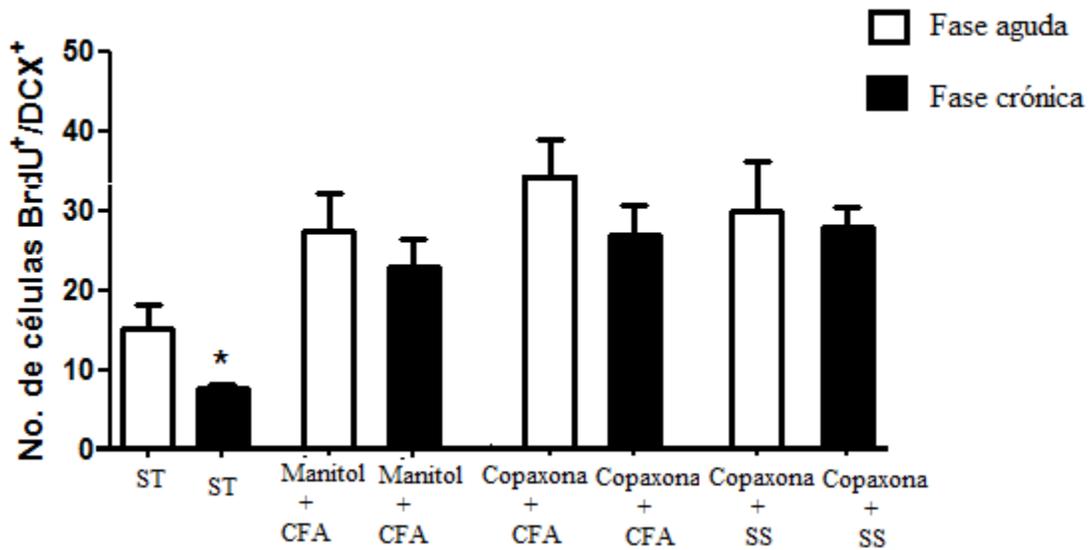


Figura 35. Comparación entre los mismos grupos de los experimentos fase aguda/fase crónica de la corteza cerebral ipsilateral a la lesión. Cuantificación de células BrdU⁺/DCX⁺. n=8. Media ± EE. * $p<0.05$ vs Fase aguda. ANOVA seguida de t de Students para pares de grupos. ST, sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina.

Con la intención de comprobar si algunas de las neuronas de nueva formación lograban alcanzar la madurez, se realizó un doble marcaje BrdU⁺/NeuN⁺ durante la fase crónica, para ello, a 4 ratas de cada grupo se les administraron dos dosis de BrdU, a los 28 días, como se indica en el diseño experimental. Los resultados muestran que el grupo tratado con Copaxona+CFA obtuvo una mayor cantidad de células positivas en comparación al resto de los grupos: ST 4.0±0.7; Manitol+CFA 8.25±1.7; Copaxona+CFA 14.25±1.9 y Copaxona+SS 12.75±1.8. La cantidad de neuronas maduras fue significativamente mayor en el grupo de Copaxona+CFA con respecto al grupo ST ($p=0.02$, Kruskal Wallis y -9.375 en la prueba post hoc de Dunn's); además observamos que estas células estaban ubicadas justo en la periferia del infarto (Figura 36).

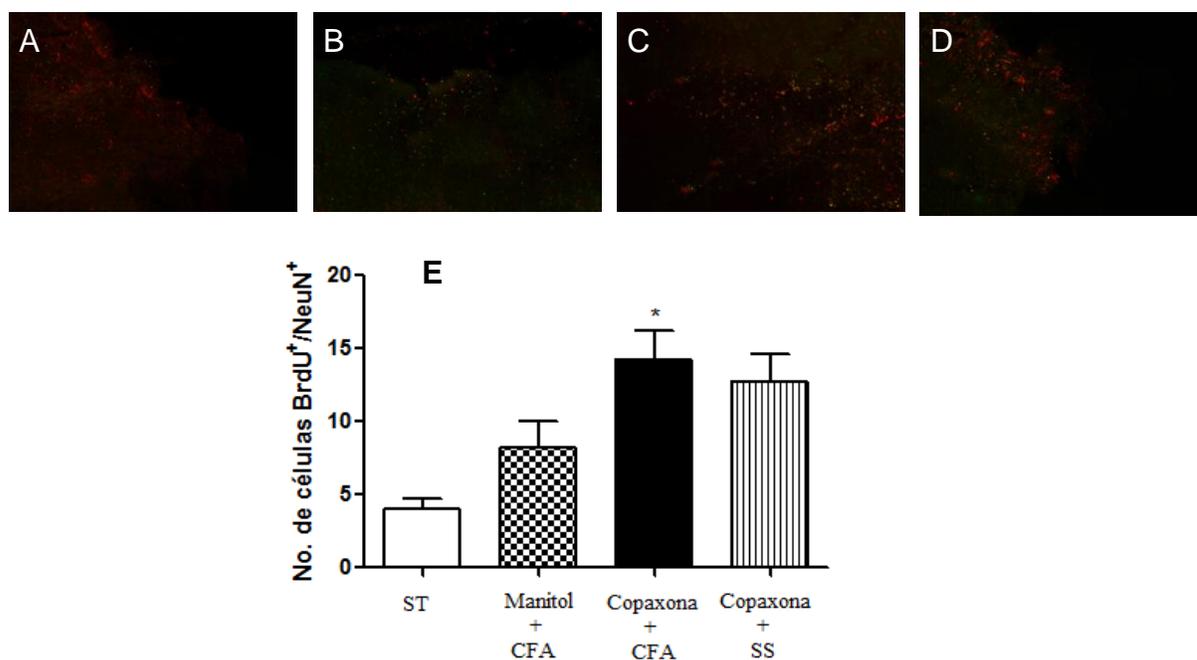


Figura 36. Corteza cerebral ipsilateral a la lesión en fase crónica. A-D) Microfotografías de células BrdU⁺/NeuN⁺ E) Cuantificación de células BrdU⁺/NeuN⁺. n=4. Media ± EE. Kruskal Wallis seguido de una Dunns. ST, sin tratamiento; CFA, coadyuvante completo de Freund; SS, solución salina. Las microfotografías, tienen un aumento de 10X y muestran zonas representativas de células positivas al doble marcaje.

8. DISCUSIÓN

La neurogénesis es un fenómeno de reparación espontáneo que se presenta después de cualquier daño cerebral, incluyendo la isquemia (Greenberg, 2007), desafortunadamente, la neurogénesis endógena es insuficiente para reparar el tejido dañado ya que aproximadamente el 80% de las neuronas nuevas mueren en las primeras dos semanas después de la isquemia cerebral (Thored y cols, 2006).

Los resultados de este trabajo, muestran que la copaxona induce una mayor neurogénesis en el modelo de isquemia cerebral con reperusión, principalmente en la ZSV, en menor grado en el DG hipocampal y en la corteza cerebral del lado ipsilateral a la lesión, además también observamos que induce la sobrevivencia de las mismas.

Durante la fase aguda, la inmunización con copaxona induce la proliferación celular tanto en la ZSV, GD y la corteza cerebral principalmente en el lado ipsilateral a la lesión. Esta proliferación fue observada no sólo a nivel neuronal sino también para otros tipos celulares ya que no todas las células BrdU+ fueron también DCX+. Esto sugiere que la copaxona no sólo induce la proliferación neuronal sino también la de otros tipos celulares que podrían ser astrocitos, oligodendrocitos o incluso CPNs. Para las dos últimas, se ha reportado recientemente que la copaxona tiene la capacidad de inducir su proliferación (Schwart y Shechter, 2010). Las CPNs, no sólo se han considerado fundamentales para el desarrollo de la neurogénesis, sino que también se ha demostrado su capacidad para promover procesos de neuroprotección

mediante el mantenimiento de sus características como células indiferenciadas y ejerciendo funciones inmunitarias (Pluchino y cols. 2005).

Probablemente el incremento de la proliferación principalmente neuronal se deba al efecto que la copaxona tiene sobre el sistema inmune y el microambiente celular, ya que de acuerdo a estudios previos, se sabe que los linfocitos T anti copaxona atraviesan la barrera hematoencefálica y llegan al sitio de lesión a partir del tercer día incrementándose hasta alcanzar un pico a los 7 días después de su aplicación (Aharoni y cols. 2000) y que pueden asentarse en diversas regiones del cerebro como en la corteza cerebral, el tálamo, el hipocampo, alrededor de los ventrículos y en las regiones perivasculares en cerebros de ratones sanos y sometidos a EAE (Aharoni y cols. 2003).

Estas células T anti copaxona secretan citocinas anti inflamatorias como la IL-4 y la IL-10; esta última inhibe la síntesis y liberación de citocinas pro-inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), IL-1 β e IL-6, las cuales se conoce que alteran de manera negativa a la neurogénesis (Cunha y cols. 2010); ya que al unirse TNF- α a sus receptores (TNF-R1 o TNF-R2) promueve la expresión del gen anti-neurogénico Hes1 vía STAT-3 evitando la diferenciación neuronal e induciendo a las CPNs a la diferenciación astrogial (Lan y cols 2012); la IL-6 por su parte a través de la misma vía también induce la diferenciación de las CPNs a astrocitos cuando se une a su receptor IL-6R (Islam y cols 2009).

También se ha demostrado que la IL-10 induce la proliferación pero no la diferenciación de CPNs en cultivos primarios (Kiyota y cols. 2012). Además las células anti copaxona inducen la liberación de diversos factores tróficos como el BDNF y NT-3 (Arnon y Aharoni 2004) los cuales participan directamente sobre la proliferación de las CPNs así como en la diferenciación y migración neuronal (Cunha y cols. 2010).

En nuestros resultados, se observó que existe una mayor respuesta neurogénica en las zonas ipsilaterales en comparación con las zonas contralaterales, esto puede deberse a los mecanismos focales de señalización que desencadena la misma fisiopatología, por ejemplo la presencia de COX-2 que es una enzima inducible producida por macrófagos y microglia activada, la cual promueve la proliferación de las CPNs a través de la prostaglandina E-2 (PGE-2) que activa al receptor de EGF, el cual provoca la señalización mitogénica de las CPNs (Pai y cols. 2002). Por otra parte, al interactuar la microglía con células T anti copaxona que fueron dirigidas al sitio de lesión o con IL-4 y cantidades pequeñas de INF- γ producidas por los linfocitos T, se induce un cambio en su fenotipo provocando la liberación de factores tróficos y de crecimiento que propician un ambiente enriquecido que puede facilitar la neurogénesis (Ibarra y García 2008)

Al comparar la cantidad de células BrdU⁺/DCX⁺ de la ZSV en la fase aguda y crónica, observamos que en los grupos inmunizados con copaxona no muestran diferencias significativas. Esto pudiera deberse a los mecanismos de memoria de la respuesta inmune adaptativa. Las clonas de memoria efectoras alojadas en la periferia

responden a la subsecuente estimulación antigénica (Abbas y cols. 2009), que pudiera ser el avance de la necrosis licuefactiva durante la fase crónica de la patología o a la reabsorción del tejido necrótico y apoptótico por los macrófagos próximos al infarto (Rodríguez, 2002). Ante esta posible respuesta de memoria de los linfocitos T anti-copaxona es posible que se siga manteniendo una respuesta anti-inflamatoria y la liberación de factores tróficos necesarios para que se desarrolle la neurogénesis.

En la ZSG, también se observan los efectos neurogénicos inducidos por copaxona como lo reportan Kipnis y su equipo (2004) en un modelo de esquizofrenia. Al igual que en la ZSV hay una mayor cantidad de células BrdU⁺/DCX⁺ en la zona ipsilateral y también una mayor cantidad de neuronas de nueva formación en la fase aguda.

Al comparar las zonas ipsilaterales de la ZSG en la fase crónica y en la aguda, se observa una disminución significativa de la neurogénesis en todos los grupos; esto nos puede indicar que en esta zona a diferencia de la ZSV ya no existen los estímulos necesarios para que se pueda continuar la neurogénesis. Lo cual pudiera deberse a que no existe el mismo nivel de daño causado por la isquemia en la zona que involucra al giro dentado en comparación con la zona más anterior del cerebro que involucra a la corteza cerebral y al caudo putamen (Lipton, 1999). Lo anterior podría provocar una menor migración de linfocitos T anti copaxona al sitio, con la consiguiente disminución de citocinas y factores neurotróficos que son los que estimulan directamente la neurogénesis.

En la corteza cerebral se observan células BrdU⁺ dispuestas en la periferia de la zona de penumbra isquémica como lo observó Shin y su equipo (2008), estos resultados refuerzan la teoría de que en condiciones patológicas las CPNs podrían ser capaces de producir neuronas nuevas en zonas no establecidas como nichos neurogénicos en el cerebro adulto (Arias-Carrión y Druker-Colín, 2007; Emsley y cols. 2005).

Del total de células BrdU⁺ en la corteza cerebral, aproximadamente la mitad son neuronas, el resto posiblemente pertenecen a otros tipos celulares. En la corteza cerebral de la zona contralateral se observan menos del 10% de células BrdU⁺/DCX⁺, lo que indica que la focalización del accidente isquémico es un factor muy importante para inducir este tipo de eventos. Al comparar la neurogénesis entre la fase aguda y la crónica se nota una reducción de la misma sin llegar a ser significativa. Como ya se mencionó anteriormente, posiblemente la respuesta inmune adaptativa pueda estar actuando a través de sus mecanismos de memoria.

Al observar que la copaxona induce un incremento en la neurogénesis, se decidió investigar si estas neuronas nuevas eran capaces de alcanzar la madurez, pues se sabe que el 80% de las neuronas nuevas no sobreviven (Thored y cols, 2006).

Para ello, se administró BrdU al día 28 post-isquemia y se sacrificó a los animales al día 60 para realizar un doble marcaje BrdU⁺/NeuN⁺ (marcador de neuronas maduras). La expresión de NeuN se presenta alrededor de la tercera semana de vida de las neuronas (Gleeson y Cols. 1999), dejando de expresar DCX, la cual es una

proteína asociada a los microtúbulos necesaria para el proceso de migración, mismo que se presenta durante esta fase.

Los resultados indican que a pesar de que el marcaje es poco, sí hubo neuronas que llegaron a la madurez y se establecieron en las áreas periféricas al infarto, principalmente en el grupo tratado con copaxona+CFA. Lo anterior sugiere que los efectos de la autorreactividad protectora inducidos o potenciados por la copaxona también intervienen sobre la migración y/o sobrevivencia de las neuronas de nueva formación como también lo reportó Aharoni (2005) en un modelo de EAE. Aunque no podríamos asegurar que las neuronas maduras que allí se encuentran se hayan originado en la corteza o sean neuronas que migraron de la ZSV a través del tallo rostral migratorio y se hayan establecido en la corteza justo en la periferia del infarto como lo observó Greenber y sus colaboradores en el 2003.

Como ya se mencionó anteriormente, uno de los efectos de la inmunización con copaxona es la producción de factores neurotróficos como el BDNF y NT-3. Los cuales ejercen sus efectos neurogénicos a través de dos tipos de receptores, los TRKs (del inglés tropomyosin related kinase) y p75^{NTR} (del inglés pan neurotrophin receptor), este último pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral y su ligando es el BDNF el cual se une a él con baja afinidad; al ser activado puede prender la vía JNK (del inglés c-Jun N-terminal kinases) que lleva a la apoptosis ó activar al factor de transcripción NF-kB que induce la sobrevivencia celular (Cunha y cols 2010).

La unión del BDNF a su receptor TrkB y el de NT-3 a TrkC pueden activar la vía PI3K/AKT, ERK o PLCY las cuales inducen ya sea la autorenovación de las CPNs, la diferenciación o supervivencia de neuronas nuevas a través de la activación del factor de transcripción CREB (Allen y Dawbarn 2006; Cunha y cols 2010).

Por otra parte, en este trabajo se observó que el grupo tratado con manitol+CFA, disminuye el déficit neurológico pero además incrementa la neurogénesis. El manitol es un agente osmótico y un neutralizador de radicales libres que además puede alterar la reología de los eritrocitos (Andrews y cols. 1993), es por ello que se utiliza ampliamente en la clínica como neuroprotector en varios tipos de patologías cerebrales como en hemorragia intracerebral no traumática e isquemia cerebral (Bereczki y cols. 2008). Disminuye en forma significativa el edema neural evitando con ello un mayor daño e incrementando una mayor recuperación neurológica.

Recientemente se ha reportado que el manitol mejora la eficacia terapéutica de células de sangre de cordón umbilical humano y facilita la entrada al cerebro de factores neurotróficos provenientes de la periferia en un modelo de hipoxia-isquémica en ratas neonatas (Yasuhara y cols. 2010). También se ha demostrado que permeabiliza la barrera hematoencefálica disminuyendo temporalmente el grosor de las células endoteliales dilatando los pequeños vasos sanguíneos. Este fenómeno también podría facilitar la entrada de una mayor cantidad de células T anti copaxona que, aunada al probable incremento de factores tróficos procedentes de la periferia podrían facilitar el incremento del fenómeno de neurogénesis.

Seyfried y sus colaboradores (2008) observaron que el manitol proporciona una mayor eficacia en la administración y migración de células estromales de médula ósea humana en ratas sometidas a hemorragia cerebral; además percibieron que posee una potencial actividad mitótica ya que en su grupo tratado sólo con manitol se incrementó la formación de nuevas células alrededor de la hemorragia intracerebral. Por todo lo anterior, consideramos que el manitol puede ayudar a los procesos de neurorestauración; aunque a la fecha, no se ha reportado ningún efecto directo sobre la neurogénesis.

El adyuvante completo de Freund es utilizado para intensificar la respuesta inmune dependiente de linfocitos T ya que los productos microbianos aumentan la expresión de moléculas de MHC y los co estimuladores (Abbas y cols 2009) este adyuvante, ha demostrado incrementar los efectos benéficos de la inmunización con copaxona pero en menor escala comparado con el copolimero sólo (Yong y cols 2011).

No hay reportes donde se evalúe el efecto que pudiera tener el adyuvante sólo sobre la neurogénesis. Ante nuestros resultados, valdría la pena evaluar el efecto que tiene tanto el manitol como del adyuvante sólo sobre ésta y así descartar cualquier efecto que pudieran estar ejerciendo el adyuvante y por lo tanto comprender si el manitol puede ser considerado como una sustancia neurogénica o si está facilitando o sinergizando el efecto de la copaxona.

9. CONCLUSIÓN

En los experimentos realizados en el presente trabajo, se logró demostrar que:

9.1 La inmunización con Copaxona induce una mayor neurogénesis tanto en la fase aguda como en la crónica en ratas con isquemia cerebral con reperfusión.

9.2 La inmunización con Copaxona facilita la sobrevivencia de neuronas nuevas después de un evento isquémico.

9.3 La inmunización con Copaxona favorece la recuperación neurológica tanto en la fase aguda como en la crónica en ratas sometidas a isquemia focal con reperfusión.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto del manitol sólo sobre la neurogénesis.
- Analizar si existe una co relación entre células T autorreactivas y la tasa neurogénica inducida por Copaxona tanto en la fase aguda como en la fase crónica.
- Analizar si la inmunización repetida de Copaxona (cada 28 días) facilita aún más la migración y sobrevivencia de neuronas nuevas durante la fase crónica.
- Examinar si la Copaxona promueve la incorporación electrofisiológica de las neuronas de nueva formación.

11. ABREVIATURAS

ACA	Arteria cerebral anterior
ACE	Arteria carótida externa
ACM	Arteria cerebral media
ACP	Arteria cerebral posterior
AG	Acetato de glatiramer
AIT	Accidente isquémico transitorio
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ANOVA	Análisis de varianza
ATP	Adenosin trifosfato
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BHE	Barrera hematoencefálica
BPM	Proteína morfogenética osea
BrdU	5-bromo-2'-deoxiuridina
BrdU+/DCX+	Marcador de neuronas nuevas
BrdU ⁺ /NeuN ⁺	Marcador de neuronas maduras
CA	Comisura anterior
CC	Corteza cerebral
CFA	Adyuvante completo de Freund
CH	Comisura hipocampal
COP-1	Copolímero-1
COX	Ciclooxigenasas
COX-2	Ciclooxigenasa
CPA's	Células presentadoras de antígeno
CPN	Células precursoras de neuronas
CPNs	Células precursoras de neuronas
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol
DCX	Proteína doblecortina
EAE	Modelo experimental de la esclerosis múltiple en roedores
ECV	Enfermedades cerebrovasculares
EE	Error estándar
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELAM	Molécula de adhesión endotelial leucocitaria
eNOS	Isoforma de óxido nítrico sintasa endotelial
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FDA	Agencia de alimentos y medicamentos
FGF2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
FSC	Flujo sanguíneo cerebral
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos

GD	Giro dentado hipocampal
GFAP	Proteína fibrilar ácida glial
GFAP	Proteína acidica fibrilar glial
GLAST	Transportador de glutamato específico de astrocitos
HCl	Ácido clorhídrico
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IL	Interleucina
iNOS	Isoforma de óxido nítrico sintasa de las células gliales
LES	Lupus eritematoso sistémico
MCAO	Obstrucción de la arteria cerebral media
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
NF-kB	Factor de transcripción factor nuclear kappa B
NGF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
NMDA	N-metil-D- aspartato
nNOS	Isoforma de óxido nítrico sintasa neuronal
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOS1	Isoforma de óxido nítrico sintasa neuronal
NOS2	Isoforma de óxido nítrico sintasa de las células gliales
NOS3	Isoforma de óxido nítrico sintasa endotelial
NT-3	Neurotrofina 3
NT-4	Neurotrofina 4
NT-5	Neurotrofina 5
O ₂	Oxígeno
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido nítrico
ONOO-	Peroxinitrito
PB	Buffer de fosfatos
PBM	Proteína básica de la mielina
PBS	Buffer de fosfatos salino
PBT	Buffer con tritón
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PECAM-1	Molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria
PGE-2	Prostaglandina E-2
PSA-NCAM	Moléculas de adhesión celular neural polisializadas
RANTES	Quimiocina en función de la activación, expresada y secretada por linfocitos T normales
SC	Subcutánea
SI	Sistema inmune
SNC	Sistema nervioso central
SS	Solución salina fisiológica
ST	Sin tratamiento

t-PA	Activador del plasminógeno tisular
TCR	Receptor de linfocitos T
Th2	Células T cooperadoras tipo 2
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
TUJ1	Tubulina β clase III específica de neuronas
TWEK	Tumor necrosis factor-like weak
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VRM	Vía rostral migratoria
ZSG	Zona subgranular
ZSV	Zona subventricular

12. REFERENCIAS

- Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. (2009). *Inmunología celular y molecular*. 6ª Edición. Ed. Elsevier España Cap. 3: 47-69.
- Abramov A, Scorziello A, Duchon M. (2007). Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *The Journal of Neuroscience*, 27 (5), 1129-1138.
- Aguilera, P., Chánez-Cárdenas, M., Maldonado, P., (2007). Recent advances in the use of antioxidant treatments in cerebral ischemia. New perspectives on brain cell damage, neurodegeneration and neuroprotective strategies. *Research Signpost*, 61-74.
- Aharoni, R., Teitelbaum, D., Leitner, O., Meshorer, A., Sela, M., Arnon, R. (2000). Specific Th2 cells accumulate in the central nervous system of mice protected against experimental autoimmune encephalomyelitis by copolymer-1. *PNAS*, 97(21), 11472-11477.
- Aharoni, R., Kayhan, B., Eilam, R., Sela, M., Arnon, R. (2003). Glatiramer acetate-specific T cells in the brain express T helper 2/3 cytokines and brain-derived neurotrophic factor in situ. *PNAS*, 100(24), 14157-14162.
- Aharoni, R., Arnon, R., Eilam, R. (2005). Neurogenesis and neuroprotection induced by peripheral immunomodulatory treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Neuroscience*, 25(36), 8217– 8228.

- Ahmed, N., Wahlgren, N., Grond, M., Hennerici, M., Lees, KR., Mikulik, R., Pearson, M., Roine, RO., Toni, D., Ringleb, P. (2010). Implementation and outcome of thrombolysis with alteplase 3-4.5 h after an acute stroke: an update analysis from SITS-ISTR. *Lancet Neurology* ,9, 866-74.
- Allen, S; Dawbarn,D. (2006) Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors. *Clinical Science*.110, 175-191.
- Álvarez-Buylla, A., García-Verdugo, JM. (2002). Neurogenesis in adult subventricular zone. *The Journal of Neuroscience*, 22(3), 629–634.
- American Heart Association (2011). Heart Disease and Stroke Statistics A Report From the American Heart Association 65-69. <http://circ.ahajournals.org>
- Andrews, RJ., Bringas, JR., Muto, RP. (1993). Effects of mannitol on cerebral blood, flow blood, pressure blood viscosity, hematocrit, sodium, and potassium. *Surgical Neurology*, 39(3), 218-22.
- Arias-Carrión O., Drucker-Colín R. (2007). Neurogénesis como estrategia terapéutica para regenerar el sistema nervioso central. *Revista de Neurología*, 45 (12), 739-745.
- Arnon, R., Aharoni, R. (2004). Mechanism of action of glatiramer acetate in multiple sclerosis and its potential for the development of new applications. *PNAS*, 101 (2), 14593-14598.

- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., Lindvall, O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nature Medicine*, 8, 963-970.
- Back, T., Kohno, K., Hossmann, K-A. (1994). Cortical negative DC deflections following middle cerebral artery occlusion and KCl-induced spreading depression: effect on blood flow, tissue oxygenation, and electroencephalogram. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 14, 12-19.
- Bamford J. (2001). Assessment and investigation of stroke and transient ischaemic attack. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 70 (1), 3–6.
- Bereczki, D., Liu, M., do Prado, GF., Fekete, I. (2008). Mannitol for Acute Stroke. *Stroke*, 39, 512-513.
- Brezun, JM., Daszuta, A. (2000). Serotonin may stimulate granule cell proliferation in the adult hippocampus, as observed in rats grafted with foetal raphe neurons. *European Journal of Neuroscience*, 12, 391–396.
- Cabrera, RA., Martínez, OO., Laguna, HG., Juárez, OR., Rosas, BV., Castellanos J, Medellin R, Cerón R, Sánchez F, Torrecilla L, Nava U. (2008). Epidemiología de la enfermedad vascular cerebral en hospitales de la Ciudad de México. Estudio multicéntrico. *Medicina Interna México*, 24(2), 98-103.

- Cameron, HA., McEwen, BS., Gould, E. (1995). Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *Journal of Neuroscience*, 15 (6), 4687-4692.
- Castillo, J., Álvarez-Sabin, J., Dávalos, E., Díez-Tejedor, E., Lizasoain, I., Martínez-Vila, E., Vivancos, J., Zarranz, J. (2003). Revisión de Consenso. Neuroprotección farmacológica en la isquemia cerebral: ¿es todavía una opción terapéutica? *Neurología*, 18(7),368-384.
- Crack, PJ., Taylor, J. (2005). Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radical Biology and Medicine*, 38, 1433-1444.
- Cross, JL., Meloni, BP., Bakker, AJ., Lee, S., Knuckey, NW. (2010). Modes of neuronal calcium entry and homeostasis following cerebral ischemia. *Stroke Research and Treatment*, 2010,1-9.
- Cuenca-López, MD., Brea, D., Segura, T., Galindo, M., Martínez, D., Agulla, J., Castillo, J., Jordán, J. (2010). La inflamación como agente terapéutico en el infarto cerebral: respuesta inflamatoria celular y mediadores inflamatorios. *Revista de Neurología*, 50 (6), 349-359.
- Cunha, C., Brambilla, R., Kerrie, LT. (2010). A simple role for BDNF in learning and memory? *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 3(1), 1-14.
- Chamorro, A., Hallenbeck, J. (2007). The harms and benefits of inflammatory and immune responses in vascular disease. *Stroke*, 37(2), 291-293.

- Daniel, WW., (2005) Bioestadística. 4ª Ed. Editorial Limusa Wiley. México. 162,692 y 326.
- Das, S., Basu, A. (2008). Inflammation: a new candidate in modulating adult neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 86(6), 1199-1208.
- Dávalos, A., Castillo, J., Álvarez-Sabín, J., Secades, JJ., Mercadal, J., López, S., Cobo, E., Steven, W., Sherman, D., Clark, WM., Lozano, R. (2002). Oral citicoline in acute ischemic stroke: an individual patient data pooling analysis of clinical trials. *Stroke*, 3,2850-2857.
- Dhal, PK., Holmes-Farley, SR., Huval, CC., Jozefiak, TH. (2006). Polymers as Drugs. *Advances in Polymer Science*, 192, 9–58.
- Díez-Tejedor, E., Brutto, OD., Álvarez-Sabin, J., Muñoz, M., Abiusi, G. (2001). Nomenclatura de las enfermedades cerebrovasculares. *Revista de Neurología*, 33(5), 455-464.
- Doetsch, F., Caillé, I., Lim, DA., García-Verdugo, JM., Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*, 97(6), 703-716.
- Dringen, R. (2000). Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in Neurobiology*, 62(6), 649-671.

Durukan, A., Tatlisumak, T. (2007). Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 87, 179-197.

pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia

Emsley, JG., Mitchell, BD., Kempermann, G., Macklis, JD. (2005). Adult neurogenesis and repair of the adult CNS with neural progenitors, precursors and stem cells. *Progress in Neurobiology*, 75(5) 321-341.

Fridkis-Hareli, M., Santambrogio, L., Stern, JNH., Fugger, L., Brosnan, C., Strominger, JL. (2002). Novel synthetic amino acid copolymers that inhibit autoantigen-specific T cell responses and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *The Journal of Clinical Investigation*, 109(12),1635-1643.

Gran, B., Tranquill, LR., Chen, M., Bielekova, B., Zhou, W., Dhib-Jalbut, S, Martin, R. (2000). Mechanisms of immunomodulation by glatiramer acetate. *Neurobiology*, 55(11), 1704-1714.

Gleeson, JG., Lin, PT., Flanagan, LA., Walsh, ChA. (1999). Doublecortin is microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating. *Neuron*, 23, 257–271.

González G. (2010) Neurogénesis y gliogénesis en el cerebro rostral del ratón adulto heterocigoto para Pax6 (+/SeyDey). Tesis doctoral. Universidad de Salamanca España, 38-46.

Gorantla, S., Liu, J., Sneller, H., Dou, H., Honguin, A., Smith, L., Ikesu, T., Volsky, DJ., Poluektova, L., Gendelman, HE. (2007). Responses in a murine model of HIV-1 anti-inflammatory glial and neuroprotective copolymer-1 induces adaptive immune. *The Journal of Immunology*, 179(7), 4345-4356.

Greenberg, DA. (2007). Neurogenesis and Stroke. *CNS and Neurological Disorders - Drug Targets*, 6(5),321-325.

Hacke, W., Furlan, AJ, Al-Rawi, Y., Davalos, A., Fiebach, JB., Gruber, F., Kaste, M., Lipka, LJ., Pedraza, S., Ringleb, PA., Rowley, HA., Schneider, D., Schwamm, LH., Leal JS., Söhlgen, M., Teal, PA., Wilhelm-Ogunbiyi. K., Wintermark, M., Warach, S. (2009). Intravenous desmoteplase in patients with acute ischaemic stroke selected by MRI perfusion-diffusion weighted imaging or perfusion CT (DIAS-2): a prospective, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet Neurology*, 8(2), 141-150.

Harwood, SM., Yaqoob, MM., Allen, DA. (2005). Caspase and calpain function in cell death: bridging the gap between apoptosis and necrosis. *Annals of Clinical Biochemistry*. 42, 415-431.

Hauben, E., Nevo, U., Yoles, E., Moalem, G., Agranov, E., Mor, F., Akselrod, S., Neeman, M., Cohen, IR., Schwartz, M. (2000)a. Autoimmune T cells as potential neuroprotective therapy for spinal cord injury. *The Lancet*, 355(9200), 286-287.

Hauben, E., Butovsky, O., Nevo, U., Yoles, E., Moalem, G., Agranov, E., Mor, F., Leibowitz-Amit, R., Pevsner, E., Akselrod, S., Neeman, M., Cohen, IR.,

- Schwartz, M. (2000)b. Passive or active immunization with myelin basic protein promotes recovery from spinal cord contusion. *Journal of Neuroscience*; 20(17), 6421-6430.
- Hoen, BD., Palmer, TD., Steinberg, GK. (2005). Neurogenesis in rats after focal cerebral ischemia is enhanced by indomethacin. *Stroke*, 36(12),2718-224.
- Hurtado, O., Moro, MA., Sobrado, M. (2008). Cadena respiratoria mitocondrial y generación de radicales libres en el infarto cerebral. En Montaner, J. Fisiopatología de la isquemia cerebral. España. *ICG Marge*, 89-96.
- Iadecola, C., Alexander, M. (2001). Cerebral ischemia and inflammation. *Current Opinion in Neurology*; 14(1), 89-94.
- Ibarra, A., Avendaño, H., Cruz, Y. (2007). Copolymer-1 (Cop-1) improves neurological recovery after middle cerebral artery occlusion in rats. *Neuroscience Letters* 425; 110–113.
- Ibarra A., García E. (2008). Immunomodulation as a neuroprotective strategy for spinal cord injury in The role of immune cells in neurodegenerative diseases. Research Signpost. Kerala, India.
- Ibarra, A., Hauben, E., Butovsky, O., Schwartz, M. (2004). The therapeutic window after spinal cord injury can accommodate T cell-based vaccination and methylprednisolone in rats. *European Journal of Neuroscience*. 19,2984-2990.

- Islam, O., Loo, TX., Heese K. (2009) Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has proliferative effects on neural stem cells through the truncated TRK-B receptor, MAP kinase, AKT, and STAT-3 signaling pathways. *Current Neurovascular Research*. 6(1):42-53.
- Kelsen, J., Hvas, CL., Agnholt, J., Dahlerup, JF. (2006). CD4 + CD25 + regulatory T cells and their importance to human illnesses. *Ugeskrift for Laeger*. 168(1),32-37.
- Kermer, P., Klöcker, N., Bähr, M. (1999). Neuronal death after brain injury. Models mechanisms and therapeutic strategies in vivo. *Cell and tissue Research*; 298(3),383-395.
- Kipnis, J, Yoles E, Schori H, Hauben E, Shaked I, and Schwartz M. (2001). Neuronal survival after CNS insult is determined by a genetically encoded autoimmune response. *The Journal of Neuroscience*; 21(13),4564–4571.
- Kipnis, J., Schwartz, M. (2002). Dual action of glatiramer acetate (COP-1) in the treatment of CNS autoimmune and neurodegenerative disorders. *Trends in Molecular Medicine*; 8(7),319-323.
- Kipnis, J., Nevo, U., Panikashvili, D., Alexandrovich, A., Yoles, E., Akselrod, S., Shohami, E., Schwartz, M. (2003). Therapeutic vaccination for closed head injury. *Journal of Neurotrauma*; 20(6), 559-569.

- Kipnis, J., Cohen, H., Cardon, M., Ziv, Y., Schwartz, M. (2004). T cell deficiency leads to cognitive dysfunction: implications for therapeutic vaccination for schizophrenia and other psychiatric conditions. *PNAS*, 101(21), 8180-8185.
- Kiyota, T., Ingraham, K.I., Swan, R.J., Jacobsen, M.T., Andrews, S.J., Ikezu, T. (2012). AAV serotype 2/1-mediated gene delivery of anti-inflammatory interleukin-10 enhances neurogenesis and cognitive function in APP+PS1 mice. *Gene Therapy*, 19,724–733.
- Kriegstein, A., Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annual Review of Neuroscience*, 32,149-184.
- Krupinski, J., Turu, M. (2008). La respuesta neuroinflamatoria en la isquemia cerebral. En Montaner, J. Fisiopatología de la isquemia cerebral. España. *ICG Marge SL*, 119-144.
- Lan, X., Chen, Q., Wang, Y., Jia, B., Sun, L. (2012) TNF- α Affects Human Cortical Neural Progenitor Cell Differentiation through the Autocrine Secretion of Leukemia Inhibitory Factor. *PLoS ONE*, 7(12):1-8.
- Lavado, A., Lagutin, O., Lionel, M.L., Suzanne, J.B., Oliver, G. (.2010). Prox1 is required for granule cell maturation and intermediate progenitor maintenance during brain neurogenesis. *PLoS Biology*, 8(8), 1-16.
- Lee, E., Son, H. (2009). Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Reports*, 42(5), 239-244.

- Lee, J., Duan, W., Mattson, MP. (2002). Evidence that brain derived neurotrophic factor is required for basal neurogenesis and mediates, in part, the enhancement of neurogenesis by dietary restriction in the hippocampus of adult mice. *Journal of Neurochemistry*. 82, 1367-1375.
- Lim, DA., Alvarez-Buylla, A. (1999). Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proceedings of the National Academy of Science*, 96, 7526-31.
- Lim, DA., Tramontin, AD., Trevejo, JM., Herrera, DG., García-Verdugo, JM., Alvarez-Buylla, A. (2000). Noggin antagonizes BMP signaling to create a niche for adult neurogenesis. *Neuron*, 28, 713–726.
- Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews*, 79(4), 1434-1532.
- Lledo, PM., Gueusi, G., Vincent, JD. (2005). Information processing in the mammalian olfactory system. *Physiological Reviews*, 85(1), 281-317.
- Lizasoain, I., Moro, A., Fernández-López, D., Pradillo, J., Sobrino, T., Castillo, J. (2008). Plasticidad, neurogénesis y angiogénesis. En Montaner, J. Fisiopatología de la isquemia cerebral. España. *ICG Marge SL*. 86-94.
- Martiñon, S., García, E., Flores, N., Gonzalez, I., Ortega, T., Buenrostro, M., Reyes, R., Fernandez-Presas, AM., Guizar-Sahagún, G., Correa, D., Ibarra, A. (2007). Vaccination with a neural-derived peptide plus administration of glutathione

improves the performance of paraplegic rats. *European Journal of Neuroscience*, 26(2), 403-412.

Menezes, JRL., Smith, CM., Nelson, KC., Luskin, MB. (1995). The division of neural progenitor cells during migration in the neonatal mammalian forebrain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 6(6), 496-508.

Ming, G., Song H. (2011). Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions. *Neuron* 70(4) ,687-702

Mirzadeh, Z., Merkle, FT., Soriano-Navarro, M., García-Verdugo, J., Álvarez-Buylla, A. (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell*, 3(3),265-278.

Montaner, J. (2008). Fisiopatología de la isquemia cerebral 2ª Edición. España. *ICG Marge SL.9-191.*

Moreno, J. (1996). Respuesta inmune y mecanismos de autoinmunidad. 1ª Ed. México D.F. *Ed. Limusa*, 46-54.

Mudó, G., Bonomo, A., Di L, V., Frinchi, M., Fuxe, K., Belluardo, N. (2009). The FGF-2/FGFRs neurotrophic system promotes neurogenesis in the adult brain. *Journal of Neural Transmission*, 116(8), 995-1005.

- Nakajima, R., Nakamura, T., Miyakawa, H., Yoshihisa, K. (2004). Effects of Mannitol on ischemia-induced degeneration in rat hippocampus. *Journal of Pharmacology Sciences*, 95,341-348.
- Nusse, R. (2008). Wnt signaling and stem cell control. *Cell Research*, 18(5), 523-527.
- Organización mundial de la salud. (2008). Estadísticas sanitarias mundiales. *Ediciones de la OMS*. [Http://wwwlive.who.int/whosis/whostat/PDF_ES_WHS08](http://www.live.who.int/whosis/whostat/PDF_ES_WHS08)
- Pai, R., Soreghan, B., Szabo, IL., Pavelka, M., Baatar, D., Tarnawski, AS. (2002). Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nature Medicine*, 8(3):289-293.
- Parris, M. (2009). Integrated brain restoration after ischemic stroke – medical management, risk factors, nutrients, and other interventions for managing inflammation and enhancing brain plasticity. *Alternative Medicine Review*, 14(1), 14-35.
- Paxinos, G., Watson, C., (2004). The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press*, San Diego. 61-97.
- Peña-Tapia, PG., Díaz, AH., Torres, JL. (2004). Oclusión endovascular permanente de la arteria cerebral media en ratas Wistar: descripción del abordaje a través de la arteria carótida interna. *Revista de Neurología*, 39(11), 1011-1016.

- Pérez, C. (2009). Nuevos aspectos en el tratamiento del acv isquémico en la etapa aguda: uso de fibrinolíticos. *Archivos de Medicina Interna*, 31(1), S41-S43.
- Petreanu, L., Alvarez-Buylla, A. (2002). Maturation and death of adult-born olfactory bulb granule neurons: role of olfaction. *The Journal of Neuroscience*, 22(14), 6106–6113.
- Pluchino, S., Zanotti, L., Deleidi, M., Martino, G. (2005). Neural stem cells and their use as therapeutic tool in neurological disorders. *Brain Research Review*, 48,211-219.
- Ramiro, M., Prieto, P., Sardiñas, J. (2008). Enfermedad vascular cerebral. En Ramiro, M., Lifshitz, A., Halabe, J., Frati, A. Editores. *El internista. Medicina interna para internistas. México*, 103510-47.
- Revesz, T., Kidd, D., Thompson, A., Barnard, R., McDonald, W. (1994). A comparison of the pathology of primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Brain*, 117, 759-65.
- Rodriguez, RR. (2002). Fundamentos de neurología y neurocirugía. 1ª Edición *Ediciones Magna publicaciones*. Argentina, 89-98.
- Roitt. I., Brostoff, .J, Male, D. (2000). Inmunología. México: Ed. *Harcourt Brace*, 14:187-199.
- Ron-Harel, N., Segev, Y., Lewitus, GM., Cardon, M., Ziv, Y., Netanel, D., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Rechavi, G., Domany, E., Schwartz, M. (2008). Age-

dependent spatial memory loss can be partially restored by immune activation.

Rejuvenation Research, 11 (5), 903-913.

Rossi, DJ., Brady, JD., Morhr, C. (2007). Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nature Neuroscience*, 10(11), 1377-1386.

Sarraf-Yazdi, S., Laskowitz, D., Warner, DS. (1999). Pathophysiology of brain damage. En Schuaib, A., Goldstein, LB. Eds. Management of acute stroke. New York. *Marcel Dekker*, 243-277.

Scheindlin, S. (2004). Copolymer 1: An Off-Beat Drug Development Story. *Molecular Interventions*, 4(1), 6-9.

Schrempf, W., Ziemssen, T. (2007). Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. *Autoimmunity Reviews*, 6(7), 4694-75.

Schwartz, M., Kipnis, J. (2005). Protective autoimmunity and neuroprotection in inflammatory and noninflammatory neurodegenerative diseases. *Journal of the Neurological Sciences*; 233,163-166.

Schwartz, M., Shechte, R, (2010). Protective autoimmunity functions by intracranial immunosurveillance to support the mind: the missing link between health and disease. *Molecular Psychiatry*, 15,342–354.

Secretaria de salud (2007) Programa nacional de salud 2007-2012. Por un México sano construyendo alianzas para una mejor salud. México. *Secretaria de salud*, 28-33 http://www.geriatria.salud.gob.mx/descargas/programa_nacional_salud.pdf

- Seok, JW., Doo, YK., Byoung. JG. (2002). Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(1), 67-86.
- Shin, HY., Kim, JH., Phi, JH., Park, CK., Kim, JE., Kim, JH., Paek, SH., Wang, KC., Kim, DG. (2008). Endogenous neurogenesis and neovascularization in the neocortex of the rat after focal cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience Research*, 86, 356–367.
- Shuaib, A. (2006). Neuroprotection STAIR-way to the future? *Cerebrovascular Diseases*, 22(1), 10–17.
- Shyu, WC., Lin, SZ., Lee, CC, (2006). Granulocyte colony-stimulating factor for acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *CMAJ*, 1(174), 927-933.
- Smith, CM., Luskin, MB. (1998). Cell cycle length of olfactory bulb neuronal progenitors in the rostral migratory stream. *Developmental Dynamics*, 213(2),220-227.
- Sobrado, M., Moro, A., Hurtado, O. (2008). El papel de la glía tras la isquemia cerebral. En Montaner, J. Fisiopatología de la isquemia cerebral. España. *ICG Marge SL*, 145-158.
- Stevens, SL., Bao, J., Hollis, J., Lessov, NS., Clark, WM., Stenzel-Poore, MP. (2002). The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cell following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Research*; 932(1-2),110-9.

- Stewart, VC, Heales, SJ. (2003) Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Radical Biology and Medicine*,34(3), 287-303.
- Sweeney, MI., Yager, JY. Walz, W., Juurlink, HJ. (1995). Cellular mechanisms involved in brain ischemia. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 73(11), 1525-1535.
- Tamura, A., Graham, DI., McCulloch, J., Teasdale, GM. (1981). Focal cerebral ischemia in the rat: Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 1(1) ,53-60.
- Thored, P., Arvidsson, A., Cassi, E., Ahlenius, H., Kallur, T., Darsalia, V., Ekdahl, CT., Kokaia, Z., Lindvall, O. (2006). Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells*, 24(3), 739-747.
- Torregrosa, G., Salom, J., Jover-Mengual, T., Alborch, E. (2008). Fisiopatología básica: de la oclusión arterial a la muerte neuronal. En Montaner, J. Fisiopatología de la isquemia cerebral. España. *ICG Marge SL*, 13-31.
- Wang, L., Chopp, M., Zhang, RL., Zhang, L., Tourneau, YL., Feng, Y., Jiang, A., Morris,DC., Zhang, ZG., (2009) The Notch pathway mediates expansion of a progenitor pool and neuronal differentiation in adult neural progenitor cells after stroke *Neuroscience* 158(4),1356–1363.

- Winner, B., Cooper-Kuhn, CM., Aigner, R., Winkler, J., Kuhn, HG. (2002). Long-term survival and cell death of newly generated neurons in the adult rat olfactory bulb. *European Journal of Neuroscience*, 16(9), 1681–1689.
- Wolf, SA., Steiner, B., Akpinarli, A., Kammertoens, T., Nassenstein, C., Braun, A. (2009) CD4-positive T lymphocytes provide a neuroimmunological link in the control of adult hippocampal neurogenesis. *Journal of Immunology*, 182, 3979–3984.
- Woo, M., Hakem, R, Soengas, MS.,Duncan, GS., Kägi, D., Hakem,A., McCurrach, M., Khoo, W., Kaufman, SA., Senaldi, G., Howard, T., Lowe, SW., Mak ,TW. (1998). Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes and Development*; 12(6), 806-819.
- Yasuhara, T., Hara, K., Maki, M., Xu, L., Yu, G., Ali, MM., Masuda, T., Yu, SJ., Bae, EK., Hayashi, T., Matsukawa, N., Kaneko, Y., Kuzmin-Nichols, N., Ellovitch, S., Cruz, EL., Klasko, SK., Sanberg, CD., Sanberg, PR., Borlongan, CV. (2010). Mannitol facilitates neurotrophic factor up-regulation and behavioural recovery in neonatal hypoxic-ischaemic rats with human umbilical cord blood grafts. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4),9149-21.
- Yoles, E., Hauben, E., Palgi, O., Agranov, E., Gothilf, A., Cohen, A., Kuchroo, V., Cohen, IR., Weiner, H., Schwartz, M. (2001). Protective autoimmunity is a physiological response to CNS trauma. *Journal of Neuroscience*, 21(11), 3740-3748.

- Yong, J; Lacan,G; Dang, H; Hsieh,T; Middleton, B; Wasserfall, C, Tian, J; Melega, W; Kaufman D. (2011)BCG Vaccine-Induced Neuroprotection in Mouse Model of Parkinson's Disease. *Plos One*, 6(1),1-8.
- Young, MJ., Bresnitz, EA., Strom, BL. (1983). Sample size nomograms for interpreting negative clinical studies. *Annals of Internal Medicine*, 99(2), 248-251.
- Yukie, S., Gye-Hyeong, W., Hitoshi, F., Sayaka, K., Keisuke, Sh., Masao, H., Kunitoshi, M., Akiyoshi, N., Makoto, Sh. (2010) Sustained production of Reelin-expressing interneurons in the hippocampal dentate hilus after developmental exposure to anti-thyroid agents in rats. *Reproductive Toxicology*, 29(4), 407–414.
- Zea, L, Phillip, R., Carlson, S., Cummins, R. (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats. *Stroke*, 20, 84-91.
- Zhang, Z., Choop, M. (2002). Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischemia. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 12(2),62-6.
- Ziemssen, T., Schrempf, W. (2007). Glatiramer acetate: mechanisms of action in multiple sclerosis. *International Review of Neurobiology*, 79,537-570.
- Ziv, Y., Avidan, H., Pluchino,. H, Martin,o G., Schwartz, M. (2006). Synergy between immune cells and adult neural stem progenitor cells promotes functional recovery from spinal cord injury. *PNAS*, 103(35), 13174-13179.

Algunas microfotografías del doble marcaje a 40X.

