



**Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana**  
**Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas**  
**Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología**

**Efecto neuroprotector y mecanismos moleculares asociados a la C-Ficocianina  
y la Ficocianobilina en modelos experimentales de Isquemia Cerebral**

TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO CIENTÍFICO

DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD

**Autor:** MSc. Javier Marín Prida, Inv. Ag.

**Tutores:** Dr.C. Giselle Pentón Rol, Inv. Tit.

Dr.C. Gilberto L. Pardo Andreu, Inv. Aux., Prof. Aux.

**La Habana**

**2014**

**INSTITUTO DE FARMACIA Y ALIMENTOS**

## DEDICATORIA

---

A mi querido hijo, Diego, por ser huella, luz y esperanza.

A mi esposa, Diani, por su amor incondicional.

*"Hay algo muy sutil y muy hondo en volverse a mirar el camino andado...*

*El camino en donde, sin dejar huella, se dejó la vida entera".*

*Dulce María Loynaz*

## AGRADECIMIENTOS

---

El presente trabajo ha sido posible gracias a la estrecha colaboración entre el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana, el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, el Centro Internacional de Restauración Neurológica, la Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto, Universidad de Sao Paulo, Brasil y el Instituto Clínico Humanitas, Italia.

Agradecemos el apoyo financiero de las siguientes instituciones: Coordinación para el Perfeccionamiento del Personal de Nivel Superior, Brasil (del portugués: “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior”, CAPES); Instituto Clínico Humanitas, Italia; Organización Internacional para las Investigaciones del Cerebro (del inglés: “International Brain Research Organization”, IBRO)

## SÍNTESIS

No existen terapias neuroprotectoras internacionalmente aprobadas para la Isquemia Cerebral (IC). La C-Ficocianina (C-FC), principal biliproteína de la *S. platensis*, y su cromóforo, la Ficocianobilina (FCB), tienen propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias, lo que avala sus potencialidades como agentes anti-isquémicos. En el presente trabajo se evaluó el posible efecto neuroprotector de ambas moléculas en modelos de IC y los mecanismos moleculares implicados en el mencionado efecto. La C-FC redujo el volumen de infarto, preservó las neuronas piramidales del hipocampo, restauró el balance redox, y mejoró el déficit neurológico, la actividad locomotora y la sobrevivencia de gerbos sometidos a una isquemia/reperfusión (I/R) cerebral global. Los estudios con las líneas neuronales PC12 y SH-SY5Y, y en mitocondrias aisladas de cerebro de rata bajo exposición a neurotóxicos, mostraron un importante efecto neuro/mitoprotector de la C-FC. La FCB, también previno la muerte celular en células PC12. De forma similar, la C-FC y la FCB limitaron la pérdida neuronal causada por una I/R en retinas de ratas. Además, la terapia post-isquémica con C-FC o FCB en ratas con hipoperfusión cerebral en fase aguda produjo la expresión diferencial de 21 genes asociados a la respuesta inflamatoria y a la integridad neurovascular. Ambos compuestos limitaron la peroxidación lipídica cerebral inducida por la hipoperfusión. La FCB, además, moduló positivamente la expresión génica relacionada con procesos inmunológicos en corteza cerebral anterior. La C-FC, por otro lado, disminuyó el volumen de infarto, la disfunción neurológica, la caída del peso corporal, la expresión de NOX2/gp91phox y la sobreproducción del anión  $O_2^{\bullet-}$  en ratas sometidas a una I/R inducida por la endotelina-1. Estos resultados ofrecen nuevas alternativas farmacológicas para el tratamiento o la prevención del infarto cerebral y sustentan el desarrollo de ensayos clínicos para la demostración final de su utilidad terapéutica en esta patología.

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b>	8
1.1. Enfermedad Cerebrovascular de tipo isquémica	8
1.1.1. Clasificación	8
1.1.2. Epidemiología	10
1.1.3. Modelos experimentales	11
1.1.4. Fisiopatología	15
1.1.4.1. Excitotoxicidad mediada por el glutamato	16
1.1.4.2. Despolarizaciones peri-infarto	18
1.1.4.3. Estrés oxidativo	19
1.1.4.4. Inflamación	23
1.1.4.5. Muerte celular	26
1.1.5. Estrategias terapéuticas	28
1.2. C-Ficocianina y Ficocianobilina	30
1.2.1. Estructura y función	30
1.2.2. Efectos farmacológicos	31
1.2.2.1. Estudios <i>in vitro</i>	31
1.2.2.2. Estudios <i>in vivo</i>	32
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	34
2.1. Purificación y caracterización físico-química de la C-FC y la FCB	34
2.2. Evaluación del efecto mitoprotector de la C-FC en mitocondrias aisladas	34
2.2.1. Aislamiento de mitocondrias de cerebro de rata	34
2.2.2. Ensayos mitocondriales	35

2.3. Ensayo electroquímico con C-FC	37
2.4. Evaluación del efecto de la C-FC y FCB en líneas celulares	38
2.4.1. Línea PC12	38
2.4.2. Línea SH-SY5Y	38
2.4.3. Ensayo de viabilidad celular	39
2.5. Evaluación del efecto de la C-FC y FCB en modelos animales de isquemia cerebral y de los mecanismos moleculares involucrados	39
2.5.1. Modelo de isquemia/reperfusión cerebral global en gerbos de Mongolia	39
2.5.1.1. Animales y diseño experimental	39
2.5.1.2. Procedimiento quirúrgico	40
2.5.1.3. Evaluación neurológica	41
2.5.1.4. Determinación del volumen de infarto	41
2.5.1.5. Evaluación histológica	42
2.5.1.6. Determinación de marcadores de estrés oxidativo	43
2.5.1.7. Evaluación de la conducta exploratoria	44
2.5.2. Modelo de isquemia/reperfusión en retina de ratas	44
2.5.2.1. Animales	44
2.5.2.2. Procedimiento quirúrgico	45
2.5.2.3. Evaluación histológica	45
2.5.3. Modelo de penumbra isquémica por hipoperfusión cerebral aguda en ratas	46
2.5.3.1. Animales y diseño experimental	46
2.5.3.2. Procedimiento quirúrgico	46
2.5.3.3. Microarreglo de ADN	47
2.5.3.4. Expresión de genes por Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en Tiempo Real	48

2.5.3.5.	Determinación de marcadores de estrés oxidativo	49
2.5.3.6.	Determinación de citocinas por Bio-Plex®	50
2.5.3.7.	Evaluación histológica	50
2.5.4.	Modelo de isquemia/reperfusión cerebral focal inducida por endotelina-1 en ratas	51
2.5.4.1.	Animales y diseño experimental	51
2.5.4.2.	Procedimiento quirúrgico	51
2.5.4.3.	Evaluación neurológica	52
2.5.4.4.	Determinación del volumen de infarto	52
2.5.4.5.	Evaluación histoquímica	53
2.6.	Análisis estadístico	55
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS</b>	56
3.1.	Efecto protector de la C-FC en mitocondrias de cerebro de rata frente al $Ca^{2+}/Pi$	56
3.2.	Inhibición de la reacción de Fenton en presencia de la C-FC	57
3.3.	Evaluación del efecto de la C-FC y la FCB en líneas celulares de origen neuronal	59
3.4.	Evaluación del efecto de la C-FC y la FCB en modelos animales de isquemia cerebral y los mecanismos moleculares involucrados	61
3.4.1.	Efecto neuroprotector de la C-FC frente a la isquemia/reperfusión cerebral global en gerbos de Mongolia	61
3.4.2.	Efecto de la C-FC y la FCB en retina de ratas sometidas a una isquemia/reperfusión	68
3.4.3.	Mecanismos inmunomoduladores y cerebroprotectores de la C-FC y la FCB en el modelo de penumbra isquémica por hipoperfusión cerebral aguda en ratas	70
3.4.4.	Efecto neuroprotector de la C-FC frente a la isquemia/reperfusión cerebral focal inducida por endotelina-1 en ratas e inhibición de la NADPH oxidasa	80

<b>4. DISCUSIÓN</b>	86
4.1. Modelos <i>in vitro</i>	86
4.1.1. Inhibición de la transición de permeabilidad mitocondrial	86
4.1.2. Efectos neuroprotectores en líneas neuronales	87
4.2. Modelos <i>in vivo</i>	89
4.2.1. Isquemia/reperfusión cerebral global en gerbos de Mongolia	89
4.2.2. Isquemia/reperfusión en retina de ratas	92
4.2.3. Hipoperfusión cerebral aguda en ratas	92
4.2.4. Isquemia/reperfusión cerebral focal en ratas inducida por endotelina-1	103
<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	106
5.1. CONCLUSIONES	106
5.2. RECOMENDACIONES	108
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	109
<b>ANEXOS</b>	

## INTRODUCCIÓN

Según datos recientes del Ministerio de Salud Pública de Cuba, las enfermedades cerebrovasculares constituyen la tercera causa de muerte para todas las edades y en todas las provincias, con una tasa de 79 por cada 100 000 habitantes en el año 2012, lo que representa un incremento del 10% respecto al año 2000,<sup>1</sup> y constituye de igual manera un grave problema de salud pública en el resto del mundo.<sup>2</sup> Las implicaciones económicas y sociales de esta enfermedad son enormes<sup>3</sup> y se prevé su incremento sostenido en el futuro inmediato debido a diversos factores de riesgo asociados cuya incidencia también va en aumento, como son la hipertensión arterial crónica, la diabetes y el envejecimiento poblacional.<sup>4</sup> Cerca del 87% de todos los infartos cerebrales son de tipo isquémicos, como resultado de una oclusión temporal o permanente de arterias cerebrales ya sea por trombosis o por embolismo; el resto son de tipo hemorrágico (parenquimatoso, ventricular o subaracnoideo).<sup>5</sup> En todos los casos se produce una drástica reducción de los niveles de oxígeno y glucosa en el cerebro, con afectaciones bioquímicas y moleculares y un daño severo en el tejido cerebral, con secuelas neurofisiológicas importantes,<sup>6</sup> que pueden llegar a ser irreversibles si no se lleva a cabo una intervención terapéutica adecuada en un período relativamente corto de tiempo, provoca infarto tisular en el territorio de perfusión del vaso afectado y la muerte neuronal.<sup>7</sup> Entre los procesos fundamentales que median la fisiopatología del ictus isquémico se encuentran la excitotoxicidad mediada por el glutamato, las despolarizaciones peri-infarto, el estrés oxidativo, la inflamación y la muerte celular.<sup>7</sup> La excesiva producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) no solo es capaz de dañar a la célula neuronal, sino a también al resto de los componentes de la unidad neurovascular, incluyendo la vasculatura cerebral.<sup>8</sup> A nivel subcelular se ha identificado a la

mitocondria como uno de los blancos principales del daño isquémico originado por la excesiva producción de EROs y la excitotoxicidad. Inmediatamente después de un evento isquémico, ocurre una disfunción en el funcionamiento mitocondrial caracterizado por el bloqueo de la síntesis de ATP, la liberación al citoplasma de calcio y de proteínas involucradas en la vía intrínseca apoptótica, como el citocromo c, Apaf-1, y el complejo Smac-DIABLO.<sup>9</sup> Uno de los mecanismos de liberación que se propone para estas proteínas mitocondriales pro-apoptóticas es la transición de permeabilidad mitocondrial (TPM), un evento caracterizado por la apertura de poros o canales en las membranas del orgánulo, que provoca la disipación del potencial de membrana, la entrada de iones acompañados de agua, que a su vez induce el hinchamiento y la ruptura de su membrana externa.<sup>10</sup> La isquemia cerebral (IC) se acompaña además de una marcada reacción inflamatoria e inmunológica.<sup>11</sup> Evidencias recientes muestran que la respuesta inflamatoria en la región isquémica puede producir tanto mediadores citotóxicos como citoprotectores, en dependencia de la etapa post-isquémica en que actúen.<sup>12</sup> La modulación de esta respuesta a favor de los procesos citoprotectores, y anti-inflamatorios, así como el bloqueo de la producción excesiva de las EROs y la mitoprotección podrían utilizarse como posibles estrategias para proteger la unidad neurovascular en un evento isquémico. La estrategia de tratamiento de la IC aguda se ha enfocado en dos direcciones: a) el restablecimiento del flujo sanguíneo cerebral por la ruptura mecánica o farmacológica del trombo; b) la interrupción de los eventos moleculares que originan la muerte neuronal, definiéndose inicialmente con el término de neuroprotección,<sup>13</sup> que se ha extendido hacia todos los tipos celulares de la unidad neurovascular empleándose también el de cerebroprotección.<sup>14</sup> El único tratamiento farmacológico aprobado para uso humano en la fase aguda de la IC es la trombolisis con el factor

activador del plasminógeno tisular (t-PA), pero con una estrecha ventana terapéutica (< 3-4,5 h), riesgo de hemorragia intracerebral, y además, con elevados precios de comercialización, siendo producido por una empresa de EEUU (Genentech Inc., San Francisco, California). Incluso en ese país, menos del 10% de los pacientes que sufren una IC logran ser intervenidos a tiempo con el t-PA, solamente en hospitales con infraestructura y personal adecuados. Por ejemplo, según un estudio reciente, el 64% de los hospitales de EEUU no lograron aplicar el t-PA a ningún paciente entre el 2004 y el 2007.<sup>15</sup> Por tanto, urge continuar evaluando potenciales candidatos farmacológicos para contrarrestar los efectos deletéreos de la IC, ya sea en su prevención o en el manejo efectivo de las etapas agudas y crónicas posteriores a la oclusión vascular.<sup>16</sup> Hasta el momento no han logrado fármacos neuroprotectores registrados en la práctica clínica que prevengan o limiten la pérdida neuronal en aquellas áreas con flujo sanguíneo disminuido (zona de penumbra), indicando la necesidad de continuar identificando potenciales blancos de intervención así como estrategias combinadas para lograr no solo la protección aguda sino también la restauración en un período crónico.<sup>17</sup>

La C-Ficocianina (C-FC) constituye la principal biliproteína de la *Spirulina platensis*, un alga verde azul de la cual se obtiene un extracto del mismo nombre (espirulina) producido en numerosos países, incluyendo al nuestro (Labiofam, Cuba), como suplemento dietético con valores nutricionales bien documentados.<sup>18</sup> La C-FC posee propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes, citoprotectoras e inmunomoduladoras en modelos experimentales de diversas patologías.<sup>19</sup> Su estructura está constituida por dos cadenas polipeptídicas ( $\alpha$  y  $\beta$ ), las cuales tienen enlazado un compuesto tetrapirrólico lineal de cadena abierta, denominado Ficocianobilina (FCB).<sup>20</sup> Una vez aplicada la C-FC *in vivo*, es digerida liberando la FCB, la cual

es probable que sea responsable, al menos en buena medida, de los efectos farmacológicos reportados para la biliproteína. En este sentido, varios estudios han demostrado el potente efecto protector y antioxidante de la FCB, frente a especies dañinas como el peroxinitrito,<sup>21</sup> los radicales peroxilos,<sup>22</sup> y en modelos animales de nefropatía diabética<sup>23</sup> y aterosclerosis.<sup>24</sup> Sin embargo, hasta el momento en la literatura no existe ningún reporte donde se evalúe el efecto neuroprotector de la C-FC o la FCB como principio activo en modelos experimentales de isquemia/reperfusión cerebral (I/R), la identificación de los mecanismos involucrados ni su potencial mitoprotector utilizando mitocondrias aisladas de cerebro como modelo experimental.

### **Problema Científico**

La urgente necesidad de identificar nuevos tratamientos para la IC conlleva a la evaluación de la C-FC y la FCB como potenciales candidatos farmacológicos a partir de sus capacidades de bloquear la cascada isquémica, en modelos experimentales que sean predictivos para su aplicación clínica.

### **Hipótesis**

Las propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias e inmunomoduladoras de la C-FC, y de su cromóforo, la FCB, permiten que estas moléculas bloqueen diferentes procesos involucrados en la cascada isquémica cerebral, por lo que pueden actuar como neuroprotectores en modelos experimentales de esta enfermedad.

### **Objetivo General**

Evaluar el posible efecto neuroprotector de la C-FC y la FCB en modelos experimentales de IC y elucidar los mecanismos moleculares involucrados en sus acciones.

### **Objetivos Específicos**

1. Determinar el efecto mitoprotector *in vitro* de la C-FC frente a daños de tipo excitotóxico.
2. Evaluar la capacidad inhibitoria de la C-FC sobre la reacción de Fenton.
3. Demostrar el efecto de la C-FC y la FCB sobre la viabilidad de líneas neuronales frente al daño excitotóxico u oxidativo.
4. Identificar los efectos protectores de la C-FC en un modelo de isquemia/reperfusión cerebral global en gerbos de Mongolia.
5. Determinar la acción anti-isquémica *in vivo* de la C-FC y la FCB en retinas de ratas.
6. Identificar los mediadores moleculares del efecto de la C-FC y la FCB en un modelo de penumbra isquémica por hipoperfusión cerebral aguda en ratas.
7. Demostrar el efecto neuroprotector de la C-FC en un modelo de isquemia/reperfusión cerebral focal inducido por endotelina-1 en ratas.

### **Tareas experimentales**

1. Evaluar el efecto de la C-FC sobre la transición de permeabilidad mitocondrial inducida por  $\text{Ca}^{2+}$ /fosfato mediante técnicas espectrofluorimétricas, y electro/inmunoquímicas.
2. Determinar si la C-FC inhibe la reacción de Fenton generada por voltametría cíclica.
3. Evaluar el efecto de la C-FC y FCB sobre la viabilidad de las células PC12 y SH-SY5Y a través de ensayos espectrofotométricos.
4. Evaluar la capacidad protectora de la C-FC en el modelo de oclusión bilateral transitoria de las Arterias Carótidas Comunes de gerbos de Mongolia, mediante parámetros neurológicos, conductuales, histológicos y bioquímicos.

5. Determinar, mediante un análisis histológico, las acciones protectoras de la C-FC y la FCB sobre las neuronas de retina de ratas sometidas a una isquemia/reperfusión.
6. Evaluar el efecto de la C-FC y la FCB sobre la expresión de genes asociados a eventos fisiopatológicos de la IC y sobre marcadores bioquímicos de estrés oxidativo en ratas con hipoperfusión cerebral aguda.
7. Determinar el efecto de la C-FC sobre el déficit neurológico, el peso corporal, el volumen de infarto cerebral medido por histología, y la expresión de la NOX2/gp91phox evaluada por inmunohistoquímica, en ratas con una IC focal inducida por Endotelina-1.

### **Novedad científica**

Diversos aspectos destacan la novedad científica de los resultados de esta tesis:

1. Se reporta por primera vez en la literatura científica el efecto neuroprotector de la C-FC y la FCB en modelos *in vivo* de daño cerebral por isquemia/reperfusión.
2. Se evidencia, por primera vez, un efecto mitoprotector *in vitro* de la C-FC, lo que confirma que la mitocondria juega un importante papel en los mecanismos de acción de esta molécula.
3. Se demuestra, por primera vez, que la C-FC y la FCB modulan un grupo de genes asociados a la respuesta inflamatoria, la remielinización, la regulación de la muerte celular, la neuroplasticidad y la angiogénesis, en ratas sometidas a una hipoperfusión cerebral en fase aguda.
4. Se demuestra que la C-FC inhibe la expresión y la actividad de la NADPH oxidasa, lo que está involucrado en la protección del tejido cerebral dañado por una isquemia/reperfusión focal en ratas.

### **Importancia teórico-práctica**

El principal aporte de esta tesis radica en la caracterización del efecto neuroprotector de la C-FC y la FCB en diferentes modelos experimentales de IC, lo cual ofrece una alternativa farmacológica novedosa para las enfermedades cerebrovasculares, que constituyen la tercera causa de muerte en Cuba. La investigación permitió identificar, además, diversos mediadores de sus mecanismos de acción a distintos niveles de organización, desde el sub-celular (mitocondrias aisladas), el celular (líneas neuronales) hasta el de organismo (gerbos, ratas), con una visión integradora y holística, teniendo en cuenta las acciones previamente reportadas para estas moléculas y las nuevas propiedades que se describen en la tesis. Desde el punto de vista práctico, la demostración de la capacidad protectora de la FCB fue presentada una patente, concedida ya en Cuba y solicitada en otros países, lo cual abre la posibilidad de su futura comercialización como tratamiento novedoso para contrarrestar la graves consecuencias clínicas de un ictus isquémico, que podría generar ingresos para la economía del Estado cubano. La extensión de estos resultados con el empleo de combinaciones farmacéuticas que incluyan a estas moléculas para el tratamiento de otros tipos de accidentes cerebrovasculares, tales como la hemorragia cerebral y la demencia vascular permitiría además, beneficiar a un mayor número de pacientes que sufren de esta patología.

Los resultados están avalados por 3 publicaciones en revistas internacionales de alto impacto como primer autor, 18 presentaciones en eventos científicos internacionales (4 resúmenes publicados, 3 premios a carteles), 13 premios científicos (incluyendo 1 Premio Nacional de la Academia de Ciencias de Cuba y 2 Premios Anuales de la Salud) y 1 patente concedida en Cuba y solicitada en otros países.

## 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Enfermedad Cerebrovascular de tipo isquémica

#### 1.1.1. Clasificación

Las Enfermedades Cerebrovasculares (ECVs) incluyen a un grupo de trastornos ocasionados por un proceso patológico en uno o varios vasos sanguíneos cerebrales. Entre estos procesos se pueden encontrar las lesiones en la pared vascular, la oclusión o ruptura del vaso y el incremento en la viscosidad de la sangre.<sup>25</sup> Son sinónimas las denominaciones accidente o ataque cerebrovascular, apoplejía y el término latino “ictus”, que al igual que su correspondiente anglosajón “stroke”, significa “golpe”, indicando el carácter brusco y súbito de la patología. Las ECVs son heterogéneas y se han identificado más de 150 causas conocidas. Se han realizado diversas clasificaciones de acuerdo a diferentes criterios (ej. naturaleza, localización, presentación clínica, causa), a partir de registros de casos clínicos, entre las cuales se encuentran las del Instituto Nacional de Desórdenes Neurológicos y de Ictus, de los Estados Unidos (del inglés “National Institute of Neurological Disorders and Stroke”), del Proceso 10172 en el Registro de Ictus Agudo (del inglés “Trial of Org 10172 in Acute Stroke Registry”, TOAST), del Registro de Ictus de Lausanne (del inglés “Lausanne Stroke Registry”) y del Proyecto Ictus de la Comunidad de Oxfordshire (del inglés “Oxfordshire Community Stroke Project”, OCSP).<sup>26</sup>

La Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares ha unificado los criterios mencionados anteriormente generando un sistema de clasificación usado en los países del área (Tabla 1), incluyendo Cuba.<sup>6</sup>

**Tabla 1.** Clasificación de las ECVs según su naturaleza.<sup>27</sup>

Criterio	Categorías		
<b>Naturaleza</b>	Ictus isquémico	Focal	Ataque Isquémico Transitorio
		Infarto Cerebral	
	Global		
	Ictus	Hemorragia subaracnoidea	
	hemorrágico	Hemorragia	Parenquimatosa
		cerebral	Ventricular
	ECV asintomática		
	Encefalopatía hipertensiva		
	Demencia vascular		

De acuerdo al mecanismo etiológico, el ictus isquémico focal se subdivide en:

- a) Aterotrombótico: estenosis u oclusión arterial debido a un trombo formado sobre una placa aterosclerótica u otra lesión vascular.
- b) Embólico: oclusión arterial causada por un émbolo distal, por ejemplo un trombo desprendido que impacta distalmente, o debido a una patología cardíaca.
- c) Hemodinámico: ocurre cuando existe una hipoperfusión global crítica y el flujo colateral compensatorio es insuficiente.
- d) Lacunar: lesión de pequeño tamaño (<1,5 cm de diámetro) en arteriolas perforantes cerebrales que son frecuentes en pacientes con hipertensión arterial crónica.
- e) De causa inhabitual: de tamaño y localización variable, ocasionado por enfermedades sistémicas (ej. infecciones, tumores, alteraciones metabólicas).

- f) De causa indeterminada: se define cuando el origen es desconocido, se han descartado los subtipos anteriores o coexiste más de una posible etiología, o de lo contrario, no se realiza un estudio exhaustivo completo.

Recientemente, se ha propuesto un sistema y un algoritmo clasificatorio basado en una escala patológica (grados 1-3) y niveles de evidencia diagnóstica (A-C), partiendo de cuatro fenotipos predeterminados: aterotrombosis (A), enfermedad de pequeño vaso (S), cardioembolismo (C) y otras causas (O) ([www.asco-classification.org](http://www.asco-classification.org)).<sup>28</sup>

### **1.1.2. Epidemiología**

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), cada año 15 millones de personas en el mundo sufren un accidente cerebrovascular, de las cuales cinco millones mueren y otros cinco millones quedan permanentemente discapacitados.<sup>2</sup> Un estudio reciente muestra, a partir de la revisión de 167 publicaciones relacionadas con la epidemiología de las ECVs en 51 países desde 1971 hasta el 2010, que su incidencia (entre 50-350/100 000 habitantes) y mortalidad (entre 20-210/100 000 habitantes) poseen tasas variables entre las distintas regiones, relacionado posiblemente con la proporción poblacional de personas en edad por encima de los 65 años.<sup>29</sup> Diferentes factores de riesgo poblacionales contribuyen a estas diferencias, pero también las disparidades en el acceso a servicios de cuidados intensivos, unidades de ictus o en políticas de prevención.

Datos reportados por la Asociación Americana del Corazón muestran que cada año 795 000 estadounidenses sufren un ataque cerebrovascular (ocurre un ictus cada 40 segundos aproximadamente en ese país), de los cuales el 87% es de origen isquémico y el resto es de origen hemorrágico (10% parenquimatoso/ventricular, 3% subaracnoideo). Cada cuatro minutos

ocurre una muerte por esta causa, estimándose 1 de cada 19 muertes en el 2010 y siendo la cuarta causa de muerte en el país.<sup>5</sup> Este mejoramiento en la mortalidad por ECV es un reflejo de las estrategias de prevención implementadas (ej. control de la presión arterial, de la hiperlipidemia y del tabaquismo).<sup>30</sup>

En Cuba, las ECVs continúan siendo la tercera causa de muerte incluyendo todas las edades y todas las provincias del país, después de los tumores malignos y las enfermedades del corazón, y muestra, además, un incremento sostenido. Por ejemplo, la tasa de mortalidad aumentó en aproximadamente un 10% en el 2012 respecto al 2000 (de 72,8 a 79/100 000 habitantes).<sup>1</sup> Una tendencia al incremento se ha pronosticado también en otras regiones, como es el caso de Europa (de 1,1 millones en 2000 a 1,5 millones en 2025).<sup>31</sup> En China, la tasa se encuentra entre 205-584/100 000 habitantes para edades comprendidas entre 45-74 años.<sup>32</sup>

### **1.1.3. Modelos experimentales**

El advenimiento del siglo XX trajo aparejado la estandarización y aplicación de modelos experimentales para el ictus isquémico, lo cual ha permitido un gran avance en el estudio de la fisiopatología y en la evaluación de estrategias terapéuticas, con énfasis en el carácter predictivo y la relevancia clínica.<sup>33</sup> Sin embargo, han existido discrepancias entre los resultados experimentales y la situación clínica, lo cual puede derivarse de alguna de las etapas de la investigación preclínica: la selección adecuada del modelo experimental y el método para inducir la isquemia, el método apropiado para evaluar y analizar el daño isquémico, y la interpretación correcta de los resultados.<sup>34</sup> A continuación se resumen los principales sistemas experimentales usados hasta el momento para el estudio de los trastornos isquémicos.

**Modelos *in vitro***

Los modelos *in vitro* incluyen tipos celulares específicos que componen la unidad neurovascular (neuronas, microglia, oligodendrocitos, astrocitos, células endoteliales, pericitos)<sup>35</sup>. Entre las líneas celulares, cultivos primarios, organotípicos o rodajas tisulares de uso más extendido se encuentran: a) origen neuronal: PC12,<sup>36</sup> SH-SY5Y,<sup>37</sup> HCN2,<sup>38</sup> neuronas corticales<sup>39</sup> e hipocampales<sup>40</sup> primarias; b) origen microglial: BV2,<sup>41</sup> microglia primaria;<sup>42</sup> c) origen oligodendrocítico: N20.1,<sup>43</sup> cultivo primario de células precursoras de oligodendrocitos o de nervio óptico;<sup>44</sup> d) origen astrocítico: U251-MG, U373-MG, CCF-STTG1,<sup>45,46</sup> astrocitos primarios;<sup>47</sup> d) origen endotelial: HUVEC;<sup>48</sup> e) pericitos primarios.<sup>49</sup> El diseño de estos estudios *in vitro* puede incluir diversos mediadores de la cascada isquémica en los medios de cultivo, siempre que su receptor esté presente en el tipo celular bajo análisis, tales como el glutamato (excitotoxicidad neuronal),<sup>50</sup> un inductor de estrés oxidativo (ej. hidroperóxido de tert-butilo,<sup>51</sup> peróxido de hidrógeno,<sup>52</sup> hierro),<sup>53</sup> un mediador inflamatorio (ej. citocina),<sup>54</sup> la deprivación trófica<sup>55</sup> o sérica.<sup>56</sup> A su vez, se han establecido protocolos específicos para la supresión de la glucosa y del oxígeno con medios de cultivo e incubadoras adecuados.<sup>57</sup> A pesar de que el estudio de tipos celulares individuales ofrece la ventaja de determinar las diferencias particulares en la sensibilidad y en los niveles de respuesta intracelular a los eventos isquémicos,<sup>58</sup> estos no permiten investigar las múltiples interacciones que se establecen entre ellos como unidad neurovascular. Por tal razón, recientemente se han ido desarrollando diversas metodologías para cumplimentar este objetivo, como por ejemplo el co-cultivo de rodajas tisulares con células endoteliales,<sup>59</sup> o dispositivos tridimensionales que combinan el cultivo de múltiples tipos celulares con instrumentos analíticos.<sup>60</sup>

**Modelos *in vivo***

Como se ha mencionado anteriormente, el ictus isquémico se puede presentar de distintas formas, en dependencia de la localización, la causa, la gravedad y el impacto funcional en el paciente. De igual manera, no existe un único modelo universal para estudiar esta enfermedad. Por el contrario, se han reportado diversos sistemas experimentales que difieren, entre otros factores, en la especie y género animal usado, el método de inducción de la isquemia, la arteria que se ocluye, la presencia o ausencia de factores de comorbilidad y el tipo de anestesia empleada.<sup>61</sup> Se han reportado una serie de recomendaciones para estudios preclínicos, entre las cuales se destacan el uso de al menos dos modelos diferentes en dos especies distintas<sup>62</sup> y el adecuado diseño experimental y estadístico.<sup>63</sup>

Los métodos de inducción de IC focal se pueden subdividir de acuerdo al abordaje quirúrgico empleado. Un primer grupo requiere la apertura de un área del cráneo para tener acceso directo a las arterias cerebrales, y su oclusión entonces se puede llevar a cabo por ligadura con sutura, o con un clip, por fototrombosis, por electrocoagulación o por inyección intracerebral del péptido vasoconstrictor endotelina-1. Estos métodos están asociados con una baja mortalidad y son reversibles, permitiendo restablecer el flujo sanguíneo en la arteria ocluida.<sup>64</sup> Han sido empleados tanto en roedores (ratas, ratones),<sup>65</sup> conejos,<sup>66</sup> perros,<sup>67</sup> cerdos<sup>68</sup> como en primates.<sup>69</sup>

Un segundo grupo comprende aquellos procedimientos que utilizan la vía intra-arterial a través del abordaje sobre el cuello para sellar la arteria cerebral de interés, principalmente la Arteria Cerebral Media (ACM),<sup>70</sup> originándose diferentes variantes, por ejemplo en el caso de la sutura intraluminal, de acuerdo a las particularidades de la sutura empleada (recubierta de silicona o de poli-L-lisina) y el cierre de vasos adicionales para manipular el flujo sanguíneo colateral.

Originalmente descrito en ratas,<sup>71</sup> también se ha empleado en ratones,<sup>72</sup> conejos,<sup>73</sup> gerbos<sup>74</sup> y primates.<sup>75</sup> Otros modelos que no emplean la craneotomía son los de tipo embólicos, entre ellos están los que inducen la coagulación sanguínea: a) la inyección de trombos autólogos en arterias extra-craneales para que alcancen a las intra-craneales;<sup>76</sup> b) la introducción de materiales embólicos artificiales, tales como silicona,<sup>77</sup> polivinilsiloxano,<sup>78</sup> o de trombos heterólogos.<sup>79</sup> Además, entre los métodos embólicos que no emplean la coagulación está la oclusión por microesferas.<sup>80</sup>

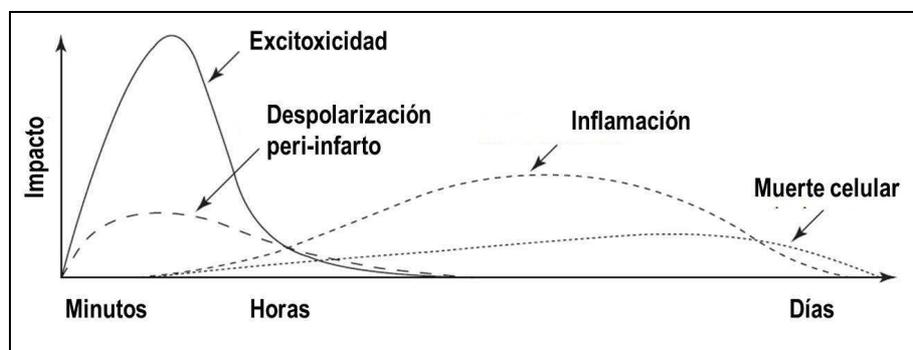
Por otro lado, también se han establecido modelos de IC global, los cuales se pueden subdividir de acuerdo al procedimiento empleado en:<sup>81</sup>

1. Inducidos por parada cardíaca: a) Fibrilación ventricular; b) Inyección intracardíaca de cardiopléjicos; c) Desangramiento; d) Ahogamiento; e) Asfixia.
2. Interrupción de la circulación cerebral:
  - 2.1. Completa: a) Oclusión de las arterias carótidas comunes en gerbos; b) Oclusión de las arterias carótidas comunes en ratas más hipotensión/hipoxia; c) Oclusión simultánea de las arterias carótidas comunes y las arterias vertebrales en ratas; d) Estrangulación cervical; e) Decapitación.
  - 2.2. Incompleta: a) Hipotensión arterial; b) Oclusión de las arterias carótidas comunes en ratas; c) Hipertensión intracraneal.

Además, es necesario controlar diversos factores experimentales que pueden influir en la reproducibilidad del daño isquémico obtenido. Por ejemplo, la temperatura corporal, la presión sanguínea, la glucemia, los gases arteriales, el tipo de anestesia, así como incluir animales dentro de un rango determinado de peso y de edad similar.<sup>82</sup>

### 1.1.4. Fisiopatología

El daño cerebral luego de la interrupción del flujo sanguíneo cerebral (FSC) se establece a partir de la drástica caída en el soporte energético cerebral, generando una serie compleja de eventos fisiopatológicos que evolucionan progresivamente en tiempo y espacio, de una manera no lineal, concomitante y con múltiples niveles fenomenológicos. Estos incluyen tanto al nivel molecular, sub-celular, celular (unidad neurovascular), regional encefálico y el de individuo, hasta diferencias poblacionales de acuerdo a la base genética y a los factores de riesgo presentes. Además, diversos mediadores tienen carácter bifásico (pueden ser dañinos o beneficiosos dependiendo del estado previo del tejido o de la etapa post-isquémica en que se encuentren actuando).<sup>83</sup> Entre los procesos fundamentales que median la fisiopatología del ictus isquémico se encuentran la excitotoxicidad mediada por el glutamato, las despolarizaciones peri-infarto, el estrés oxidativo, la inflamación y la muerte celular (Fig. 1).<sup>84</sup>



**Fig. 1.** Evolución temporal de procesos fundamentales de la cascada isquémica cerebral.

En 1977, Astrup y cols.<sup>85</sup> demostraron mediante mediciones electrofisiológicas la existencia de regiones que eran disfuncionales pero todavía viables en primates sometidos a una IC focal, en las áreas periféricas del ictus. Estas mostraban un flujo sanguíneo moderado y neuronas que todavía retenían su potencial de membrana de reposo. Cuando se incrementaba la presión

sanguínea y el flujo colateral aumentaba, estas áreas se recuperaban y los potenciales de acción eran restaurados. Sin embargo, la restauración era dependiente del tiempo. Los autores denominaron a esas áreas con el término “penumbra”, probablemente haciendo referencia al carácter intermedio entre zonas de luz (ej. vida) y oscuridad (ej. muerte). A partir de entonces, la penumbra, definida como aquellas regiones cerebrales que tras un ataque isquémico eran afectadas pero que todavía se mantenían con vida, ha sido el blanco fundamental para intervenciones terapéuticas.<sup>86</sup> Aunque todavía no es conocido con exactitud todos los procesos que median la dinámica cerebral en la penumbra, los diferentes abordajes metodológicos empleados hasta el momento han ido revelando aspectos importantes de la cascada isquémica que a continuación se mencionan.

#### **1.1.4.1. Excitotoxicidad mediada por el glutamato**

Como consecuencia del bloqueo arterial, se interrumpe el suministro de O<sub>2</sub> y glucosa al tejido cerebral, que conduce al cese de la fosforilación oxidativa en la respiración mitocondrial y a la disminución del ATP. En estas circunstancias, una fuente energética alternativa es la glucólisis anaerobia, la cual sin embargo, genera altas concentraciones de ácido láctico, que provoca una disminución del pH tisular.<sup>87</sup> Esta acidosis tisular es detectada por receptores de membrana neuronal denominados canales iónicos sensibles a ácido (del inglés: “acid-sensing ion channel”, ASIC), complejos hetero u homotriméricos permeables al Ca<sup>2+</sup> que producen efectos dañinos neuronales luego de un ataque isquémico.<sup>88</sup>

Como los mecanismos encargados de mantener la homeostasis iónica son dependientes de ATP (ej. ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, ATPasa de Ca<sup>2+</sup> de la membrana y del retículo endoplasmático), esta se pierde rápidamente luego del ataque isquémico. Al incrementarse el Na<sup>+</sup> intracelular ocurre una

despolarización de la membrana neuronal responsable de una rápida elevación del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico (debido a canales de  $\text{Ca}^{2+}$  sensibles al voltaje). Este promueve la liberación de glutamato desde las terminales pre-sinápticas, el cual luego interactúa con sus receptores ionotrópicos post-sinápticos tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) y no-NMDA, como el  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y el de kainato (KA), produciendo a su vez una entrada masiva de calcio, sodio y agua a la neurona. Estos cambios traen como consecuencia el aumento del edema tisular y del volumen celular, lo que produce la lisis celular osmótica o muerte por necrosis temprana en el foco isquémico.<sup>89</sup> El glutamato se acumula en el espacio sináptico al no ser reciclado completamente por ejemplo por los astrocitos, e induce otros procesos deletéreos. Esta acumulación conduce a un continuo aumento del influjo de  $\text{Ca}^{2+}$  a las neuronas, mediador fundamental del proceso conocido como excitotoxicidad. El  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular es secuestrado mayormente por la mitocondria, por lo que la disfunción de este orgánulo durante el evento isquémico lo convierte en pieza clave en el daño neuronal por excitotoxicidad.<sup>90</sup> Además, el retículo endoplasmático (RE) también participa en el control de los niveles citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$ , y la isquemia induce alteraciones en sus mecanismos de captación/liberación de este importante catión. Entre estos se encuentran los receptores de rianodina (RyRs) o de trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3\text{Rs}$ ), ambos canales iónicos permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  y responsables de su liberación al citosol,<sup>91,92</sup> El ataque isquémico inhibe la bomba responsable de la captación del  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el interior del RE, denominada SERCA (del inglés, “sarcoplasmic/endoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa”),<sup>93</sup> aunque también puede ser afectada por modificaciones oxidativas de especies reactivas del oxígeno (EROs), como el hidroxilo o el peroxinitrito.<sup>94</sup> Otros canales y bombas iónicas son activados por la isquemia y participan, de

igual manera, en la acumulación intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$ , como los anteriormente mencionados canales ASICs, los canales aniónicos regulados por volumen,<sup>95</sup> el transportador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ,<sup>96</sup> y los canales TRPM.<sup>97</sup>

La acumulación del  $\text{Ca}^{2+}$  libre en el citosol neuronal induce procesos catabólicos debido a la activación de proteasas, lipasas y nucleasas, así como la activación de enzimas involucradas en la generación de EROs, como la óxido nítrico sintasa (del inglés: “nitric oxide synthase”, NOS).<sup>98</sup>

El exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  activa proteasas como la calpaína que está involucrada en la liberación del factor inductor de apoptosis de la membrana mitocondrial (del inglés: “apoptosis inducing factor”, AIF).<sup>99</sup> El  $\text{Ca}^{2+}$  puede, además, perturbar la dinámica estructural de la mitocondria por fragmentación, mitofagia, mitogénesis o fisión/fusión,<sup>100</sup> la cual a su vez puede estar implicada en los procesos de muerte neuronal.<sup>101</sup> Un efecto fundamental del  $\text{Ca}^{2+}$  sobre la mitocondria cuando se encuentra a niveles suprafiológicos, se ha denominado la Transición de Permeabilidad Mitocondrial (TPM), caracterizada por el incremento en la permeabilidad de las membranas mitocondriales a la libre difusión de solutos con dimensiones menores a 1,5 kDa (como por ejemplo el agua), cuya composición molecular todavía no ha sido completamente elucidada.<sup>102</sup> Entre las consecuencias de la TPM se encuentran: a) disrupción de la fosforilación oxidativa; b) incremento en la actividad ATP hidrolasa de la FOF1-ATPasa, lo cual compromete aún más el balance energético celular; c) inhibición del complejo I debido a la disminución del NADH; d) liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y mediadores de cascadas de muerte celular como el citocromo c, AIF y SMAC/DIABLO.<sup>103</sup>

#### **1.1.4.2. Despolarizaciones peri-infarto**

El bloqueo del FSC induce la despolarización anóxica de las células cerebrales (neuronas y glia),

facilitada por el aumento de los niveles extracelulares de glutamato y  $K^+$ . En el foco isquémico las células se despolarizan al máximo y mueren, pero en áreas de penumbra, puede ocurrir la repolarización celular a expensas del consumo de ATP. Luego de ocurrir nuevamente el desbalance iónico y glutamatérgico, las células vuelven a despolarizarse de manera repetitiva, y se propaga hacia sitios distales hemisféricos en ondas de aproximadamente 3 mm/min en ratas, un proceso denominado despolarizaciones peri-infarto.<sup>104</sup> Estas ondas pueden tener una frecuencia de 1-4 veces/h durante al menos 6-8 h post-ictus en animales isquémicos, contribuyendo al daño cerebral mediante mecanismos aún no esclarecidos, pero se ha asociado con el agravamiento del infarto cerebral. Probablemente, estas despolarizaciones intermitentes favorezcan la acumulación de calcio intra-neuronal. Recientemente, se ha reportado que la despolarización peri-infarto más persistente se correlaciona con una hipoperfusión local más severa en ratas, tanto en IC global,<sup>105</sup> como focal.<sup>106</sup> En humanos, se ha observado que tras un ictus isquémico estas ondas de despolarización ocurren en la corteza cerebral a una velocidad de entre 1,7 y 9,2 mm/min.<sup>107</sup>

#### **1.1.4.3. Estrés oxidativo**

El estrés oxidativo es un estado patológico caracterizado por un desbalance entre la producción de especies reactivas oxidantes y la actividad de los sistemas biológicos antioxidantes (incluyendo sus niveles cuantitativos).<sup>108</sup> El término de EROs es usado aquí siguiendo el criterio de B. Halliwell (2006) en referencia a todas las moléculas que contienen oxígeno en su estructura y con capacidad de dañar o modificar a las biomoléculas mediante reacciones de oxidación-reducción. Estas incluyen a las derivadas del propio  $O_2$ , del nitrógeno, del cloro, del bromo y del sulfuro, aunque también existen otras que no contienen al oxígeno.<sup>109</sup>

La cadena de transporte electrónico (CTE) mitocondrial es la principal fuente de generación de EROs en la mayoría de las células eucariotas,<sup>110</sup> al ocurrir una reducción parcial (monoelectrónica) del  $O_2$  que produce el altamente reactivo anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), que luego es transformado a la especie más estable  $H_2O_2$  por las superóxido dismutasas mitocondriales (Mn-SOD de la matriz y Cu,Zn-SOD del espacio intermembranal).<sup>111</sup> Al ocurrir un ataque isquémico seguido por el restablecimiento al menos parcial del FSC, el tejido cerebral es reoxigenado, pero debido a las alteraciones previas de la CTE, se incrementa la producción de  $O_2^{\bullet-}$ , el cual en presencia de elevados niveles de óxido nítrico ( $^{\bullet}NO$ ) (por la activación excitotóxica de la NOS), genera una especie altamente dañina, el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ).<sup>112</sup> A partir de su capacidad oxidante y de nitración sobre proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, el  $ONOO^-$  produce, entre sus acciones biológicas deletéreas, las siguientes:<sup>113</sup> a) modificación covalente de receptores y la consecuente afectación de señales secuencia abajo; b) inhibición de enzimas antioxidantes (ej. Cu,Zn- y Mn-SOD, glutatión reductasa, glutaredoxina); c) consumo de moléculas antioxidantes (ej. glutatión); d) inhibición de enzimas del metabolismo celular (ej. gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, tirosina hidroxilasa, creatina quinasa, tirosina fosfatasas); e) modificación química de cofactores enzimáticos (ej. tetrahidrobiopterina, NADH); f) inhibición de canales iónicos (ej. canales de  $Na^+$ , canales SERCA); g) inducción de peroxidación lipídica (POL); h) modificación de bases nitrogenadas del ADN y rupturas de su doble cadena; i) bloqueo de la respiración mitocondrial, desacoplamiento e inducción de la TPM (por inactivación de los complejos I, II y V, y la oxidación de grupos tioles). Además de sus acciones directas sobre las biomoléculas, el  $ONOO^-$  genera otras especies altamente dañinas, tales como el ácido peroxinitroso ( $ONOOH$ ) en presencia de un pH tisular ácido, y los radicales anión carbonato

( $\text{CO}_3^{\cdot-}$ ) y el dióxido de nitrógeno ( $\cdot\text{NO}_2$ ) a partir de su reacción con el  $\text{CO}_2$ .<sup>114,115</sup>

Por otra parte, diversas enzimas producen EROs como un subproducto normal de su actividad, y en un ambiente isquémico también contribuyen al establecimiento del desbalance oxidativo, como por ejemplo la monoamino oxidasa.<sup>116</sup> Además, la auto-oxidación de sustancias endógenas en presencia de  $\text{O}_2$ , como la dopamina, la 6-hidroxdopamina, los grupos tioles (ej. de cisteína) y las catecolaminas, producen  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .<sup>117</sup> Unido a estos mecanismos generadores de EROs, se encuentra la activación, dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , de la fosfolipasa  $\text{A}_2$ , la cual libera ácido araquidónico, cuyo metabolismo por las lipooxigenasas y ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1,-2) hasta la formación de eicosanoides, también producen  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .<sup>118</sup>

Otra de las fuentes importantes de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  en el ictus isquémico es la enzima NADPH oxidasa, la cual comprende una familia de isoformas (Nox1-5, DUOX1-2) que incluyen varias subunidades (1 catalítica y hasta 5 reguladoras).<sup>119</sup> Esta enzima puede localizarse en diferentes membranas biológicas (ej. núcleo, RE, endosoma, fagosoma, mitocondria o membrana celular) y cataliza la transferencia de electrones desde el NADPH citosólico hasta el  $\text{O}_2$ , produciendo el anión  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (Nox1, 2, 5) o en determinadas isoformas, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Nox4, DUOX1, DUOX2). En condiciones normales, las NADPH oxidasas tienen funciones fisiológicas importantes (ej. supervivencia, migración y proliferación de células endoteliales; modulación de la respuesta inflamatoria), pero tras un ataque isquémico su sobre-activación contribuye sustancialmente al estrés oxidativo y daño cerebrales.<sup>120</sup>

Una de las especies más reactivas conocidas es el radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ). Entre sus fuentes principales se encuentran las denominadas reacciones de Fenton ( $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{Fe}^{3+} + \text{OH}\cdot + \text{OH}^-$ )<sup>121</sup> y de Haber-Weiss ( $\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}_2\text{O}_2 = \text{O}_2 + \text{OH}\cdot + \text{OH}^-$ ).<sup>122</sup> El  $\text{Fe}^{2+}$  puede ser generado por

reducción directa del superóxido ( $\text{Fe}^{3+} + \text{O}_2^{\bullet-} = \text{Fe}^{2+} + \text{O}_2$ ), o por acción dañina de este último sobre las enzimas que lo contienen (ej. cluster Fe-S), o por liberación de las proteínas secuestradoras de hierro (ej. ferritina, transferrina) inducido por las condiciones isquémicas (ej. acidosis).<sup>123</sup>

A pesar de que todas las células aeróbicas pueden sufrir daños por el estrés oxidativo, el tejido cerebral es particularmente vulnerable debido a diversas razones, entre las cuales podemos mencionar:<sup>124</sup> a) posee una alta tasa de consumo de  $\text{O}_2$  (ej. ~20% del consumo total del cuerpo humano); b) posee aminoácidos excitotóxicos; c) la generación mitocondrial de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  es alta; d) varios aminoácidos neurotransmisores son auto-oxidables; e) el hierro está presente en todo el cerebro, incluyendo el fluido cerebroespinal; f) las membranas neuronales son ricas en ácidos grasos poli-insaturados, los cuales son particularmente susceptibles a la POL; g) tiene altos niveles de ácido ascórbico, que puede actuar como un pro-oxidante en presencia de hierro; h) posee bajos niveles de glutatión peroxidasa y vitamina E, que forman parte de las defensas antioxidantes; i) las neuronas son células altamente diferenciadas que no se dividen, por lo que el daño oxidativo puede ser acumulativo e irreversible.

En respuesta a las EROs, el cerebro cuenta con sistemas de defensa antioxidante enzimáticos y no enzimáticos. La superóxido dismutasa (SOD), enzima que convierte el  $\text{O}_2^{\bullet-}$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{O}_2$ , está presente en todo el cerebro, pero debe estar acompañada por la actividad de otra enzima que sea capaz de remover el  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado. La catalasa (CAT), que realiza esta función, no tiene una expresión importante en el tejido cerebral.<sup>125</sup> Por su parte, la glutatión peroxidasa (GPx) también es capaz de eliminar el  $\text{H}_2\text{O}_2$  cerebral, acoplando su reducción con la oxidación del tripéptido Glu-Cys-Gly (glutatión o GSH) ( $\text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{GSH} = \text{GSSG} + 2\text{H}_2\text{O}$ ). La GPx, además,

también participa en la detoxificación de otros radicales, tales como peróxidos lipídicos, radicales peroxilos y alcoxilos.<sup>126</sup> Estudios con animales *knock-out* y transgénicos para estas enzimas han revelado su importancia en la protección cerebral frente al ictus isquémico.<sup>127</sup>

#### **1.1.4.4. Inflamación**

La respuesta inflamatoria luego de un ataque isquémico cerebral transita por determinadas etapas temporales, e involucra mediadores tanto locales (endotelio, microglia, astrocitos) como sistémicos (células inflamatorias circulantes, sistema del complemento). La investigación en esta área como en los restantes aspectos de la cascada isquémica, se mantiene en un desarrollo continuo, y ha demostrado que el sistema nervioso central mantiene una estrecha interacción recíproca con el sistema inmune. En etapas tempranas luego del ictus, el proceso inflamatorio comienza en el espacio intra-vascular a partir de la oclusión del vaso, cuando la hipoxia estimula la cascada de coagulación, activa el sistema del complemento, las plaquetas<sup>128</sup> y modula a las células endoteliales (ej. expresión de factores de adhesión vascular, producción de EROs, inhibición de eNOS, aumento del transporte trans-endotelial, expresión de proteasas, disminución en los niveles de proteínas de unión endotelial adyacente).<sup>129</sup> El desbalance oxidativo vascular provoca la contracción de los pericitos capilares, lo que agrava aún más la obstrucción del FSC.<sup>130</sup> Como consecuencia, ocurre una disrupción en la integridad de la BHE y la matriz extracelular, que facilita la extravasación de células inflamatorias circulantes.<sup>131</sup> Al mismo tiempo, en el espacio peri-vascular, las células mastoides liberan diversos mediadores, como la histamina, proteasas y el Factor de Necrosis Tumoral (del inglés: “Tumor Necrosis Factor”, TNF), mientras que macrófagos activados producen citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias que refuerzan la inducción de proteínas de adhesión endotelial, la ruptura de la

BHE y la trans-migración de células inflamatorias (neutrófilos, leucocitos, monocitos).<sup>132</sup> De igual manera, en el parénquima cerebral, la microglia y los astrocitos hipóxicos adquieren un estado caracterizado por, entre otros aspectos, la producción de citocinas y quimiocinas, de receptores específicos y de metaloproteinasas de la matriz extracelular,<sup>133,134</sup> contribuyendo al ambiente pro-inflamatorio.

A medida que la cascada isquémica progresa, diversos procesos inflamatorios se van estableciendo a partir de componentes de ambos sub-sistemas, el innato y el adaptativo (Tabla 2). La necrosis neuronal libera al parénquima diversas moléculas que en su conjunto se han denominado patrones moleculares asociados a daños (del inglés: “damage-asociated molecular patterns”, DAMPs) que activan a las células inflamatorias mediante diferentes receptores (ej. los de tipo Toll) expresados en microglia, macrófagos perivasculares y células endoteliales.<sup>135</sup> Las DAMPs pueden tener efectos beneficiosos o deletéreos en dependencia de la etapa del proceso inflamatorio, por ejemplo en la fase aguda post-ictus, la neutralización por anticuerpo de la proteína HMGB1 (del inglés: “high mobility group protein B1”) es neuroprotectora,<sup>136</sup> pero en etapas de resolución, la HMGB1 realiza acciones restauradoras.<sup>137</sup> Otras DAMPs conocidas son: el ácido úrico, las proteínas de choque térmico, el ATP, las proteínas S100, el heparan sulfato, y los ácidos nucleicos (ADN, ARN).<sup>138</sup>

Los componentes del sistema inmune adaptativo incluyen tanto a las células B y T, como sus productos secretados (anticuerpos, citocinas, quimiocinas). Las células T entran al parénquima cerebral tras su adhesión al endotelio facilitada por la disrupción de la BHE y las quimiocinas, y producen localmente interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), el cual es altamente tóxico para las neuronas.<sup>139</sup>

**Tabla 2.** Mediadores de la inflamación post-isquémica y sus fuentes celulares.<sup>140</sup>

Mediador / (fuente celular)	Iniciación (no transcripcional)	Amplificación (transcripcional)	Resolución (transcripcional)
<b>Moléculas de adhesión</b>	P-selectinas (CE, PLQ)	ICAM-1, VCAM-1, P-selectina, E-selectina, Mac-1, VLA-1 (CE, Leuc, MPV, MG, AC)	-
<b>Factores de crecimiento</b>	-	-	BDNF, EPO, FGF, G-CSF, GDNF, HB-EGF, IGF-1, NGF, VEGF (MG, AC, MPV, Macr, CE, Neu)
<b>Citocinas</b>	IL-1 $\beta$ (MG, MPV, CM), IL-1 $\alpha$ (PLQ), TNF (CM)	IL-1, IL-6, IL-10, IL-17, IL-20, TNF (CE, MPV, MG, AC, Neu)	TGF- $\beta$ , IL-10, IL-17, IL-23, (T cel, MG, Macr, AC)
<b>Proteasas</b>	Elastase, MMP-8, MMP-9, MT6-MMP (Leuc) Factores de coagulación (Circ), Complemento (Circ, CE, AC, Neu)	MMP2, MMP9 (CE, Leuc) Complemento (Circ, CE, AC, Neu)	MMP-9 (AC, Neu), Complemento (Circ, CE, AC, Neu)
<b>Otros mediadores</b>	Prostanoides, leucotrienos (CE, PLQ, MG, Neu) ATP (Circ, Neu), EROs (CE, PLQ, Leuc, MPV, MG, Neu)	iNOS (MG, Leuc, CE) COX-2 (Neu, MG, Leuc, CE) LOX (Neu, Leuc) PTGES (Neu, MG, Leuc, CE) NADPH oxidasa (MG, Leuc)	Ciclopentenonas prostaglandinas Lipoxinas Docosanoides (resolvinas, protectinas)

Siglas: CE: células endoteliales; PLQ: plaquetas; Leuc: leucocitos; MPV: macrófagos perivascuales; MG: microglia; AC: astrocitos; Neu: neuronas, Macr: macrófagos; CM: células mastoides; T cel: células T; Circ: células sanguíneas circulantes

El papel deletéreo en la etapa aguda post-ictus de los linfocitos T se ha demostrado por diferentes métodos, por ejemplo, la depleción o bloqueo farmacológico de células T $\gamma\delta$ ,<sup>141</sup> CD8<sup>+</sup> o CD4<sup>+</sup>,<sup>142</sup> disminuye el daño isquémico cerebral. Otro tipo de linfocito T que por el contrario, posee propiedades inmuno-supresoras y moduladoras, son las llamadas células T reguladoras, caracterizadas por la expresión de un factor transcripcional que dirige su diferenciación, el Foxp3 (del inglés: “factor forkhead box protein P3”), y la producción de IL-10 y TGF- $\beta$ .<sup>143</sup> Diversos estudios recientes muestran el papel protector de estas células frente al ictus isquémico de gravedad moderada,<sup>144</sup> e incluso su transferencia adoptiva ha mostrado efectos beneficiosos tanto

en el sistema nervioso central<sup>145</sup> como en la periferia.<sup>146</sup> Por otro lado, las células B reguladoras también han evidenciado ser protectoras frente al ictus isquémico, mediado por la disminución en la extravasación y activación de leucocitos, y de citocinas pro-inflamatorias.<sup>147,148</sup>

La respuesta inflamatoria tardía tiene como objetivo participar en la reorganización estructural y funcional del cerebro isquémico. Hasta el momento existe un conocimiento limitado de los mecanismos involucrados en esta etapa, pero las evidencias sugieren que no transita por vías pasivas, es decir, debido al agotamiento de los mediadores pro-inflamatorios deletéreos de la fase aguda, sino más bien debido a la interacción de eventos supresores de la inflamación con procesos beneficiosos derivados de la etapa pro-inflamatoria previa y con factores de supervivencia.<sup>149</sup> Por ejemplo, la microglia activada y los macrófagos infiltrados se encargan de fagocitar los restos de células muertas mediado por señales liberadas por estas. La microglia, los astrocitos, las neuronas y células del sistema inmune también producen factores de crecimiento que favorecen la recuperación funcional (Tabla 2).

#### **1.1.4.5. Muerte celular**

Distintas formas de muerte celular se han descrito en la literatura, tradicionalmente enfocado en eventos mutuamente excluyentes. Sin embargo, evidencias recientes indican que los mecanismos por los cuales una célula pierde su viabilidad comparten sitios y orgánulos sub-celulares, e incluso algunas moléculas iniciadoras y efectoras. La forma de muerte que predominará depende, entre otros factores, del estado de desarrollo del organismo, del contexto celular y de las señales extracelulares presentes.<sup>150</sup>

El estudio del tipo de muerte celular y la definición del mecanismo por el que transita puede ser una medida del efecto farmacológico de determinado tratamiento, o validar blancos terapéuticos

relevantes para la clínica. La mayoría de los estudios hasta el momento se han enfocado en la sustancia gris cerebral, pero recientemente la identificación de los mediadores de muerte de otros tipos celulares de la unidad neurovascular ha cobrado importancia, tales como los oligodendrocitos que conforman la sustancia blanca cerebral.<sup>151</sup>

La mitocondria está involucrada tanto en los procesos de necrosis, apoptosis, como de autofagia luego del ictus isquémico, dependiendo de la severidad del daño, la presencia de reperusión tisular y la naturaleza de la ruta de señalización celular. La IC bloquea completamente la producción de ATP por la mitocondria en las neuronas en el foco isquémico, provocando, en cuestión de minutos, una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y alteraciones iónicas que resulta en la muerte por necrosis.<sup>152</sup> Sin embargo, en zonas donde la caída del FSC es menos severa, diversas vías de señalización celular involucran a la mitocondria en eventos que desencadenan la apoptosis, entre ellos, la liberación de citocromo c al citoplasma, donde interactúa con factores citosólicos como Apaf-1 y caspasa-9, activa la caspasa-3 y el subsecuente clivaje de proteínas sustratos, dentro de los que se incluye la poli-ADP-ribosa polimerasa.<sup>153</sup>

Estudios recientes sugieren que la autofagia pudiera contribuir a la reestructuración del tejido cerebral dañado mediante la degradación de agregados proteicos y orgánulos defectuosos.<sup>154</sup> Sin embargo, la desregulación de este proceso también conlleva a efectos deletéreos cerebrales. Diversas EROs son capaces de oxidar e inactivar a proteínas reguladoras o efectoras de la autofagia neuronal, por ejemplo el  $\text{H}_2\text{O}_2$  sobre la proteína Atg4, la S-nitración por  $\bullet\text{NO}$  sobre IKK $\beta$  (inhibiendo la vía de mTOR) y JNK (inhibiendo la disociación de beclina/Atg6 de Bcl-2).<sup>155</sup> La modulación adecuada de los procesos autofágicos podría constituir, por tanto, una estrategia terapéutica para el ictus, por ejemplo para reciclar componentes celulares dañados

como las mitocondrias disfuncionales<sup>156</sup> y las proteínas alteradas que se van acumulando en el medio intracelular.<sup>157</sup>

### 1.1.5. Estrategias terapéuticas

Hasta el momento, existen cuatro intervenciones que se emplean en la práctica clínica y han demostrado cierta mejoría en los pacientes elegibles al ser aplicadas en la etapa aguda post-ictus: 1) el manejo de los pacientes dentro de unidades hospitalarias especializadas (unidades de ictus);<sup>158</sup> 2) el uso de la aspirina antes de las 48 h post-ictus;<sup>159</sup> 3) la hemisferotomía o descompresión quirúrgica;<sup>160</sup> 4) la trombolisis por el factor activador del plasminógeno tisular (tPA) antes de las 4,5 h post-ictus.<sup>161</sup> Un número considerable de estrategias se han evaluado y continúan probándose tanto en modelos experimentales como en ensayos clínicos con el objetivo de incrementar el arsenal terapéutico frente al ictus isquémico. Estas pueden ser divididas en: a) abordajes que mejoran la aplicación del tPA o nuevas moléculas trombolíticas; b) remoción mecánica del trombo; c) neuroprotección y restauración neurológica.

Para incrementar la efectividad del tPA se han implementado los denominados protocolos “puente”, en los cuales se aplica el tPA por vía intravenosa inicialmente, y si no se demuestra la re-canalización arterial dentro de un período de tiempo determinado, se realiza una segunda administración de ese fármaco por vía intra-arterial,<sup>162</sup> que puede ser combinado con dispositivos mecánicos, por ejemplo los sistemas MERCI<sup>163</sup> o PENUMBRA.<sup>164</sup> Además, también se ha demostrado experimentalmente y en estudios clínicos la efectividad de la aplicación concomitante del ultrasonido con tPA, mediada por un mejor transporte del fármaco hasta el coágulo que bloquea la arteria.<sup>165</sup> Entre las nuevas moléculas trombolíticas con potencialidades clínicas se encuentran la desmoteplasa,<sup>166</sup> la tenecteplasa,<sup>167</sup> el ancrod,<sup>168</sup> la batroxobina,<sup>169</sup> y el

activador del plasminógeno tipo uroquinasa tisular humana (del inglés: “Human Tissue Urokinase type Plasminogen Activator”, HTUPA).<sup>170</sup> Algunas de ellas tienen una mayor especificidad por la fibrina que el tPA, por lo que reducen el riesgo de complicaciones por hemorragias.

Las estrategias neuroprotectoras se dirigen a bloquear la cascada isquémica en uno o varios de sus mecanismos patológicos. Dentro de esta categoría se incluyen, además, las terapias que modulan los procesos endógenos de protección, como el pre-condicionamiento,<sup>171</sup> y a aquellas enfocadas en la regeneración/restauración del tejido cerebral desde el punto de vista estructural y funcional. Tras más de 30 años de estudios preclínicos con este tipo de moléculas, todavía no se ha logrado aplicarlas en la práctica clínica, lo que ha conllevado a una diversidad de criterios para explicar este hecho. En un estudio que revisó críticamente las evidencias de 1026 moléculas evaluadas como posibles tratamientos del ictus isquémico, se encontró que aquellas testadas en ensayos clínicos (114) no habían mostrado mayor efectividad experimental en fase pre-clínica que aquellas evaluadas solo en modelos animales (912), lo cual pone en duda si la selección de los mejores candidatos hacia ensayos clínicos ha sido adecuada o permeada por criterios económicos.<sup>172</sup> El mayor número de estudios clínicos reportados de neuroprotectores en el infarto cerebral ha sido para bloqueadores de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , seguido por antioxidantes/secuestradores de radicales libres, hipotermia, bloqueadores de canales de  $\text{Na}^{2+}$  y antagonistas de receptores de glutamato.<sup>13</sup> Entre las recomendaciones más importantes para llevar a cabo los estudios preclínicos de IC se encuentran las reportada por el grupo STAIR (del inglés: “Stroke Therapy Academic and Industry Roundtable”), resaltando por ejemplo el empleo de al menos dos modelos en dos especies animales diferentes,<sup>173</sup> y que han sido, además,

extendidas también para ensayos clínicos.<sup>174</sup> Las estrategias de restauración neurológica implican la recuperación cognitiva y motora mediante diversos mecanismos, como por ejemplo la reestructuración de las conexiones neurales remanentes, o la génesis de nuevas neuronas y conexiones. Entre los candidatos evaluados hasta el momento se encuentran las células madres (ej. embrionarias, de médula espinal, progenitoras adultas multipotentes, umbilicales y neurales).<sup>175</sup>

## **1.2. C-Ficocianina y Ficocianobilina**

### **1.2.1. Estructura y función**

La C-Ficocianina (C-FC) es un compuesto de origen natural, una biliproteína, que se encuentra en algunas algas verde-azules como la *Spirulina platensis*, la cual es frecuentemente utilizada como un suplemento dietético en muchos países por sus propiedades nutricionales y citoprotectoras.<sup>176</sup> La C-FC es una proteína altamente conservada que forma parte del ficobilisoma, un complejo proteínico macromolecular cuya función es utilizar energía solar para el aparato fotosintético de las cianobacterias.<sup>177</sup> Las clases más comunes de ficobiliproteínas son: Alo-Ficocianina, C-FC y Ficoeritrina. Todas están formadas por una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$  con pesos entre 17-20 kDa. Contienen grupos prostéticos tetrapirrólicos lineales isoméricos diferentes (grupo cromóforo o bilin) y que difieren en cuanto a la disposición de sus dobles enlaces. Estos grupos bilin están unidos a las cadenas polipeptídicas mediante enlaces tioéter a residuos específicos de cisteína.<sup>178</sup> En la C-Ficocianina el grupo bilin se denomina Ficocianobilina (FCB), y contiene tres en su estructura, uno de ellos unido a la cisteína 84 de la cadena  $\alpha$  y el resto a las cisteínas 84 y 155 de la cadena  $\beta$ , respectivamente (Anexo 1).<sup>20</sup>

## 1.2.2. Efectos farmacológicos

### 1.2.2.1. Estudios *in vitro*

Una gran parte de los estudios *in vitro* con C-FC se han realizado con el propósito de demostrar sus propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias, citoprotectoras y anti-tumorales. Ensayos de quimioluminiscencia demostraron la acción secuestradora de la C-FC sobre los radicales alcoxilos e hidroxilos, además de la inhibición de hidrocloreuro 2,2' azobis 2-amidinopropano (HAAP), un iniciador de la formación de radicales libres y de la POL.<sup>179</sup> La C-FC inhibe el incremento de peróxidos lipídicos de microsomas del hígado de ratas después de la co-incubación con ácido ascórbico y hierro.<sup>180</sup> Basado en estos resultados también se ha reportado que la C-FC protege los eritrocitos humanos de la lisis celular.<sup>181</sup> La interacción de ambos, la C-FC y la FCB, con peroxinitro (ONOO<sup>-</sup>) fue estudiada espectroscópicamente y se demostró que son eficientes secuestradores de esta ERO.<sup>21</sup> Por otra parte, estudios en líneas celulares han mostrado que la C-FC limita la proliferación de tumores, por ejemplo de origen leucemia mieloide,<sup>182</sup> y hepatocarcinoma.<sup>183</sup> Además, se ha observado que la C-FC es un inhibidor de la agregación plaquetaria.<sup>184</sup> Se ha demostrado también en dos sistemas experimentales (ensayo de enzima aislada y ensayo sanguíneo completo) que la C-FC es un inhibidor selectivo de la COX-2.<sup>185</sup> Otros resultados sugieren que la C-FC puede ser empleada como agente cicatrizante de heridas pues, regula transcripcionalmente el factor activador de plasminógeno tipo-uroquinasa a través de la ruta de la proteína quinasa A dependiente de AMPc e incrementa la proliferación y migración de fibroblastos humanos.<sup>186</sup> A una concentración entre 1-3 mg/mL, la C-FC previene la muerte neuronal causada por la ausencia de potasio y suero en un cultivo de células granulosas cerebelares durante 24 horas<sup>23</sup> lo que sugiere una acción neuroprotectora.<sup>187</sup>

### 1.2.2.2. Estudios *in vivo*

Estas investigaciones se han realizado principalmente con el objetivo de explorar las potencialidades anti-inflamatorias, citoprotectoras y cicatrizantes del compuesto. La C-FC inhibe el edema producido en modelos de inflamación de la pata inducida por carragenina y glucosa oxidasa,<sup>188</sup> así como en el modelo de inflamación de la oreja del ratón inducida con ácido araquidónico.<sup>189</sup> Se propuso que los efectos pueden ser debidos a la inhibición de la POL. En el modelo de artritis inducida por zimosano en ratones, la C-FC (25, 50, 100 mg/kg), administrada por vía oral, diariamente durante 8 días, suprimió la actividad de la glucuronidasa en un 60, 80 y 93%, lo que mostró una disminución de la respuesta inflamatoria.<sup>190</sup> Por otro lado, la inhibición de la COX-2 por la C-FC media sus efectos protectores contra el daño hepático inducido por CCl<sub>4</sub>, asociado además a su capacidad de secuestrar eficientemente radicales libres e inhibir la POL.<sup>191</sup> En ratones tratados intra-traquealmente con lipopolisacárido (LPS), la C-FC administrada tres horas después, logró disminuir en los pulmones los niveles de citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) y quimiocinas (CINC-3), de EROs (nitrito/nitrato, O<sub>2</sub> $\bullet$ ), así como la expresión de iNOS, COX-2 y del factor NF- $\kappa$ B, y la actividad de la mieloperoxidasa. Además, moduló la expresión de factores anti-apoptóticos (aumento de Bcl-2 y Bcl-XL) y anti-apoptóticos (disminución de Bax) mitocondriales.<sup>192</sup> La C-FC también ha sido evaluada en un modelo de colitis inducida por ácido acético en ratas, inhibiendo la actividad de mieloperoxidasa y la infiltración de neutrófilos en el tejido del colon.<sup>193</sup> La aplicación tópica de C-FC en heridas dérmicas en ratones acelera el ritmo de cicatrización,<sup>194</sup> involucrando la modulación efectiva de proteínas totales, ácido urónico y factores de crecimiento.<sup>195</sup> Por otra parte, la C-FC mejoró la recuperación cardíaca durante el daño al miocardio inducido por isquemia/reperfusión, mediado

por la activación de ERK1/2 y la expresión de Bcl-2 y también por la atenuación de p38 MAPK y caspasa-3.<sup>196</sup>

El papel neuroprotector de la C-FC ha sido examinado en un modelo de daño cerebral inducido por ácido kaínico en ratas. Los síntomas clínicos de este modelo incluyen sacudidas, temblores y alteraciones en el comportamiento. La incidencia de estos cambios fue significativamente más baja en aquellas ratas que recibieron 100 mg/kg por vía oral de C-FC.<sup>197</sup> La C-FC logró atenuar los daños causados en hígado y cerebro con una dosis intra-peritoneal de 50 mg/Kg, administrada dos veces en un intervalo de 24 horas, en un modelo de encefalopatía hepática inducida con tioacetamida en ratas.<sup>198</sup> Otros estudios preclínicos de la C-FC incluyen su papel protector y antioxidante frente a la aterosclerosis,<sup>199</sup> la hipertensión asociada al síndrome metabólico,<sup>200</sup> el daño renal inducido por HgCl<sub>2</sub><sup>201</sup> y cisplatina,<sup>202,203</sup> la catarata inducida por selenio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>)<sup>204</sup> y la encefalomiелitis autoinmune experimental en ratas.<sup>205</sup>

La C-FC posee pocos estudios toxicológicos, pero las evidencias sugieren que es altamente segura. La dosis efectiva de la C-FC en varios modelos animales de diferentes enfermedades ha sido de 25 a 300 mg/Kg, administrada por vía oral, intra-peritoneal o tópica. La dosis mayor reportada hasta el momento para la C-FC es de 3 g/Kg para ratas y ratones, por vía oral, sin mortalidad asociada. Los animales fueron observados por 14 días y no mostraron ninguna alteración en el comportamiento, y las diferencias en el peso no fueron estadísticamente significativas entre tratados y no tratados. En el análisis histopatológico no se encontraron daños en órganos y tejidos.<sup>206</sup>

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Purificación y caracterización físico-química de la C-FC y la FCB

La C-FC y la FCB fueron purificadas y caracterizadas por métodos físico-químicos por el Departamento de Física-Química del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (Anexo 1). La C-FC con más de un 90% de pureza (en lo adelante C-FC o C-FC<sub>90%</sub>) fue purificada siguiendo un procedimiento reportado.<sup>205</sup> El contenido de endotoxina se determinó por el ensayo de turbidez en lisado de amebocitos de *Limulus polyphemus*.<sup>207</sup> La C-Ficocianina comercial (Biodelta Ltd., Sudáfrica) fue obtenida con certificado de calidad No. 24326-NOP-B, a una pureza del 30% (en lo adelante C-FC<sub>30%</sub>). La purificación de FCB se describe en el Anexo 1. Antes de aplicarse, las soluciones de ambas moléculas fueron filtradas en condiciones estériles (filtros de 0,2 µm, Sartorius, Minisart®, Alemania).

### 1.3. Evaluación del efecto mitoprotector de la C-FC en mitocondrias aisladas

#### 1.3.1. Aislamiento de mitocondrias de cerebro de rata

Las mitocondrias fueron aisladas siguiendo un procedimiento previamente descrito con modificaciones menores.<sup>208</sup> Brevemente, dos ratas Wistar machos pesando 200-240 g fueron sacrificadas por decapitación, y sus cerebros fueron rápidamente removidos y colocados en 10 mL del búffer de aislamiento frío (manitol 225 mM, sacarosa 75 mM, ácido tetraacético etilenglicol (EGTA) 1mM, albúmina de suero bovino (BSA) 0,1% deslipidada y ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico (HEPES), pH 7,2). El bulbo olfatorio, el cerebelo y las regiones de la base del cerebro fueron desechadas, y los hemisferios cerebrales fueron divididos usando tijeras quirúrgicas y lavados dos veces en el búffer de aislamiento. El tejido cerebral fue manualmente homogeneizado en 20 mL de búffer de aislamiento usando un homogeneizador

tipo Dounce (20-25 vueltas). El homogenado fue centrifugado a 4 °C ( $2\ 000 \times g$ , 3 min) en un rotor Hitachi RT15A5 (Japón), y el sobrenadante resultante fue nuevamente centrifugado ( $12\ 000 \times g$ , 8 min). El pellet fue suavemente resuspendido en 10 mL de búffer de aislamiento conteniendo 20  $\mu$ L de digitonina 10% (para inducir la lisis de los sinaptosomas), mediante el empleo de un fino pincel, y luego centrifugado a  $12\ 000 \times g$  por 10 min. El pellet oscuro obtenido fue resuspendido en 10 mL de búffer de aislamiento sin EGTA ni BSA y centrifugado nuevamente ( $12\ 000 \times g$ , 10 min), y el pellet resultante fue resuspendido en 200  $\mu$ L de medio estándar de incubación (MEI: manitol 225 mM, sacarosa 75 mM y  $K^+$ HEPES 10 mM, pH 7,2). La concentración de proteínas totales fue determinada por el método de Biuret usando BSA como estándar, y fue aproximadamente 30-50 mg/mL para cada preparación. Todos estos procedimientos se realizaron a 4 °C.

### **1.3.2. Ensayos mitocondriales**

Los experimentos empleando mitocondrias de cerebro de ratas (MCRs) aisladas fueron realizados a 30 °C con agitación magnética constante en el MEI descrito anteriormente. La relación control de respiración (cociente entre las pendientes respiratorias del estado 3 y el estado 4) fue por encima de 4, determinada luego del monitoreo del consumo de oxígeno con un oxígrafo equipado con un electrodo tipo Clark (Hansatech Instruments Ltd., Reino Unido), y con 1 mg/mL de MCRs más succinato 5 mM, rotenona 2  $\mu$ M, ADP 800  $\mu$ M y  $KH_2PO_4$  2 mM. La oligomicina a 1  $\mu$ g/mL fue usada en el estado 4. El hinchamiento mitocondrial fue estimado a partir de la disminución en la absorbancia a 540 nm usando un espectrofotómetro Hitachi modelo U-2910 (Japón). La generación de EROs en MCRs fue monitoreada empleando la sonda diacetato de diclorodihidrofluoresceína ( $H_2DCFDA$ ) a 2  $\mu$ M (Invitrogen, Life Technology Co.,

EEUU). Los cambios en la fluorescencia del producto DCF fueron monitoreados usando un espectrofluorímetro F-4500 (Hitachi, Japón) a unas longitudes de onda de excitación/emisión 503/529 nm, y los resultados se expresan como diferencias respecto al valor inicial.<sup>209,210</sup> El potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ) fue estimado mediante el monitoreo continuo de la concentración del catión lipofílico cloruro de tetrafenilfosfonio ( $\text{TPP}^+$ ) en el medio extramitocondrial<sup>211</sup> con un electrodo selectivo para  $\text{TPP}^+$  (World Precision Instruments Inc., EEUU) conectado al oxígrafo. Para el cálculo del  $\Delta\Psi$ , se asumió que el volumen de la matriz de las MCRs fue de 1,5  $\mu\text{L}$ /mg de proteína. El potencial de membrana fue calculado asumiendo que la distribución del  $\text{TPP}^+$  entre la mitocondria y el medio siguió la ecuación de Nernst. La correcciones se realizaron de acuerdo a la constante de asociación del  $\text{TPP}^+$  con la membrana mitocondrial reportada previamente.<sup>212</sup> Los resultados se expresaron como porcentaje de  $\Delta\Psi$  respecto al nivel alcanzado antes de la adición de  $\text{Ca}^{2+}$ . La liberación de citocromo c fue evaluado en las mismas condiciones que se emplearon en los experimentos de hinchamiento. La suspensión mitocondrial fue centrifugada ( $9000 \times g$ , 6 min) a 4  $^{\circ}\text{C}$ , y el sobrenadante (100  $\mu\text{L}$ ) fue mezclado con 2  $\mu\text{L}$  de un coctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, EEUU) e incubado con 25  $\mu\text{L}$  de búffer de corrida (glicerol 50%, SDS 10%, bromofenol azul 0,05%, mercaptoetanol 25%) a 95  $^{\circ}\text{C}$  por 5 min, luego sometido a una SDS-PAGE al 12% y transferido a una membrana de nitrocelulosa. Para la detección se empleó un anticuerpo monoclonal de ratón contra citocromo c (1:1000, BD Biosciences Pharmingen, EEUU), un anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, EEUU) y el sistema ECL<sup>TM</sup> (GE HealthCare, Reino Unido). Los filmes obtenidos se colocaron en un escáner digital (Hewlett Packard HP Scanjet 3770, EEUU) para la adquisición de las

imágenes. La densitometría se realizó usando el programa ImageJ 1.41 (Institutos Nacionales de la Salud [INS], EEUU). Los resultados fueron presentados como porcentaje respecto al control dañado con  $\text{Ca}^{2+}$ /fosfato.

#### 1.4. Ensayo electroquímico con C-FC

Los ensayos electroquímicos fueron realizados con un instrumento BAS CV-27 (Bioanalytical System Inc., EEUU) usando celdas electroquímicas convencionales con tres electrodos y un sensor Omnigraphic 100 (Texas Instruments, EEUU). Se empleó como electrodo de trabajo uno de carbono vidrioso con un área de  $0,0314 \text{ cm}^2$ , pulido con agua-alúmina  $1 \mu\text{M}$  y lavado meticulosamente con agua y acetona. Un alambre de platino fue usado como electrodo opuesto, y todos los potenciales se refirieron a un electrodo  $[\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}(\text{sat})]$  sin considerar el potencial del líquido de unión. La solución electrolítica de soporte (SES) se obtuvo mezclando  $\text{KCl}$   $100 \text{ mM}$  con ácido tricloroacético  $100 \text{ mM}$   $\text{pH}$  3,3, mientras que la solución de  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA ( $0,1 \text{ mM}$ ) se preparó a partir de adiciones equimolares de  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  y  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ . La solución madre de hidroperóxido  $100 \text{ mM}$  fue preparada disolviendo  $\text{H}_2\text{O}_2$   $30\%$  con la SES. Cada muestra fue desoxigenada con argón por  $20 \text{ min}$  antes de realizar las mediciones electroquímicas. La voltametría cíclica se realizó en un volumen final de  $5 \text{ mL}$  para todos los experimentos con una velocidad de barrido del potencial igual a  $30 \text{ mV/s}$  y una ventana de potencial entre  $-0,4 \text{ V}$  y  $0,4 \text{ V}$ . Los experimentos controles se llevaron a cabo en la SES en presencia de  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en presencia de ambos sin C-FC u oxígeno (purgador de argón). El ruido voltamétrico de fondo se midió en presencia de  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA pero en ausencia de peróxidos o de oxígeno (purgador de  $\text{N}_2$ ).

## 2.4. Evaluación del efecto de la C-FC y FCB en líneas celulares

### 2.4.1. Línea PC12

Las células PC12 (ATCC, EEUU) se expandieron en medio RPMI 1640 (Gibco, EEUU) suplementado con suero de caballo al 10% inactivado con calor, 5% de suero fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 0,3 mg/mL de L-glutamina a 37 °C en 5% CO<sub>2</sub>/95% aire. El medio se cambió cada dos días y las células se sub-cultivaron cada 4 días con solución de tripsina (0,05%)/EDTA (0,025%) a 3 x 10<sup>5</sup> células/mL. Para el ensayo de viabilidad, las células se cultivaron en cuadruplicado en placas de 96 pozos (pre-cubiertas con 10 µg/mL de poli-D-lisina por 1 h) a una concentración de 2 x 10<sup>4</sup> células/mL por 24 h. A continuación, fueron incubadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o glutamato recién preparados en medio completo a diferentes concentraciones durante 24 h, o pre-tratadas con C-FC o FCB durante 24 h seguido por la incubación con medio fresco conteniendo el producto y el tóxico (200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o 40 mM glutamato), por 24 h.

### 2.4.2. Línea SH-SY5Y

Las células de neuroblastoma humano SH-SY5Y (Banco de Células de Río de Janeiro, Brasil) fueron expandidas en medio DMEM (Gibco, EEUU) conteniendo suero fetal bovino 10%, penicilina G 100 UI/mL, estreptomina 100 µg/mL y anfotericina B 0,25 µg/mL, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> 5%/ aire 95% a 37 °C. El medio se cambió cada dos días, las células fueron subcultivadas cada cuatro días por tripsinización y re-sembradas a una densidad de 4 x 10<sup>5</sup> células/mL. Las células SH-SY5Y entre el tercero y séptimo pase fueron cultivadas en cuadruplicado en placas de 96 pozos a 4 x 10<sup>4</sup> células/200 µL/pozo durante 24 h. Las células fueron incubadas con *t*-BOOH recién preparado en medio completo a diferentes concentraciones

durante 6 h, o pre-tratadas con C-FC durante 24 h seguido por la incubación con medio fresco conteniendo C-FC y 25  $\mu$ M *t*-BOOH por otras 6 h.

### **2.4.3. Ensayo de viabilidad celular**

La viabilidad celular fue medida a través de los productos azules formazán obtenidos de la transformación enzimática del MTT (del inglés: “3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide”) (Sigma-Aldrich, EEUU) por las deshidrogenasas mitocondriales, las cuales son activas solamente en células viables. Después del período de incubación con los productos (C-FC o FCB) y los tóxicos ( $H_2O_2$ , glutamato o *t*-BOOH), las células fueron lavadas suavemente con PBS estéril pH 7,2 (200  $\mu$ L/pozo), y el MTT (recién preparado a 0,5 mg/mL en medio libre de suero) fue añadido a 200  $\mu$ L/pozo e incubado por 4 h a 37  $^{\circ}$ C. Después de la retirada del MTT, 200  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO) fue añadido a cada pozo para solubilizar los cristales de formazán, y la absorbancia de cada pozo fue medida a 570 nm en un lector de placas (equipos Varian Cary 50, Australia, para células SH-SY5Y; o SUMA, La Habana, Cuba, para células PC12). Los resultados fueron expresados como el porcentaje de absorbancia en relación a las células controles no dañadas.

## **2.5. Evaluación del efecto de la C-FC y FCB en modelos animales de isquemia cerebral y de los mecanismos moleculares involucrados**

### **2.5.1. Modelo de isquemia/reperfusión cerebral global en gerbos de Mongolia**

#### **2.5.1.1. Animales y diseño experimental**

Los gerbos de Mongolia machos de 60-80 g (CENPALAB, La Habana, Cuba) fueron adaptados por al menos una semana y luego mantenidos en condiciones ambientales de  $25 \pm 1$   $^{\circ}$ C y una humedad relativa de 60%, en un ciclo de 12 horas alternas de luz-oscuridad. Se les suministró

agua y alimentación *ad libitum*. Todos los procedimientos fueron aprobados por la institución, y siguieron normas bioéticas internacionales (Directiva del Consejo de Comunidades Europeas del 24 de noviembre de 1986, 86/609/EEC).

Los gerbos fueron divididos aleatoriamente en los grupos siguientes: a) grupo control (n=25 o n=20 para los esquemas profiláctico o terapéutico, respectivamente), a cuyos animales se les practicó la disección quirúrgica de las arterias carótidas comunes (ACCs) sin ocluir las; b) grupo I/R vehículo (n=33 o n=25 para los esquemas profiláctico o terapéutico, respectivamente), animales con oclusión de las ACCs y tratamiento con solución NaCl 0,9%; c) grupo I (n=31), animales isquémicos y tratados con una dosis diaria por vía oral con C-FC<sub>30%</sub> 200 mg/Kg, durante siete días anteriores a la cirugía (esquema profiláctico); d) grupo II, III y IV (n=21 cada uno), animales isquémicos y tratados con dosis acumulativas de C-FC<sub>30%</sub> de 50, 75 y 100 mg/Kg, respectivamente, a los 30 min, 3, 6 y 12 h posteriores a la cirugía (esquema terapéutico); e) grupo tratado con C-FC<sub>90%</sub> 25 mg/Kg siguiendo el mismo esquema terapéutico (n=10).

### **2.5.1.2. Procedimiento quirúrgico**

Los gerbos fueron anestesiados con hidrato de cloral (300 mg/Kg, i.p.),<sup>213</sup> y sus ACCs se ocluyeron bilateralmente durante 10 min. La interrupción de la circulación y comienzo de la recirculación se confirmó visualmente y luego la piel se suturó asépticamente. Los animales con operación simulada (grupo control) fueron anestesiados, y sus ACCs sólo fueron expuestas sin oclusión. La temperatura del cuerpo durante la oclusión vascular se mantuvo a  $36,8 \pm 0,3$  °C con una lámpara incandescente y los animales se dejaron recuperar en una manta eléctrica de calefacción. Después de que los gerbos se recuperaron de la anestesia, se les dio libre acceso al agua y la alimentación como en condiciones de mantenimiento pre-quirúrgicas.

### 2.5.1.3. Evaluación neurológica

Después de 24 h de reperfusión, un observador entrenado realizó la evaluación neurológica de los diferentes grupos experimentales siguiendo los criterios de Lawner y cols. (1979).<sup>214</sup> La escala neurológica se calcula como la sumatoria de la puntuación de diferentes signos clínicos: a) ptosis (sin síntomas = 0; un párpado parcialmente cerrado = 1; un párpado totalmente cerrado = 2; ambos párpados cerrados parcialmente = 3; ambos párpados se cerraron totalmente = 4) b) erizamiento del pelo (sin síntoma = 0; pelo erizado = 1); c) disminución del tono muscular (sin síntoma = 0; tono muscular disminuido o fuerza en las extremidades = 1); d) reflejo flexor (sin síntoma = 0; extremidades traseras ligeramente retirados cuando se pellizca = 1; no retirada de las patas traseras cuando se pellizca = 2); e) postura (normal = 0; encorvado = 1); f) patrón locomotor (normal = 0; lento = 1; no camina = 2). A mayor escala, mayor déficit neurológico, con un valor máximo de 11 puntos.

### 2.5.1.4. Determinación del volumen de infarto

Para la evaluación del infarto cerebral mediante tinción con TTC (del inglés: “2,3,5-triphenyltetrazolium chloride”),<sup>215</sup> se utilizaron seis animales por grupo (esquemas profilácticos y terapéuticos) a las 24 h después del procedimiento de I/R. Los gerbos anestesiados fueron sometidos a perfusión cardíaca con solución salina al 0,9% fría y se extrajeron sus cerebros, los cuales fueron congelados (20 min, - 20 °C) y se seccionaron en cinco cortes coronales de 2 mm de espesor (rostral a caudal). Los cortes de cerebro se incubaron durante 30 min en una solución al 2% de TTC a 37 °C y se fijaron por inmersión en una solución de paraformaldehído al 4 % (en PBS 0,1 M, pH 7,4) durante 48 horas.<sup>216</sup> Cinco secciones cerebrales por animal teñidas con TTC fueron escaneadas (Hewlett Packard HP Scanjet 5370 C, EEUU), y las imágenes analizadas

usando un software comercial (Photoshop CS3 10.0, Adobe Systems Inc., EEUU). El área de infarto se calculó como se describe por Bahcekapili y cols. con algunas modificaciones.<sup>217</sup> Las mediciones del tejido infartado se realizaron manualmente, definido como la región cerebral no teñida. Se usó el área de infarto por secciones de cerebro para calcular el porcentaje del tejido infartado con relación al área hemisférica ipsilateral, y se expresó como el promedio de ambos hemisferios. El volumen de infarto o del hemisferio por secciones cerebrales, se determinó multiplicando el área infartada o el área hemisférica, respectivamente, por el grosor del corte (2 mm). El volumen de infarto por animal se calculó como el porcentaje de la suma del volumen de tejido infartado de los cinco cortes respecto a la suma del volumen del hemisférico ipsilateral, y se expresó como el promedio de ambos hemisferios.

### **2.5.1.5. Evaluación histológica**

A los siete días posteriores al procedimiento quirúrgico, los animales sobrevivientes se anestesiaron con hidrato de cloral (300 mg/Kg, i.p.) y se sometieron a perfusión cardíaca con solución salina 0,9 % fría durante 10 min y luego durante 15 min con el fijador formaldehído 10% frío (en PBS 0,1 M, pH 7,4). Se extrajeron los cerebros del cráneo y después se fijaron en formaldehído al 10% durante una semana. Cada bloque de tejido fue embebido en parafina y se cortó con un micrótopo de deslizamiento (Sakura, Japón) en secciones coronales de 4  $\mu$ m conteniendo el hipocampo dorsal en la coordenada -1,6 mm respecto a bregma,<sup>218</sup> y se tiñeron con hematoxilina-eosina. El análisis morfométrico se realizó contando las neuronas viables (no eosinofílicas) en las diferentes áreas de la capa de células piramidales del hipocampo. El límite CA-2/CA-3 se definió utilizando una extrapolación morfométrica según un reporte previo.<sup>219</sup> La región CA-4 se definió como la capa de células piramidales limitada por los dos brazos del giro

dentado. Las células piramidales mostrando atrofia, contracción, picnosis nuclear, coloración oscura citoplasmática o espacios vacíos se consideró indicativo de degeneración celular.<sup>220</sup> Para la evaluación del daño neuronal, se contó el número de neuronas viables en zonas determinadas de CA-1 (150 × 320 μm), CA-2 (150 × 320 μm), CA-3 (0,115 mm<sup>2</sup>) o CA-4 (150 × 320 μm) de cada animal usando el programa ImageJ 1.41 (INS, EEUU). Los recuentos de células se expresaron en porcentaje respecto al grupo control.

### **2.5.1.6. Determinación de marcadores de estrés oxidativo**

Se utilizaron seis animales por grupo (del esquema profiláctico) a las 24 horas después de la cirugía, para la determinación de biomarcadores de estrés oxidativo. Las muestras de sangre fueron tomadas por punción cardíaca en animales anestesiados (hidrato de cloral 300 mg/Kg, i.p.), y luego sometidos a perfusión cardíaca con solución salina 0,9% fría durante 10 min. El suero se obtuvo por procedimientos estándares y se almacenó a -70 °C hasta su uso. Para la homogenización, cada cerebro se colocó en un tubo de micro centrífuga conteniendo perlas de vidrio de 4 mm y 2 mL de tampón KCl 0,1 M/histidina 5 mM (pH 7,3). El tejido se maceró y se agitó durante 2 min. Los homogenados se centrifugaron durante 5 min a 10 000 × g a 4 °C, y el sobrenadante se almacenó a -70 °C hasta su uso. El contenido de proteína de los homogenizados se determinó por el método del Azul Brillante de Coomassie.<sup>221</sup> Los parámetros bioquímicos fueron determinados utilizando un espectrofotómetro Ultrospect III Plus (Pharmacia LKB, Suecia). La concentración de malonildialdehído (MDA), marcador de la POL, se ensayó empleando un kit comercial (Bioxytech, Oxis International Inc., EEUU). Para la determinación del peroxidación potencial (PP), las muestras fueron incubadas con 2 mM de CuSO<sub>4</sub> a 37 °C durante 24 h. La PP se estimó tomando la diferencia entre el contenido de MDA en 24 y 0 h y se

expresó como  $\mu\text{M}$  para el suero, y  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de proteína para el homogenado de cerebro.<sup>222</sup> La capacidad reductora férrica (del inglés: “Ferric Reducing Ability of Plasma”, FRAP) del suero y del homogenado de cerebro se determinó sobre la base de la capacidad de las muestras para reducir el hierro de forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a su forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ). El Fe (II)-2,4,6-tripiridil-s-triazina formado se detectó a 593 nm. El ácido ascórbico se usó como estándar en la curva patrón y los resultados se expresaron como equivalentes  $\mu\text{M}$  de ácido ascórbico para el suero y  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de proteína para el homogenado de cerebro.<sup>223</sup>

### **2.5.1.7. Evaluación de la conducta exploratoria**

La evaluación del comportamiento se llevó a cabo antes (todos los animales) y siete días después (todos los animales sobrevivientes) del evento isquémico en el esquema profiláctico. La actividad locomotora se midió utilizando una caja de actividad automatizada (Modelo 7401, Ugo Basile, Italia) durante 30 min después de un período de 10 min de aclimatación, como se describe anteriormente.<sup>224</sup> La actividad se cuantifica como el número de movimientos por animal durante 30 min. Se contó el número de empujones durante tres intervalos de 3 minutos para cada animal y se obtuvo la mejor curva de ajuste (se define como la curva de habituación).

## **2.5.2. Modelo de isquemia/reperfusión focal en retina de ratas**

### **2.5.2.1. Animales**

Las ratas fueron obtenidas del Centro de Cuidado de Animales del Campus de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo (USP). Los animales fueron mantenidos bajo condiciones estándares de laboratorio (humedad 60%,  $22 \pm 1$  °C y ciclo de luz/oscuridad de 12h), con acceso libre a comida y agua. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en correspondencia con las guías de la USP y la Directiva del Consejo de Comunidades Europeas del 24 de noviembre de

1986 (86/609/EEC) para la experimentación animal.

### **2.5.2.2. Procedimiento quirúrgico**

La isquemia/reperfusión en retinas de ratas fue inducida siguiendo un procedimiento descrito previamente con algunas modificaciones.<sup>225</sup> Las ratas machos Wistar con un peso de 250-300 g en el momento de la cirugía (n=5 por grupo) fueron anestesiadas con uretano a 450 mg/Kg vía i.p. (Acrôs Organic, EEUU),<sup>226</sup> y luego se canuló la cámara anterior del ojo izquierdo con una aguja de calibre 27G conectada con un manómetro, una bomba y un reservorio de aire. La presión intraocular (PIO) se elevó hasta 120 mmHg durante 45 min. A continuación la aguja fue retirada, y la PIO fue normalizada durante un período de 15 min de reperfusión. El fármaco fue inyectado intraocularmente 15 min antes del daño isquémico a 0,5 µL/min con una bomba de infusión (Insight Ltd., Ribeirão Preto, Sao Paulo Brasil). Las retinas de los ojos derechos no fueron manipuladas y sirvieron como controles sanos (n=10).

### **2.5.2.3. Evaluación histológica**

Después del período de reperfusión, los animales fueron sacrificados, y ambos ojos fueron rápidamente removidos, colocados en una solución de fijación (25,5 mL de etanol 80%, 3 mL de formaldehído 37% y 1,5 mL de ácido acético glacial) por 24 h y transferidos a etanol 80% durante otros cuatro días.<sup>227</sup> Las retinas obtenidas fueron deshidratadas secuencialmente en etanol y xilol, y embebidas en parafina. Luego fueron cortadas en secciones de 5 µm a partir de aproximadamente 1 mm del nervio óptico, y teñidas con hematoxilina y eosina. Para cada grupo experimental, fueron fotografiados cinco campos microscópicos (400x de aumento) de una sección sagital por cada retina usando una cámara digital (DFC300 FX) acoplada a un microscopio óptico (DM 5000 B, software Q-Win, ambos de Leica Microsystems, Alemania). El

número de células viables fue contado manualmente en áreas establecidas (200  $\mu\text{m}$  x 50  $\mu\text{m}$ ) de la capa nuclear interna (CNI) usando el programa ImageJ 1.41 (INS, EEUU). Las células que mostraron atrofia, picnosis nuclear, coloración oscura del citoplasma o espacios circundantes vacíos se consideraron dañadas. Los resultados fueron expresados como porcentaje respecto al número de células viables en las retinas controles.

### **2.5.3. Modelo de penumbra isquémica por hipoperfusión cerebral aguda en ratas**

#### **2.5.3.1. Animales y diseño experimental**

Las ratas Wistar machos (250-300 g) (CENPALAB, La Habana, Cuba) se mantuvieron bajo condiciones estándares de laboratorio (60% humedad,  $22 \pm 1$  °C, y 12h de ciclo luz/oscuridad) con libre acceso a agua y comida. Los procedimientos se aprobaron por el comité institucional de ética de acuerdo con la directiva del Consejo de la Comunidad Europea del 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC) y las orientaciones ARRIVE (del inglés: “Animals in Research: Reporting In Vivo Experiments”) para la experimentación animal.<sup>228</sup> Los animales se dividieron aleatoriamente en los siguientes grupos: a) control: las ACCs solo se expusieron quirúrgicamente, sin ligadura; b) OPACC (oclusión bilateral permanente de las arterias carótidas comunes) vehículo: animales sujetos a OPACC y tratados con solución NaCl 0,9% vía i.p. por 30 min, 1, 3 y 6 h después de la cirugía c) animales sujetos a OPACC y tratados con FCB 47 o 213  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ , o con C-FC 8  $\text{mg}/\text{Kg}$  por vía i.p. siguiendo el mismo esquema terapéutico. Estas dosis acumulativas fueron igualmente subdivididas para administrar la misma cantidad de fármaco cada vez y alcanzar la dosis final después de cuatro inyecciones.

#### **2.5.3.2. Procedimiento quirúrgico**

La hipoperfusión cerebral se indujo según se describió previamente.<sup>229</sup> Brevemente, las ratas

fueron anestesiadas intraperitonealmente con 350 mg/Kg de hidrato cloral. La OPACC se realizó a través de dos ligaduras permanentes en las ACCs con hilo de sutura 5-0 y el posterior corte en el centro de ambos puntos ligados. La temperatura corporal durante la cirugía se mantuvo a  $37 \pm 0,5$  °C con una manta de calentamiento. Los animales se sacrificaron por decapitación 24 h después de la oclusión y sus bulbos olfatorios, cerebelos, estriados, cortezas cerebrales e hipocampos, fueron rápidamente removidos. La corteza cerebral se dividió en dos secciones (anterior y posterior) en relación al bregma, para el análisis de expresión de genes.<sup>230</sup>

### 2.5.3.3. Microarreglo de ADN

Los perfiles de expresión de ARNm en la corteza cerebral anterior fue realizado por Cogentech Consortium for Genomic Technologies (Milano, Italia) utilizando el chip de Affymetrix GeneChip Rat Gene ST 1.1, según los protocolos del fabricante. La extracción de los datos y el control de calidad inicial se realizaron utilizando los paquetes Bioconductor.<sup>231</sup> Las intensidades de las señales se normalizaron usando RMA (del inglés: “Robust Multi-array Average”). El análisis estadístico de los genes expresados diferencialmente entre las ratas isquémicas tratadas con FCB y las tratadas con el vehículo se llevó a cabo usando el método de Rango de Productos implementado en el paquete RankProd.<sup>232</sup> Un valor de  $q < 1,05$  y cambios superiores a 1,5 veces se usaron para identificar genes diferencialmente expresados. El análisis de la ontología genética (GO) relacionada con los fenotipos de genes, se llevó a cabo usando Gorilla para cada lista de genes con expresión aumentada o disminuida.<sup>233</sup> Los procesos biológicas se presentan como mapa de jerarquía utilizando la herramienta de visualización REVIGO.<sup>234</sup>

#### 2.5.3.4. Expresión de genes por Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en Tiempo Real

Las regiones cerebrales removidas después de la eutanasia de los animales (n=3 por grupos) se preservaron en búffer RNAlater® (Ambion Inc., Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la homogenización y la extracción del ARN total por TRIzol (Invitrogen, San Diego, CA, EEUU). A partir de 1  $\mu\text{g}$  de ARN, la síntesis de ADNc se llevó a cabo utilizando el High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), siguiendo las instrucciones del fabricante. La Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en Tiempo Real (del inglés: “quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction”, qRT-PCR) se realizó utilizando tres réplicas por gen. Todos los pasos técnicos se efectuaron de acuerdo a las recomendaciones MIQE (del inglés: “Minimal Information for Publication of Quantitative RT-PCR Experiments”).<sup>235</sup> Los cebadores específicos de cada gen se diseñaron por medio de una búsqueda *in silico* con el algoritmo de alineamiento BLAST (Anexo 2) y se usaron a 300 mM (Metabion, Martinsried, Alemania). Como sistema de detección se usó el Fast SYBR Green PCR Master Mix en el instrumento de qRT-PCR Light Cycler 480 (Roche Applied Science, Mannheim, Alemania).<sup>236</sup> Las reacciones controles con agua doblemente destilada resultaron negativas para los genes seleccionados. Los datos se calcularon como unidades de expresión normalizada media con el software Q-Gene,<sup>237,238</sup> usando el gen peptidil-prolil isomerasa A (*PPIA*, también conocida como ciclofilina A) como referencia o normalizador para la cuantificación relativa.<sup>239</sup> Los resultados se muestran como porciento respecto al grupo control.

### 2.5.3.5. Determinación de marcadores de estrés oxidativo

Se utilizaron 5 animales por grupo para las determinaciones bioquímicas a las 24 h después de la cirugía. Las muestras de sangre se tomaron por punción cardíaca en los animales anestesiados que luego fueron perfundidos con solución salina fría al 0,9%. El suero se obtuvo por procedimientos estándares y almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La homogenización cerebral se llevó a cabo colocando cada tejido cerebral en tubos de micrcentrífuga que contenían balines de acero de 4 mm y 2 mL de tampón 0,1 M KCl/5 mM histidina (pH 7,3). El tejido se homogenizó en un dispositivo Tissue Lyser II (Qiagen, CA, EEUU). El homogenado se centrifugó por 10 min a  $10\,000 \times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$ , y el sobrenadante se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. El contenido total de proteínas se determinó por el método de Bradford usando como patrón la BSA.<sup>240</sup> Los biomarcadores de estrés oxidativo se determinaron en el suero y en los homogenados de las regiones cerebrales por medio de un espectrofotómetro T70 UV/VIS (PG Instruments Ltd, Wibtoft, Reino Unido).

El MDA se determinó como marcador de la POL (kit LPO-586, Calbiochem, La Jolla, EEUU) por medio de una reacción colorimétrica con N-metil-2 fenilindol a  $45^{\circ}\text{C}$  por 40 min de incubación y midiendo el producto estable a 586 nm. Para la determinación del potencial de peroxidación (PP) las muestras se incubaron con 2 mM de  $\text{CuSO}_4$  a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 h. El PP se estimó por medio de la diferencia entre el contenido de MDA a las 24 y 0 h, y se expresó en  $\mu\text{M}$  para el suero y  $\mu\text{M}/\text{mg}$  de proteínas para los homogenados de las regiones cerebrales.<sup>222</sup>

La actividad SOD (EC 1.15.1.1) se determinó por medio de un kit comercial (Cat. No. SD 125, Randox Labs, Crumlin, Reino Unido), donde la xantina y la xantina oxidasa se usaron para generar el radical anión superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), que reacciona con el cloruro de 2-(4-iodophenyl)-3-

(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium (INT) para formar el colorante rojo formazán. La actividad SOD de la muestra se expresó de acuerdo al grado de inhibición de esta reacción. La actividad CAT (EC 1.11.1.6) se determinó siguiendo la descomposición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 240 nm por intervalos de 10 s durante 1 min.<sup>241</sup>

### **2.5.3.6. Determinación de citocinas por Bio-Plex®**

Los niveles séricos de citocinas se determinaron por triplicado usando un instrumento Bio-Plex® dual laser (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) con kits de ensayos específicos (R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU) para CXCL2, ICAM-1, IL-1β, TNF-α y VEGFA (Cat. No. LUR525, LUR583, LUR501, LUR510, LUR564, respectivamente), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

### **2.5.3.7. Evaluación histológica**

Luego de 30 días post-cirugía, las ratas (n=5 por grupo) fueron anestesiadas con hidrato de cloral 350 mg/Kg i.p. y sometidas a una perfusión cardíaca con NaCl 0,9% seguida por paraformaldehído al 4% (en PBS 0,1 M, pH 7,4). Los cerebros fueron removidos y post-fijados, deshidratados y embebidos en parafina. Se obtuvieron cortes coronales de 5 μm de espesor en la coordenada -3,3 mm respecto a bregma,<sup>230</sup> y teñidas con hematoxilina-eosina siguiendo un procedimiento estándar. Las imágenes digitales fueron obtenidas de las regiones del hipocampo con una cámara Canon Power Shot G5 (Japón) acoplada a un microscopio óptico Carl Zeiss (Alemania). Se consideró como neurona viable a aquellas con núcleos de forma redondeada u ovalada definida, sin mostrar reducción del soma o edema circundante.<sup>242</sup> Se realizó un conteo neuronal usando el programa ImageJ 1.41 (INS, EEUU), en áreas definidas para CA-1, -2, -4 (300 x 100 μm) y CA-3 (300 x 250 μm, largo x ancho) de manera bilateral (en el hipocampo de

ambos hemisferios cerebrales), y se calcularon los valores medios para determinar el porcentaje de neuronas viables respecto al grupo control.

### **2.5.4. Modelo de isquemia/reperfusión cerebral focal inducida por endotelina-1 en ratas**

#### **2.5.4.1. Animales y diseño experimental**

Las ratas Wistar machos (250-350 g) fueron obtenidas del Centro de Cuidado de Animales del Campus de Ribeirão Preto, Universidad de São Paulo (USP). Los animales fueron mantenidos bajo condiciones estándares de laboratorio (humedad 60%,  $22 \pm 1$  °C y ciclo de luz/oscuridad de 12h), con acceso libre a comida y agua. Todos los procedimientos fueron llevados a cabo en correspondencia con las guías de la USP y la Directiva del Consejo de Comunidades Europeas del 24 de noviembre de 1986 (86/609/EEC) para la experimentación animal. Las ratas fueron divididas aleatoriamente en los grupos experimentales siguientes: a) control: animales con inyección intracerebral de solución salina 0,9% en lugar de endotelina-1 (ET-1); b) I/R vehículo: animales inyectados con ET-1 intracerebralmente y tratados con solución salina 0,9% i.p. a los 30 min, 1, 3, y 6 h post-cirugía; c) animales con inyección intracerebral de ET-1 y tratados con C-FC a dosis acumulativas de 2,5; 5 y 10 mg/Kg i.p. siguiendo el mismo esquema terapéutico.

#### **2.5.4.2. Procedimiento quirúrgico**

El procedimiento se siguió a partir de un reporte previo con algunas modificaciones.<sup>243</sup> Las ratas fueron anestesiadas por vía i.p. con una combinación de ketamina 80 mg/Kg y xilacina 8 mg/Kg,<sup>244</sup> y colocadas posteriormente en un marco estereotáxico. Se realizó una incisión en línea recta en la parte superior media de la piel encima del cráneo, removiendo cuidadosamente el periostio. La superficie ósea expuesta fue entonces limpiada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% y gasa estéril. A partir de la localización de bregma, se realizó una perforación del cráneo e inserción de la aguja de

inyección 27G en la vecindad de la Arteria Cerebral Media usando las coordenadas siguientes: -0,2 (antero-posterior), +5,2 (lateral), -8,0 (ventral).<sup>230</sup> La ET-1 a 600 pmol fue inyectada lentamente (1  $\mu$ L/min) con una bomba de infusión (Insight Ltd., Ribeirão Preto, Sao Paulo Brasil), usando una jeringuilla Hamilton (Sigma-Aldrich, EEUU) conectada a la cánula de inyección mediante un fino tubo de plástico. La cánula se retiró del parénquima cerebral luego de cinco minutos a partir de la inyección de ET-1, y la piel fue suturada con hilo de seda 4-0. La temperatura rectal de las ratas se mantuvo en  $37 \pm 0,5$  °C usando una lámpara incandescente.

### **2.5.4.3. Evaluación neurológica**

Luego de 24 h posteriores a la cirugía, se midió el peso corporal y a continuación, se determinó el estado neurológico de las ratas mediante el uso de la escala reportada por García y cols. (1995).<sup>245</sup> Esta escala se basa en la sumatoria de la puntuación (0, 1, 2, 3) de seis parámetros para un máximo total de 18 puntos: a) actividad locomotora espontánea; b) simetría motora de las cuatro extremidades; c) extensión de las patas delanteras; d) fuerza de agarre a una rejilla; e) sensibilidad propioceptiva corporal; f) respuesta de las vibrisas al roce. Una menor escala indica un mayor déficit neurológico.

### **2.5.4.4. Determinación del volumen de infarto**

El volumen de infarto se determinó empleando la técnica de tinción con TTC.<sup>246</sup> Un día después de la cirugía, las ratas (n=5 para los grupos control y tratados con C-FC; n=9 para ET-1 + vehículo) fueron anestesiadas (ketamina 80 mg/Kg/xilacina 8 mg/Kg i.p.) y sometidas a perfusión cardíaca con solución salina al 0,9% fría. A continuación se les extrajeron sus cerebros, los cuales fueron congelados por 20 min a  $-20$  °C y se seccionaron en seis cortes coronales de 2 mm de espesor (rostral a caudal). Los cortes de cerebro se incubaron durante 30

min en una solución de TTC al 2% (en PBS 0,1 M pH 7,4) a 37 °C y se fijaron por inmersión en una solución de paraformaldehído 4% durante 48 horas a 4 °C. Las secciones fueron escaneadas (Hewlett Packard HP Scanjet G2710, EEUU), y analizadas mediante el programa ImageJ 1.41 (INS, EEUU). La medición del área de infarto cortical y subcortical (zonas no teñidas) se realizó por cada sección coronal. El volumen de infarto por corte coronal se determinó multiplicando el área de infarto total por el grosor del corte (2 mm), y la sumatoria de las seis secciones como volumen de infarto total. Se calculó un factor de corrección para eliminar el efecto del edema, dividiendo el volumen del hemisferio ipsilateral sobre el hemisferio contralateral a la inyección de ET-1. El volumen de infarto reportado corresponde al resultado de dividir el volumen de infarto total calculado entre el factor de corrección del edema.<sup>247</sup>

#### **2.5.4.5. Evaluación histoquímica**

A las 24 horas post-cirugía, las ratas (n=5 para todos los grupos) fueron anestesiadas (ketamina 80 mg/Kg/xilacina 8 mg/Kg i.p.) y sometidas a perfusión cardíaca con solución salina al 0,9% fría. A continuación se les extrajeron sus cerebros y se congelaron en una mezcla de isopentano (Sidma-Aldrich, EEUU) con hielo seco, y se mantuvieron a -70 °C hasta su uso. Se realizaron cortes secuenciales (20 µm) en la región de -3,6 mm respecto a bregma,<sup>230</sup> en un criostato (CM 1850, Leica Microsystems, Alemania) con empleo de Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek, EEUU) a -20 °C. Las láminas con 3 cortes secuenciales permanecieron toda la noche a 37 °C. A continuación, se utilizaron dos láminas por animal para realizar la tinción con dihidroetidio (DHE) (Cat. No. D1168, Invitrogen, Molecular Probes, EEUU), marcador fluorescente específico para el O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, y la inmunofluorescencia contra la subunidad NOX2 de la enzima NADPH oxidasa, respectivamente. Siguiendo un protocolo previamente descrito,<sup>248</sup> el DHE a 2

$\mu\text{M}$  (en PBS 0,1 M pH 7,4) fue incubado con las láminas conteniendo los cortes histológicos cerebrales en una estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  por 30 min, protegidas de la luz, y luego fueron lavadas dos veces con PBS 0,1 M pH 7,4 y cubiertas con medio de montaje (S302380-2, Dako do Brasil Ltda., Sao Paulo, Brasil) para su observación.

Las láminas conteniendo secciones coronales adyacentes a las usadas con el DHE, fueron fijadas en metanol (previamente enfriado) seguido por paraformaldehído 4%, a temperatura ambiente durante 10 min cada uno, y 3 lavados de 5 min con PBS 0,1 M pH 7,4. A continuación se bloquearon con una solución de BSA 3% / Tween® 20 0,5% (en PBS) por 30 min, a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo primario policlonal de conejo anti-NOX2/gp91phox (ab31092, Abcam, EEUU), dilución 1:250 (en la misma solución de bloqueo), durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ , fue seguida por dos lavados con PBS 0,1 M de 5 min. La señal fue revelada con un anticuerpo secundario fluorescente Alexa Fluor® 488 anti-IgG (H+L) de conejo (Molecular Probes, Life Technologies, EEUU), dilución 1:1000 (en PBS 0,1 M pH 7,4), durante tres horas a temperatura ambiente y protegido de la luz. Las láminas fueron cubiertas con medio de montaje (S302380-2, Dako do Brasil Ltda., Sao Paulo, Brasil) para su observación.

En el hemisferio ipsilateral a la inyección de la ET-1, fueron fotografiados tres áreas de interés en la corteza cerebral a un aumento de 200x (HL, Par1 y Par2, del inglés: “hindlimb, parietal 1 y parietal 2”),<sup>230</sup> usando una cámara digital (DFC300 FX) acoplado a un microscopio de fluorescencia (DM 5000 B, software Q-Win, ambos de Leica Microsystems, Alemania). Se realizó un análisis densitométrico de la intensidad de la fluorescencia emitida en cada corte usando el ImageJ 1.41 (INS, EEUU) y se determinó la media del grupo. Los resultados se muestran como el porciento de intensidad respecto al control (fluorescencia relativa).

## 2.6. Análisis estadístico

El programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., EEUU) fue usado para el análisis estadístico. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  Error Estándar de la Media (E.E.M.). Para todos los datos obtenidos se verificó inicialmente la normalidad con la prueba de Kolmogorov-Smirnov. A partir del resultado, se aplicaron diferentes pruebas de comparación de medias, paramétricas (análisis de varianza de clasificación simple [ANOVA], seguido de la prueba de Newman-Keuls de comparaciones múltiple) o no paramétricas (test de rangos de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn's). El análisis de supervivencia en gerbos de Mongolia se realizó con el método de Kaplan-Meier<sup>249</sup> durante los siete días posteriores a la cirugía, y las curvas de supervivencia obtenidas se compararon mediante la prueba de "Log-Rank". Se realizó un análisis de regresión lineal para comparar las pendientes de las curvas de habituación en los gerbos de Mongolia. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas los valores de  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Efecto protector de la C-FC en mitocondrias de cerebro de rata frente al $\text{Ca}^{2+}/\text{Pi}$

En el siguiente conjunto de experimentos se evaluó el efecto de la C-FC sobre la TPM mediante la estimación del hinchamiento de las MCRs inducido por  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfato inorgánico (Pi), como ha sido reportado previamente.<sup>250</sup> Las comparaciones entre la disminución inicial de las pendientes de las absorbancias a 540 nm revelaron que la C-FC previno la TPM en un rango bajo de concentración micromolar (Fig. 2A). Esto sugiere que la inhibición de la TPM está involucrada en los mecanismos responsables de los efectos neuroprotectores de la C-FC. La TPM ha sido relacionada con el incremento en los niveles de EROs en la mitocondria de cerebro.<sup>251</sup> Nuestros resultados mostraron que la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  desencadenó un aumento significativo en los niveles de EROs en MCRs (Fig. 2B), y que el pre-tratamiento con C-FC previno este efecto. Para evaluar el efecto de la C-FC en la disipación del  $\Delta\Psi$  promovida por el  $\text{Ca}^{2+}$ , las MCRs fueron pre-incubadas con C-FC 30  $\mu\text{M}$  por aproximadamente 10 min, y luego se añadió 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  (Fig. 2C). La sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  produjo la disipación de aproximadamente el 30% del  $\Delta\Psi$ , la cual fue contrarrestada de manera efectiva por el tratamiento ya sea con C-FC o con el inhibidor clásico de la TPM, la ciclosporina A (Fig. 2C). La liberación de citocromo c de la mitocondria juega un papel importante en la muerte celular.<sup>252</sup> Se empleó la técnica del *Western blot* para detectar el citocromo c libre en el sobrenadante obtenido luego de los experimentos de hinchamiento (Fig. 2D). La sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Pi}$  provocó una liberación sustancial de citocromo c de MCRs, la cual fue prevenida por la C-FC a bajas concentraciones micromolares. El efecto de la C-FC fue significativamente superior al obtenido para el antioxidante Trolox.

### 3.2. Inhibición de la reacción de Fenton en presencia de la C-FC

En la presente investigación evaluamos el efecto de la C-FC sobre la reacción de Fenton usando un dispositivo electroquímico.<sup>253</sup> En la Fig. 3 se puede observar el voltamograma cíclico que representa el proceso redox (ecuación 1, trazo a) de  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA a  $\text{Fe}^{2+}$ -EDTA (ganancia de 1 electrón).

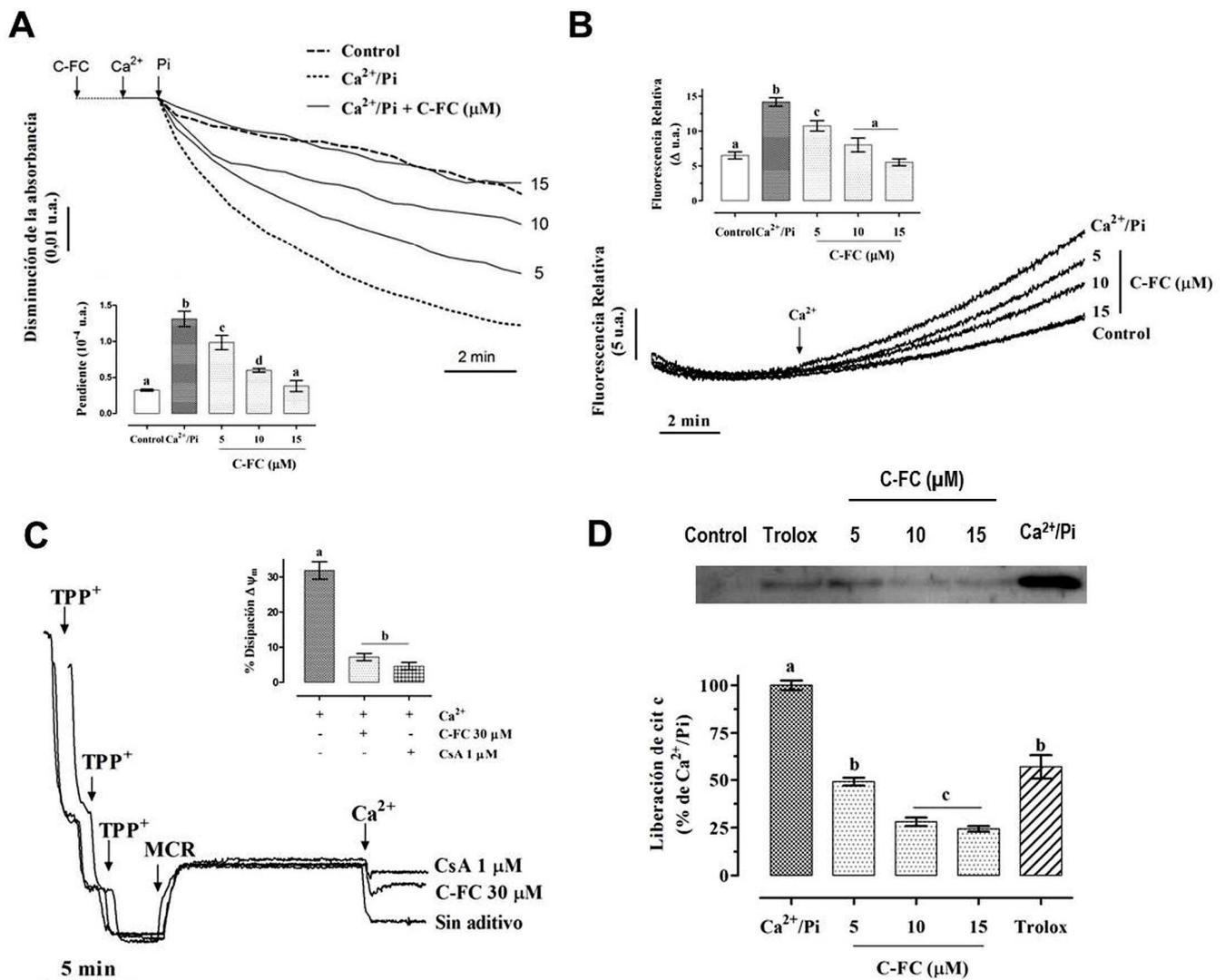
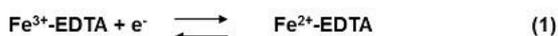
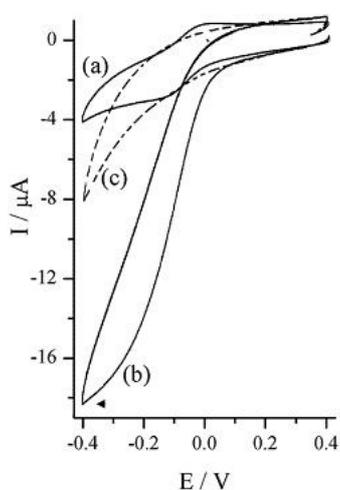


Fig. 2 (pie de figura en la página siguiente).

**Fig. 2 (página anterior).** Efecto de la C-FC en mitocondrias de cerebros de rata (MCRs) frente al daño inducido por  $\text{Ca}^{2+}/\text{Pi}$ . **(A)** Hinchamiento mitocondrial. Las MCRs (1 mg/mL) fueron pre-incubadas por 5 min a  $30^{\circ}\text{C}$  con C-FC en MEI con 5 mM de succinato y  $2\ \mu\text{M}$  rotenona seguido por la adición de  $100\ \mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ) por otro min. Luego se añadió 3 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Pi) a la suspensión mitocondrial, y la absorbancia fue monitoreada a 540 nm por 10 min. Se comparó el grado de hinchamiento por la pendiente de la disminución de la absorbancia en los primeros 5 min posteriores de la adición de Pi. **(B)** Niveles de EROs mitocondriales. Las MCRs (1 mg/mL) fueron incubadas por 5 min a  $30^{\circ}\text{C}$  en MEI más C-FC, 5 mM succinato,  $2\ \mu\text{M}$  rotenona, 3 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Pi) y  $2\ \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCFDA}$ , y luego se inició el monitoreo de la fluorescencia. Después de 5 min, se añadió  $100\ \mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a la suspensión, la cual fue monitoreada durante otros 10 min. Las comparaciones entre las intensidades de fluorescencia se realizaron en este punto respecto al inicial (diferencias). **(C)** Potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ). Se muestran los efectos en ausencia o presencia de  $30\ \mu\text{M}$  C-FC, en presencia de  $1\ \mu\text{M}$  de ciclosporina A (CsA), y el % de disipación del  $\Delta\Psi$  después de añadir  $\text{Ca}^{2+}$  (flecha). Los valores de  $\Delta\Psi$  antes y después de la adición de  $\text{Ca}^{2+}$  para los grupos sin aditivos, C-FC y CsA, en mV, fueron:  $-154,06 \pm 4,43$  y  $-108,90 \pm 3,14$ ;  $-153,49 \pm 2,81$  y  $-143,96 \pm 2,17$ ;  $-159,52 \pm 4,12$  y  $-153,83 \pm 5,26$ , respectivamente. El  $\text{TPP}^+$  a  $0,5\ \mu\text{M}$  se adicionó secuencialmente (indicado por flechas) en MEI (con 5 mM succinato y  $2\ \mu\text{M}$  rotenona) hasta alcanzar una concentración final de  $1,5\ \mu\text{M}$ , en presencia o ausencia de aditivos (C-FC o CsA). Posteriormente se añadió las MCRs (2 mg/mL) y luego  $100\ \mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$  ( $\text{Ca}^{2+}$ ). **(D)** Liberación de citocromo c (cit c) mitocondrial. Se muestran Western blots representativos y la densitometría del citocromo c libre obtenido después de la incubación de las MCRs en las condiciones de hinchamiento. Los resultados están presentados como media  $\pm$  E.E.M. de tres experimentos independientes. Letras diferentes:  $p < 0.05$  de acuerdo a las pruebas de ANOVA y Newman-Keuls.



**Fig. 3.** Efectos de la C-FC sobre la reacción de Fenton. Se muestran voltamogramas cíclicos de la oxidación-reducción reversible de  $\text{Fe}^{3+}\text{-EDTA}/\text{Fe}^{2+}\text{-EDTA}$  (trazo a, Ecuación (1)) y la reacción electroquímica entre  $\text{Fe}^{2+}\text{-EDTA}$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  en ausencia (trazo b, Ecuación (2)) y en presencia de  $0,38\ \text{mM}$  C-FC (trazo c). Las soluciones contenían  $100\ \text{mM}$   $\text{KCl}$ ,  $0,1\ \text{mM}$   $\text{Fe}^{3+}\text{-EDTA}$  y  $100\ \text{mM}$  ácido cloroacético ( $\text{pH}\ 3,3$ ). Los voltamogramas cíclicos fueron realizados en ausencia de  $\text{O}_2$  (mediante el uso previo de un purgador de nitrógeno), a una velocidad de barrido de  $100\ \text{mV/s}$ , y con un electrodo de carbón vidrioso (área  $0,0314\ \text{cm}^2$ ) como electrodo de trabajo. Se muestra un trazado representativo de tres experimentos independientes.

El trazo b muestra el comportamiento de esa reacción en presencia de 4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, observándose un aumento sustancial en la corriente catódica desde -4 μA hasta aproximadamente -18 μA (punta de flecha), pero no en la corriente anódica. Esto indica que ocurrió una catálisis similar a la reacción de Fenton (ecuación 2). La presencia de C-FC redujo la corriente catódica hasta -8 μA (trazo c), lo cual representa la inhibición de aproximadamente un 55% de la reacción de Fenton.

### 3.3. Evaluación del efecto de la C-FC y FCB en líneas celulares de origen neuronal

La Fig. 4 muestra una disminución significativa de alrededor de un 60% en la capacidad reductora del MTT de las células PC12 expuestas a 200 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o 40 mM de glutamato. Cuando el pre-tratamiento con C-FC o FCB fue seguido por la co-incubación del producto en presencia de estos neurotóxicos, se previno la caída en la reducción del MTT de forma dosis-dependiente y en un rango bajo de concentraciones. La C-FC a 400 u 800 μg/mL, y la FCB a 10 o 5 μM, restauraron completamente esta capacidad reductora de las células comparable al control sin daño para el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o el glutamato, respectivamente y no mostraron además ningún efecto tóxico sobre las células. Este resultado demuestra que ambos compuestos (la C-FC y su cromóforo, la FCB) son neuroprotectores en células PC12 sometidas a un daño oxidativo o excitotóxico, eventos involucrados en la cascada isquémica cerebral. A continuación, se muestran resultados obtenidos en otra línea de origen neuronal, las SH-SY5Y (neuroblastoma humano), frente al daño oxidativo provocado por el hidroperóxido de ter-butilo (*t*-BOOH). La viabilidad de las células SH-SY5Y fue significativamente reducida después de ser expuestas al *t*-BOOH, mientras que el pre-tratamiento con C-FC fue capaz de prevenir este efecto (Fig. 5). La C-FC a 50 μM previno casi completamente la reducción de la viabilidad celular y no evidenció

efectos citotóxicos, demostrando la seguridad del compuesto. Este resultado demuestra que la C-FC ejerce un efecto protector frente al daño oxidativo neurotóxico inducido por el *t*-BOOH. Se empleó, además al Trolox, un análogo de la vitamina E soluble en agua, como control antioxidante, para demostrar que las EROs juegan un papel esencial en la citotoxicidad del *t*-BOOH en células SH-SY5Y,<sup>254</sup> y que el efecto de la C-FC es superior al de esta molécula.

FFi

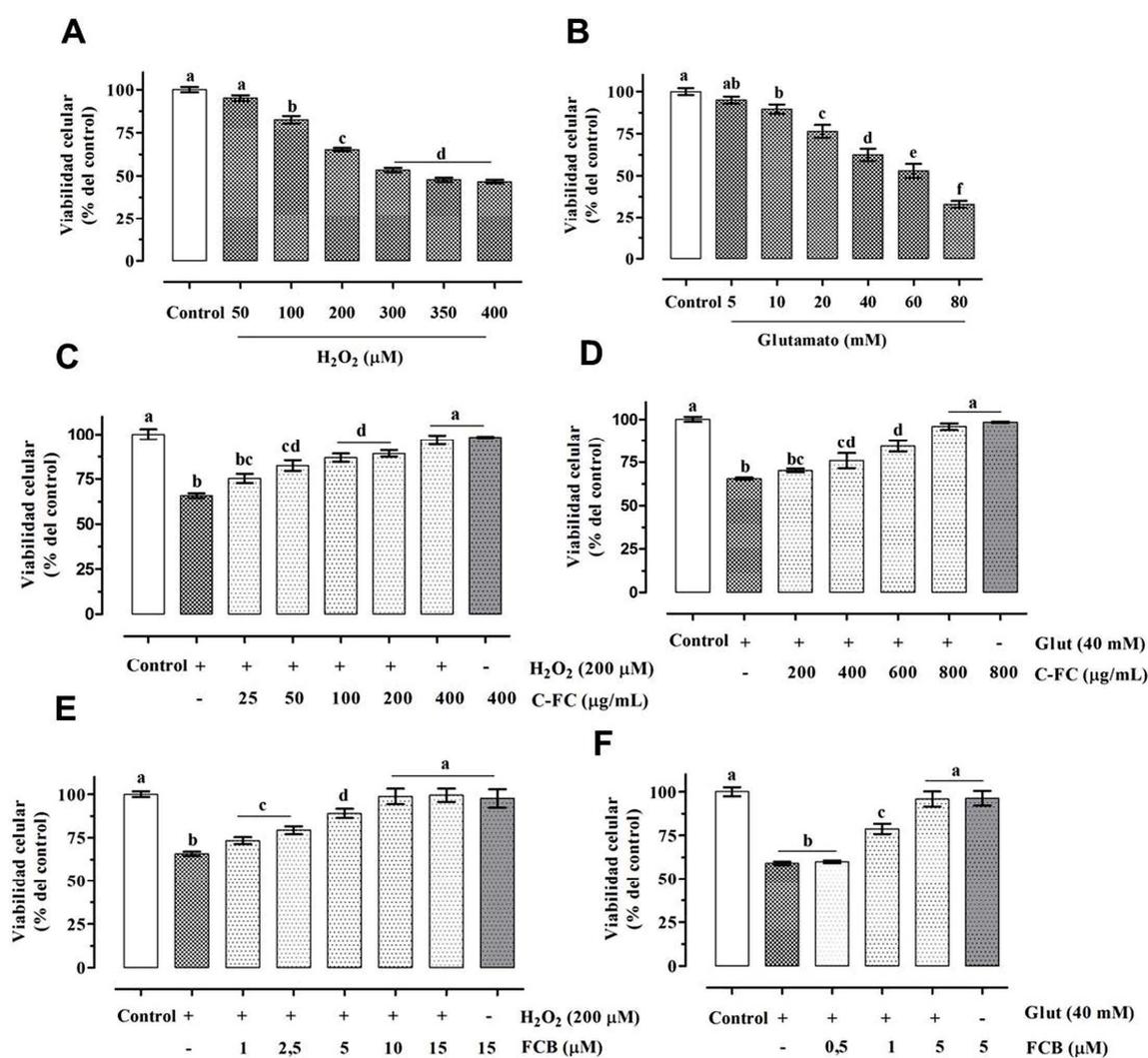
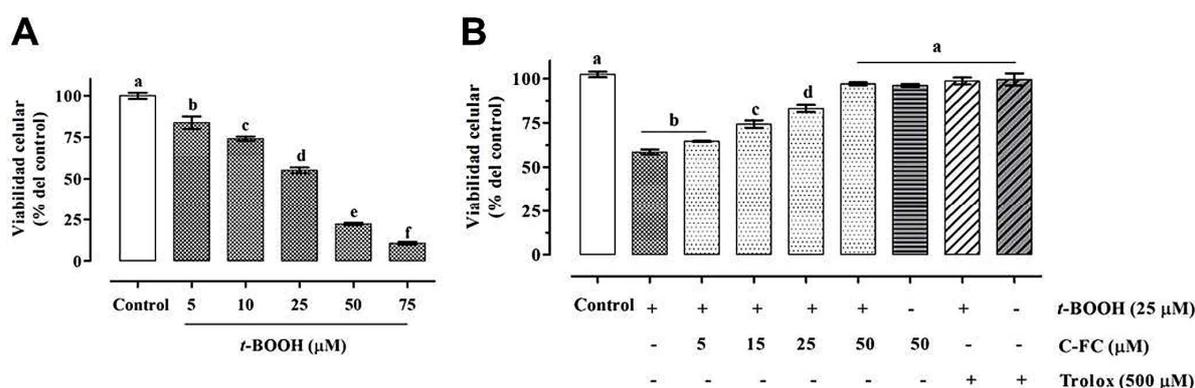


Fig. 4 (pi de figura en la página siguiente).

**Fig. 4** (página anterior). Efecto de la C-FC y FCB sobre la capacidad reductora del MTT (indicativa de la viabilidad celular) de la línea neuronal PC12. (A) y (B) Exposición de las PC12 a diferentes concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o glutamato por 24 h, respectivamente. Los paneles siguientes muestran las PC12 expuestas a 200 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o 40 mM glutamato y tratadas con C-FC (C, D) o FCB (E, F). Las células (2 x 10<sup>4</sup>/pozo) fueron pre-tratadas con diferentes dosis de los candidatos farmacológicos por 24 h y luego remplazadas con medio fresco conteniendo el producto y los neurotóxicos, o el producto solamente. El control se trató con el medio sin los aditivos. Los datos se expresan como media ± E.E.M. de tres experimentos independientes. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0,05) (Kruskal-Wallis + Dunn).



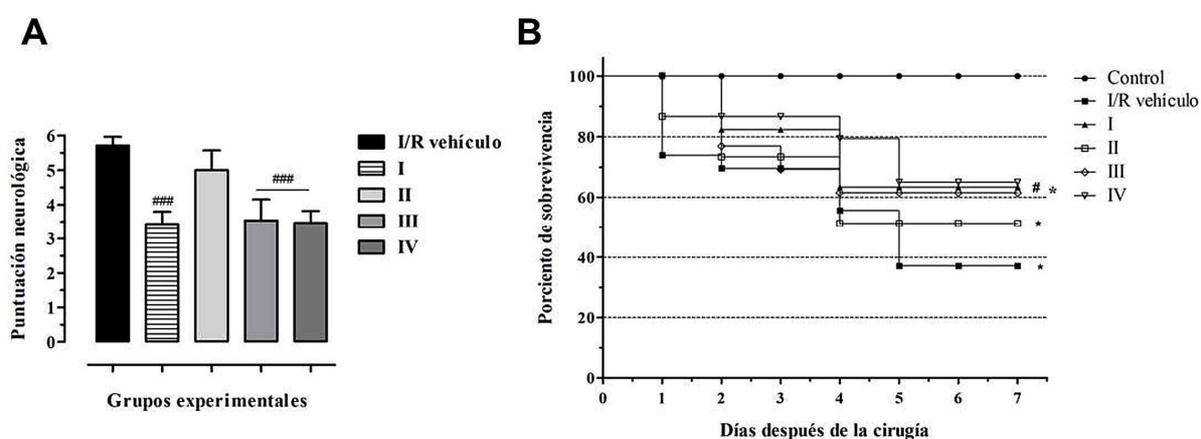
**Fig. 5.** Efecto protector de la C-FC contra el daño oxidativo en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y. (A) Viabilidad de las células expuestas a diferentes concentraciones de hidróperóxido de ter-butilo (*t*-BOOH) por 6 h. (B) Efectos del pre-tratamiento con C-FC por 24 h seguido por la co-incubación con 25 μM de *t*-BOOH por 6 h. El Trolox (500 μM) se empleó como control antioxidante. La viabilidad celular fue estimada por el ensayo de reducción del MTT y expresada como porcentaje del control. Los resultados están presentados como media ± E.E.M. de tres experimentos independientes. Letras diferentes: p<0,05 (ANOVA + Newman-Keuls).

### 3.4. Evaluación del efecto de la C-FC y FCB en modelos animales de isquemia cerebral y los mecanismos moleculares involucrados

#### 3.4.1. Efecto neuroprotector de la C-FC frente a la isquemia/reperfusión cerebral global en gerbos de Mongolia

El pre-tratamiento con C-FC<sub>30%</sub> (200 mg/Kg, oral, grupo I) durante siete días consecutivos antes de la isquemia produjo una reducción significativa en la puntuación neurológica en comparación

con el grupo I/R vehículo 24 h después de la reperfusión. Asimismo, la C-FC<sub>30%</sub> administrada por vía intraperitoneal después de la isquemia, logró producir una disminución dosis-dependiente de la puntuación del déficit clínico, con una ligera reducción en el grupo tratado a 50 mg/Kg (grupo II), pero una disminución significativa en los animales tratados con 75 y 100 mg/Kg (grupos III y IV, respectivamente) (Fig. 6A). El grupo control no mostró ningún signo neurológico de isquemia.



**Fig. 6.** Efecto de la C-FC<sub>30%</sub> sobre el grado de deterioro clínico después de 24 h del daño isquémico cerebral (**A**) y sobre la sobrevivencia de los gerbos durante 7 días posteriores a la cirugía (**B**). Los números romanos (I-IV) indican las dosis y esquemas de tratamiento según se describen en Materiales y Métodos. ###p<0,001 en relación a I/R vehículo (pruebas de Kruskal Wallis + Dunns); \*p<0,05 comparado con el control, #p<0,05 comparado con el I/R-vehículo (test Log-Rank).

Las curvas de sobrevivencia obtenidas mostraron que el grupo control no sufrió mortalidad alguna. Sin embargo, el grupo I/R vehículo mostró una sobrevivencia de solo el 37,1% al cabo de siete días, mientras que el tratamiento C-FC<sub>30%</sub> logró aumentarla de manera apreciable (grupos I, II, III y IV hasta 63,3; 51,3; 61,5 y 65%, respectivamente) (Fig. 6B). Por otro lado, todos los animales del grupo I/R vehículo mostraron grandes áreas infartadas, tanto corticales como subcorticales (Fig. 7A).

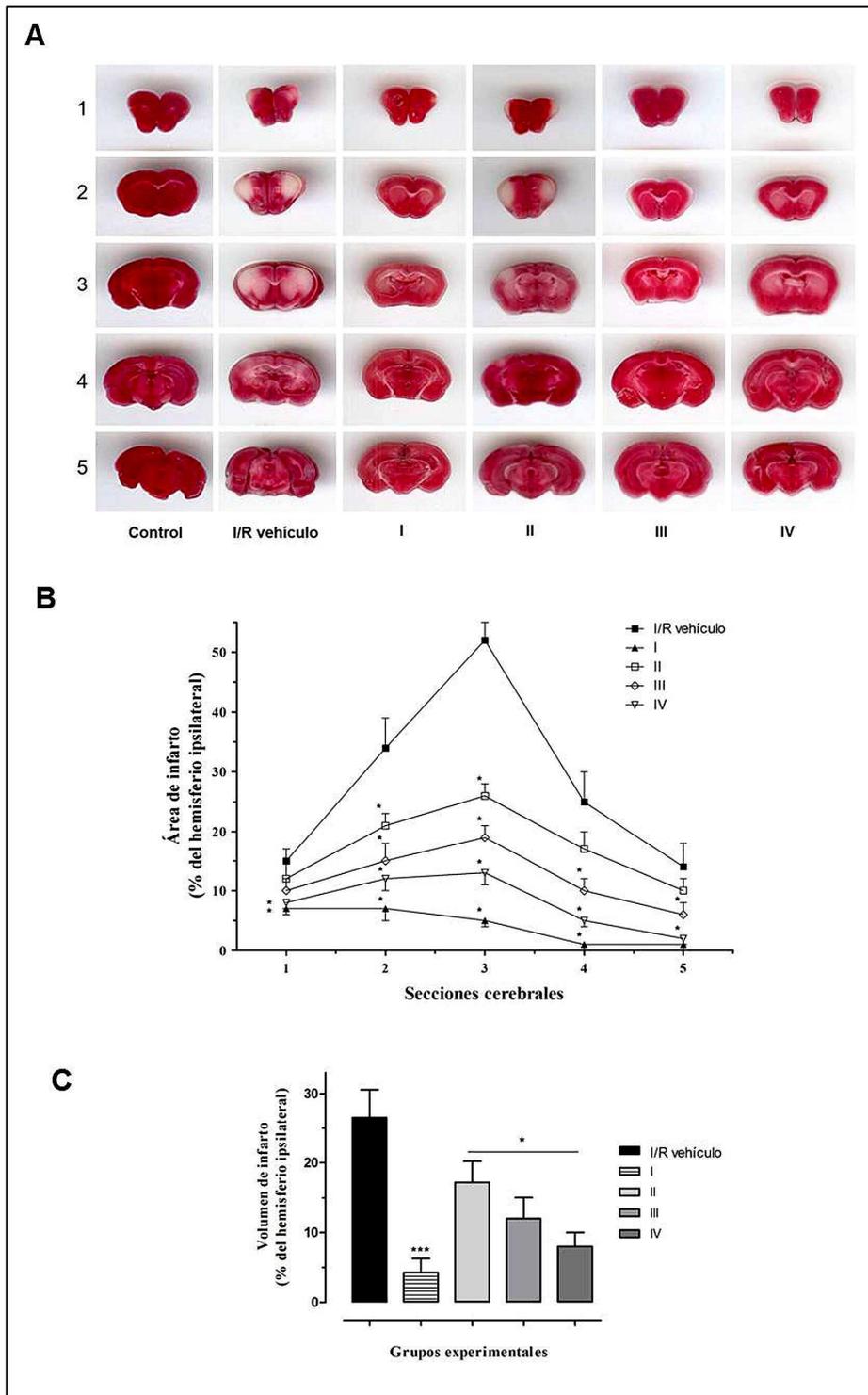


Fig. 7 (pie de figura en la página siguiente).

**Fig. 7 (página anterior).** Efecto de la C-FC<sub>30%</sub> sobre el infarto cerebral 24 h después de la reperusión. **(A)** Secciones cerebrales representativas, teñidas con TTC de los grupos control, I/R vehículo y tratados con C-FC<sub>30%</sub>. Los números romanos (I-IV) indican las dosis y esquemas de tratamiento según se describen en Materiales y Métodos. Las áreas cerebrales de coloración blanca indican tejido infartado. El grupo control no mostró áreas isquémicas. **(B)** Distribución rostrocaudal de las áreas infartadas en 5 secciones coronales de cerebro de 2 mm de espesor. **(C)** Volumen de infarto por grupos experimentales. \* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$  vs. I/R vehículo (ANOVA + Newman-Keuls).

El grupo control no mostró tejido isquémico. La administración de C-FC<sub>30%</sub> fue capaz de reducir el área de infarto total en los gerbos tratados, incluyendo una disminución significativa en todas las secciones de cerebro en el grupo profiláctico (I) y el grupo terapéutico de 100 mg/ Kg (grupo IV), como se muestra en el panel B de la Fig. 7. Finalmente, la C-FC<sub>30%</sub> redujo significativamente el volumen del infarto cerebral en el grupo profiláctico hasta un 4,3%, y de una manera dependiente de la dosis en los grupos terapéuticos, hasta 17,2%, 12% y 8% para 50, 75 y 100 mg/Kg, respectivamente, muy por debajo del grupo I/R vehículo (26,6%) (Fig. 7C).

La Fig. 8A muestra que 10 min de interrupción del FSC global en los gerbos, seguida de siete días de reperusión, produjo una pérdida neuronal significativa en todas las regiones del hipocampo. El tratamiento profiláctico con C-FC<sub>30%</sub> fue capaz de prevenir casi completamente la pérdida de neuronas en las regiones CA-2, CA-3 y CA-4; mientras que los regímenes terapéuticos restablecieron las líneas de células piramidales en dichas regiones hipocampales (Fig. 8B, C). Para demostrar que la C-Ficocianina es el principio activo responsable del efecto neuroprotector observado con la C-FC<sub>30%</sub>, se evaluaron dosis equivalentes de C-FC<sub>30%</sub> y C-FC<sub>>90%</sub> sobre el volumen de infarto cerebral. La Fig. 9 muestra que ambos productos disminuyen de manera similar el volumen de infarto a las 24 h después de la I/R. La Fig. 10 muestra el establecimiento de un estrés oxidativo sérico y cerebral 24 h después de la I/R en los gerbos tratados solo con el vehículo, dado por un incremento de MDA, de FRAP, y del PP.

El tratamiento oral por siete días consecutivos con C-FC<sub>30%</sub> antes de la I/R, redujo de manera significativa estos parámetros de daño oxidativo tanto en suero como en cerebro. Esto confirma que la capacidad antioxidante de la C-FC forma parte de los mecanismos que median su acción neuroprotectora frente a la IC.

La actividad locomotora (Fig. 11A) y la progresión de empinamientos en el tiempo (habituaación) (Fig. 11B) fueron similares en todos los grupos experimentales antes de la I/R. Sin embargo, siete días después de la I/R se produce un incremento en la locomoción característica de este tipo de daño en los gerbos tratados solo con el vehículo,<sup>255</sup> al compararlos con los controles (Fig. 11A). Por otro lado, el daño isquémico induce además un incremento en el número de empinamientos (pendiente positiva), indicativo de la dificultad del animal dañado para habituarse al entorno (Fig. 11C, grupo I/R vehículo). La hiperactividad se redujo de forma significativa (alrededor de un 30%) en los animales tratados profilácticamente durante siete días con 200 mg/Kg de C-FC<sub>30%</sub> (Fig. 11A). También hubo una mejor adaptación de estos a su entorno, dado por una disminución en la progresión de empinamientos (pendiente negativa), similar al grupo control (Fig. 11C).

**Fig. 8 (página siguiente).** Evaluación histológica (tinción con hematoxilina–eosina) de los efectos del tratamiento con C-FC<sub>30%</sub>. Los paneles muestran: **(A)** Fotos representativas (barra = 500  $\mu$ m); **(B)** Análisis morfométrico de las regiones del hipocampo de los animales pertenecientes a los grupos control, I/R vehículo, y tratados con C-FC<sub>30%</sub> a los 7 días después de la cirugía. Los rectángulos indican las regiones del hipocampo definidas para el conteo celular. **(C)** Microfotografías representativas (barra = 50  $\mu$ m) de la región CA-3 hipocampal, incluyendo símbolos que indican neuronas viables (cabezas de flecha) y vacuolización (asteriscos). \*\*\* $p < 0,001$  vs. control, ### $p < 0,001$  vs. I/R vehículo dentro de las respectivas secciones hipocampales (ANOVA + Newman-Keuls).

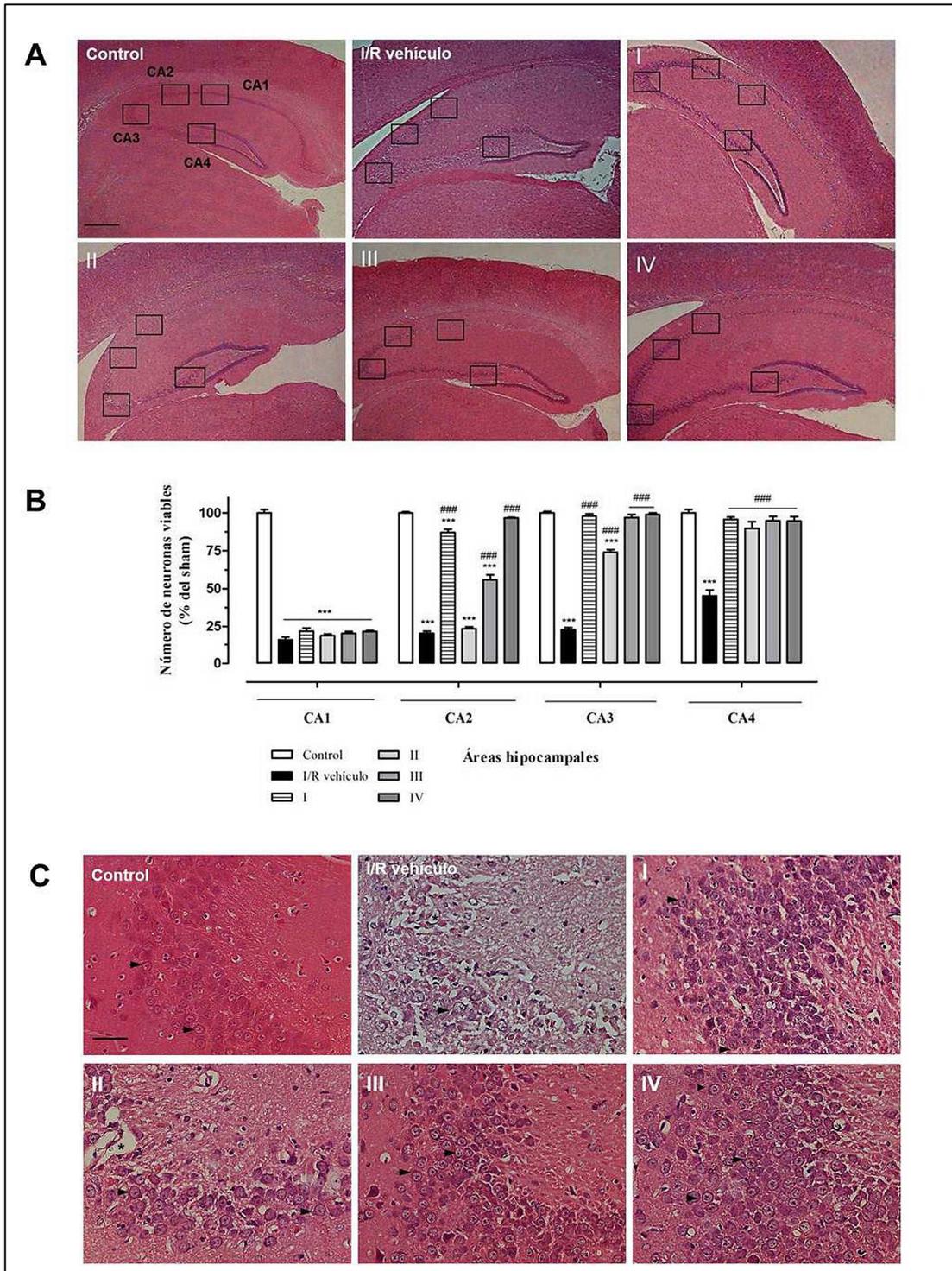
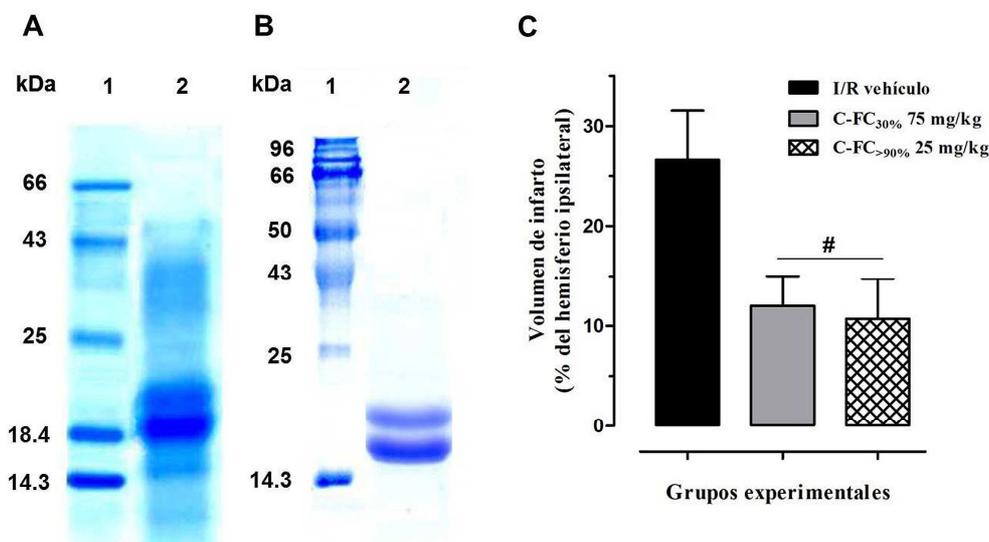
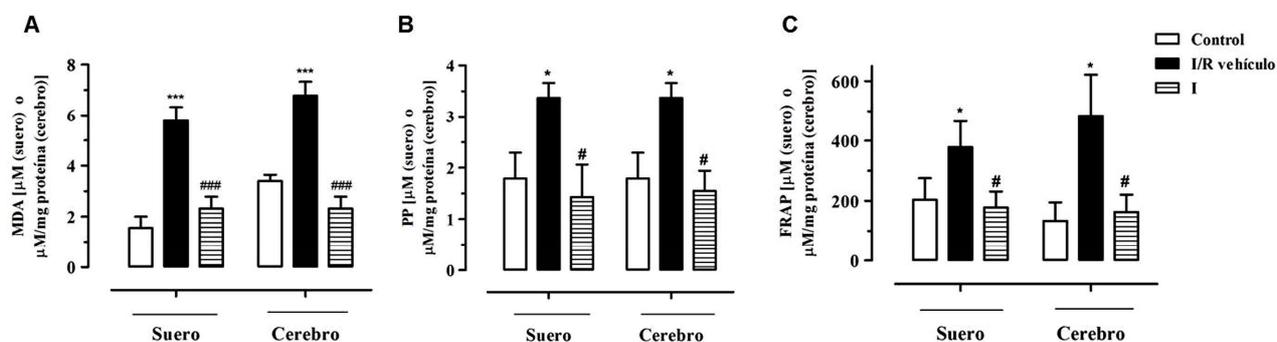


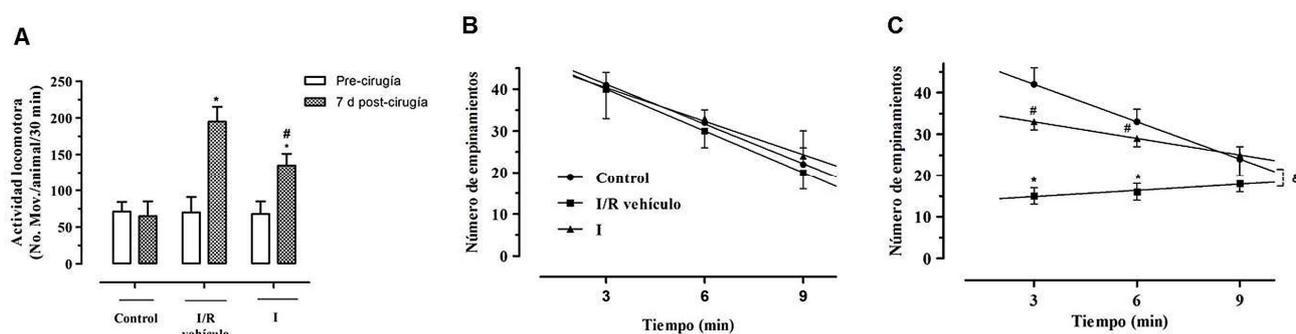
Fig. 8 (pie de figura en la página anterior).



**Fig. 9.** Evaluación del efecto de la C-Ficocianina con diferentes grados de pureza sobre el infarto cerebral. **(A)** SDS-PAGE (tinción con Azul Brillante de Coomassie) de C-Ficocianina obtenida de Biodelta Ltd. (Sudáfrica) con un 30% de pureza (C-FC<sub>30%</sub>) o **(B)** después de su purificación por intercambio iónico con más de 90% de pureza (C-FC<sub>90%</sub>). Línea 1: marcador de peso molecular; línea 2: C-Ficocianina 20  $\mu$ g. **(C)** Volumen de infarto cerebral (tinción con TTC) de los animales tratados con el vehículo o dosis intraperitoneales acumulativas de C-FC<sub>30%</sub> (75 mg/Kg) o C-FC<sub>90%</sub> (25 mg/Kg). # $p < 0,05$  vs. I/R vehículo (ANOVA + Newman-Keuls).



**Fig. 10.** Efecto del pre-tratamiento de la C-FC<sub>30%</sub> (200 mg/Kg, oral diario por siete días) sobre marcadores de estrés oxidativo en suero y homogenado de cerebro, a las 24 h de reperusión. **(A)-(C)** muestran los marcadores de peroxidación lipídica (MDA), potencial de peroxidación (PP), y capacidad reductora férrica del plasma (FRAP por sus siglas en inglés). \* $p < 0,05$  y \*\*\* $p < 0,001$  vs. control, # $p < 0,05$  y ### $p < 0,001$  vs. I/R vehículo (ANOVA + Newman-Keuls).



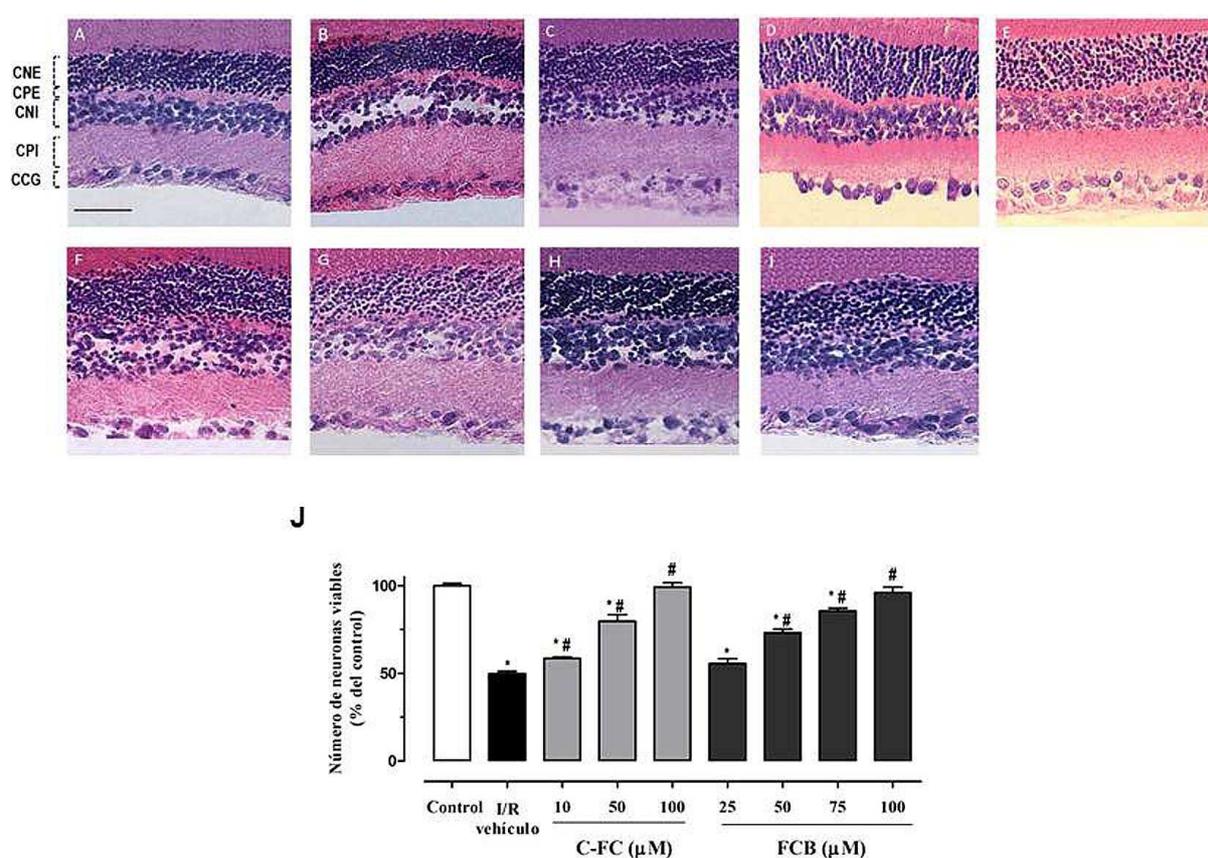
**Fig.11.** Efecto de la C-FC<sub>30%</sub> sobre la actividad locomotora de gerbos sometidos a una I/R cerebral. (A) Actividad locomotora antes (barras blancas) y siete días después (barras moteadas) de la I/R en los grupos control, I/R-vehículo y el tratado con 200 mg/Kg de C-FC<sub>30%</sub> (grupo I). Los números de empinamientos se contaron durante tres intervalos de 3 min para cada animal y se obtuvo la recta de mejor ajuste antes (B) y siete días después (C) de la I/R. \*p<0,05 vs. control, #p<0,05 vs. I/R vehículo dentro de la misma serie (ANOVA + Newman-Keuls). &p<0,05 vs. I/R vehículo (regresión lineal).

### 3.4.2. Efecto de la C-FC y la FCB en retina de ratas sometidas a una isquemia/reperfusión

La retina es una extensión del diencefalo, y por ende sus vasos sanguíneos comparten propiedades anatómicas y fisiológicas similares a los del encéfalo. Posee una barrera hemato-retiniana similar a la barrera hemato-encefálica. Además, la isquemia de la retina muestra eventos fisiopatológicos que también intervienen en el infarto cerebral, tales como la excitotoxicidad, el estrés oxidativo, la apoptosis y la inflamación.<sup>256</sup> La inducción de la isquemia retiniana por el aumento de la PIO es un procedimiento relativamente simple y poco invasivo, por lo que nos propusimos usar este modelo experimental para evaluar si la C-FC y la FCB podrían proteger a las neuronas de ese tejido frente a la oclusión vascular transitoria, y ofrecer de esta forma, nuevas evidencias de sus efectos anti-isquémicos.

La Fig. 12 muestra que la retina de ratas fue altamente susceptible a una lesión por isquemia-reperfusión (I/R) principalmente en la capa nuclear interna (CNI) en nuestras condiciones

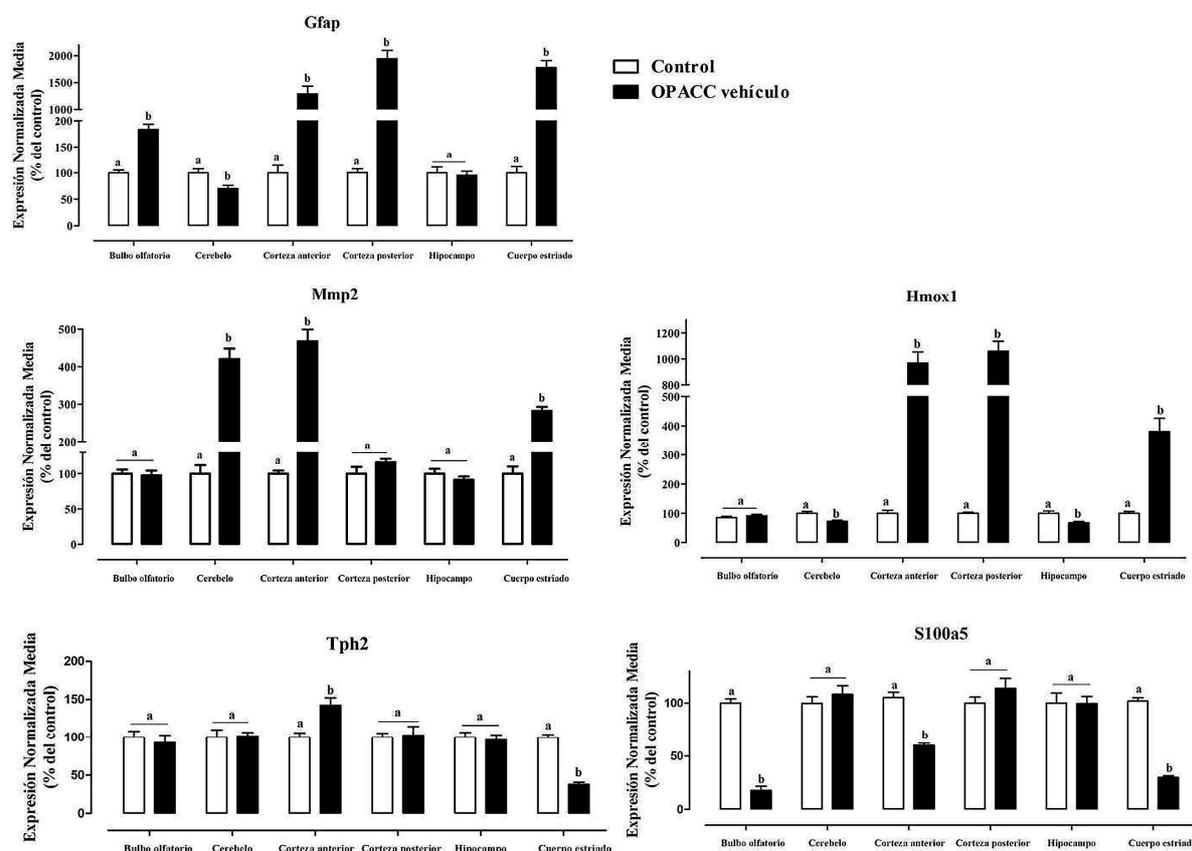
experimentales, la cual exhibió menos del 50% de células viables respecto al control no dañado (Fig. 12J). La muerte neuronal fue también acompañada por edema y desorganización de las capas de la retina (Fig. 12B). El pre-tratamiento con C-FC o con FCB previno la pérdida celular en la CNI de forma creciente dependiendo de la dosis, indicando que estos compuestos no solo son capaces de proteger a las neuronas *in vitro*, sino también en diferentes modelos *in vivo* frente a eventos isquémicos.



**Fig. 12.** Evaluación histológica (tinción con hematoxilina-eosina) de los efectos de la C-FC y la FCB frente a la I/R en retina de ratas. Los paneles muestran fotografías representativas de secciones sagitales de retina de controles no dañados (A), y de retina luego de la isquemia-reperfusión (I-R) tratada con vehículo (B), 10 μM C-FC (C), 50 μM C-FC (D) o 100 μM C-FC (E). El análisis morfométrico de las regiones de la CNI se muestran en (F). \*p<0,05 vs. control; #p<0,05 vs. I/R vehículo (ANOVA + Newman-Keuls). CNE: capa nuclear externa, CPE: capa plexiforme externa, CNI: capa nuclear interna, CPI: capa plexiforme interna, CCG: capa de células ganglionares. Barra: 50 μm.

### **2.4.3. Mecanismos inmunomoduladores y cerebroprotectores de la C-FC y FCB en el modelo de penumbra isquémica por hipoperfusión cerebral aguda en ratas**

Las regiones cerebrales sufren reducciones diferentes en el FSC local después de una OPACC, lo cual está asociado con sus cambios estructurales, metabólicos y funcionales.<sup>257</sup> Por tanto, en este modelo se evaluó primeramente la vulnerabilidad cerebral mediante el análisis de la expresión de cinco genes relacionados con distintos aspectos fisiológicos en seis estructuras cerebrales relevantes, usando técnicas de qRT-PCR. La Fig. 13 muestra que todos los genes fueron significativamente modulados en la corteza cerebral anterior y en el cuerpo estriado, lo que sugiere una mayor vulnerabilidad de estas regiones a la hipoperfusión aguda. También encontramos modulaciones diferenciales de cuatro genes (*Gfap*, *Mmp2*, *Tph2* y *Hmox1*) en regiones particulares en respuesta a la OPACC. El gen *S100a5* mostró una expresión disminuida en tres áreas (bulbo olfatorio, corteza anterior y estriado), sin encontrarse diferencias en el resto. A partir de este resultado, se analizó mediante técnicas de microarreglos el perfil de expresión génica en la corteza cerebral anterior, y su modulación por efecto del tratamiento con FCB. Una lista de genes diferencialmente expresados (valor  $q < 1,05$ , nivel de cambio  $> 1,5$ ) luego del tratamiento de las ratas isquémicas con FCB se muestra en el Anexo 3. Un total de 93 genes mostraron una expresión aumentada, mientras que 97 genes tuvieron niveles de expresión disminuidos, debido al tratamiento con FCB. Además, para caracterizar las funciones biológicas de los genes afectados por el tratamiento con FCB, se realizó un análisis de los procesos biológicos asociados a los genes modulados. El resultado muestra que los procesos inmunológicos juegan un importante papel en los mecanismos de acción de la FCB en el tejido de la corteza cerebral anterior sometido a una hipoperfusión global. (Fig. 14).



**Fig. 13.** Evaluación de los niveles de expresión por qRT-PCR de los genes *Gfap*, *Mmp2*, *Tph2*, *Hmox1* y *S100a5* en varias regiones cerebrales. Las muestras se tomaron 24 h después de la oclusión bilateral permanente de las arterias carótidas comunes (OPACC). El grupo control se sometió a la misma intervención quirúrgica pero sin oclusión de las arterias. Letras diferentes:  $p < 0,05$  ( $n=3$  para cada grupo) (pruebas de Kruskal-Wallis + Dunn).

En otra serie de experimentos se determinó el efecto de la C-FC y la FCB en la expresión de ocho genes involucrados en la respuesta inflamatoria en el bulbo olfatorio, la corteza anterior y el hipocampo. Nuestros resultados revelaron que *IFN- $\gamma$* , *IL-6*, *CD74*, *CCL12* e *IL-17A* mostraron una expresión incrementada en el bulbo olfatorio y la corteza anterior en el grupo isquémico tratado con el vehículo. La expresión de estos cinco genes se redujo significativamente por el tratamiento con C-FC y FCB en las mismas estructuras cerebrales (Fig. 15A).



**Fig. 14.** Funciones biológicas de genes con expresión aumentada por FCB en ratas isquémicas respecto al grupo OPACC vehículo. El tamaño de los cuadrantes denota los valores de log p de significación estadística de cada término. Las intensidades similares denotan similitud semántica.

Entre ellos, solo las expresiones de *IL-6* e *IL-17A* fueron elevadas en el hipocampo, las cuales fueron efectivamente revertidas por la aplicación de C-FC y FCB (Fig. 15A). El gen *Foxp3* tuvo una expresión disminuida en el grupo isquémico tratado con el vehículo, mientras que la C-FC y la FCB indujeron su expresión en las tres regiones evaluadas (Fig. 15A). Un patrón similar se observó con el gen de *IL-4*, que disminuyó sus niveles de ARNm en el bulbo olfatorio de las ratas isquémicas, pero fue significativamente inducido por ambos productos en las tres áreas cerebrales (Fig. 15A). La OPACC redujo expresión de *TGF- $\beta$* , pero fue significativamente revertido por la C-FC y FCB, ambos efectos manifestados en todas las estructuras evaluadas (Fig. 15A). Se evaluó también los niveles de expresión de seis genes adicionales relacionados con varios aspectos fisiológicos de la unidad neurovascular en estas tres regiones.

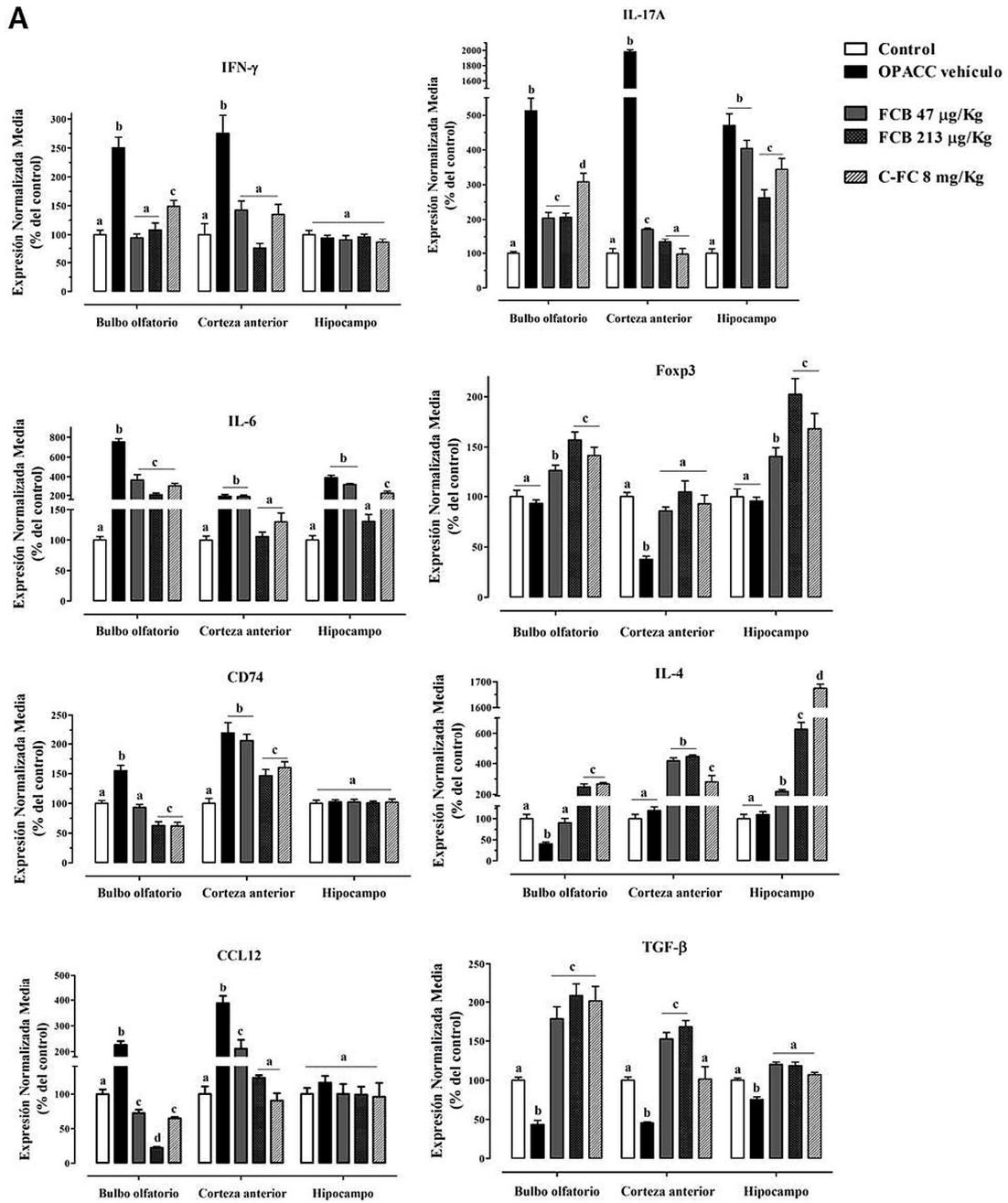
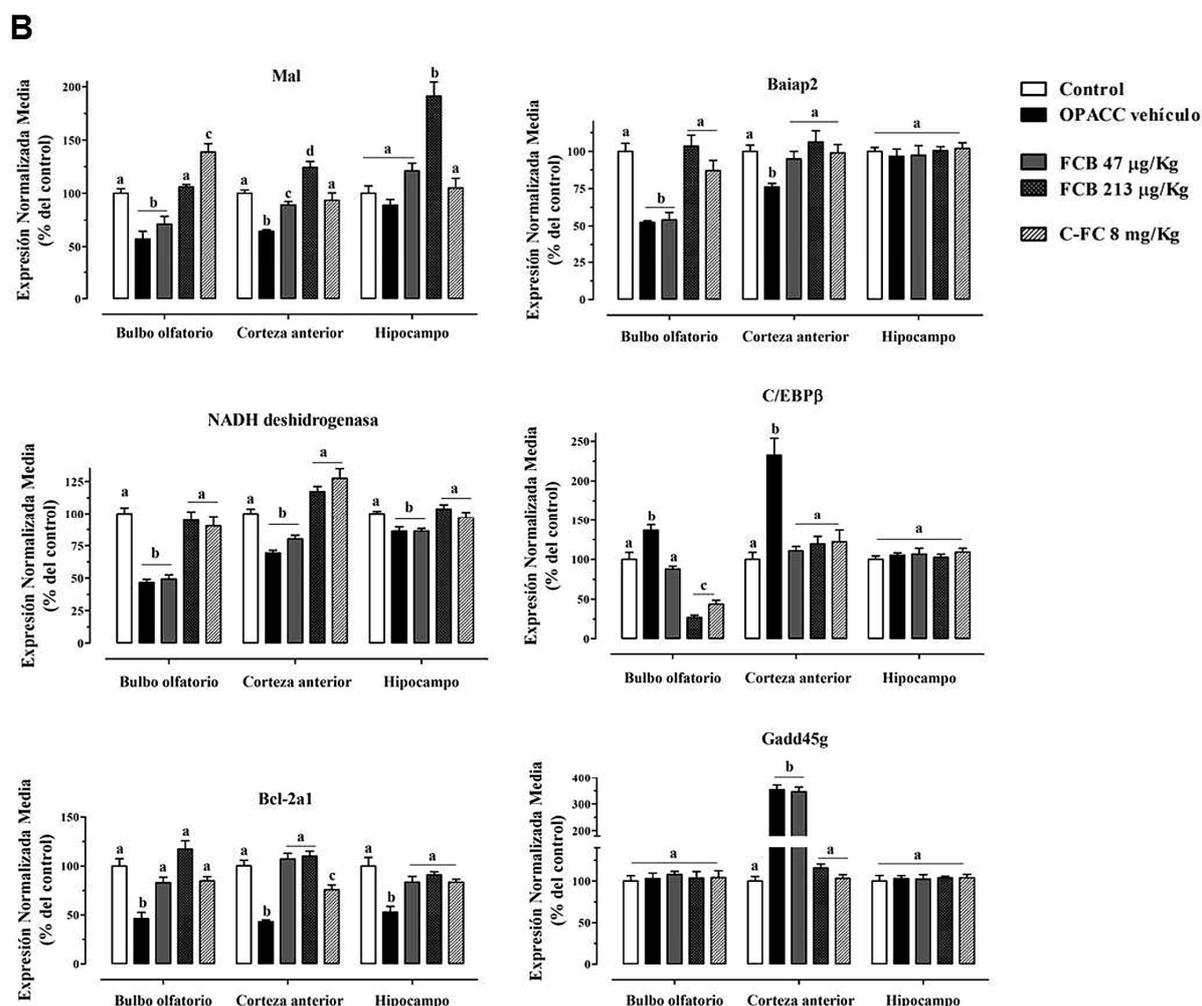


Fig. 15 (pie de figura en la página siguiente)

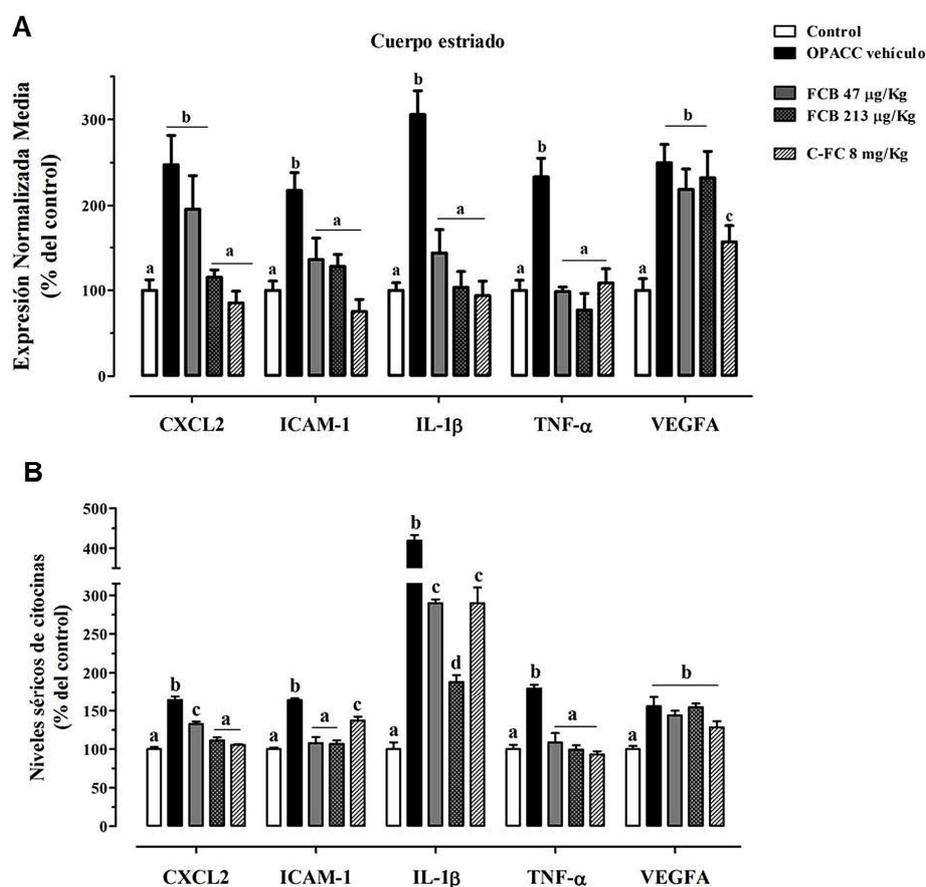


**Fig. 15 (continuación de la página anterior).** Efecto de la C-FC y la FCB sobre los niveles de expresión de genes evaluados por qRT-PCR en el bulbo olfatorio, la corteza anterior e hipocampo. Los paneles muestran los niveles de ARNm de genes relacionados con la respuesta inflamatoria (A) y con la fisiología neurovascular (B) a las 24 h después de la oclusión bilateral permanente de las arterias carótidas comunes (OPACC). El grupo control se sometió a la misma intervención quirúrgica sin oclusión de las arterias. La C-FC o la FCB se aplicaron a dosis acumulativas de 8  $\text{mg}/\text{Kg}$  o 47 y 213  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  via i.p. por 30 min, 1, 3 y 6 h después de la cirugía, respectivamente. Letras diferentes:  $p < 0,05$  ( $n=3$  para cada grupo) (pruebas de Kruskal-Wallis + Dunn).

Como se muestra en la Fig. 15 (panel B), los genes *Mal*, *NADH deshidrogenasa*, *Bcl-2a1* y *Baiap2* mostraron una expresión disminuida en el bulbo olfatorio y la corteza anterior en los

animales isquémicos tratados con el vehículo. El tratamiento con C-FC y con FCB fue capaz de recuperar significativamente la expresión de estos cuatro genes. En el hipocampo, la OPACC solo disminuyó *Bcl-2a1*, cuya expresión también fue restaurada a los niveles del control por ambas moléculas (Fig. 15B). En el hipocampo, el gen *Mal* también se indujo significativamente por el tratamiento con FCB. Por otro lado, los genes *C/EBPβ* y *Gadd45a* mostraron niveles incrementados de ARNm en la corteza anterior de los cerebros hipoperfundidos y tratados con el vehículo, efecto que se previno por la FCB y la C-FC (Fig. 15B).

Como se mencionó anteriormente, además de la corteza cerebral anterior, el cuerpo estriado también evidenció una vulnerabilidad selectiva a la hipoperfusión cerebral aguda. La respuesta inflamatoria que sigue a un evento isquémico en el cerebro involucra la infiltración de células inmunes periféricas, así como la activación de la microglia local y astrocitos. En este contexto se ha demostrado que las moléculas de adhesión endotelial, las citocinas y las quimiocinas desempeñan un papel esencial.<sup>258</sup> La evaluación de genes involucrados en esta interacción neuro-inflamatoria (*CXCL2*, *ICAM-1*, *IL-1β* y *TNF-α*) reveló un significativo incremento en sus niveles de ARNm en el cuerpo estriado de las ratas hipoperfundidas respecto al grupo control (Fig. 16A). El tratamiento con C-FC y con FCB logró estabilizar estos rangos de expresiones a los niveles del control. Por otro lado, la OPACC indujo la expresión de *VEGFA*, un gen involucrado en la respuesta angiogénica adaptativa,<sup>259</sup> que se mantuvo después del tratamiento con ambos compuestos (Fig. 16A). El análisis de los productos polipeptídicos de estos cinco genes en las muestras de suero reveló que su modulación entre los diferentes grupos fue similar comparados con los correspondientes niveles de ARNm (Fig. 16B).

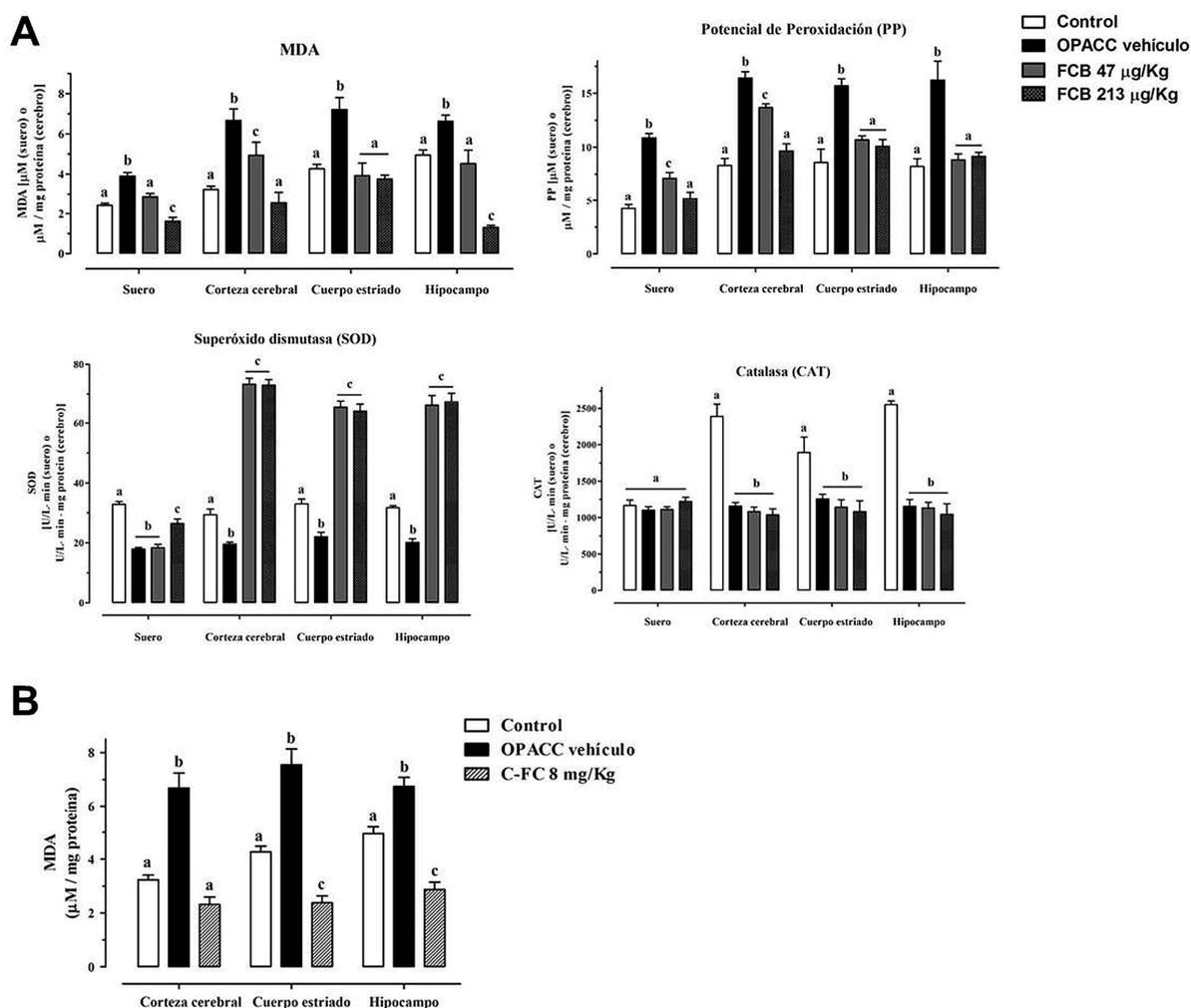


**Fig.16.** Efecto de la C-FC y la FCB sobre los niveles de expresión de *CXCL2*, *ICAM-1*, *IL-1 $\beta$* , *TNF- $\alpha$*  y *VEGFA* evaluado por qRT-PCR en cuerpo estriado (**A**) o por la técnica de Bio-Plex® en el suero (**B**) de ratas 24 h después de la oclusión bilateral permanente de las arterias carótidas comunes (OPACC). El grupo control se sometió a la misma intervención quirúrgica sin oclusión de las arterias. La C-FC o la FCB se aplicaron a dosis acumulativas de 8 mg/Kg o 47 y 213 µg/Kg vía i.p. por 30 min, 1, 3 y 6 h después de la cirugía, respectivamente. Letras diferentes:  $p < 0,05$  ( $n=3$  para cada grupo) (pruebas de Kruskal-Wallis + Dunn).

Por otro lado, nuestros resultados revelaron un incremento significativo de los niveles de MDA y PP a las 24 h después de la OPACC en el suero, corteza cerebral, cuerpo estriado e hipocampo de las ratas tratadas con vehículo (Fig. 17A). Estos resultados indican un incremento de los niveles de POL en las ratas isquémicas. Después del tratamiento con FCB, ambos marcadores fueron efectivamente restaurados en el suero y las regiones cerebrales (Figs. 17A). Además, la actividad

SOD disminuyó en los animales isquémicos pero se recuperó significativamente con el tratamiento con FCB en todos estos tejidos. La actividad CAT no mostró cambio alguno entre los grupos experimentales en suero. Sin embargo, este biomarcador redox mostró un comportamiento similar en el grupo isquémico tratado con el vehículo o con FCB, con una significativa disminución en relación al control, en las estructuras cerebrales (Fig. 17A). A pesar de no disponer de datos de todos los biomarcadores y compartimentos tisulares anteriores, la C-FC también logró disminuir la sobre-producción de MDA en las regiones cerebrales analizadas (Fig. 17B).

Resultados obtenidos por análisis histológico al mes posterior a la oclusión vascular, mostraron una disminución significativa (<60%) en el número de neuronas viables en todas las áreas piramidales del hipocampo en el grupo isquémico tratado con vehículo. Por el contrario, el tratamiento con C-FC logró prevenir esta pérdida neuronal en el hipocampo, alcanzando los niveles del control en CA-1, -2 y -4 (Fig. 18).



**Fig. 17.** Efecto del tratamiento con (A) FCB sobre los niveles de MDA, PP, SOD y CAT en el suero y homogenado de regiones cerebrales de ratas, o con (B) C-FC sobre los niveles de MDA en áreas cerebrales, a las 24 h de la oclusión bilateral permanente de las arterias carótidas comunes (OPACC). El grupo control se sometió a la misma intervención quirúrgica sin oclusión de las arterias. La C-FC o la FCB se aplicaron a dosis acumulativas de 8 mg/Kg o 47 y 213 µg/Kg vía i.p. por 30 min, 1, 3 y 6 h después de la cirugía, respectivamente. Letras diferentes:  $p < 0,05$  ( $n=5$  para cada grupo) (pruebas de Kruskal-Wallis + Dunn).

**Fig.18 (página siguiente).** La C-FC protegió a las neuronas de la capa piramidal del hipocampo en ratas sometidas a una hipoperfusión cerebral aguda. (A) Imágenes representativas (tinción con hematoxilina-eosina) y (B) Análisis morfométrico de las regiones del hipocampo a los 30 días posteriores a la oclusión bilateral permanente de las arterias carótidas comunes (OPACC). La C-FC se administró a una dosis acumulativa de 8 mg/Kg vía i.p. por 30 min, 1, 3 y 6 h después de la cirugía, respectivamente. Letras diferentes:  $p < 0,05$  ( $n=5$  para cada grupo) (pruebas de Kruskal-Wallis + Dunn). Barra: 50 µm.

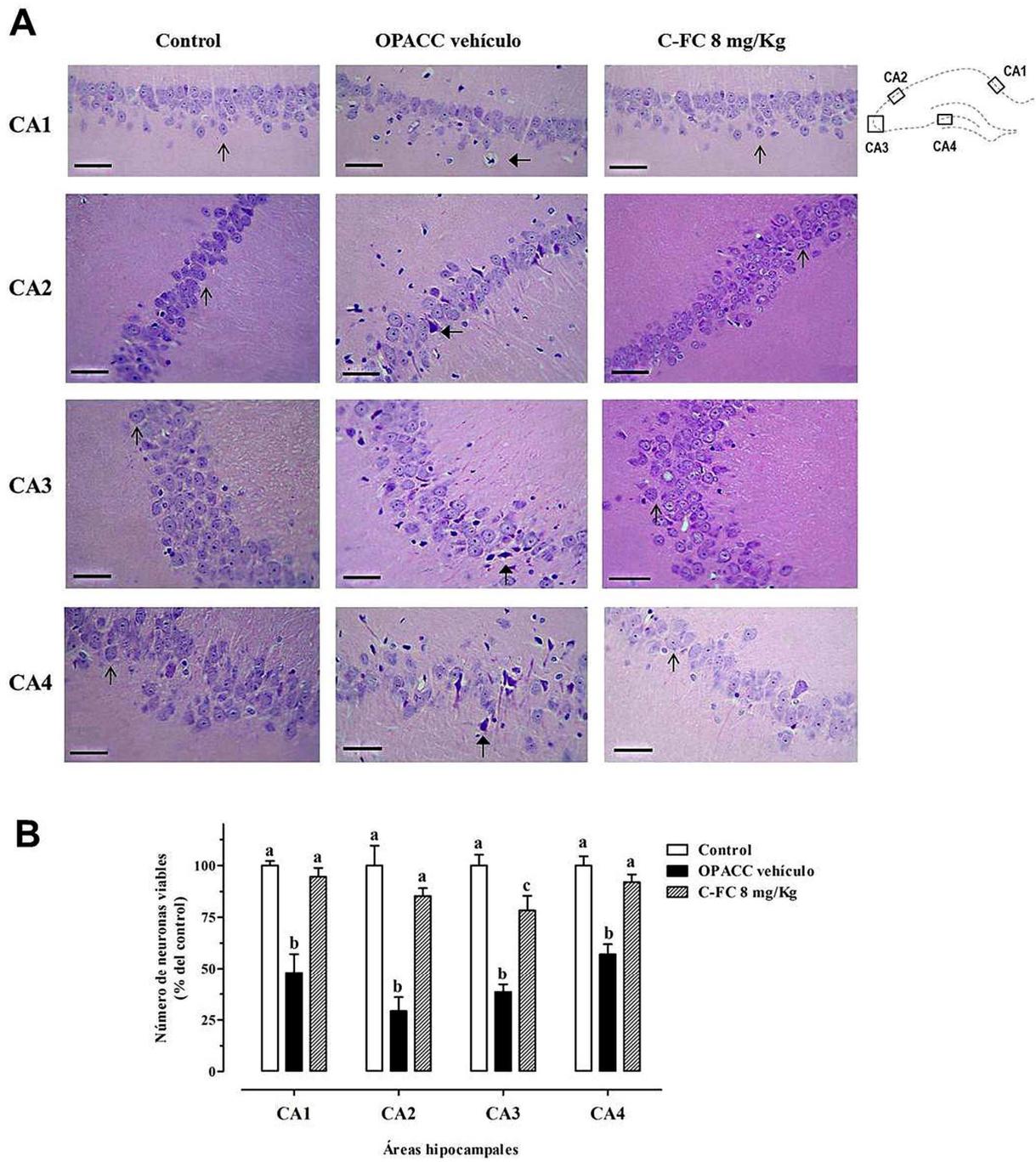
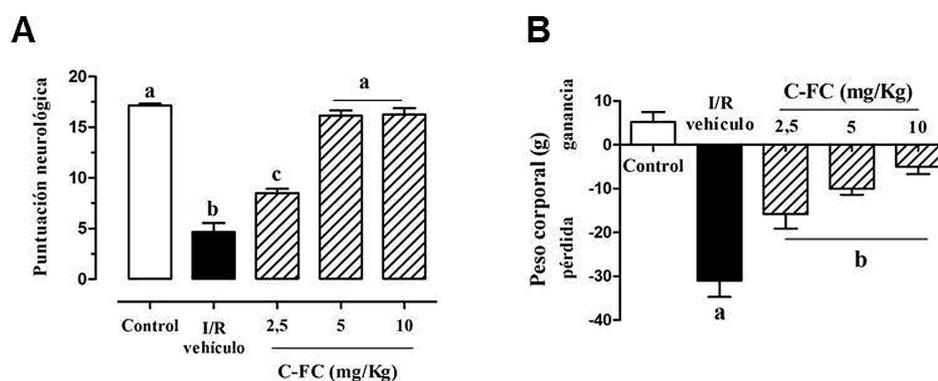


Fig. 18 (pie de figura en la página anterior).

#### **3.4.4. Efecto neuroprotector de la C-FC frente a la isquemia/reperfusión cerebral focal inducida por endotelina-1 en ratas e inhibición de la NADPH oxidasa**

Para continuar caracterizando las potencialidades farmacológicas de la C-FC frente al ictus isquémico, se empleó un modelo de IC focal en ratas Wistar, inducido por el péptido vasoconstrictor endotelina-1 (ET-1), inyectado en la vecindad de la ACM. En las condiciones del presente estudio, todos los animales operados (n=10 cada uno) del grupo control y los tratados con C-FC sobrevivieron hasta el final del experimento (24 h post-cirugía). En el grupo ET-1 + vehículo, de un total de 21 animales operados, 7 murieron antes de las 3 h posteriores a la inyección de ET-1, y no se consideraron para el análisis estadístico. De los 14 restantes, 9 se usaron para la tinción con TTC y 5 para la evaluación histoquímica (tinción con DHE e inmunotinción anti-NOX2/gp91phox).

La Fig. 19 muestra que los animales isquémicos tratados con vehículo sufrieron una severa afectación neurológica (media de 4,67 de una escala máxima de 18 puntos) acompañada por una drástica caída en el peso corporal (pérdida promedio de 31 g, mientras que los controles tuvieron una ganancia media de 5,2 g en el mismo período de tiempo), a las 24 h posteriores a la inyección de ET-1. El tratamiento post-isquémico con C-FC logró reducir significativamente el deterioro clínico y la pérdida del peso corporal de forma dosis-dependiente, alcanzando los niveles de funcionamiento neurológico del control a la dosis de 5 mg/Kg (Fig. 19).



**Fig. 19.** La C-FC previene la disfunción neurológica (A) y la pérdida de peso corporal (B) inducidas por una isquemia/reperfusión cerebral focal tras 24 h de la aplicación de ET-1 (600 pmol) en la cercanía de la Arteria Cerebral Media. El control recibió una inyección de solución salina 0,9% en lugar de ET-1. Letras diferentes:  $p < 0,05$  de acuerdo a las pruebas de Kruskal-Wallis + Dunn (panel A) o de ANOVA + Newman-Keuls (panel B).

Además, se observaron elevadas áreas de infarto subcortical y cortical en el grupo isquémico tratado con vehículo (Fig. 20 A, B), principalmente en las secciones cerebrales 2, 3 y 4, mientras que el grupo control no mostró tejido isquémico alguno (Fig. 20A). El grupo IR vehículo mostró un volumen de infarto cerebral de  $284,5 \text{ mm}^3$  (como promedio), lo cual representa el 42,6% del volumen del hemisferio cerebral ipsilateral (Fig. 20C). El tratamiento con C-FC mostró una reducción significativa tanto en las áreas de infarto (corticales y subcorticales) en todas las secciones cerebrales, como del volumen de infarto cerebral, a partir de la dosis de 5 mg/Kg (Fig. 20), en concordancia con los resultados obtenidos con la evaluación neurológica (Fig. 19A). La C-FC logró disminuir el volumen de infarto cerebral (entre paréntesis se indica el porcentaje respecto al volumen del hemisferio ipsilateral) hasta  $225,02 \text{ mm}^3$  (32,8%),  $64,2 \text{ mm}^3$  (11,7%) y  $55,4 \text{ mm}^3$  (8,2%) para las dosis de 2,5, 5 y 10 mg/Kg, respectivamente (Fig. 20C).

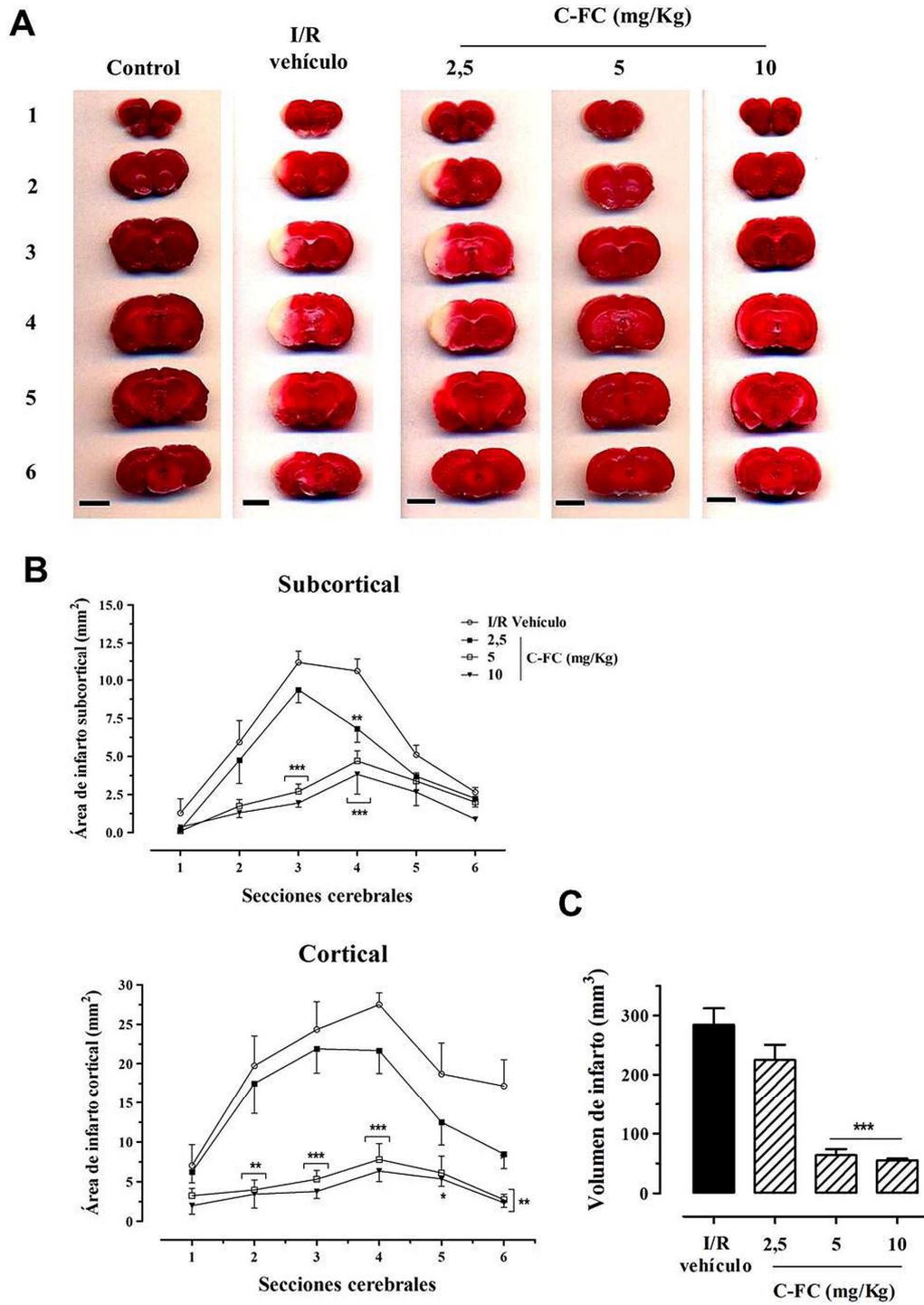
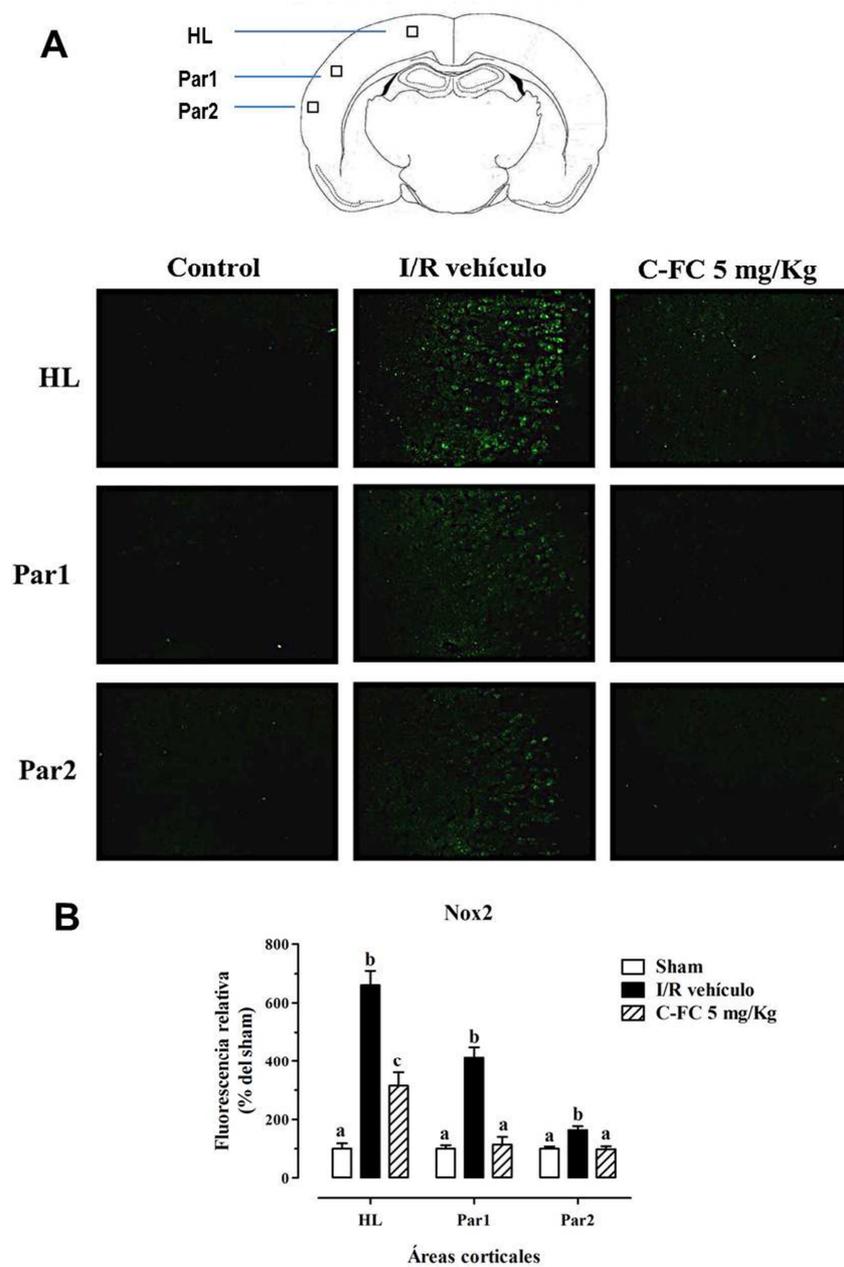


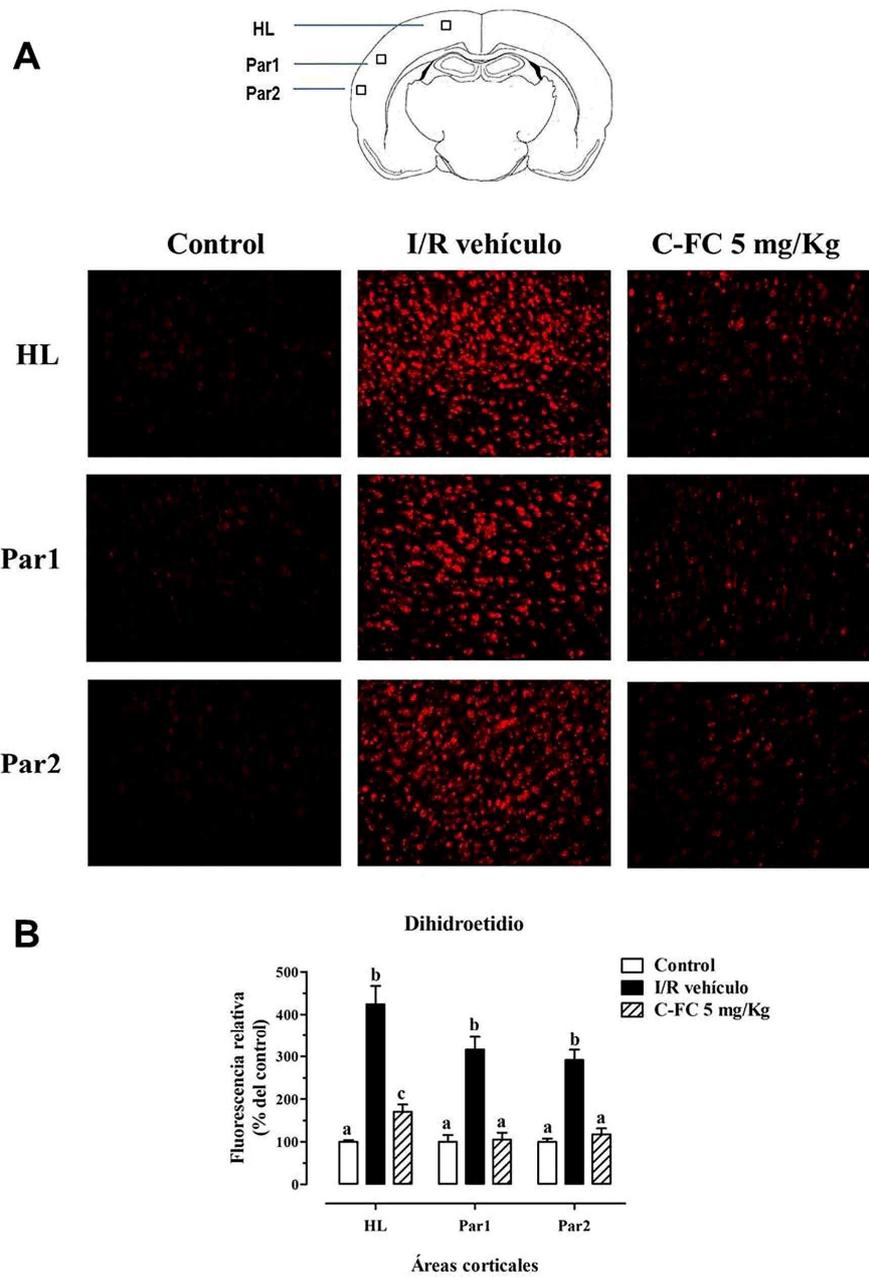
Fig. 20 (pie de figura en la página siguiente).

**Fig. 20 (página anterior).** Efecto de la C-FC sobre el infarto cerebral tras 24 h de la aplicación de ET-1 (600 pmol) en la cercanía de la Arteria Cerebral Media. **(A)** Imágenes representativas de la tinción con TTC y **(B)** Áreas de infarto por sección cerebral (rostral a caudal). **(C)** Volumen de infarto cerebral. El control recibió una inyección de solución salina 0,9% en lugar de ET-1. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. I/R vehículo, entre áreas de la misma sección cerebral, o entre los volúmenes de infarto (ANOVA + Newman-Keuls). Barra: 0,5 cm.

La dosis mínima efectiva de C-FC fue de 5 mg/Kg en la evaluación de la disfunción neurológica y del volumen de infarto cerebral. Por tanto, se decidió emplear esta dosis para el posterior análisis de la expresión y actividad de la NADPH oxidasa en tejido cerebral, como posible mediador de los mecanismos de acción de esta molécula frente a la I/R inducida por ET-1. Como se muestra en la Fig. 21, los niveles de expresión de la subunidad catalítica NOX2/gp91phox en diferentes áreas corticales de interés (HL, Par1, Par2) fue significativamente superior en el grupo I/R vehículo en comparación con el control. A su vez, las cantidades del radical  $O_2^{\bullet-}$  producidas en las mismas regiones cerebrales también estuvieron significativamente superiores en los animales isquémicos tratados con salina respecto a los controles (Fig. 22), lo cual está en concordancia con lo reportado en la literatura.<sup>260</sup> La C-FC a 5 mg/Kg inhibió significativamente la sobre-expresión de NOX2/gp91phox (Fig. 21), así como el incremento de superóxido (Fig. 22), en las tres áreas cerebrales analizadas.



**Fig. 21.** (A) Imágenes representativas (200x) del inmunomarcaje anti-NOX2/gp91phox en tres áreas cerebrales de interés (indicadas en el esquema superior) tras 24 h de la aplicación de ET-1 (600 pmol) en la cercanía de la Arteria Cerebral Media. (B) Análisis densitométrico. El control recibió una inyección de solución salina 0,9% en lugar de ET-1. Letras diferentes:  $p < 0,05$  (pruebas de ANOVA + Newman-Keuls).



**Fig. 22.** (A) Imágenes representativas (200x) de la tinción con dihidroetidio (marcador fluorescente específico de  $O_2^{\bullet}$ ) en tres áreas cerebrales de interés (indicadas en el esquema superior) tras 24 h de la aplicación de ET-1 (600 pmol) en la cercanía de la Arteria Cerebral Media. (B) Análisis densitométrico. El control recibió una inyección de solución salina 0,9% en lugar de ET-1. Letras diferentes:  $p < 0,05$  (pruebas de ANOVA + Newman-Keuls).

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Modelos *in vitro*

#### 4.1.1. Inhibición de la transición de permeabilidad mitocondrial

Las mitocondrias son tanto iniciadoras como blancos de las lesiones oxidativas celulares, las cuales son capaces de interrumpir la producción de ATP, inducir la TPM y liberar factores proapoptóticos.<sup>261,262</sup> Por tales razones, en el presente trabajo se estudió la mitocondria cerebral como blanco farmacológico potencial de la C-FC. Las mitocondrias aisladas sufren una TPM bajo diferentes condiciones, tales como en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y fosfato inorgánico (Pi). Este proceso se caracteriza por un aumento en la permeabilidad de las membranas mitocondriales, provocando la disipación del  $\Delta\Psi$ , el hinchamiento del orgánulo, y la eventual ruptura de la membrana mitocondrial externa.<sup>263</sup> En el presente trabajo, la TPM fue inducida en MCRs por una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  y Pi, y estimada experimentalmente mediante los cambios espectrofotométricos a 540 nm que revelan el hinchamiento mitocondrial. Estas condiciones simulan el ambiente isquémico neuronal, en el cual ocurre un incremento de las concentraciones citosólicas de  $\text{Ca}^{2+}$  y Pi debido a la excitotoxicidad mediada por el glutamato y el aumento en la hidrólisis del ATP, respectivamente.<sup>264</sup> Como resultado del tratamiento con C-FC, el hinchamiento mitocondrial y por ende la TPM, fueron significativamente prevenidos, lo cual podría contribuir a la capacidad neuroprotectora de la C-FC. La isquemia induce un aumento patológico en los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  provocando la activación de proteasas y enzimas generadoras de EROs, las cuales pueden lesionar las estructuras mitocondriales.<sup>265</sup> En concordancia con esto, nuestros resultados mostraron un incremento significativo en los niveles de EROs en MCRs aisladas como consecuencia de la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ /Pi. La sonda empleada

en este estudio para la detección de EROs, la H<sub>2</sub>DCFDA, es una molécula permeable a las membranas que puede ser convertida por las esterasas de la matriz mitocondrial en el producto no fluorescente H<sub>2</sub>DCF.<sup>266</sup> Esta sonda no es específica para superóxido y peróxido de hidrógeno, importantes EROs que se producen en la mitocondria,<sup>267</sup> sino que reacciona, además, con diferentes radicales, tales como hidroxilos, carbonatos, dióxido de nitrógeno,<sup>268</sup> convirtiéndose por oxidación en el producto altamente fluorescente DCF. Por tanto, el incremento en la oxidación del H<sub>2</sub>DCF refleja el aumento de los niveles de distintas EROs en lugar de cualquier especie en particular. El efecto inhibitorio de la C-FC obtenido sobre los niveles mitocondriales de EROs, sugiere que su actividad secuestradora de radicales forma parte del mecanismo de protección frente al daño oxidativo en la mitocondria. Nuestros resultados también mostraron que entre las principales consecuencias de la TPM se encuentran la disipación del  $\Delta\Psi$  y la liberación del citocromo c, lo cual está relacionado con el daño oxidativo a las membranas mitocondriales.<sup>269,270</sup> Estos procesos fueron inhibidos por la CsA y el Trolox, lo cual indica que la TPM y el desbalance oxidativo son mediadores importantes en la disfunción mitocondrial. El efecto protector de la C-FC sobre el  $\Delta\Psi$  y su acción inhibitoria sobre la liberación de citocromo c pudiera entonces estar indirectamente causado por sus propiedades antioxidantes.

#### **4.1.2. Efectos neuroprotectores en líneas neuronales**

Nuestros resultados demuestran que tanto la C-FC como la FCB protegen a las células PC12 frente al daño inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o por glutamato. Estudios previos indican que la reducción del MTT en células de mamíferos ocurre en varios compartimentos subcelulares como la mitocondria, citoplasma, endosoma/lisosoma y la membrana plasmática, indicando la actividad metabólica de la célula.<sup>271</sup> Debido a la reacción con iones metálicos como el hierro o el cobre, el

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produce radicales hidroxilos, compuesto altamente reactivo y principal responsable de la toxicidad por EROs en esta línea celular.<sup>272</sup> El glutamato activa los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA-R) produciendo un influjo de Ca<sup>2+</sup> y varios eventos moleculares que incluyen una producción incrementada de radicales libres y eventualmente la ejecución de programas de muerte celular.<sup>273</sup> Adicionalmente, los receptores metabotrópicos de glutamato (mGluRs) parecen potenciar la neurodegeneración mediada por los NMDA-R.<sup>274</sup> Se ha reportado la expresión de mGluRs funcionales<sup>275</sup> así como NMDA-Rs<sup>276</sup> en células PC12, que pueden contribuir a la toxicidad por glutamato observada en esta investigación. Tanto al C-FC como la FCB poseen capacidades antioxidantes<sup>21</sup> que pudieran contribuir, al menos de manera parcial, a sus efectos protectores en las PC12. Por tanto, estos resultados sugieren su potencial aplicación para preservar la integridad neuronal luego de un infarto cerebral. De igual forma, la protección que ejerció la C-FC sobre la línea SH-SY5Y frente al daño oxidativo por *t*-BOOH refuerzan sus potencialidades anti-isquémicas. El hierro puede catalizar la conversión del *t*-BOOH a radicales ter-butilperoxilos o tert-butoxilos, los cuales pueden iniciar la POL.<sup>277</sup> En cultivos primarios de neuronas corticales de rata, el daño por *t*-BOOH fue bloqueado por el pre-tratamiento con deferoxamina, un quelante específico para el hierro, lo cual indica que el hierro intracelular es importante para la toxicidad del *t*-BOOH.<sup>278</sup> De hecho, ha sido reportado que el *t*-BOOH induce una sobreproducción de radicales libres en células SH-SY5Y.<sup>279</sup> Así, las potentes acciones de la C-FC en el secuestro de radicales libres,<sup>179</sup> la preservación de los sistemas endógenos antioxidantes,<sup>280</sup> en conjunto con su capacidad quelante sobre el hierro,<sup>281</sup> y su efecto inhibitorio sobre la reacción de Fenton, pudieran estar relacionadas con los efectos neuroprotectores de la C-FC en las células SH-SY5Y y las PC12.

## 4.2. Modelos *in vivo*

### 4.2.1. Isquemia/reperfusión cerebral global en gerbos de Mongolia

El presente estudio demuestra por primera vez los efectos neuroprotectores de la C-FC y su cromóforo, la FCB, contra la lesión isquémica cerebral en diferentes modelos pre-clínicos y especies animales, así como la identificación de los mediadores y mecanismos moleculares involucrados.

Un círculo de Willis incompleto hace de los gerbos de Mongolia un sistema experimental adecuado para modelar la encefalopatía después de un paro cardíaco humano. El tratamiento con C-FC<sub>30%</sub> en ambos esquemas, profiláctico y terapéutico, fue capaz de reducir el déficit neurológico, y el volumen del infarto cerebral, así como mejorar la sobrevivencia de los gerbos. El efecto beneficioso sobre el volumen del infarto también fue confirmado con la administración de C-FC<sub>>90%</sub> a una dosis bioequivalente en relación con C-PC<sub>30%</sub>, lo que demuestra que la C-Ficocianina es la molécula responsable de la protección anti-isquémica. Nuestros resultados indican que 10 minutos de interrupción del FSC global seguido de siete días de reperfusión causó una pérdida neuronal en todas las regiones piramidales del hipocampo, de acuerdo con estudios anteriores,<sup>282</sup> a pesar de que también se ha reportado una degeneración retardada mayormente en la zona de CA1.<sup>283,284</sup> Se ha propuesto que esta muerte neuronal generalizada del hipocampo puede estar asociada con una persistente excitotoxicidad del glutamato después del evento isquémico.<sup>285</sup> La administración profiláctica de C-FC<sub>30%</sub> contrarrestó casi completamente los efectos perjudiciales isquémicos en la viabilidad neuronal en CA2, CA3 y CA4, mientras que en esquema terapéutico, la C-FC<sub>30%</sub> indujo una recuperación neuronal dependiente de la dosis en las mismas áreas. Estos resultados sugieren que la C-FC<sub>30%</sub>

promueve la supervivencia neuronal *in vivo* tanto para la prevención como para una estrategia terapéutica en el accidente cerebrovascular isquémico. Como se ha mencionado la POL es una de las principales consecuencias de la lesión mediada por radicales libres en el cerebro.<sup>286</sup> Compuestos que atenúan este proceso también han sido capaces de proteger frente al daño neuronal del hipocampo en gerbos sometidos a IC global.<sup>286</sup> Nuestros resultados muestran una elevación significativa de la POL, que se evidencia por el incremento en los niveles de MDA en suero y cerebro de los gerbos isquémicos, lo cual fue casi completamente prevenido por el tratamiento con C-FC<sub>30%</sub>. La isquemia conduce a la activación dependiente de Ca<sup>2+</sup> de la fosfolipasa A<sub>2</sub>,<sup>287</sup> la consiguiente hidrólisis de los fosfolípidos de membrana y la liberación de ácidos grasos libres, incluyendo ácido araquidónico,<sup>288</sup> que luego se metaboliza por las vías de las lipooxigenasas y ciclooxigenasas, produciendo anión O<sub>2</sub><sup>•-</sup> en el proceso.<sup>289</sup> El anión O<sub>2</sub><sup>•-</sup> puede producir radicales hidroxilo (iniciadores de la POL) a través de las mencionadas reacciones de Fenton y Haber-Weiss. La potente capacidad de prevenir la POL de C-FC<sub>30%</sub> podría explicarse por su propiedad inhibidora de la COX-2,<sup>185</sup> y de eliminar de manera eficiente varias especies radicalarias (peroxilos, hidroxilos, alcoxilos). En este sentido, se ha reportado que los inhibidores selectivos de la COX-2 son neuroprotectores en diferentes modelos experimentales de accidente cerebrovascular isquémico.<sup>290,291</sup> El PP, biomarcador que se interpreta como la susceptibilidad a la POL de la muestra, fue incrementado en el grupo I/R vehículo, y se ha asociado con varias enfermedades tales como la neuromielitis óptica<sup>292</sup> y el VIH / SIDA.<sup>293</sup> Por lo tanto, su ascenso indica el desequilibrio redox establecido como resultado del procedimiento de I/R. El pre-tratamiento con C-FC<sub>30%</sub> fue capaz de recuperar de manera significativa los niveles de este biomarcador (PP), mostrando su capacidad para contrarrestar la

producción y para inactivar las EROs dañinas. En contraste, FRAP es indicativo de la capacidad reductora de la muestra e implica la integración compleja de todos los compuestos con actividad antioxidante en la muestra,<sup>294</sup> y su aumento en el grupo I/R vehículo podría parecer contradictorio. Sin embargo, teniendo en cuenta que este biomarcador se midió a las 24 h post-cirugía, podría reflejar una respuesta defensiva endógena frente al entorno oxidante, probablemente mediada por la cascada de Nrf2/ARE,<sup>295,296</sup> pero no lo suficiente para desintoxicar la sobrecarga masiva especies pro-oxidantes asociadas a la lesión isquémica cerebral.<sup>297</sup> Los gerbos tratados con C-FC<sub>30%</sub> mostraron una recuperación de los niveles normales de FRAP, probablemente mediante la prevención indirecta de la inducción de la cascada de Nrf2/ARE a través de las múltiples propiedades antioxidantes de la biliproteína, que podría mantener el entorno redox en un estado normal. Por otro lado, la hiperactividad locomotora inducida por la I/R en gerbos se ha asociado con el daño de las neuronas del hipocampo y una reducción en la capacidad del animal para habituarse o para formar mapas espaciales.<sup>298</sup> El tratamiento profiláctico con C-FC<sub>30%</sub> redujo la actividad locomotora y mejoró la habituación así como la disfunción neurológica en comparación con el grupo tratado con vehículo. Estos resultados están en concordancia con la reducción del volumen de infarto cerebral y con la preservación neuronal en el hipocampo. La mejoría conductual y clínica sugiere que la administración de C-FC<sub>30%</sub> no sólo protegió la integridad neuronal, sino que también conserva sus funciones neurofisiológicas. En este sentido, se ha demostrado que la aplicación oral de C-FC en ratas previo a la inyección intracerebral de kainato, una excitotoxina análoga al glutamato, fue capaz de evitar efectos conductuales nocivos como convulsiones y temblores.<sup>197</sup> El modelo de I/R cerebral global en gerbos permitió, de esta manera, llevar a cabo una primera

aproximación a la evaluación pre-clínica de la C-FC en un modelo *in vivo* de IC, demostrando acciones beneficiosas de esta biliproteína.

#### **4.2.2. Isquemia/reperfusión en retina de ratas**

La isquemia de la retina inducida por el aumento en la PIO puede producir enfermedades visuales devastadoras tales como el glaucoma, la cual es la segunda causa de ceguera a nivel mundial.<sup>299</sup> La retina es sumamente sensible a la interrupción transitoria del suministro sanguíneo debido a su actividad metabólica y el alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados, y por ende, este tejido es muy susceptible al daño oxidativo.<sup>300</sup> A nivel celular, la evidencia acumulada indica que la excitotoxicidad mediada por el glutamato y el estrés oxidativo son mediadores esenciales en la lesión por I/R en la retina,<sup>301</sup> de forma similar al daño observado en un cerebro isquémico.<sup>302</sup> El presente estudio es el primero en la literatura en revelar que la C-FC y la FCB previenen la pérdida neuronal en retina de ratas sometidas a una I/R. Es muy probable que las actividades secuestradoras de la C-FC frente a los radicales hidroxilos,<sup>180</sup> peroxilos<sup>303</sup> y aniones peroxinitritos<sup>21</sup> estén involucradas en su capacidad para prevenir la neurodegeneración de la retina luego de una I/R. En concordancia con esto, nuestros resultados mostraron además un efecto inhibitorio de la C-FC sobre la reacción de Fenton, y esta inhibición también pudiera estar implicada en la protección de la retina frente a la lesión isquémica.

#### **4.2.3. Hipoperfusión cerebral aguda en ratas**

La fase aguda luego de la OPACC en ratas puede ser usada como modelo del área de penumbra isquémica cerebral, considerando la drástica (pero persistente caída) del FSC a niveles correspondientes a una moderada reducción sanguínea. Nuestros resultados revelaron que la corteza anterior y el estriado experimentaron una modulación significativa en la expresión de

todos los genes evaluados respecto al grupo control, sugiriendo un papel específico para estos genes en aquellas estructuras cerebrales como una respuesta al evento isquémico. Se ha reportado una marcada reducción del FCS local en áreas corticales y del estriado en la fase aguda después de la OPACC, alcanzando niveles de ~54%, ~47% y ~55% (en relación al control) para la corteza anterior, posterior y el estriado, respectivamente.<sup>304,305</sup> Sin embargo, la disminución aguda del FSC en el hipocampo es menos dramática (~65%).<sup>304</sup> Aquí observamos que la expresión de varios genes no varió en esta área, sugiriendo que el daño inducido por la OPACC en su fase aguda es menos pronunciado en el hipocampo que en las otras regiones cerebrales aquí evaluadas. El gen *Gfap* codifica para un filamento intermediario usado frecuentemente como marcador de astrogliosis reactiva, un proceso bifásico que puede ser tanto dañino como beneficioso luego de un evento isquémico.<sup>306</sup> Los astrocitos reactivos son fuentes potenciales de mediadores pro-inflamatorios tales como los analizados en este estudio.<sup>307</sup> Nuestras evidencias sugieren la participación de la astrogliosis reactiva en los cambios patológicos tempranos en la corteza, el estriado y bulbo olfatorio. Por otro lado, la expresión de *Mmp2* se incrementó en tres regiones cerebrales del grupo de ratas isquémicas. Esta proteasa juega un papel fundamental en el daño mediado por la OPACC sobre la BHE y la integridad de la sustancia blanca cerebral,<sup>308</sup> lo que puede afectar el funcionamiento del entorno microvascular. *Mmp2* puede también liberar el VEGF activo debido a la escisión e inactivación de la proteína de inhibición de este factor angiogénico.<sup>309</sup> Este último podría actuar en asociación con la remodelación de la membranas basal de la BHE promovida por *Mmp2*, en el proceso angiogénico que se ha reportado a largo plazo después de la OPAAC.<sup>310</sup> La triptófano hidroxilasa (TPH, EC 1.14.16.4) cataliza la primera reacción, y es la enzima limitante en la vía biosintética de la serotonina.<sup>311</sup> Estudios

previos han revelado que las neuronas productoras de serotonina pueden inervar las arterias cerebrales,<sup>312</sup> y que la expresión de *Tph2* es crítica para la síntesis de serotonina en la corteza cerebral frontal.<sup>313</sup> Nuestros resultados reflejan que la OPACC induce un incremento en la expresión de *Tph2* en la corteza cerebral anterior, un efecto que podría potenciar la rápida caída del FSC en estas regiones a través de los receptores serotoninérgicos vasoconstrictores en la vasculatura.<sup>314</sup> En contraste, detectamos una disminución en los niveles de ARNm de *Tph2* en el cuerpo estriado de ratas con OPACC, una región donde la actividad de la isoforma *Tph1* podría ser predominante.<sup>315</sup>

El gen inducible *Hmox1* (Hemo-oxigenasa 1, EC 1.14.99.3) tiene como función la escisión específica del grupo hemo en monóxido de carbono, hierro y biliverdina, la cual luego se convierte en el antioxidante fisiológico bilirrubina por la biliverdina reductasa.<sup>316</sup> Nuestros resultados muestran un incremento agudo de *Hmox1* en la corteza cerebral y el estriado del grupo expuesto a OPACC, resultado que puede asociarse a una respuesta endógena contra el entorno oxidativo manifestado por un incremento en los niveles de MDA y PP en las mismas regiones. Por otra parte, el hierro libre producido por la reacción catalítica de *Hmox1* podría estar involucrado en el establecimiento de un estrés oxidativo, si no es adecuadamente secuestrado en estas regiones.

El gen *S100a5* codifica para una proteína de unión al calcio que se ha reportado como uno de los ligandos del receptor para los productos finales de glicación avanzada (del inglés: “Receptor for Advance Glycation End Products”, RAGE),<sup>317</sup> una vía que se correlaciona con los peores pronósticos después del infarto cerebral isquémico.<sup>318</sup> En el presente trabajo detectamos bajos niveles de ARNm para *S100a5* en el bulbo olfatorio, la corteza anterior y el estriado del grupo

OPACC vehículo. Este resultado podría indicar una reacción protectora endógena frente al daño inducido por la OPACC en la unidad neurovascular mediado por la interacción RAGE-S100a5.

El presente estudio es el primero en la literatura que revela que tanto la C-FC como su cromóforo tetrapirrólico, la FCB, son capaces de modular significativamente la expresión de diferentes genes, así como la actividad enzimática y el desarrollo de procesos biológicos asociados con una OPACC aguda en ratas. Esta modulación indicó un efecto cerebroprotector frente a la OPACC, y por ende aportó nuevas evidencias relacionadas con los mecanismos moleculares de ambas moléculas en un contexto isquémico cerebral, en particular del área de penumbra. Nuestros resultados de microarreglos indican que la FCB modula la expresión de genes principalmente relacionados con la respuesta inmune subsiguiente al infarto cerebral. En este sentido, se ha reportado previamente la participación de genes relacionados con la respuesta inflamatoria después de la I/R global en ratas.<sup>319</sup> De esta forma, la modulación positiva de genes asociados con procesos inmunológicos por la FCB puede ser un factor que contrarreste, al menos en parte, el daño isquémico, resultado que se corresponde con la regulación de genes pro-inflamatorios y reguladores según se observó por qRT-PCR.

Nuestros resultados mostraron un incremento de *IFN- $\gamma$*  e *IL-6* en el bulbo olfatorio y la corteza anterior de las ratas isquémicas, probablemente asociado a la activación de leucocitos y neutrófilos.<sup>320</sup> Ambas citocinas participan en el establecimiento de reacciones inflamatorias deletéreas después del infarto cerebral isquémico.<sup>321</sup> Por tanto, la C-FC y la FCB pueden potencialmente proteger la zona de penumbra isquémica por la inhibición de la expresión de estas citocinas, restableciendo sus niveles normales, y por ende, bloqueando sus cascadas dependientes como la estimulación de moléculas de adhesión vascular.<sup>322</sup> Además, ambas

citocinas son producidas por la microglia activada, lo cual sugiere que estas células gliales son controladas en su estado inactivo en respuesta a la aplicación de ambos compuestos.<sup>323</sup> La actividad antioxidante de la C-FC y FCB podría ser también un elemento que limite la expresión de *IL-6* en astrocitos.<sup>324</sup>

Se observó, además, un incremento en los niveles de *CD74* en el bulbo olfatorio y la corteza anterior del grupo OPACC vehículo, que fue atenuado por ambos compuestos. Debido a que la proteína que codifica este gen está involucrada en la formación de MHC-II (del inglés: “Major Histocompatibility Complex class II”), este resultado sugiere un incremento en la presentación de antígenos en las áreas isquémicas mencionadas, probablemente causado por una subpoblación derivada de la microglia denominadas células dendríticas cerebrales.<sup>325</sup> Este efecto podría estar acompañado por el aumento en la expresión del MHC-II inducido por IFN- $\gamma$  en estas células.<sup>326</sup> Por tanto, la disminución de la expresión de *CD74* inducida por C-FC y FCB podría contribuir a la cerebroprotección a través de la disminución del reconocimiento de antígenos.

El gen *Foxp3* codifica para un factor de transcripción específicamente expresado por las células T reguladoras (Treg), las cuales producen TGF- $\beta$ .<sup>327,328</sup> Aquí observamos un incremento en los niveles de ARNm de *Foxp3* inducido por la C-FC y FCB en todas las regiones cerebrales estudiadas. En este sentido, una inducción similar de Treg ha sido reportada anteriormente en células mononucleares sanguíneas aisladas de pacientes con esclerosis múltiple, y tratadas con C-FC.<sup>329</sup> El incremento significativo de *Foxp3* sugiere una posible contribución de las células Treg a la cerebroprotección inducida por C-FC y FCB frente a la disminución moderada del FSC, como se ha reportado previamente por Liesz cols. (2009),<sup>330</sup> pero no en caso de un daño isquémico más severo.<sup>331</sup> Reportes recientes muestran incluso que la transferencia adoptiva de

Treg logró disminuir el daño isquémico cerebral,<sup>332</sup> sin efectos colaterales adversos en la inmunidad sistémica post-ictus.<sup>333</sup> En estrecha relación con este resultado, también detectamos un incremento significativo de la expresión de *TGF-β* en las ratas isquémicas después del tratamiento con C-FC y FCB en las tres regiones evaluadas. Las células Treg pueden servir como fuente de esta citocina anti-inflamatoria,<sup>334,335</sup> que también se ha reportado que ejerce un papel neuroprotector contra el infarto cerebral isquémico.<sup>336</sup> CCL12, que es una quimiocina para las células inmunes circulantes<sup>337</sup> y la IL-4, una citocina anti-inflamatoria que desempeña un papel cerebroprotector,<sup>338</sup> también fueron positivamente modulados por la C-FC y la FCB.

Aquí observamos un incremento de la expresión de IL-17A como consecuencia de la OPACC. Aunque esta citocina es característica de las células T<sub>H</sub>17,<sup>339</sup> evidencias previas sugieren que la IL-17 puede producirse también en células T  $\gamma\delta$  como fuente importante en el ictus isquémico.<sup>340</sup> IL-17 induce un daño neuronal directo,<sup>341</sup> y a la BHE,<sup>342</sup> y amplifica la cascada pro-inflamatoria, observándose que su bloqueo protege frente a la isquemia.<sup>343</sup> Por tanto, la disminución de los niveles de ARNm para IL-17A inducido por la C-FC y FCB podría jugar un papel beneficioso en la recuperación del tejido cerebral en hipoperfusión.

El gen *Mal* codifica una proteína integral de membrana involucrada en la mielogénesis a través del transporte vesicular de lípidos.<sup>344</sup> Se detectó un incremento en la expresión del gen *Mal* inducido por la C-FC y FCB, que puede estar asociado a un incremento en la formación de mielina y su maduración a una estructura compacta por los oligodendrocitos, previniendo de esta forma el típico daño a la materia blanca inducido por la OPACC.<sup>345</sup>

La NADH deshidrogenasa (también conocida como complejo I) es una de las enzimas de entrada de la CTE, que ayuda a la generación del potencial electroquímico para la síntesis de ATP.<sup>346</sup> Se

detectó niveles reducidos de ARNm para uno de los componentes del complejo I en las ratas isquémicas, la NADH deshidrogenasa (ubiquinona) 1 beta, subcomplejo 2. Asumiendo que esta subunidad contribuye de manera importante al correcto funcionamiento del complejo enzimático completo (aquí referido como NADH deshidrogenasa, EC 1.6.5.3), este resultado sugiere que la hipoperfusión cerebral está asociada con una deficiencia del complejo I mitocondrial. En concordancia, se ha reportado la deficiencia en los parámetros de fosforilación oxidativa y por tanto en la producción de energía, en mitocondrias aisladas de cerebro de ratas previamente sometidas a la OPACC, cuando se utilizan sustratos del Complejo I (glutamato/malato).<sup>347</sup> La C-FC y FCB restauraron los niveles de expresión de la NADH deshidrogenasa similar al control, indicando un efecto beneficioso para la producción de energía en el tejido isquémico. Esta acción, unida al posible incremento en la disponibilidad de oxígeno y glucosa mediado por la angiogénesis inducida por el VEGF, podría contribuir a la preservación del balance energético cerebral

La familia de proteínas Bcl-2 juega un papel crítico en la transducción de las señales intracelulares de apoptosis a través de la modulación de la TPM, para proveer neuroprotección frente al infarto cerebral.<sup>348</sup> Aquí observamos una disminución de la expresión de Bcl-2 (isoforma *Bcl-2a1*) en las ratas hipoperfundidas y tratadas con el vehículo, que fue significativamente contrarrestado por la C-FC y FCB, sugiriendo una acción anti-apoptótica. Como se ha mencionado anteriormente, en etapas muy tempranas después de la oclusión vascular, como consecuencia de la muerte celular necrótica se liberan al parénquima cerebral diversas moléculas intracelulares denominadas DAMPs, que activan a las células inmunes mediante receptores específicos y la cascada de NF- $\kappa$ B.<sup>349</sup> Por tanto, la modulación efectiva de

Bcl-2a1 y NADH deshidrogenasa por C-FC y FCB pudiera contribuir de una forma indirecta, a prevenir la respuesta inflamatoria post-ictus al preservar la viabilidad celular.

La regulación del transcriptoma constituye uno de los mecanismos por los cuales las células perciben y responden a las modificaciones isquémicas de su entorno, particularmente a través de factores de transcripción de respuesta a la hipoxia como *C/EBPβ*.<sup>350</sup> Nuestros resultados mostraron un incremento en los niveles de ARNm para *C/EBPβ* inducido por la OPACC en el bulbo olfatorio y la corteza anterior. El daño cerebral luego de la isquemia mediado por *C/EBPβ* involucra un incremento en la infiltración de células inmunes mediado por ICAM-1,<sup>351</sup> y probablemente por la estimulación de la expresión de genes pro-inflamatorios como IL-6<sup>352</sup> y de otros genes involucrados en el daño neuronal.<sup>353</sup> La C-FC y FCB lograron restringir la inducción de *C/EBPβ*, reforzando su capacidad de reducir la inflamación post-isquémica e influyendo sobre la protección directa de la fisiología neuronal.

De acuerdo con estudios previos que indican que la IC promueve la expresión de *Gadd45*,<sup>354</sup> nuestros resultados muestran que el procedimiento de OPACC induce un incremento en los niveles de ARNm para *Gadd45g* en la corteza anterior, que puede reflejar una respuesta endógena protectora vinculada a los procesos de reparación del ADN. El tratamiento con C-FC y FCB limitó la expresión de *Gadd45g* a los niveles del control. Una hipótesis razonable para explicar este hecho es que la prevención del estrés oxidativo mediada por ambas moléculas en la corteza cerebral puede estar acompañada por una disminución del daño oxidativo al ADN, disminuyendo así la actividad de los mecanismos reparadores incluyendo *Gadd45g*. Por otro lado, el gen *Baiap2* (también conocido como receptor de la insulina de 53 kDa, *IRSp53*), codifica para una proteína que conecta las protuberancias de la membrana citoplasmática con los

filamentos de actina en la formación de los filopodios, un proceso que es esencial para la sinaptogénesis,<sup>355</sup> la formación de neuritas,<sup>356,357</sup> y la remodelación dendrítica.<sup>358</sup> De esta forma, la recuperación de los niveles de expresión de *Baiap2* inducido por la C-FC y FCB sugiere un efecto promotor sobre la neuroplasticidad.

El análisis de la expresión genética en el cuerpo estriado mostró una estrecha correlación entre los niveles de ARNm y proteínas de los cinco genes evaluados en todos los grupos experimentales, sugiriendo que su expresión no se afectó a nivel post-transcripcional. En conjunto, estos resultados indican que la OPACC induce un ambiente pro-inflamatorio reflejado por el incremento de la expresión de la quimocina de neutrófilos CXCL2,<sup>359</sup> del ligando facilitador de la trans migración endotelial de leucocitos ICAM-1<sup>360</sup> y las citocinas dañinas IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ .<sup>361,362</sup> Esta afectación del contexto neuro-inmune fue efectivamente revertido por la aplicación de la C-FC y FCB. El gen *VEGFA*, el miembro más importante de la familia VEGF que promueve angiogénesis,<sup>363</sup> está involucrado en la remodelación del sistema arterial en respuesta a la hipoperfusión cerebral.<sup>364</sup> Ambos compuestos lograron mantener el incremento de *VEGFA* induciendo indirectamente acciones pro-angiogénicas y neuroprotectoras.<sup>365,366</sup>

Como consecuencia de la OPACC se observó un incremento en los niveles de MDA y PP, más evidente en el tejido cerebral que en suero probablemente debido a la mayor contenido de lípidos oxidables como los ácidos grasos poli-insaturados en el cerebro. El tratamiento con la FCB redujo significativamente la susceptibilidad a la lipoperoxidación en todos los compartimentos tisulares evaluados, mientras que la C-FC mostró el mismo efecto en las áreas cerebrales, lo cual indica una potente capacidad antioxidante. Como se ha mencionado anteriormente, la POL puede ser iniciada por el radical  $\bullet$ OH, formado tanto por la descomposición de los aniones peroxinitrito

(ONOO<sup>-</sup>) como por la reacción del Fe<sup>2+</sup> con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.<sup>286</sup> Además, importantes cantidades del radical anión O<sub>2</sub><sup>•-</sup> pueden acumularse como resultado de una disfunción en el transporte de electrones mitocondrial, generando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediado por la actividad SOD y produciendo ONOO<sup>-</sup> por la reacción con óxido nítrico (NO<sup>•</sup>).<sup>367</sup> Nuestros resultados muestran una disminución de la expresión del complejo I mitocondrial en las ratas expuestas a OPACC y tratadas con el vehículo, lo cual puede estar involucrado en la generación de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> debido a un incremento del estado reducido en los componentes de la CTE, contribuyendo de esta manera a la POL. Por tanto, el aumento de la expresión de subunidades de este complejo enzimático por la intervención con C-FC y FCB podría atenuar reacciones mediadas por O<sub>2</sub><sup>•-</sup> y que favorecen la lipoperoxidación. Los resultados también muestran actividades disminuidas de SOD y CAT en las regiones isquémicas cerebrales que probablemente contribuyen al daño oxidativo cerebral aquí observado. El tratamiento con FCB no alteró la actividad CAT en las áreas cerebrales, pero fue capaz de inducir significativamente la actividad SOD, incluso en suero, la cual puede remover el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> del tejido, mientras que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producido por la dismutación pudiera ser eliminado por la glutatión peroxidasa (GPx). Este efecto, junto al mejoramiento de la función del complejo I mitocondrial contribuye, al menos parcialmente, en la prevención del daño oxidativo a los lípidos en los cerebros isquémicos tratados con FCB.

En el presente estudio se observó, además, una pérdida apreciable de la viabilidad neuronal en la capa piramidal del hipocampo a los 30 días posteriores a la OPACC, en los animales tratados con vehículo. El tratamiento con C-FC logró restaurar la integridad neuronal en estas áreas, lo cual confirma sus efectos neuroprotectores en este modelo, y sugiere que la modulación temprana de diversos mecanismos moleculares después de la OPACC permite proteger el tejido cerebral en

etapas más tardías a la oclusión arterial. Indirectamente, este resultado podría sugerir un efecto neuroprotector similar para FCB, aunque la obtención de esa evidencia todavía debe realizarse.

Los resultados obtenidos en el modelo de penumbra isquémica por hipoperfusión cerebral aguda en ratas han permitido identificar diversos mediadores moleculares que expliquen la protección cerebral de C-FC y FCB frente al ictus. El análisis de la expresión del genoma completo de la corteza cerebral anterior apoya la participación de procesos inflamatorios claves en esta condición, efecto que fue contrarrestado por la administración de FCB. En este sentido, la evaluación de la expresión de citocinas (*IFN- $\gamma$* , *IL-6*, *IL-4*, *TGF- $\beta$* , *IL-1 $\beta$* , *TNF- $\alpha$* , *IL-17A*), quimiocinas (*CCL12*, *CXCL2*), factores de transcripción (*Foxp3*, *C/EBP $\beta$* ), moléculas asociadas a la presentación de antígenos (*CD74*) y a la adhesión vascular (*ICAM-1*), confirma el panorama disfuncional de un entorno pro-inflamatorio en las ratas isquémicas, que fue efectivamente controlado por la C-FC y la FCB. Además, ambos compuestos modularon positivamente la expresión de los genes *Mal*, *NADH deshidrogenasa* (subunidad 1 beta), *Bcl-2a1*, *Gadd45g*, *Baiap2* y *VEGFA*, ofreciendo mecanismos alternativos de cerebroprotección contra la hipoperfusión cerebral como la re-mielinización, el metabolismo energético, la anti-apoptosis, la plasticidad sináptica y la angiogénesis. Se observó, además, un significativo incremento en la susceptibilidad a la POL con una reducción concomitante de las actividades SOD y CAT en las ratas hipoperfundidas, indicando el establecimiento de un estrés oxidativo. La C-FC y la FCB redujeron la lipoperoxidación, mientras que FCB indujo la actividad SOD sin efecto en la actividad CAT, confirmando que sus capacidades antioxidantes ejercen acciones fundamentales contra la hipoperfusión cerebral aguda.

#### 4.2.4. Isquemia/reperfusión cerebral focal en ratas inducida por endotelina-1

La ACM es el vaso sanguíneo cerebral que con más frecuencia se afecta en los casos clínicos de ictus isquémico, incluyendo adultos<sup>368</sup> e infantes<sup>369</sup> de diferentes zonas geográficas;<sup>370,371</sup> y es asimismo, la arteria más comúnmente ocluida en los modelos experimentales de IC focal.<sup>372</sup> En el presente estudio se empleó el modelo de oclusión transitoria de la ACM por el péptido vasoconstrictor endotelina-1 (ET-1) para determinar si las acciones neuroprotectoras de la C-FC se reproducían en un sistema experimental con mayor valor predictivo para la mayoría de los pacientes que sufren esta patología, además de identificar posibles mediadores moleculares de tales efectos.

Nuestros resultados muestran un drástico deterioro neurológico y del peso corporal, así como áreas y volúmenes de infarto apreciables en las ratas del grupo I/R vehículo, a las 24 h post-cirugía. En los reportes precedentes de este modelo se observa una concordancia unánime con la caída de los dos primeros parámetros,<sup>373,374</sup> y del establecimiento de un infarto cerebral reproducible y medible cuantitativamente por la técnica del TTC, aunque en diferente magnitud debido a diferencias de diseño experimental, tales como la concentración de ET-1, la posición respecto a la ACM donde se inyecta (coordenadas estereotáxicas), el tipo de anestesia, la especie de rata utilizada, entre otros aspectos.<sup>375</sup> El tratamiento con C-FC logró mejorar significativamente estos tres parámetros, indicando un potente efecto protector frente a la I/R cerebral focal.

La NADPH oxidasa es una fuente importante de EROs en la vasculatura y el parénquima cerebral, y está involucrada en el estrés oxidativo que se produce luego de un ictus isquémico, particularmente a nivel de la BHE.<sup>376</sup> Se expresa en diversos tipos celulares involucrados en la

interacción neurovascular y neuro-inmune, incluyendo las neuronas,<sup>377</sup> los astrocitos,<sup>378</sup> las células endoteliales,<sup>379</sup> la microglia, los monocitos y los neutrófilos.<sup>380</sup> NOX2 está conformada por el dímero catalítico gp91phox (también denominado con el nombre de la isoforma) unida a p22phox (también llamado citocromo b558), y las subunidades reguladoras p47phox, p67phox, p40phox y Rac, una GTPasa. La fosforilación de p47phox por varias quinasas (ej. PKC, Akt), induce su traslación hacia la membrana permitiendo el contacto entre la p67phox y gp91phox. Una vez ensambladas ambas subunidades, el complejo entonces es capaz de transferir electrones desde el NADPH hasta el oxígeno, generando el anión  $O_2^{\bullet-}$ .<sup>381</sup> Nuestros resultados evidencian una elevada expresión de NOX2/gp91phox y producción incrementada de anión  $O_2^{\bullet-}$  en las mismas áreas cerebrales analizadas (parénquima), pertenecientes al grupo I/R vehículo, en concordancia con lo reportado previamente.<sup>248,382</sup> En las arterias de la penumbra isquémica, la generación de superóxido por la NADPH oxidasa también se incrementa dramáticamente en las primeras horas después de la IC, un efecto que es virtualmente abolido por inhibidores específicos de este complejo enzimático.<sup>383</sup> La aplicación de C-FC 5 mg/Kg logró atenuar significativamente tanto la expresión de NOX2/gp91phox como la sobreproducción de  $O_2^{\bullet-}$ . Este resultado indica que la inhibición de la NADPH oxidasa está involucrada en los mecanismos de acción anti-isquémicos de esta biliproteína. Un efecto similar de la C-FC sobre varias subunidades de la NADPH oxidasa se ha observado en modelos de otras patologías. La C-FC inhibió la expresión de p22phox en hámsteres alimentados con una dieta aterogénica, reduciendo el desarrollo de aterosclerosis principalmente vinculado a la inhibición de factores pro-oxidantes.<sup>384</sup> Aunque en el presente estudio no se determinó si la FCB también restringe la sobre-expresión de NADPH oxidasa, en reportes previos se ha observado ese efecto en otros contextos

experimentales. Recientemente, Zheng y cols. (2013) mostraron que tanto la C-FC como la FCB administradas oralmente a ratones diabéticos inhibieron la expresión renal de varios componentes de la NADPH oxidasa (Nox4, p22phox y p47phox), contribuyendo de esta manera a explicar su acción protectora frente a la nefropatía diabética.<sup>23</sup> En células endoteliales humanas (línea EA.hy926) tratadas con FCB 200  $\mu$ M durante 24 h, también se evidenció una disminución significativa en la expresión de p22phox.<sup>24</sup>

## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. CONCLUSIONES

1. La C-FC previno el daño inducido por  $\text{Ca}^{2+}/\text{Pi}$  en mitocondrias de cerebro de rata por medio de la inhibición de la Transición de Permeabilidad Mitocondrial.
2. La C-FC inhibió la reacción de Fenton generada por voltametría cíclica.
3. La C-FC protegió a las células PC12 del daño inducido por  $\text{H}_2\text{O}_2$  y por glutamato, y a las SH-SY5Y frente al efecto pro-oxidante del *t*-BOOH.
4. La C-FC<sub>30%</sub>, tanto en esquema profiláctico como terapéutico, ejerció un potente efecto neuroprotector frente al daño cerebral isquémico en gerbos de Mongolia, al reducir el volumen de infarto, el déficit neurológico y el estrés oxidativo, así como preservar la viabilidad neuronal en el hipocampo, la actividad locomotora y la sobrevivencia de los animales tratados.
5. Se demostró que la C-Ficocianina es el principio activo responsable del efecto neuroprotector de la C-FC<sub>30%</sub> en gerbos de Mongolia.
6. La C-FC y su cromóforo, la FCB, protegieron de manera dosis-dependiente a las neuronas de la capa nuclear interna de la retina de ratas sometidas a una isquemia/reperfusión por aumento de la presión intraocular.
7. La administración de C-FC y FCB logró ejercer una modulación positiva sobre la expresión de genes asociados a procesos inmunológicos en el modelo de penumbra por hipoperfusión cerebral aguda en ratas, así como relacionados con la fisiología neurovascular.
8. La C-FC y la FCB contrarrestaron el incremento en la peroxidación lipídica inducida por

## CONCLUSIONES

la OPACC en su fase aguda, mientras que la FCB, además, indujo la actividad SOD sin efecto alguno sobre la CAT en suero y regiones cerebrales.

9. La C-FC previno la pérdida neuronal en el hipocampo de ratas a los 30 días posteriores a la OPACC.

10. La C-FC disminuyó significativamente el deterioro neurológico, la pérdida de peso corporal y el volumen de infarto cerebral inducido por la endotelina-1 sobre la ACM en ratas, e inhibió la expresión de NOX2/gp91phox y la sobreproducción de superóxido en las áreas isquémicas cerebrales.

## 5.2. RECOMENDACIONES

1. Profundizar en otros aspectos farmacológicos relevantes para la aplicación clínica de estos productos, tales como la farmacocinética, la ventana terapéutica, y la toxicología.
2. Estudiar la acción de la C-FC y la FCB en modelos trombóticos de oclusión de la ACM.
3. Determinar si la actividad anti-inflamatoria de ambas moléculas ejerce algún efecto depresor sobre el estado del sistema inmune posterior al evento isquémico.
4. Explorar la modulación de otros procesos mitocondriales en el efecto anti-isquémico de ambos compuestos (mitogénesis, mitofagia, expresión de genes mitocondriales).
5. Identificar el efecto de la C-FC y la FCB sobre marcadores celulares específicos de la unidad neurovascular.
6. Profundizar en el efecto de ambos compuestos sobre mediadores específicos de diversos tipos de muerte celular (necrosis, apoptosis, autofagia, necroptosis).
7. Desarrollar ensayos clínicos con vistas a confirmar las acciones de estos compuestos en pacientes que sufren un infarto cerebral.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- 
- <sup>1</sup> Ministerio de Salud Pública, Cuba. Anuario estadístico de salud, 2012. (Folleto en internet) (acceso 24 febrero 2014). Disponible en: [www.infomed.sld.cu/servicios/estadisticas/](http://www.infomed.sld.cu/servicios/estadisticas/)
- <sup>2</sup> World Health Organization. The atlas of the heart disease and stroke. 2010. (acceso 24 febrero 2014). Disponible en: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/resources/atlas/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/)
- <sup>3</sup> Payne KA, Huybrechts KF, Caro JJ, Green TJC, Klittich WS. Long term cost-of-illness in stroke, *Pharmacoeconomics* 2002; 20: 813–25.
- <sup>4</sup> Editorial, Tackling the global burden of stroke, *Lancet Neurol* 2005; 4: 689.
- <sup>5</sup> American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Executive summary: heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2014; 129: 399-10.
- <sup>6</sup> Concepción OF, Buergo Zuaznábar MA. Diagnóstico de la enfermedad cerebrovascular isquémica. *Resumed* 2000; 13: 159-69. Disponible en: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/res/vol13\\_4\\_00/res04400.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/res/vol13_4_00/res04400.htm)
- <sup>7</sup> Endres M, Dirnagl U, Moskowitz MA, The ischemic cascade and mediators of ischemic injury, in: Fisher M (Ed.). *Stroke, Part I. Handbook of Clinical Neurology*, vol. 92, 2009, pp. 31–41.
- <sup>8</sup> Chrissobolis S, Miller AA, Drummond GR, Kemp-Harper BK, Sobey CG. Oxidative stress and endothelial dysfunction in cerebrovascular disease. *Front Biosci* 2011; 16: 1733–45.
- <sup>9</sup> Sims NR, Muyderman H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802: 80–91.
- <sup>10</sup> Azarashvili T, Stricker R, Reiser G. The mitochondria permeability transition pore complex in the brain with interacting proteins – promising targets for protection in neurodegenerative diseases. *Biol Chem* 2010; 391: 619–29.
- <sup>11</sup> Iadecola C, Alexander M. Cerebral ischemia and inflammation. *Neurology* 2001; 14: 89–94.
- <sup>12</sup> Kerschensteiner M, Meinl E, Hohlfeld R. Neuro-immune crosstalk in CNS diseases. *Neuroscience* 2009; 158: 1122–32.
- <sup>13</sup> Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 2008; 55: 363–89.
- <sup>14</sup> Dirnagl U. Pathobiology of injury after stroke: the neurovascular unit and beyond. *Ann NY Acad Sci* 2012; 1268: 21–5.
- <sup>15</sup> Kleindorfer D, Xu Y, Moomaw CJ, Khatri P, Adeoye O, Hornung R. US geographic distribution of rt-PA utilization by hospital for acute ischemic stroke. *Stroke* 2009; 40: 3580-4.
- <sup>16</sup> Fisher M. New approaches to neuroprotective drug development. *Stroke* 2011; 42: S24-S27.
- <sup>17</sup> Tymianski M. Novel Approaches to neuroprotection trials in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2013; 44: 2942-50.
- <sup>18</sup> Khan Z, Bhadouria P, Bisen PS. Nutritional and therapeutic potential of Spirulina. *Curr Pharm Biotechnol* 2005; 6: 373-9.

- 
- <sup>19</sup> Romay C, González R, Ledón N, Ramirez D, Rimbau V. C-Phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. *Curr Protein Pept Sci* 2003; 4: 207–16.
- <sup>20</sup> Padyana AK, Bhat VB, Madyastha KM, Rajashankar KR, Ramakumar S. Crystal structure of a light-harvesting protein C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 893–98.
- <sup>21</sup> Bhat VB, Madyastha KM. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from damage to DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 285: 262-66.
- <sup>22</sup> Benedetti S, Benvenuti F, Scoglio S, Canestrari F. Oxygen radical absorbance capacity of phycocyanin and phycocyanobilin from the food supplement *Aphanizomenon flos-aquae*. *J Med Food*. 2010 Feb; 13(1): 223-7.
- <sup>23</sup> Zheng J, Inoguchi T, Sasaki S y cols. Phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* protect against diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2013; 304: R110–20.
- <sup>24</sup> Strasky Z, Zemankova L, Nemeckova I y cols. *Spirulina platensis* and phycocyanobilin activate atheroprotective heme oxygenase-1: a possible implication for atherogenesis. *Food Funct* 2013; 4(11): 1586-94.
- <sup>25</sup> Martí Vilalta JL. Concepto y clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. En: Castillo Sánchez J, Álvarez Sabín J, Martí Vilalta JL, Martínez Vila F, Matías Guiu J, eds. *Manual de enfermedades vasculares cerebrales*. Barcelona: JR Prous; 1995:26-32.
- <sup>26</sup> Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan LR, Donnan GA, Hennerici MG. Classification of stroke subtypes. *Cerebrovasc Dis* 2009; 27: 493–501.
- <sup>27</sup> Díez-Tejedor E, Del Brutto O, Álvarez-Sabín J, Muñoz M, Abiusi G. Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. *Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. Rev Neurol* 2001; 33: 455-64.
- <sup>28</sup> Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan LR, Donnan GA, Hennerici MG. New approach to stroke subtyping: the A-S-C-O (phenotypic) classification of stroke. *Cerebrovasc Dis* 2009; 27: 493–501.
- <sup>29</sup> Thrift AG, Cadilhac DA, Thayabaranathan T y cols. Global stroke statistics. *Int J Stroke* 2014; 9: 6-18.
- <sup>30</sup> Towfighi A, Saver JL. Stroke declines from third to fourth leading cause of death in the United States. Historical perspective and challenges ahead. *Stroke* 2011; 42: 2351-55.
- <sup>31</sup> Truelsen T, Piechowski-Józwiak B, Bonita R, Mathersa C, Bogousslavsky J, Boysen G. Stroke incidence and prevalence in Europe: a review of available data. *Eur J Neurol* 2006; 13: 581–98.
- <sup>32</sup> Tsai CF, Thomas B, Sudlow CLM. Epidemiology of stroke and its subtypes in Chinese vs white populations A systematic review. *Neurology* 2013; 81: 264-72.
- <sup>33</sup> Perel P, Roberts I, Sena E y cols. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *Br Med J* 2007; 334: 197-200.
- <sup>34</sup> Hossmann KA. Cerebral ischemia: Models, methods and outcomes. *Neuropharmacology* 2008; 55: 257-70.
- <sup>35</sup> Lok JI, Gupta P, Guo S y cols. Cell-cell signaling in the neurovascular unit. *Neurochem Res* 2007; 32: 2032-45.

- 
- <sup>36</sup> Singh GI, Siddiqui MA, Khanna VK y cols. Oxygen glucose deprivation model of cerebral stroke in PC-12 cells: glucose as a limiting factor. *Toxicol Mech Methods* 2009; 19: 154-60.
- <sup>37</sup> Chen Y1, Yu M, Jones DP, Greenamyre JT, Cai J. Protection against oxidant-induced apoptosis by mitochondrial thioredoxin in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006; 216: 256-62.
- <sup>38</sup> Sonee M, Martens JR, Mukherjee SK. Nicotinamide protects HCN2 cells from the free radical generating toxin, tertiary butylhydroperoxide (t-BuOOH). *Neurotox Res* 2002; 4: 595-99.
- <sup>39</sup> Goldberg MP, Choi DW. Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture e calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* 1993; 13: 3510-24.
- <sup>40</sup> Noraberg J1, Poulsen FR, Blaabjerg M y cols. Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2005; 4: 435-52.
- <sup>41</sup> Zhou M1, Wang CM, Yang WL, Wang P. Microglial CD14 activated by iNOS contributes to neuroinflammation in cerebral ischemia. *Brain Res* 2013; 1506: 105-14.
- <sup>42</sup> Yao L, Kan EM, Lu J y cols. Toll-like receptor 4 mediates microglial activation and production of inflammatory mediators in neonatal rat brain following hypoxia: role of TLR4 in hypoxic microglia. *J Neuroinflammation* 2013; 10: 23.
- <sup>43</sup> Zhang J, Li Y, Zheng X y cols. Bone marrow stromal cells protect oligodendrocytes from oxygen-glucose deprivation injury. *J Neurosci Res* 2008; 86: 1501-10.
- <sup>44</sup> Arai K, Lo EH. Experimental models for analysis of oligodendrocyte pathophysiology in stroke. *Exp Transl Stroke Med* 2009; 1: 6.
- <sup>45</sup> Holden LJ1, Coleman MD. Further preliminary assessment of three human glioma cell lines as models of human astrocytic toxicity in vitro. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2008; 26: 290-6.
- <sup>46</sup> Shimizu T1, Uehara T, Nomura Y. Possible involvement of pyruvate kinase in acquisition of tolerance to hypoxic stress in glial cells. *J Neurochem* 2004; 91: 167-75.
- <sup>47</sup> Dugan LL1, Kim-Han JS. Astrocyte mitochondria in in vitro models of ischemia. *J Bioenerg Biomembr* 2004; 36: 317-21.
- <sup>48</sup> Hang X, Li P, Li Z y cols. Transcription and splicing regulation in human umbilical vein endothelial cells under hypoxic stress conditions by exon array. *BMC Genomics* 2009; 10: 126.
- <sup>49</sup> Boroujerdi A1, Tigges U, Welsch-Alves JV, Milner R. Isolation and culture of primary pericytes from mouse brain. *Methods Mol Biol* 2014; 1135: 383-92.
- <sup>50</sup> Voulgari-Kokota A, Fairless R, Karamita M y cols. Mesenchymal stem cells protect CNS neurons against glutamate excitotoxicity by inhibiting glutamate receptor expression and function. *Exp Neurol* 2012; 236: 161-70.
- <sup>51</sup> Hartl R, Gleinich A, Zimmermann M. Dramatic increase in readthrough acetylcholinesterase in a cellular model of oxidative stress. *J Neurochem* 2011; 116: 1088-96.

- 
- <sup>52</sup> Zheng WX, Wang F, Cao XL y cols. Baicalin protects PC-12 cells from oxidative stress induced by hydrogen peroxide via anti-apoptotic effects. *Brain Inj* 2014; 28: 227-34.
- <sup>53</sup> Dai MC, Zhong ZH, Sun YH y cols. Curcumin protects against iron induced neurotoxicity in primary cortical neurons by attenuating necroptosis. *Neurosci Lett* 2013; 536: 41-6.
- <sup>54</sup> Kichev A, Rousset CI, Baburamani AA y cols. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) signaling and cell death in the immature central nervous system after hypoxia-ischemia and inflammation. *J Biol Chem* 2014 Feb 7. Disponible en: <http://www.jbc.org/content/early/2014/02/07/jbc.M113.512350.long>
- <sup>55</sup> Niidome T, Morimoto N, Iijima S y cols. Mechanisms of cell death of neural progenitor cells caused by trophic support deprivation. *Eur J Pharmacol* 2006; 548: 1-8.
- <sup>56</sup> Iglesias M1, Segura MF, Comella JX, Olmos G. Mu-opioid receptor activation prevents apoptosis following serum withdrawal in differentiated SH-SY5Y cells and cortical neurons via phosphatidylinositol 3-kinase. *Neuropharmacology* 2003; 44: 482-92.
- <sup>57</sup> Gharibani PM, Modi J, Pan C y cols. The mechanism of taurine protection against endoplasmic reticulum stress in an animal stroke model of cerebral artery occlusion and stroke-related conditions in primary neuronal cell culture. *Adv Exp Med Biol* 2013; 776: 241-58.
- <sup>58</sup> Aksenova MV, Aksenov MY, Mactutus CF, Booze RM. Cell culture models of oxidative stress and injury in the central nervous system. *Curr Neurovasc Res* 2005; 2: 73-89.
- <sup>59</sup> Zehendner CM1, White R, Hedrich J, Luhmann HJ. A neurovascular blood-brain barrier in vitro model. *Methods Mol Biol* 2014; 1135: 403-13.
- <sup>60</sup> Alcendor DJ, Block Iii FE, Cliffler DE y cols. Neurovascular unit on a chip: implications for translational applications. *Stem Cell Res Ther* 2013; 4 Suppl 1: S18.
- <sup>61</sup> Howells DW, Porritt MJ, Rewell SS y cols. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2010; 30: 1412-31.
- <sup>62</sup> Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR). Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 1999; 30: 2752-8.
- <sup>63</sup> Dirnagl U. Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 1465-78.
- <sup>64</sup> Wang-Fischer Y (ed). *Manual of stroke models in rats*. 2009, Boca Raton, CRC Press.
- <sup>65</sup> Durukan A1, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav* 2007; 87: 179-97.
- <sup>66</sup> Jahan R, Stewart D, Vinters HV y cols. Middle cerebral artery occlusion in the rabbit using selective angiography: application for assessment of thrombolysis. *Stroke* 2008; 39: 1613-5.
- <sup>67</sup> Washiyama N1, Kazui T, Takinami M y cols. Experimental study on the effect of antegrade cerebral perfusion on brains with old cerebral infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 122: 734-40.

- 
- <sup>68</sup> Imai H, Konno K, Nakamura M y cols. A new model of focal cerebral ischemia in the miniature pig. *J Neurosurg* 2006; 104: 123–32.
- <sup>69</sup> Urbanski HF1, Kohama SG, West GA. Changes in spontaneous activity assessed by accelerometry correlate with extent of cerebral ischemia-reperfusion injury in the nonhuman primate. *Transl Stroke Res* 2012; 3: 442-51.
- <sup>70</sup> Macrae IM. Preclinical stroke research – advantages and disadvantages of the most common rodent models of focal ischaemia. *Br J Pharmacol* 2011; 164: 1062–78.
- <sup>71</sup> Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of experimental embolism in rats in which recirculation can be reintroduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke* 1986; 8: 1–8.
- <sup>72</sup> Ansari S, Azari H, McConnell DJ, Afzal A, Mocco J. Intraluminal middle cerebral artery occlusion (MCAO) model for ischemic stroke with laser doppler flowmetry guidance in mice. *J Vis Exp* 2011; 51: 2879.
- <sup>73</sup> Kong LQ, Xie JX, Han HB, Liu HD. Improvements in the intraluminal thread technique to induce focal cerebral ischaemia in rabbits. *J Neurosci Methods* 2004; 137: 315–9.
- <sup>74</sup> Baskaya MK, Dogan A, Dempsey RJ. Application of endovascular suture occlusion of middle cerebral artery in gerbils to obtain consistent infarction. *Neurol Res* 1999; 21: 574–8.
- <sup>75</sup> Freret T, Bouet V, Toutain J y cols. Intraluminal thread model of focal stroke in the non-human primate. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28: 786–96.
- <sup>76</sup> Busch E, Kruger K, Hossmann KA. Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat. *Brain Res* 1997; 778: 16–24.
- <sup>77</sup> Lauer KK, Shen H, Stein EA, Ho KC, Kampine JP, Hudetz AG. Focal cerebral ischemia in rats produced by intracarotid embolization with viscous silicone. *Neurol Res* 2002; 24: 181-90.
- <sup>78</sup> Yang Y, Yang T, Li Q, Wang CX, Shuaib A. A new reproducible focal cerebral ischemia model by introduction of polyvinylsiloxane into the middle cerebral artery: a comparison study. *J Neurosci Methods* 2002; 118: 199–206.
- <sup>79</sup> Chung DJ, Choi CB, Lee SH y cols. Intraarterially delivered human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in canine cerebral ischemia. *J Neurosci Res* 2009; 87: 3554-67.
- <sup>80</sup> Roos MW, Ericsson A, Berg M, Sperber GO, Sjoquist M, Meyerson BJ. Functional evaluation of cerebral microembolization in the rat. *Brain Res* 2003; 961: 15–21.
- <sup>81</sup> Prieto-Arribas R, Moreno-Gutiérrez A, Simal-Hernández P y cols. Modelos experimentales de isquemia cerebral. *Rev Neurol* 2008; 47: 414-26.
- <sup>82</sup> Braeuninger S, Kleinschnitz C. Rodent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Exp Transl Stroke Med* 2009; 1: 8.
- <sup>83</sup> Xing C, Arai K, Lo EH, Hommel M. Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke* 2012; 7: 378–385.
- <sup>84</sup> Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999; 22: 391–397.

- 
- <sup>85</sup> Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA. Cortical evoked potential and extracellular K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 1977; 8: 51–57.
- <sup>86</sup> Lo EH. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med* 2008; 14: 497-500.
- <sup>87</sup> Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 1999; 79: 1431-1568.
- <sup>88</sup> Pignataro G, Simon RP, Xiong ZG. Prolonged activation of ASIC1a and the time window for neuroprotection in cerebral ischaemia. *Brain* 2007; 130: 151–58.
- <sup>89</sup> Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Br Dis* 2004; 19: 151-67.
- <sup>90</sup> Starkov AA, Chinopoulos C, Fiskum G. Mitochondrial calcium and oxidative stress as mediators of ischemic brain injury. *Cell Calcium* 2004; 36: 257–64.
- <sup>91</sup> Bull R, Finkelstein JP, Galvez J y cols. Ischemia enhances activation by Ca<sup>2+</sup> and redox modification of ryanodine receptor channels from rat brain cortex. *J Neurosci* 2008; 28: 9463–72.
- <sup>92</sup> Ruiz A, Matute C, Alberdi E. Endoplasmic reticulum Ca(2+) release through ryanodine and IP(3) receptors contributes to neuronal excitotoxicity. *Cell Calcium* 2009; 46: 273–81.
- <sup>93</sup> Bodalia A, Li H, Jackson MF. Loss of endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> homeostasis: contribution to neuronal cell death during cerebral ischemia. *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34: 49–59.
- <sup>94</sup> Banhegyi G, Mandl J, Csala M. Redox-based endoplasmic reticulum dysfunction in neurological diseases. *J Neurochem* 2008; 107: 20–34.
- <sup>95</sup> Simard JM, Kent TA, Chen M, Tarasov KV, Gerzanich V. Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol* 2007; 6: 258–68.
- <sup>96</sup> Bano D, Munarriz E, Chen HL y cols. The plasma membrane Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger is cleaved by distinct protease families in neuronal cell death. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1099: 451–55.
- <sup>97</sup> Aarts MM, Tymianski M. TRPMs and neuronal cell death. *Pflugers Arch* 2005; 451: 243–49.
- <sup>98</sup> Sattler R, Xiong Z, Lu WY y cols. Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD- 95 protein. *Science* 1999; 284: 1845–48.
- <sup>99</sup> Cao G, Xing J, Xiao X y cols. Critical role of calpain I in mitochondrial release of apoptosis-inducing factor in ischemic neuronal injury. *J Neurosci* 2007; 27: 9278–93.
- <sup>100</sup> Szabadkai G, Simoni AM, Bianchi K y cols. Mitochondrial dynamics and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1763: 442–49.
- <sup>101</sup> Rugarli EI, Langer T. Mitochondrial quality control: a matter of life and death for neurons. *EMBO J* 2012; 31: 1336–49.
- <sup>102</sup> Baines CP. The molecular composition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 46: 850–57.

- 
- <sup>103</sup> Stavrovskaya IG, Kristal BS. The powerhouse takes control of the cell: Is the mitochondrial permeability transition a viable therapeutic target against neuronal dysfunction and death? *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 687–97.
- <sup>104</sup> Hossmann KA. Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1996; 8: 195-208.
- <sup>105</sup> Bere Z, Obrenovitch TP, Bari F, Farkas E. Ischemia-induced depolarizations and associated hemodynamic responses in incomplete global forebrain ischemia in rats. *Neuroscience* 2014; 260:217-26.
- <sup>106</sup> Lückl J, Dreier JP, Szabados T, Wiesenthal D, Bari F, Greenberg JH. Peri-infarct flow transients predict outcome in rat focal brain ischemia. *Neuroscience* 2012; 226: 197-207.
- <sup>107</sup> Woitzik JI, Hecht N, Pinczolits A y cols. Propagation of cortical spreading depolarization in the human cortex after malignant stroke. *Neurology* 2013; 80: 1095-102.
- <sup>108</sup> Halliwell B. Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 4th edn, 2006, Oxford University Press, Oxford.
- <sup>109</sup> Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochemistry* 2006; 97: 1634–58.
- <sup>110</sup> Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 333–43.
- <sup>111</sup> Cardoso AR, Chausse B, da Cunha FM y cols. Mitochondrial compartmentalization of redox processes. *Free Radic Biol Med* 2012; 52: 2201–08.
- <sup>112</sup> Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischaemic stroke. *Int J Stroke* 2009; 4: 461–70.
- <sup>113</sup> Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 662-80.
- <sup>114</sup> Radi R y cols. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 463–88.
- <sup>115</sup> Augusto O, Bonini MG, Amanso AM y cols. Nitrogen dioxide and carbonate radical anion: two emerging radicals in biology. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 841–59.
- <sup>116</sup> Gal S, Zheng H, Fridkin M, Youdim MB. Novel multifunctional neuroprotective iron chelator–monoamine oxidase inhibitor drugs for neurodegenerative diseases. In vivo selective brain monoamine oxidase inhibition and prevention of MPTP-induced striatal dopamine depletion. *J Neurochem* 2005; 95: 79–88.
- <sup>117</sup> Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44-84.
- <sup>118</sup> Simonian NR, Coyle JT. Oxidative stress in neurodegenerative diseases *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36: 83-106.
- <sup>119</sup> Infanger DW, Sharma RV, Davisson RL. NADPH oxidases of the brain: distribution, regulation, and function. *Antioxid Redox Signal* 2006; 8: 1583–96.

- 
- <sup>120</sup> Kahles T, Brandes RP. NADPH oxidases as therapeutic targets in ischemic stroke. *Cell Mol Life Sci* 2012; 69: 2345–63.
- <sup>121</sup> Leonard SS, Harris GK, Shi X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 1921–42.
- <sup>122</sup> Liochev SI, Fridovich I. The Haber–Weiss cycle—70 years later: An alternative view. *Redox Rep* 2002; 7: 55–57.
- <sup>123</sup> Selim MH, Ratan RR. The role of iron neurotoxicity in ischemic stroke. *Ageing Res Rev* 2004; 3: 345–53.
- <sup>124</sup> Cui K, Luo X, Xu K, Ven Murthy MR. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2004; 28: 771–99.
- <sup>125</sup> Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 2003; 552: 335–44.
- <sup>126</sup> Brigelius-Flohe R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med* 1999; 27: 951–65.
- <sup>127</sup> Saito A, Maier CM, Narasimhan P y cols. Oxidative stress and neuronal death/survival signaling in cerebral ischemia. *Mol Neurobiol* 2005; 31: 105–16.
- <sup>128</sup> Peerschke EI, Yin W, Ghebrehiwet B. Complement activation on platelets: implications for vascular inflammation and thrombosis. *Mol Immunol* 2010; 47: 2170–75.
- <sup>129</sup> Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med* 2011; 364: 656–65.
- <sup>130</sup> Yemisci M y cols. Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat Med* 2009; 15: 1031–37.
- <sup>131</sup> Engelhardt B, Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol* 2009; 31: 497–11.
- <sup>132</sup> Kongsman JP, Drukarch B, Van Dam AM. (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin Sci (Lond.)* 2007; 112: 1–25.
- <sup>133</sup> Takano T, Oberheim N, Cotrina ML, Nedergaard M. Astrocytes and ischemic injury. *Stroke* 2009; 40: S8–S12.
- <sup>134</sup> Yenari MA, Kauppinen TM, Swanson RA. Microglial activation in stroke: therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 2010; 7: 378–91.
- <sup>135</sup> Marsh BJ, Williams-Karnesky RL, Stenzel-Poore MP. Toll-like receptor signaling in endogenous neuroprotection and stroke. *Neuroscience* 2009; 158, 1007–20.
- <sup>136</sup> Liu K, Mori S, Takahashi HK y cols. Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody ameliorates brain infarction induced by transient ischemia in rats. *FASEB J* 2007; 21: 3904–16.
- <sup>137</sup> Hayakawa K, Qiu J, Lo EH. Biphasic actions of HMGB1 signaling in inflammation and recovery after stroke. *Ann NY Acad Sci* 2010; 1207: 50–57.
-

- 
- <sup>138</sup> Chamorro A, Meisel A, Planas AM, Urra X, van de Beek D, Veltkamp R. The immunology of acute stroke. *Nat Rev Neurol* 2012; 8: 401–10.
- <sup>139</sup> Yilmaz G, Arumugam TV, Stokes KY, Granger DN. Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation* 2006; 113: 2105-12.
- <sup>140</sup> Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 2011; 17: 796-808.
- <sup>141</sup> Konoeda F1, Shichita T, Yoshida H y cols. Therapeutic effect of IL-12/23 and their signaling pathway blockade on brain ischemia model. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 402: 500-6.
- <sup>142</sup> Liesz A1, Zhou W, Mracskó É y cols. Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke. *Brain* 2011; 134: 704-20.
- <sup>143</sup> Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133: 775–87.
- <sup>144</sup> Liesz A1, Suri-Payer E, Veltkamp C y cols. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med* 2009; 15: 192-9.
- <sup>145</sup> Li P, Gan Y, Sun BL y cols. Adoptive regulatory T-cell therapy protects against cerebral ischemia. *Ann Neurol* 2013; 74(3): 458-71.
- <sup>146</sup> Li P, Mao L, Zhou G y cols. Adoptive regulatory T-cell therapy preserves systemic immune homeostasis after cerebral ischemia. *Stroke* 2013; 44: 3509-15.
- <sup>147</sup> Ren X, Akiyoshi K, Dziennis S y cols. Regulatory B cells limit CNS inflammation and neurologic deficits in murine experimental stroke. *J Neurosci* 2011; 31: 8556-63.
- <sup>148</sup> Bodhankar S, Chen Y, Vandenbark AA, Murphy SJ, Offner H. Treatment of experimental stroke with IL-10-producing B-cells reduces infarct size and peripheral and CNS inflammation in wild-type B-cell-sufficient mice. *Metab Brain Dis* 2014; 29: 59-73.
- <sup>149</sup> Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell* 2010; 140: 871–82.
- <sup>150</sup> Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833: 3448-59. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy.
- <sup>151</sup> Arai K, Lo EH. Experimental models for analysis of oligodendrocyte pathophysiology in stroke. *Exp Transl Stroke Med* 2009; 1: 6.
- <sup>152</sup> Puyal J, Ginet V, Clarke PG. Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: a challenge for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 2013; 105: 24-48.
- <sup>153</sup> Yuan J. Neuroprotective strategies targeting apoptotic and necrotic cell death for stroke. *Apoptosis* 2009; 14: 469–77.
- <sup>154</sup> Luo T, Park Y, Sun X, Liu C, Hu B. Protein misfolding, aggregation, and autophagy after brain ischemia. *Transl Stroke Res* 2013; 4: 581-8.

- 
- <sup>155</sup> Lee J, Giordano S Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J* 2012; 41: 523–40.
- <sup>156</sup> Li Q, Zhang T, Wang J y cols. Rapamycin attenuates mitochondrial dysfunction via activation of mitophagy in experimental ischemic stroke. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 444: 182-8.
- <sup>157</sup> Lu Y, Kang J, Bai Y y cols. Hyperbaric oxygen enlarges the area of brain damage in MCAO rats by blocking autophagy via ERK1/2 activation. *Eur J Pharmacol.* 2014; 728C: 93-99.
- <sup>158</sup> Donnan G, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Stroke. *Lancet* 2008; 371: 1612–23.
- <sup>159</sup> The International Stroke Trial (IST): a randomized trial of aspirin, subcutaneous heparin, both, or neither among 19,435 patients with acute ischaemic stroke. International Stroke Trial Collaborative Group. *Lancet* 1997; 349: 1569–81.
- <sup>160</sup> Vahedi K, Hofmeijer J, Juettler E y cols. Early decompressive surgery in malignant infarction of the middle cerebral artery: a pooled analysis of three randomised controlled trials. *Lancet Neurol* 2007; 6: 215–22.
- <sup>161</sup> Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333: 1581–87.
- <sup>162</sup> Khatri P, Hill MD, Palesch YY y cols. Methodology of the Interventional Management of Stroke III Trial. *Int J Stroke* 2008; 3: 130–7.
- <sup>163</sup> Smith WS, Sung G, Starkman S y cols. Safety and efficacy of mechanical embolectomy in acute ischemic stroke: results of the MERCI trial. *Stroke* 2005; 36: 1432–38.
- <sup>164</sup> Bose A, Henkes H, Alfke K y cols. (2008) The Penumbra System: a mechanical device for the treatment of acute stroke due to thromboembolism. *AJNR Am J Neuroradiol* 2008; 29: 1409–13.
- <sup>165</sup> Tsvigoulis G y cols. Safety and efficacy of ultrasound-enhanced thrombolysis: a comprehensive review and meta-analysis of randomized and nonrandomized studies. *Stroke* 2010; 41: 280–87.
- <sup>166</sup> Liberatore GT, Samson A, Bladin C, Schleuning WD, Medcalf RL. Vampire bat salivary plasminogen activator (desmoteplase): a unique fibrinolytic enzyme that does not promote neurodegeneration. *Stroke* 2003; 34: 537–43.
- <sup>167</sup> Haley EC, Thompson JL, Grotta JC y cols. Tenecteplase in Stroke Investigators. Phase IIB/III trial of tenecteplase in acute ischemic stroke: results of a prematurely terminated randomized clinical trial. *Stroke* 2010; 41: 707–11.
- <sup>168</sup> Levy DE, del Zoppo GJ, Demaerschalk BM y cols. Ancrod in acute ischemic stroke: results of 500 subjects beginning treatment within 6 hours of stroke onset in the ancrod stroke program. *Stroke* 2009; 40: 3796–3803.
- <sup>169</sup> Xu G, Liu X, Zhu W, Yin Q, Zhang R, Fan X. Feasibility of treating hyperfibrinogenemia with intermittently administered batroxobin in patients with ischemic stroke/transient ischemic attack for secondary prevention. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2007; 18, 193–97.
- <sup>170</sup> Hu HH, Teng MM, Hsu LC y cols. A pilot study of a new thrombolytic agent for acute ischemic stroke in Taiwan within a five-hour window. *Stroke* 2006; 37: 918–9.

- <sup>171</sup> Dirnagl U, Meisel A. Endogenous neuroprotection: Mitochondria as gateways to cerebral preconditioning? *Neuropharmacology* 2008; 55: 334–44.
- <sup>172</sup> O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA y cols. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* 2006; 59: 467–77.
- <sup>173</sup> Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR). Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 1999; 30: 2752–58.
- <sup>174</sup> Saver JL, Albers GW, Dunn B, Johnston KC, Fisher M, for the STAIR VI Consortium. Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (STAIR) recommendations for extended window acute stroke therapy trials. *Stroke* 2009; 40: 2594-2600.
- <sup>175</sup> Sahota P, Savitz SI. Investigational therapies for ischemic stroke: neuroprotection and neurorecovery. *Neurotherapeutics* 2011; 8: 434–51.
- <sup>176</sup> Singh S, Nate BN, Banerjee UC. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. *Crit Rev Biotechnol* 2005; 25: 73–95.
- <sup>177</sup> Montgomery BL. Sensing the light: photoreceptive systems and signal transduction in cyanobacteria. *Mol Microbiol* 2007; 64: 16–27.
- <sup>178</sup> Scheer H, Zhao KH. Biliprotein maturation: the chromophore attachment. *Mol Microbiol* 2008; 68: 263–76.
- <sup>179</sup> Bhat VB, Madyastha KM. C-phycoyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. *Biochem. Biophys Res Commun* 2000; 275: 20-25.
- <sup>180</sup> Romay C, Armesto J, Ramirez D, González R, Ledón N, García I. Antioxidant properties of C-phycoyanin from blue-green algae. *Inflamm Res* 1998; 47: 36-41.
- <sup>181</sup> Romay Ch, González RJ. Phycocyanin is an antioxidant protector of human erythrocytes against lysis by peroxy radicals. *Pharm Pharmacol* 2000; 52: 367-68.
- <sup>182</sup> Subhashini J, Mahipal SVK, Reddy MC y cols. Molecular mechanisms in C-Phycocyanin induced apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Biochem Pharmacol* 2004; 68: 453–62.
- <sup>183</sup> Nishanth RP, Ramakrishna BS, Jyotsna RG y cols. C-Phycocyanin inhibits MDR1 through reactive oxygen species and cyclooxygenase-2 mediated pathways in human hepatocellular carcinoma cell line. *Eur J Pharmacol* 2010; 649: 74–83.
- <sup>184</sup> Hui-Fen Ch, Shih-Ping Y, Yu-Ling, Yuan-Shu L, Tz-Chong Ch. Mechanisms involved in the antiplatelet effect of C-phycoyanin. *Br J Nutr* 2006; 95: 435–40.
- <sup>185</sup> Reddy CM, Bhat VB, Kiranmai G, Reddy MN, Reddanna P, Madyastha KM. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277: 599-603.
- <sup>186</sup> Madhyastha HK, Radha KS, Sugiki MS, Maruyama M. C-phycoyanin transcriptionally regulates uPA ARNm through cAMP mediated PKA pathway in human fibroblast WI-38 cells. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760: 1624-30.

- 
- <sup>187</sup> Rimbau V, Camins A, Pubill D y cols. C-Pc protects cerebellar granule cells from low potassium/serum deprivation-induced apoptosis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001; 364: 96-104.
- <sup>188</sup> Romay C, Armesto J, Ramirez D y cols. Antioxidant and anti-inflammatory properties of C-phycoyanin from blue-green algae. *Inflamm Res* 1998; 47: 36-41.
- <sup>189</sup> Romay C, Ledón N, González R. Effects of phycoyanin extract on prostaglandin E2 levels in mouse ear inflammation test. *Arzneimittelforschung* 2000; 50: 1106-9.
- <sup>190</sup> Ramirez, D, González A, Merino M y cols. Phycoyanin as an antiarthritic compound. *Drug Dev Res* 1999; 48: 70-75.
- <sup>191</sup> Vadiraja BB, Gaikwad NW, Madyastha KM. Hepatoprotective effect of C-phycoyanin: protection for carbon tetrachloride. *Biochem Biophys Res Commu* 1998; 249: 428-31.
- <sup>192</sup> Leung P, Lee H, Kung YC y cols. Therapeutic effect of C-Phycoyanin extracted from blue green algae in a rat model of acute lung injury induced by lipopolysaccharide. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013; 2013: 916590.
- <sup>193</sup> Janssen-Heininger YMW, Pointer ME, Baeverle PA. Anti-inflammatory effects of phycoyanin. *Free Rad Biol Med* 2000; 28: 1317-27.
- <sup>194</sup> Madhyastha HK, Radha KS, Nakajima Y, Omura S, Maruyama M. uPA dependent and independent mechanisms of wound healing by C-phycoyanin. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 2691-703.
- <sup>195</sup> Madhyastha H, Madhyastha R, Nakajima Y, Omura S, Maruyama M. Regulation of growth factors associated cell migration by C-phycoyanin scaffold in dermal wound healing. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2012; 39: 13-9.
- <sup>196</sup> Khan M, Varadharaj S, Ganesan L P, Shobha J C, Naidu M U. C-phycoyanin protects against ischemia-reperfusion injury of heart through involvement of p38 MAPK and ERK signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: 2136-45.
- <sup>197</sup> Rimbau V, Camins A, Romay C, González R, Pallás M. Protective effects of C-phycoyanin against kainic acid-induced neuronal damage in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 1999; 276: 75-78.
- <sup>198</sup> Sathyaikumar KV, Swapna I, Reddy PVB, Murthy Ch RK, Roy KR. Co-administration of C-Phycoyanin ameliorates thioacetamide-induced hepatic encephalopathy in Wistar rats. *J Neurol Sci* 2007; 252: 67-75.
- <sup>199</sup> Li B, Chu XM, Xu YJ, Yang F, Lv CY, Nie S. CD59 underlines the antiatherosclerotic effects of C-Phycoyanin on mice. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 729413.
- <sup>200</sup> Ichimura M, Kato S, Tsuneyama K y cols. Phycoyanin prevents hypertension and low serum adiponectin level in a rat model of metabolic syndrome. *Nutr Res* 2013; 33: 397-405.
- <sup>201</sup> Rodríguez-Sánchez R, Ortiz-Butrón R, Blas-Valdivia V, Hernández-García A, Cano-Europa E. Phycobiliproteins or C-phycoyanin of *Arthrospira* (*Spirulina*) maxima protect against HgCl<sub>2</sub>-caused oxidative stress and renal damage. *Food Chem* 2012; 135: 2359-65.
- <sup>202</sup> Lim BJ, Jeong JY, Chang YK y cols. C-phycoyanin attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. *Ren Fail* 2012; 34: 892-900.

- <sup>203</sup> Fernández-Rojas B, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R y cols. C-Phycocyanin prevents cisplatin-induced nephrotoxicity through inhibition of oxidative stress. *Food Funct* 2014; 5: 480-90.
- <sup>204</sup> Kumari RP, Sivakumar J, Thankappan B, Anbarasu K. C-Phycocyanin modulates selenite-induced cataractogenesis in rats. *Biol Trace Elem Res* 2013; 151: 59–67.
- <sup>205</sup> Pentón-Rol G, Martínez-Sánchez G, Cervantes-Llanos M y cols. C-Phycocyanin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces regulatory T cells. *Int Immunopharmacol* 2011; 11: 29–38.
- <sup>206</sup> Romay Ch, Ledon N, Gonzalez R. Further studies on anti-inflammatory activity of phycocyanin in some animal models of inflammation. *Inflamm Res* 1998; 47: 334-8.
- <sup>207</sup> Park CY, Jung SH, Bak JP, Lee SS, Rhee DK. Comparison of the rabbit pyrogen test and *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) assay for endotoxin in hepatitis B vaccines and the effect of aluminum hydroxide. *Biologicals* 2005; 33: 145–51.
- <sup>208</sup> Mirandola SR, Melo DR, Saito A, Castilho RF. 3-Nitropropionic acid-induced mitochondrial permeability transition: comparative study of mitochondria from different tissues and brain regions. *J Neurosci Res* 2010; 88: 630–39.
- <sup>209</sup> Esposti MD. Measuring mitochondrial reactive oxygen species. *Methods* 2002; 26: 335–40.
- <sup>210</sup> Rodrigues FP, Pestana CR, Santos G y cols. Characterization of the stimulus for reactive oxygen species generation in calcium-overloaded mitochondria. *Redox Report* 2011; 16, 108–113.
- <sup>211</sup> Ross MF, Kelso GF, Blaikie FH y cols. Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology. *Biochemistry (Moscow)* 2005; 2: 273–83.
- <sup>212</sup> Jensen BD, Gunter KK, Gunter TE. The efficiencies of the component steps of oxidative phosphorylation. II. Experimental determination of the efficiencies in mitochondria and examination of the equivalence of membrane potential and pH gradient in phosphorylation. *Arch Biochem Biophys* 1986; 248: 305–23.
- <sup>213</sup> Gaertner DJ, Hallman TM, Hankenson FC, Batchelder MA. Anesthesia and analgesia for laboratory rodents, In: Fish RE, Brown MJ, Danneman PJ, Karas AZ (Eds.). *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. 2008; 2nd ed. Academic Press, San Diego, EEUU, 239–97.
- <sup>214</sup> Lawner P, Laurent J, Simeone F, Fink E, Rubin E. Attenuation of ischemic brain edema by pentobarbital after carotid ligation in the gerbil. *Stroke* 1979; 10: 644-7.
- <sup>215</sup> Lundy EF, Solik BS, Frank RS y cols. Morphometric evaluation of brain infarcts in rats and gerbils. *J Pharmacol Methods* 1986; 16: 201-14.
- <sup>216</sup> Brahma MK, Dohare P, Varma S y cols. The neuronal apoptotic death in global cerebral ischemia in gerbil: important role for sodium channel modulator. *J Neurosci Res* 2009; 87: 1400-11.
- <sup>217</sup> Bahcekapili N, Uzüm G, Gökkusu C, Kuru A, Ziyilan YZ. The relationship between erythropoietin pretreatment with blood-brain barrier and lipid peroxidation after ischemia/reperfusion in rats. *Life Sci* 2007; 80: 1245-51.
- <sup>218</sup> Loskota WJ, Lomax P, Verity MA. A stereotaxic atlas of the Mongolian gerbil brain (*Meriones unguiculatus*). 1973, 1ra ed., Ann Arbor Science, Los Angeles, EEUU, 5–30.

- <sup>219</sup> Hatakeyama T, Matsumoto M, Brengman JM, Yanagihara T. Immunohistochemical investigation of ischemic and postischemic damage after bilateral carotid occlusion in gerbils. *Stroke* 1988; 19: 1526-34.
- <sup>220</sup> Bian Q, Shi T, Chuang DM, Qian Y. Lithium reduces ischemia-induced hippocampal CA1 damage and behavioral deficits in gerbils. *Brain Res* 2007; 1184: 270-6.
- <sup>221</sup> Spector T. Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for less than or equal to 0.5 to 50 microgram of protein. *Anal Biochem* 1978; 86: 142-6.
- <sup>222</sup> Ozdemirler G, Mehmetcik G, Oztezcan S, Toker G, Sivas A, Uysal M. Peroxidation potential and antioxidant activity of serum in patients with diabetes mellitus and myocard infarction. *Horm Metab Res* 1995; 27: 194-96.
- <sup>223</sup> Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 1996; 239: 70-6.
- <sup>224</sup> Candelario-Jalil E, Alvarez D, Castañeda JM y cols. The highly selective cyclooxygenase-2 inhibitor DFU is neuroprotective when given several hours after transient cerebral ischemia in gerbils. *Brain Res* 2002; 927: 212-5.
- <sup>225</sup> Beleboni RO, Guizzo R, Fontana ACK y cols. Neurochemical characterization of a neuroprotective compound from *Parawixia bistriata* spider venom that inhibits synaptosomal uptake of GABA and glycine. *Mol Pharmacol* 2006; 69, 1998-2006.
- <sup>226</sup> Meyer RE, Fish RE. Pharmacology of injectable anesthetics, sedatives and tranquilizers. In: Fish RE, Brown MJ, Danneman PJ, Karas AZ (Eds.). *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. 2008; 2nd ed. Academic Press, San Diego, EEUU, 56-59.
- <sup>227</sup> Krinke G. *The Laboratory Rat*. 2000; Academic Press, San Diego, CA, EEUU.
- <sup>228</sup> McGrath J, Drummond G, Kilkenny C, Wainwright C. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 2010; 160: 1573-76.
- <sup>229</sup> Wang J, Zhan HY, Tang XC. Huperzine A improves chronic inflammation and cognitive decline in rats with cerebral hypoperfusion. *J Neurosci Res* 2010; 88: 807-15.
- <sup>230</sup> Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 1998, Academic Press, Londres, Reino Unido.
- <sup>231</sup> Reimers M, Carey VJ. Bioconductor: an open source framework for bioinformatics and computational biology. *Methods Enzymol* 2006; 411: 119-34.
- <sup>232</sup> Hong F, Breitling R, McEntee CW, Wittner BS, Nemhauser JL, Chory J. RankProd: a bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis. *Bioinformatics* 2006; 22: 2825-27.
- <sup>233</sup> Eden E, Navon R, Steinfeld I, Lipson D, Yakhini Z. GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics* 2009; 10 (48).
- <sup>234</sup> Supek F, Bosnjak M, Skunca N, Smuc T. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One* 2011; 6: e21800.
- <sup>235</sup> Bustin SA, Benes, V, Garson JA y cols. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55: 611-22.

- 
- <sup>236</sup> Lech M, Avila-Ferrufino A, Skuginna V, Susanti H.E, Anders HJ. Quantitative expression of RIG-like helicase, NOD like receptor and inflammasome-related mRNAs in humans and mice. *Int Immunol* 2010; 22: 717–28.
- <sup>237</sup> Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z. Processing of gene expression data generated by quantitative real time RT-PCR. *Biotechniques* 2002; 32: 1372–79.
- <sup>238</sup> Simon P. Q-Gene: processing quantitative real-time RT-PCR data. *Bioinformatics* 2003; 19: 1439–40.
- <sup>239</sup> Lofqvist C, Willett KL, Aspegren O y cols. Quantification and localization of the IGF/insulin system expression in retinal blood vessels and neurons during oxygen-induced retinopathy in mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 1831–37.
- <sup>240</sup> Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–54.
- <sup>241</sup> Mannheim Boehringer. Biochemica information. A revised biochemical reference source. *Enzymes for routine*. 1ra. ed. 1987, Boehringer Mannheim, Berlin, Alemania.
- <sup>242</sup> Liu C, Wu J, Gu J y cols. Baicalein improves cognitive deficits induced by chronic cerebral hypoperfusion in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2007; 86(3): 423-30.
- <sup>243</sup> Moyanova SG, Kortenska LV, Mitreva RG, Pashova VD, Ngomba RT, Nicoletti F. Multimodal assessment of neuroprotection applied to the use of MK-801 in the endothelin-1 model of transient focal brain ischemia. *Brain Res* 2007; 1153: 58-67.
- <sup>244</sup> Fisher YW, Koetzner L. Anesthesia of laboratory rats. Cap. 8: 62-3. En: Fisher YW (ed.). *Manual of stroke models in rats*. 2009, 1ra. ed. Grupo Taylor y Francis, Boca Raton, Florida, EEUU.
- <sup>245</sup> Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* 1995; 26: 627-34.
- <sup>246</sup> Zille M, Farr TD, Przedzding I y cols. Visualizing cell death in experimental focal cerebral ischemia: promises, problems, and perspectives. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32: 1–19.
- <sup>247</sup> Candelario-Jalil E, González-Falcón A, García-Cabrera M, León OS, Fiebich BL. Wide therapeutic time window for nimesulide neuroprotection in a model of transient focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* 2004; 1007: 98–108.
- <sup>248</sup> McCann SK, Dusting GJ, Roulston CL. Early increase of Nox4 NADPH oxidase and superoxide generation following endothelin-1-induced stroke in conscious rats. *J Neurosci Res* 2008; 86: 2524-34.
- <sup>249</sup> Bland JM, Altman DG. Statistics notes: survival probabilities (the Kaplan–Meier method). *BMJ* 1998; 317: 1572–80.
- <sup>250</sup> Berman SB, Watkins SC, Hastings TG. Quantitative biochemical and ultrastructural comparison of mitochondrial permeability transition in isolated brain and liver mitochondria: evidence for reduced sensitivity of brain mitochondria. *Exp Neurol* 2000; 164: 415–25.
- <sup>251</sup> Maciel EN, Vercesi AE, Castilho RF. Oxidative stress in Ca<sup>2+</sup>-induced membrane permeability transition in brain mitochondria. *J Neurochem* 2001; 79: 1237–45.

- <sup>252</sup> Galluzzi L, Morselli E, Kepp O, Kroemer G. Targeting post-mitochondrial effectors of apoptosis for neuroprotection. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1787: 402–13.
- <sup>253</sup> Laine DF, Cheng IF. Analysis of hydrogen peroxide and an organic hydroperoxide via the electrocatalytic Fenton reaction. *Microchem J* 2009; 91: 78–81.
- <sup>254</sup> Lee HS, Park CW, Kim YS. MPP(+) increases the vulnerability to oxidative stress rather than directly mediating oxidative damage in human neuroblastoma cells. *Exp Neurol* 2000; 165: 164–71.
- <sup>255</sup> Katsuta K, Umemura K, Ueyama N, Matsuoka N. Pharmacological evidence for a correlation between hippocampal CA1 cell damage and hyperlocomotion following global cerebral ischemia in gerbils. *Eur J Pharmacol* 2003; 467: 103–9.
- <sup>256</sup> D'Onofrio PM, Koeberle PD. What can we learn about stroke from retinal ischemia models? *Acta Pharmacol Sin* 2013; 34: 91–103.
- <sup>257</sup> Farkas E, Luiten PG, Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat: a model for chronic cerebral hypoperfusion-related neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev* 2007; 54: 162–80.
- <sup>258</sup> Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med* 2009; 7: 97.
- <sup>259</sup> Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *BioEssays* 2004; 26: 943–954.
- <sup>260</sup> Tang X, Liu KJ, Ramu J, Chen Q, Li T, Liu W. Inhibition of gp91(phox) contributes towards normobaric hyperoxia afforded neuroprotection in focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2010; 1348: 174–80.
- <sup>261</sup> Sims NR, Anderson MF. Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke. *Neurochem Int* 2002; 40: 511–26.
- <sup>262</sup> Valko M, Leibfritzb D, Moncola J y cols. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 44–84.
- <sup>263</sup> Zamzami N, Larochette N, Kroemer G. Mitochondrial permeability transition in apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ* 2005; 12 (Supl 2): 1478–80.
- <sup>264</sup> Oliveira GA, Kowaltowski AJ. Phosphate increases mitochondrial reactive oxygen species release. *Free Radic Res* 2004; 38: 1113–18.
- <sup>265</sup> Kostandy BB. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurol Sci* 2012; 33: 223–37.
- <sup>266</sup> LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC Evaluation of the probe 2<sup>l</sup>,7<sup>l</sup> - dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol* 1992; 5: 227–31.
- <sup>267</sup> Kowaltowski AJ, Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 333–43.

- <sup>268</sup> Wardman P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls and prospects. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 995–1022.
- <sup>269</sup> Brustovetsky N, Brustovetsky T, Jemmerson R, Dubinsky JM. Calcium-induced cytochrome c release from CNS mitochondria is associated with the permeability transition and rupture of the outer membrane. *J Neurochem* 2002; 80: 207–18.
- <sup>270</sup> Peng TI, Jou MJ. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1201: 183–88.
- <sup>271</sup> Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev* 2005; 11: 127–52.
- <sup>272</sup> Hashida K, Sakakura Y, Makino N. Kinetic studies on the hydrogen peroxide elimination by cultured PC12 cells: rate limitation by glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1572: 85–90.
- <sup>273</sup> Pereira CF, de Oliveira CR. Oxidative glutamate toxicity involves mitochondrial dysfunction and perturbation of intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Neurosci Res* 2000; 37: 227–36.
- <sup>274</sup> Bruno V, Copani A, Knöpfel T y cols. Activation of metabotropic glutamate receptors coupled to inositol phospholipid hydrolysis amplifies NMDA-induced neuronal degeneration in cultured cortical cells. *Neuropharmacology* 1995; 34: 1089–98.
- <sup>275</sup> Kane MD, Vanden Heuvel JP, Isom GE, Schwarz RD. Differential expression of group I metabotropic glutamate receptors (mGluRs) in the rat pheochromocytoma cell line PC12: role of nerve growth factor and ras. *Neurosci Lett* 1998; 252: 1–4.
- <sup>276</sup> Lee JH, Song DK, Jung CH y cols. (-)- Epigallocatechin gallate attenuates glutamate-induced cytotoxicity via intracellular Ca<sup>2+</sup> modulation in PC12 cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2004; 31: 530–36.
- <sup>277</sup> Cadenas, E, Sies H. Low level chemiluminescence of liver microsomal fractions initiated by tert-butyl hydroperoxide. *Eur J Biochem* 1982; 124: 349–56.
- <sup>278</sup> Abe K, Saito H. Characterization of t-butyl hydroperoxide toxicity in cultured rat cortical neurones and astrocytes. *Pharmacol Toxicol* 1998; 83: 40–6.
- <sup>279</sup> Amoroso S, Gioielli A, Cataldi M, Renzo GD, Annunziato L. In the neuronal cell line SH-SY5Y, oxidative stress-induced free radical overproduction causes cell death without any participation of intracellular Ca<sup>2+</sup> increase. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1452: 151–60.
- <sup>280</sup> Bermejo-Bescós P, Piñero-Estrada E, Fresno AMV. Neuroprotection by *Spirulina platensis* protean extract and phycocyanin against iron-induced toxicity in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicol In Vitro* 2008; 22: 1496–1502.
- <sup>281</sup> Bermejo P, Pinero E, Villar AM. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. *Food Chem* 2008; 110: 436–445.
- <sup>282</sup> Cruz YR, Támos YM, Cernuda AM Y cols. Treatment with nasal neuro-EPO improves the neurological, cognitive, and histological state in a gerbil model of focal ischemia. *Sci World J* 2010; 10: 2288–2300.

- <sup>283</sup> Kaundal RK, Iyer S, Kumar A, Sharma SS. Protective effects of pioglitazone against global cerebral ischemic-reperfusion injury in gerbils. *J Pharmacol Sci* 2009; 109: 361-67.
- <sup>284</sup> Hetz C, Vitte PA, Bombrun A y cols. Bax channel inhibitors prevent mitochondrion-mediated apoptosis and protect neurons in a model of global brain ischemia. *J Biol Chem* 2005; 280: 42960-70.
- <sup>285</sup> Radenovic L, Selakovic V, Janac B, Andjus PR. Neuroprotective efficiency of NMDA receptor blockade in the striatum and CA3 hippocampus after various durations of cerebral ischemia in gerbils. *Acta Physiol Hung* 2011; 98: 32-44.
- <sup>286</sup> Lee SY, Kim CY, Lee JJ, Jung JG, Lee SR. Effects of delayed administration of (-)-epigallocatechin gallate, a green tea polyphenol on the changes in polyamine levels and neuronal damage after transient forebrain ischemia in gerbils. *Brain Res Bull* 2003; 61: 399-406.
- <sup>287</sup> Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Phospholipase A2, hydroxyl radicals, and lipid peroxidation in transient cerebral ischemia. *Antioxid Redox Signal* 2003; 5: 647-54.
- <sup>288</sup> Muralikrishna AR, Hatcher JF. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* 2006; 40: 376-87.
- <sup>289</sup> Nelson DL, Cox MM. Lipid biosynthesis. Cap. 21: 787-832. En: *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed., 2005, W.H. Freeman Publishers, New York, EEUU.
- <sup>290</sup> Candelario-Jalil E, Álvarez D, Castañeda JM y cols. The highly selective cyclooxygenase-2 inhibitor DFU is neuroprotective when given several hours after transient cerebral ischemia in gerbils, *Brain Res* 2002; 927: 212-15.
- <sup>291</sup> Candelario-Jalil E, Mhadu MH, González-Falcón A y cols. Effects of the cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide on cerebral infarction and neurological deficits induced by permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Neuroinflamm* 2005; 2: 3-10.
- <sup>292</sup> Pentón-Rol G, Cervantes-Llanos M, Martínez-Sánchez G y cols. TNF-<sup>L</sup> and IL-10 downregulation and marked oxidative stress in Neuromyelitis Optica. *J Inflamm (Lond.)* 2009; 6: 18-27.
- <sup>293</sup> Gil L, Martínez-Sánchez G, González I y cols. Contribution to characterization of oxidative stress in HIV/AIDS patients. *Pharmacol Res* 2003; 47: 217-24.
- <sup>294</sup> Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 2005; 23: 1841-56.
- <sup>295</sup> Nguyen T, Nioi P, Pickett CB. The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* 2009; 284: 13291-95.
- <sup>296</sup> Shah ZA, Li R, Thimmulappa RK y cols. Role of reactive oxygen species in modulation of Nrf2 following ischemic reperfusion injury. *Neuroscience* 2007; 147: 53-59.
- <sup>297</sup> Candelario-Jalil E, Mhadu NH, Al-Dalain SM, Martínez-Sánchez G, León OS. Time course of oxidative damage in different brain regions following transient cerebral ischemia in gerbils. *Neurosci Res* 2001; 41: 233-41.
- <sup>298</sup> Wang D, Corbett D. Cerebral ischemia, locomotor activity and spatial mapping. *Brain Res* 1990; 533: 78-82.

- 
- <sup>299</sup> Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D y cols. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the World Health Organization* 2004; 82: 844–51.
- <sup>300</sup> Kuriyama H, Waki M, Nakagawa M, Tsuda M. Involvement of oxygen free radicals in experimental retinal ischemia and the selective vulnerability of retinal damage. *Ophthalmic Res* 2001; 33: 196–202.
- <sup>301</sup> Osborne NN, Casson RJ, Wood JPM y cols. Retinal ischemia: mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Progress in Retinal and Eye Research* 2004; 23: 91–147.
- <sup>302</sup> Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Eur J Physiol* 2010; 460: 525–42.
- <sup>303</sup> Lissi EA, Pizarro M, Aspee A, Romay C. Kinetics of phycocyanine bilin groups destruction by peroxy radicals. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 1051–55.
- <sup>304</sup> Ohta H, Nishikawa H, Kimura H, Anayama H, Miyamoto M. Chronic cerebral hypoperfusion by permanent internal carotid ligation produces learning impairment without brain damage in rats. *Neuroscience* 1997; 79: 1039–50.
- <sup>305</sup> Tanaka K, Wada-Tanaka N, Miyazaki I, Nomura M, Ogawa N. Chronic cerebral hypoperfusion induces striatal alterations due to the transient increase of NO production and the depression of glutathione content. *Neurochem Res* 2002; 27: 331–36.
- <sup>306</sup> Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 2010; 119: 7–35.
- <sup>307</sup> Orzylowska O, Oderfeld-Nowak B, Zaremba M, Januszewski S, Mossakowski M. Prolonged and concomitant induction of astroglial immunoreactivity of interleukin-1beta and interleukin-6 in the rat hippocampus after transient global ischemia. *Neurosci Lett* 1999; 263: 72–6.
- <sup>308</sup> Ihara M, Tomimoto H, Kinoshita M y cols. Chronic cerebral hypoperfusion induces MMP-2 but not MMP-9 expression in the microglia and vascular endothelium of white matter. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 828–34.
- <sup>309</sup> Dean RA, Butler GS, Hamma-Kourbali Y y cols. Identification of candidate angiogenic inhibitors processed by matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in cell-based proteomic screens: disruption of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)/Heparin Affin Regulatory Peptide (Pleiotrophin) and VEGF/Connective Tissue Growth Factor Angiogenic Inhibitory Complexes by MMP-2 proteolysis. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 8454–65.
- <sup>310</sup> Choy M, Ganesan V, Thomas DL y cols. The chronic vascular and haemodynamic response after permanent bilateral common carotid occlusion in newborn and adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 1066–75.
- <sup>311</sup> Schwartz JH. Neurotransmitters. En: Kandel ER, Schwartz .H, Jessel TM (Eds.). *Principles of Neural Science*. 2000, 4ta. ed. McGraw-Hill, New York, EEUU.
- <sup>312</sup> Moreno MJ, López de Pablo AL, Marco EJ. Tryptophan hydroxylase activity in rat brain base arteries related to innervation originating from the dorsal raphe nucleus. *Stroke* 1994; 25: 1046–49.
- <sup>313</sup> Clark JA, Flick RB, Pai LY y cols. Glucocorticoid modulation of tryptophan hydroxylase-2 protein in raphe nuclei and 5-hydroxytryptophan concentrations in frontal cortex of C57/Bl6 mice. *Mol Psychiatry* 2008; 13: 498–506.

- 
- <sup>314</sup> Johansson S, Povlsen GK, Edvinsson L. Expressional changes in cerebrovascular receptors after experimental transient forebrain ischemia. *PLoS One* 2012; 7: e41852.
- <sup>315</sup> Sugden K, Tichopad A, Khan N, Craig IW, D'Souza UM. Genes within the serotonergic system are differentially expressed in human brain. *BMC Neurosci* 2009; 10: 50.
- <sup>316</sup> Llesuy SF, Tomaro ML. Heme oxygenase and oxidative stress: evidence of involvement of bilirubin as physiological protector against oxidative damage. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1223: 9–14.
- <sup>317</sup> Hermann, A., Donato, R., Weiger, T.M., Chazin WJ. S100 calcium binding proteins and ion channels. *Front Pharmacol* 2012; 3: 1–10.
- <sup>318</sup> Kamide T, Kitao Y, Takeichi T y cols. RAGE mediates vascular injury and inflammation after global cerebral ischemia. *Neurochem Int* 2012; 60: 220–28.
- <sup>319</sup> Büttner F, Cordes C, Gerlach F y cols. Genomic response of the rat brain to global ischemia and reperfusion. *Brain Res* 2009; 1252: 1–14.
- <sup>320</sup> Ferrarese, C, Mascarucci P, Zoia C y cols. Increased cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19, 1004-9.
- <sup>321</sup> Vila N, Castillo J, Davalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* 2001; 31: 2325–29.
- <sup>322</sup> Yilmaz G, Arumugam TV, Stokes KY, Granger N. Role of T lymphocytes and interferon- $\gamma$  in ischemic stroke. *Circulation* 2006; 113: 2105-12.
- <sup>323</sup> Yenari MA, Kauppinen TM, Swanson RA. Microglial activation in stroke: therapeutic targets. *Neurotherapeutics* 2010; 7: 378-91.
- <sup>324</sup> Maeda Y, Matsumoto M, Hori O y cols. Hypoxia/reoxygenation-mediated induction of astrocyte interleukin 6: a paracrine mechanism potentially enhancing neuron survival. *J Exp Med* 1994; 180: 2297–308.
- <sup>325</sup> Felger JC, Abe T, Kaunzner UW2 y cols. Brain dendritic cells in ischemic stroke: time course, activation state, and origin. *Brain Behav Immun* 2010; 24, 724–37.
- <sup>326</sup> Gottfried-Blackmore A, Kaunzner UW, Idoyaga J, Felger JC, McEwen BS, Bullochb K. Acute in vivo exposure to interferon- $\gamma$  enables resident brain dendritic cells to become effective antigen presenting cells *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 20918–23.
- <sup>327</sup> Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299, 1057–61.
- <sup>328</sup> Curotto de Lafaille MA, Lafaille JL. Natural and adaptive Foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009; 30, 626–35.
- <sup>329</sup> Pentón-Rol G, Martínez-Sánchez G, Cervantes-Llanos M y cols. C-Phycocyanin ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces regulatory T cells. *Int Immunopharmacol* 2011; 11: 29–38.

- 
- <sup>330</sup> Liesz A, Suri-Payer E, Veltkamp C y cols. Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med* 2009; 15: 192–99.
- <sup>331</sup> Ren X, Akiyoshi K, Vandenbark AA, Hurn PD, Offner H. CD4 + FoxP3 + regulatory T-cells in cerebral ischemic stroke. *Metab Brain Dis* 2011; 26: 87–90.
- <sup>332</sup> Li P, Gan Y, Sun BL y cols. Adoptive regulatory T-cell therapy protects against cerebral ischemia. *Ann Neurol* 2013; 74: 458-71.
- <sup>333</sup> Li P, Mao L, Zhou G y cols. Adoptive regulatory T-cell therapy preserves systemic immune homeostasis after cerebral ischemia. *Stroke* 2013; 44: 3509-15.
- <sup>334</sup> O'Garra A, Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 2004; 10: 801–5.
- <sup>335</sup> Chen S, Wu H, Klebe D, Hong Y, Zhang J, Tang J. Regulatory T cell in stroke: a new paradigm for immune regulation. *Clin Dev Immunol* 2013; 2013: 689827.
- <sup>336</sup> Dobolyi A, Vincze C, Pál G, Lovas G. The neuroprotective functions of transforming growth factor Beta proteins. *Int J Mol Sci* 2012; 13: 8219–58.
- <sup>337</sup> Sarafi M, Garcia-Zepeda E, MacLean J, Charo I, Luster A. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. *J Exp Med* 1997; 185: 99–109.
- <sup>338</sup> Xiong X, George Barreto G, Xu L, Ouyang Y, Xie X, Giffard RG. Increased brain injury and worsened neurological outcome in IL-4 knockout mice following transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 2011; 42: 2026–32.
- <sup>339</sup> Onishi RM, Gaffen SL. Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology* 2010; 129: 311-21.
- <sup>340</sup> Shichita T, Sugiyama Y., Ooboshi H y cols. Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing  $\gamma\delta$ T cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat Med* 2009; 15: 946–51.
- <sup>341</sup> Wang DD, Zhao YF, Wang GY y cols. IL-17 potentiates neuronal injury induced by oxygen–glucose deprivation and affects neuronal IL-17 receptor expression. *J Neuroimmunol* 2009; 212: 17–25.
- <sup>342</sup> Kebir H, Kreymborg, K, Ifergan I y cols. Human TH17 lymphocytes promote blood–brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 2007; 13: 1173–75.
- <sup>343</sup> Gelderblom M, Weymar A, Bernreuther C et al. Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood* 2012; 120: 3793-802.
- <sup>344</sup> Frank M. MAL, a proteolipid in glycosphingolipid enriched domains: functional implications in myelin and beyond. *Prog Neurobiol* 2000; 60: 531-44.
- <sup>345</sup> Wakita H, Tomimoto H, Akiguchi I y cols. Axonal damage and demyelination in the white matter after chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res* 2002; 924: 63–70.
- <sup>346</sup> Brandt U. Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Ann Rev Biochem* 2006; 75: 69–92.

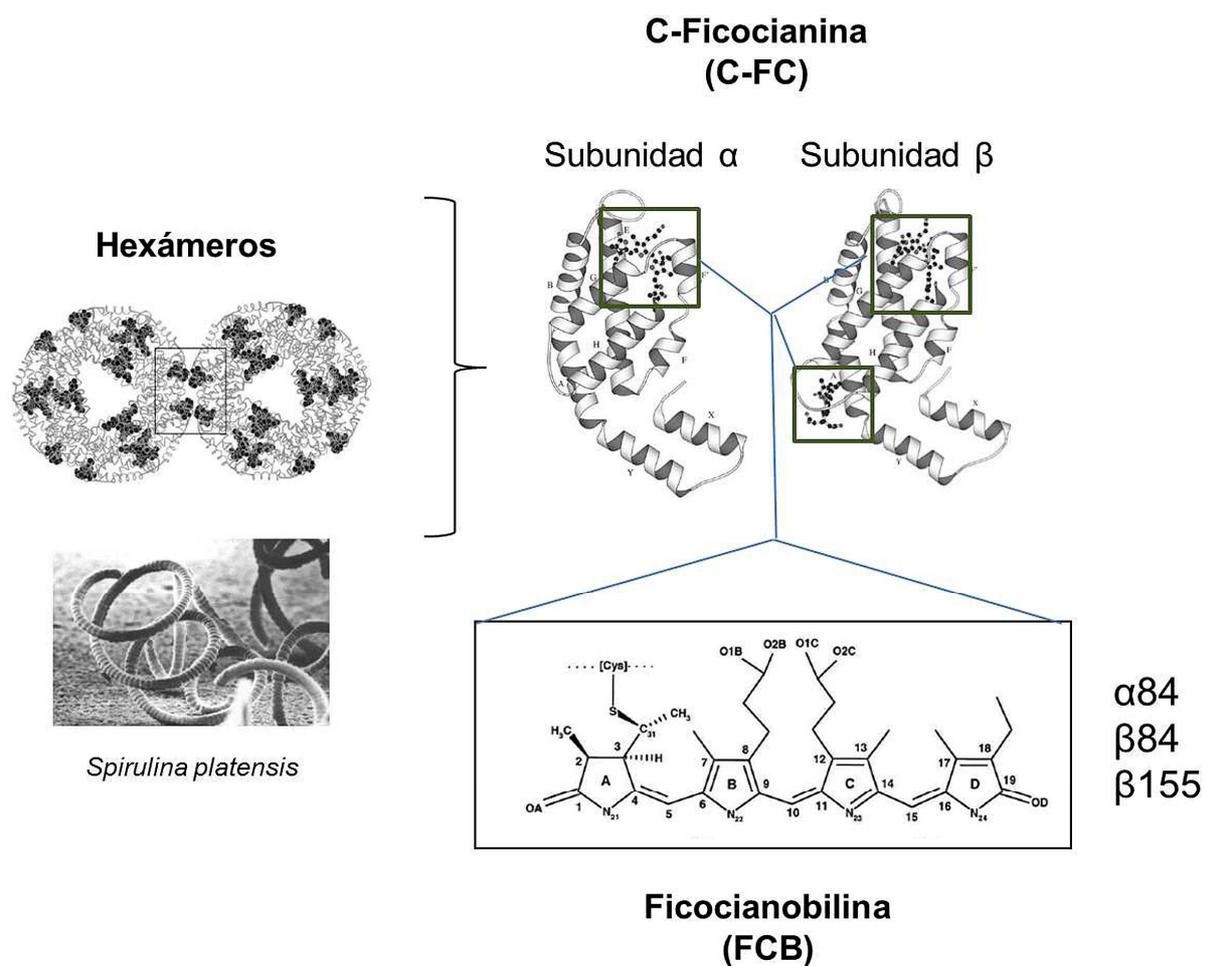
- 
- <sup>347</sup> He XL, Wang YH, Gao M y cols. Baicalein protects rat brain mitochondria against chronic cerebral hypoperfusion-induced oxidative damage. *Brain Res* 2009; 1249: 212-21.
- <sup>348</sup> Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 47-59.
- <sup>349</sup> Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 279–289.
- <sup>350</sup> Cummins EP, Taylor CT. Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch* 2005; 450: 363–71.
- <sup>351</sup> Kapadia R, Tureyen K, Bowen KK y cols. Decreased brain damage and curtailed inflammation in transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta knockout mice following transient focal cerebral ischemia. *J Neurochem* 2006; 98: 1718–31.
- <sup>352</sup> Yan SF, Tritto I, Pinsky D y cols. Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells. Central role of the binding site for nuclear factor-IL-6. *J Biol Chem* 1995; 270: 11463–71.
- <sup>353</sup> Cortes-Canteli M, Wagner M, Ansorge W, Perez-Castillo A. Microarray analysis supports a role for CCAAT/enhancer-binding protein-beta in brain injury. *J Biol Chem* 2004; 279: 14 409–17.
- <sup>354</sup> Chen J, Uchimura K, Stetler RA y cols. Transient global ischemia triggers expression of the DNA damage inducible gene GADD45 in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 646–57.
- <sup>355</sup> Lim KB, Bu W, Goh WI et al. The Cdc42 effector IRSp53 generates filopodia by coupling membrane protrusion with actin dynamics. *J Biol Chem* 2008; 283: 20454-72.
- <sup>356</sup> Dent EW, Kwiatkowski AV, Mebane LM et al. Filopodia are required for cortical neurite initiation. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1347-59.
- <sup>357</sup> Crespi A, Ferrari I, Lonati P et al. LIN7 regulates the filopodium- and neurite-promoting activity of IRSp53. *J Cell Sci* 2012; 125: 4543-54.
- <sup>358</sup> Choi J, Ko J, Racz B y cols. Regulation of dendritic spinemorphogenesis by insulin receptor substrate 53, a downstream effector of Rac1 and Cdc42 small GTPases. *J Neurosci* 2005; 25: 869–79.
- <sup>359</sup> Brait VH, Rivera J, Broughton BR y cols. Chemokine-related gene expression in the brain following ischemic stroke: no role for CXCR2 in outcome. *Brain Res* 2011; 1372: 169–79.
- <sup>360</sup> Supanc V, Biloglav Z, Kes VB, Demarin V. Role of cell adhesion molecules in acute ischemic stroke. *Ann Saudi Med* 2011; 31: 365–70.
- <sup>361</sup> Plaschke K, Grant M, Weigand MA, Zuchner J, Martin E, Bardenheuer HJ. Neuromodulatory effect of propentofylline on rat brain under acute and long-term hypoperfusion. *Br J Pharmacol* 2001; 133: 107–16.
- <sup>362</sup> Yang GY, Schielke G.P, Gong C y cols. Expression of tumor necrosis factor-alpha and intercellular adhesionmolecule-1 after focal cerebral ischemia in interleukin-1beta converting enzyme deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 1109–17.
- <sup>363</sup> Ribatti D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. *Br J Haematol* 2005; 128: 303–9.

- 
- <sup>364</sup> Hai J, Li ST, Lin Q y cols. Vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis induced by chronic cerebral hypoperfusion in rat brain. *Neurosurgery* 2003; 53: 963–70.
- <sup>365</sup> Kusaka N, Sugiu K, Tokunaga K y cols. Enhanced brain angiogenesis in chronic cerebral hypoperfusion after administration of plasmid human vascular endothelial growth factor in combination with indirect vasoreconstructive surgery. *J. Neurosurg.* 103, 882–890.
- <sup>366</sup> Storkebaum E, Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *BioEssays* 2004; 26: 943–54.
- <sup>367</sup> Bergendi L, Benes L, Duracková Z, Ferencik M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 1999; 65: 1865–74.
- <sup>368</sup> Palm F, Urbanek C, Wolf J y cols. Etiology, risk factors and sex differences in ischemic stroke in the Ludwigshafen Stroke Study, a population-based stroke registry. *Cerebrovasc Dis* 2012; 33: 69–75.
- <sup>369</sup> Benders MJ, Groenendaal F, De Vries LS. Preterm arterial ischemic stroke. *Semin Fetal Neonatal Med* 2009; 14: 272-7.
- <sup>370</sup> Beltrán-Blasco I, Medrano V, Sánchez-Pérez RM, Moltó- Jordá JM, Matías-Guiu J. Diferencias entre pacientes con ictus isquémico españoles frente a centro y nordeuropeos: un estudio de casos y controles. *Rev Neurol* 2005; 40: 193–8.
- <sup>371</sup> Blasco AML, Portuondo ESG. Ictus por infarto cerebral aterotrombótico en el Hospital Universitario “Manuel Ascunce Domenech” de Camagüey durante el año 2010. *Rev Cubana Neurol Neurocir* 2013; 3: 139-44.
- <sup>372</sup> Durukan A, Strbian D, Tatlisumak T. Rodent models of ischemic stroke: a useful tool for stroke drug development. *Curr Pharmaceut Des* 2008; 14: 359-70.
- <sup>373</sup> Callaway JK, Knight MJ, Watkins DJ, Beart PM, Jarrott B. Delayed treatment with AM-36, a novel neuroprotective agent, reduces neuronal damage after Endothelin-1 -induced Middle Cerebral Artery occlusion in conscious rats. *Stroke* 1999; 30: 2704-12.
- <sup>374</sup> Moyanova S, Kortenska L, Mitreva R. Endothelin-1 -induced cerebral ischemia: effects of ketanserin and MK-801 on limb placing in rats. *Int J Neurosci* 2007; 117: 1361–81.
- <sup>375</sup> Mecca AP, O'Connor TE, Katovich MJ, Sumners C. Candesartan pretreatment is cerebroprotective in a rat model of endothelin-1-induced middle cerebral artery occlusion. *Exp Physiol* 2009; 94: 937–46.
- <sup>376</sup> Kahles T, Heumueller S, Brandes RP. NADPH oxidases and blood-brain barrier dysfunction in stroke. En: Sauer H, Shah AM, Laurindo FR, eds. *Studies on Cardiovascular Disorders*. 2010, Humana Press, New York, EEUU, pp. 211-230.
- <sup>377</sup> Vallet P, Charnay K, Steger K y cols. Neuronal expression of the NADPH oxidase NOX4, and its regulation in mouse experimental brain ischemia. *Neuroscience* 2005; 132: 233-8.
- <sup>378</sup> Abramov AY, Jacobson J, Wientjes F, Hothersall J, Canevari L, Duchen MR. Expression and modulation of an NADPH oxidase in mammalian astrocytes. *J Neurosci* 2005; 25: 9176–84.

- 
- <sup>379</sup> Ago T, Kitazono T, Kuroda J y cols. NAD(P)H Oxidases in rat basilar arterial endothelial cells. *Stroke* 2005; 36: 1040-46.
- <sup>380</sup> Bianca VD, Dusi S, Bianchini E, Dal Pra I, Rossi F. Beta-amyloid activates the O<sub>2</sub>-forming NADPH oxidase in microglia, monocytes, and neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 1999; 274: 15493-99.
- <sup>381</sup> Babior BM. NADPH oxidase. *Curr Opin Immunol* 2004; 16: 42-7.
- <sup>382</sup> Tanga X, Liu KJ, Ramu J, Chen Q, Li T, Liu W. Inhibition of gp91phox contributes towards normobaric hyperoxia afforded neuroprotection in focal cerebral ischemia. *Brain Res* 2010; 1348: 174-80.
- <sup>383</sup> Miller AA, Dusting GJ, Roulston CL, Sobey CG. NADPH-oxidase activity is elevated in penumbral and non-ischemic cerebral arteries following stroke. *Brain Res* 2006; 1111: 111-16.
- <sup>384</sup> Riss J, Décordé K, Sutra T y cols. Phycobiliprotein C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 7962-67.

## ANEXO 1

Representación esquemática de la estructura nativa de la C-Ficocianina (C-FC) y la Ficocianobilina (FCB)<sup>1</sup>



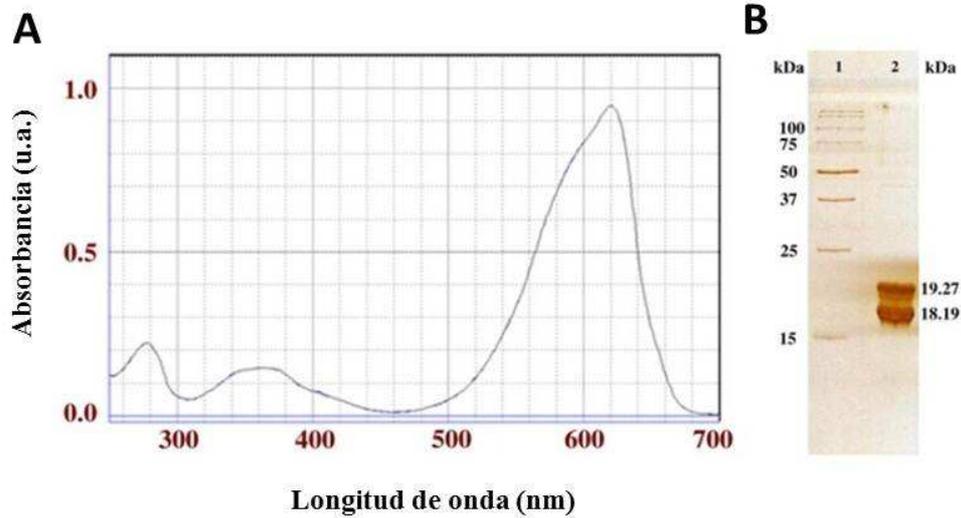
<sup>1</sup> Padyana AK, Bhat VB, Madyastha KM, Rajashankar KR, Ramakumar S. Crystal structure of a light-harvesting protein C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 282: 893–98.

**Purificación de FCB**

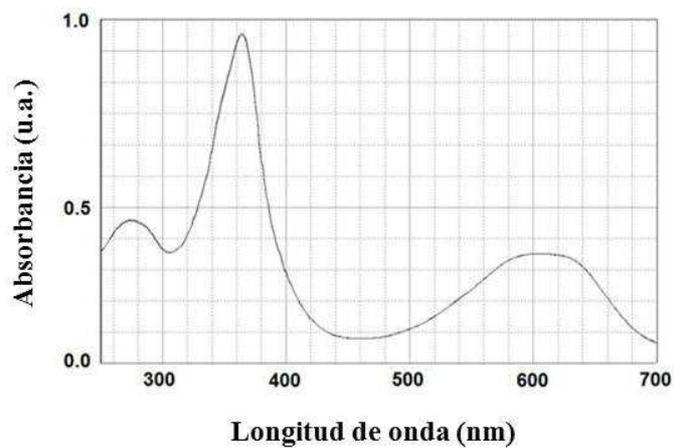
Se partió de 30 g de biomasa de *S. platensis*, resuspendida en 100 mL de buffer Tris 20 mM, pH 8,0 luego sonicada durante 20 min para la ruptura de las células, y centrifugada a  $10\,000 \times g$  por 20 min. El material soluble se eliminó por ultrafiltración con Amicon® Ultra 30 K (Millipore, Billerica, MA, EEUU). El extracto rico en C-Ficocianina obtenido se diluyó en 320 mL de metanol, con agitación lenta en la oscuridad por 16 h, a 40 °C. Los productos de esta etapa de metanólisis fueron concentrados con Amicon® Ultra 30 K (Millipore, Billerica, MA, EEUU), seguido por su dilución seriada seis veces en agua destilada, y su transferencia a un recipiente Amicon® Ultra 10 K (Millipore, Billerica, MA, EEUU). El filtrado obtenido se pasó por una columna Vidac C18 (10  $\mu\text{m}$ , 1x25 cm) (Vydac, Hesperia, CA, EEUU) de HPLC (del inglés: “high-performance liquid chromatography”), equilibrada con solución de ácido trifluoroacético 0,1% (en agua milli-Q) seguida por un gradiente de 0 a 65% de ácido trifluoroacético 0,1% (en etanol 96%). La FCB obtenida fue liofilizada y almacenada a -70°C hasta su uso. El espectro de absorbancia se realizó empleando un espectrofotómetro UV-VIS Ultrospec2000 (GE Healthcare, EEUU).

---

Espectro de absorción (**A**) de C-FC y corrida electroforética en SDS-PAGE (**B**) revelada con tinción de plata.<sup>2</sup> (u.a.: unidades arbitrarias)



Espectro de absorción de FCB



<sup>2</sup> Heukeshoven J, Dernick R. Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. Electrophoresis 1985; 6: 103.

## ANEXO 2

### Cebadores empleados para el análisis de la expresión de genes mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en Tiempo Real.

Nombre del gen (del inglés) y símbolo	Identificador en NCBI#	Cebador sentido (dirección 5'-3')	Cebador antisentido (dirección 5'-3')
Peptidylprolyl isomerase A ( <i>Ppia</i> )	NM_017101.1	TTTCGCGCTTGCTGCAGACA	AACAGCTCGAAGCAGACGCGAC
Tryptophan hydroxylase 2 ( <i>Tph2</i> )	NM_173839.2	ACAACGTCCCAGCTGGAAGA	TGCCGCACGTAAGTGCAGT
S100 calcium binding protein A5 ( <i>S100a5</i> )	NM_001106438.1	ACCACGCTGTGCATGGCCTACA	AAGAAAGAGAAGGGCAGGGGGCT
Chemokine (C-C motif) ligand 12 ( <i>Ccl12</i> )	NM_001105822.1	AATCACAAGCAGCCAGTGTCCCG	ACCCACTTCTCCTTGGGGTCAGCA
NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 2 ( <i>NDUFB1</i> )	NM_001108624.2	ATGGTGGACACATTCAGCCCGGT	ACCCAGCACAGCATCCGAGTCA
Myelin and lymphocyte protein ( <i>Mal</i> )	NM_012798.1	TGCAGCCTACCACTGTGTGGCT	AGGCGAACACCACTGCAGCGAT
B-cell leukemia / lymphoma 2 related protein A1 ( <i>Bcl-2a1</i> )	NM_133416.1	TGGAGGCTGGGAAGATGGCTTACA	AGGGAGCCAGGGTCTCTCTGGTCA
MHC-II invariant chain ( <i>CD74</i> )	NM_013069.2	AAACCTGTGAGCCCGATGCGCA	TCACGGGCGCTTGGAGCATGTT
Brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2 ( <i>Baiap2</i> )	NM_057196.1	TCAGCAACAAGCAGGGCGAGCT	AGCGGAGTCTTGGCCACTGCA
Heme oxygenase 1 ( <i>Hmox1</i> )	NM_012580.2	TGCAGAGACGCCCCGAGGAAAA	TGCCACGGTCGCCAACAGGAAA
Matrix metalloproteinase 2 ( <i>Mmp2</i> )	NM_031054.2	TGGATGCAGTCGTGGACCTGCA	AGCAGCCCAGCCAGTCCGATTT
Glial fibrillary acidic protein ( <i>Gfap</i> )	NM_017009.2	ACGTTGCTTCCCGCAACGCA	TTGTGCGCGCAAGGACTCAA
CCAAT/enhancer binding protein beta ( <i>C/EBPβ</i> )	NM_024125.4	GCAACAACATCGCGGTGCGCAA	AGCACCTTGTGCTGCGCTCCA
Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma ( <i>Gadd45g</i> )	NM_001077640.1	CGCCGGGAAAGCATTGCACGAA	TCGGCAGCCAGCACGCAAAA
Interleukin-17A ( <i>IL-17A</i> )	NM_001106897.1	TGTGTCCAACGCCGAGGCCAA	AGGGCCTTCTGGAGCTCGCTTT
Interferon gamma ( <i>IFN-γ</i> )	NM_138880.2	TGCTACACGCCGCTTTGGTT	TGAGTGTGCCCTGGCAGTAACAGCC
Interleukin-4 ( <i>IL-4</i> )	NM_201270.1	ACCGGGAACGGTATCCACGGATGT	CCGTGGTGTCTCTGTTGCCGT
Interleukin-6 ( <i>IL-6</i> )	NM_012589.1	TGTCTCGAGCCACCAGGAACGAA	AGGGAAGGCAGTGGCTGTCAACA
Transforming growth factor beta 1 ( <i>TGF-β1</i> )	NM_021578.2	ACGCCAAAGAAGTCAACCCGCT	ACGGGACAGCAATGGGGTCTCT
Forkhead box P3 ( <i>Foxp3</i> )	NM_001108250.1	GCCTGCACAAGTGTCTTGTGCG	TTGGAGCACTTGTGGGGCGTT
Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 ( <i>Cxcl2</i> )	NM_053647.1	GCAAGCTCCCTCCTGTGCTCAA	CACTGGCCACAACAACCCCTGT
Intercellular adhesion molecule 1 ( <i>ICAM-1</i> )	NM_012967.1	ATTGCGGGCTTCGTGATCGTGG	AGGCGGGGCTTGTACCTTGAGT
Interleukin 1 beta ( <i>IL-1β</i> )	NM_031512.2	ACGTGTGTTTCCCTCCCTGCCT	TCGACAATGCTGCCCTGTGACC
Tumor necrosis factor alpha ( <i>TNF-α</i> )	NM_012675.3	TACACTGGCCCGAGGCAACACA	AGACACCCGCTGGAGTTCTGGA
Vascular endothelial growth factor ( <i>VEGFA</i> )	NM_031836.2	AGGCCGAAGTCTGTTGCTGCTGC	TCAGGGCCAGGGATGGGTTTGT

#NCBI: National Center for Biotechnology Information

## ANEXO 3

**Genes diferencialmente modulados en la corteza cerebral anterior por el tratamiento de FCB luego de la oclusión permanente de las arterias carótidas comunes (OPACC) en ratas.**

**Genes con expresión aumentada:**

No.	Símbolo del gen	Nombre del gen (en inglés)	Valor q	Nivel de cambio
1	Rpl10a	ribosomal protein L10A	1.0003421	2.48
2	LOC692042	hypothetical protein LOC692042	1.0004745	2.47
3	LOC678805	hypothetical protein LOC678805	1.0004745	2.47
4	Pter	phosphotriesterase related	1.0000625	2.38
5	RGD1561231	similar to MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4 (MAP/microtubule affinity-regulating kinase like 1)	0.9971666	2.33
6	RGD1561546	similar to serine/threonine kinase	0.9971666	2.33
7	RGD1565379	similar to serine/threonine kinase	0.9971666	2.33
8	LOC689107	similar to MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	0.9971666	2.33
9	Slc39a12	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 12	1.00016	2.19
10	Acsm3	acyl-CoA synthetase medium-chain family member 3	0.98966146	2.07
11	Fcgr2b	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	1.0006138	2.06
12	Adamts1	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 1	0.9915726	2.01
13	Obp3	alpha-2u globulin PGCL4	1.0001878	1.99
14	Mup4	major urinary protein 4	1.0001878	1.99
15	Mup5	major urinary protein 5	1.0001878	1.99
16	LOC298109	alpha-2u globulin PGCL2	1.0001878	1.99
17	LOC259246	alpha-2u globulin PGCL1	1.0001878	1.99
18	LOC298116	alpha-2u-globulin (L type)	1.0001878	1.99
19	LOC298111	alpha2u globulin	1.0001878	1.99
20	LOC259244	alpha-2u globulin PGCL3	1.0001878	1.99
21	LOC685482	similar to alpha2u globulin	1.0001878	1.99
22	LOC366380	alpha 2U globulin	1.0001878	1.99
23	St13	suppression of tumorigenicity 13	1.00031	1.94

<b>24</b>	Ndst4	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 4	1.080613	1.90
<b>25</b>	Ogn	osteoglycin	1.0014311	1.85
<b>26</b>	Nupr1	transcriptional regulator 1	1.0002831	1.83
<b>27</b>	Lair1	leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1	0.98377675	1.80
<b>28</b>	Ccl2	chemokine (C-C motif) ligand 2	0.9790033	1.79
<b>29</b>	Rxfp2	relaxin/insulin-like family peptide receptor 2	1.0015999	1.78
<b>30</b>	Gpr34	G protein-coupled receptor 34	1.0015812	1.78
<b>31</b>	Cask	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family)	1.0015812	1.78
<b>32</b>	Ptgds	prostaglandin D2 synthase (brain)	1.0004019	1.78
<b>33</b>	Slc43a3	solute carrier family 43, member 3	1.0005454	1.77
<b>34</b>	LOC687897	hypothetical protein LOC687897	1.0014162	1.73
<b>35</b>	LOC691962	hypothetical protein LOC691962	1.0014162	1.73
<b>36</b>	Obox2	oocyte specific homeobox 2	1.0009596	1.72
<b>37</b>	LOC680377	similar to Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A (Leucine-rich acidic nuclear protein)	0.9838403	1.71
<b>38</b>	P2ry12	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 12	1.0017537	1.71
<b>39</b>	Thrsp	thyroid hormone responsive	1.0017229	1.71
<b>40</b>	Serpina3n	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3N	0.9116652	1.70
<b>41</b>	LOC690826	similar to protocadherin beta 16	1.0017138	1.69
<b>42</b>	Cox4i2	cytochrome c oxidase subunit IV isoform 2	1.0014646	1.68
<b>43</b>	LOC289673	similar to Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	1.0013652	1.68
<b>44</b>	Alox5ap	arachidonate 5-lipoxygenase activating protein	1.0012794	1.67
<b>45</b>	RGD1560825	similar to putative protein kinase	1.0012462	1.67
<b>46</b>	RGD1564858	similar to putative protein kinase	1.0012462	1.67
<b>47</b>	RGD1565231	similar to putative protein kinase	1.0012462	1.67
<b>48</b>	RGD1561339	similar to putative protein kinase	1.0012462	1.67
<b>49</b>	LOC689299	similar to serine/threonine kinase	1.0012462	1.67

<b>50</b>	C3ar1	complement component 3a receptor 1	1.0005891	1.66
<b>51</b>	Pld4	phospholipase D family, member 4	1.0016338	1.64
<b>52</b>	Slc9a4	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 4	1.0009445	1.64
<b>53</b>	Elmod2	ELMO/CED-12 domain containing 2	0.9832045	1.63
<b>54</b>	Csf1r	colony stimulating factor 1 receptor	1.0017077	1.63
<b>55</b>	Kcnj13	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 13	1.0005134	1.62
<b>56</b>	Ptx3	pentraxin related gene	1.0232165	1.62
<b>57</b>	Inpp5d	inositol polyphosphate-5-phosphatase D	1.000715	1.61
<b>58</b>	Mt1a	metallothionein 1a	1.0003173	1.60
<b>59</b>	Slc13a4	solute carrier family 13 (sodium/sulfate symporters), member 4	1.0006903	1.59
<b>60</b>	Cd163	CD163 molecule	1.0004808	1.59
<b>61</b>	Hist2h2bb	histone cluster 2, H2bb	1.0007834	1.59
<b>62</b>	Tcfap2d	transcription factor AP-2, delta	1.0018251	1.58
<b>63</b>	Styx	serine/threonine/tyrosine interacting protein	0.9862402	1.58
<b>64</b>	RGD1562607	similar to Serine/threonine/tyrosine interacting protein (Protein tyrosine phosphatase-like protein)	0.9862402	1.58
<b>65</b>	Lptm5	lysosomal protein transmembrane 5	1.0014367	1.58
<b>66</b>	RGD1561231	similar to MAP/microtubule affinity-regulating kinase 4 (MAP/microtubule affinity-regulating kinase like 1)	1.0111173	1.58
<b>67</b>	RGD1565379	similar to serine/threonine kinase	1.0111173	1.58
<b>68</b>	RGD1561546	similar to serine/threonine kinase	1.0111173	1.58
<b>69</b>	LOC689107	similar to MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3	1.0111173	1.58
<b>70</b>	Hist2h4	histone cluster 2, H4	1.0006368	1.57
<b>71</b>	Nlr1	NLR family member X1	1.0013928	1.57
<b>72</b>	Ccr5	chemokine (C-C motif) receptor 5	0.98649675	1.56
<b>73</b>	LOC305698	similar to Glutaredoxin-1 (Thioltransferase-1) (TTase-1)	0.98654866	1.56
<b>74</b>	LOC679752	similar to Glutaredoxin-1 (Thioltransferase-1) (TTase-1)	0.98654866	1.56
<b>75</b>	Mt1a	metallothionein 1a	1.0010897	1.55
<b>76</b>	Il28ra	interleukin 28 receptor alpha	1.0008624	1.55

<b>77</b>	Mpeg1	macrophage expressed gene 1	1.0012946	1.55
<b>78</b>	Sypl2	synaptophysin-like 2	1.0242367	1.54
<b>79</b>	RGD1561928	similar to ribosomal protein L9	1.0009125	1.53
<b>80</b>	Fcgr2b	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)	1.0015416	1.53
<b>81</b>	LOC498276	Fc gamma receptor II beta	1.0015416	1.53
<b>82</b>	Cfh	complement factor H	1.0009991	1.53
<b>83</b>	Cyr61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	1.0016309	1.52
<b>84</b>	Itgbl1	integrin, beta-like 1	1.0000517	1.52
<b>85</b>	RGD1566229	similar to 60S ribosomal protein L7a	1.0019628	1.52
<b>86</b>	LOC499070	similar to 60S ribosomal protein L7a	1.0019628	1.52
<b>87</b>	A2m	alpha-2-macroglobulin	0.9938268	1.52
<b>88</b>	Ttr	transthyretin	0.9907679	1.52
<b>89</b>	Itgb2	integrin, beta 2	1.0013658	1.51
<b>90</b>	Tc2n	tandem C2 domains, nuclear	0.9936914	1.50
<b>91</b>	LOC690885	similar to NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6, 17kDa isoform 2	1.0011051	1.50
<b>92</b>	Slc13a3	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 3	1.0010041	1.50
<b>93</b>	Cd93	CD93 molecule	1.00137	1.50

---

**Genes con expresión disminuida:**

No.	Símbolo del gen	Nombre del gen (en inglés)	Valor q	Nivel de cambio
1	RGD1564409	similar to hypothetical protein 4930509O22	1.0041474	-1.50
2	LOC300308	similar to hypothetical protein 4930509O22	1.0041474	-1.50
3	LOC500815	similar to par-1 CG8201-PO, isoform O	1.0041474	-1.50
4	LOC687373	similar to ribosomal protein S14	1.0039603	-1.50
5	LOC691255	similar to ribosomal protein S14	1.0039603	-1.50
6	Mphosph8	M-phase phosphoprotein 8	1.0027357	-1.50
7	Ctrl	chymotrypsin-like	1.0021633	-1.50
8	Eml5	echinoderm microtubule associated protein like 5	1.0036011	-1.51
9	Dppa3	developmental pluripotency-associated 3	0.9993232	-1.51
10	RGD1560771	similar to STELLA	0.9993232	-1.51
11	RGD1559950	similar to STELLA	0.9993232	-1.51
12	LOC679766	similar to developmental pluripotency- associated 3	0.9993232	-1.51
13	LOC682399	similar to developmental pluripotency- associated 3	0.9993232	-1.51
14	Vof16	ischemia related factor vof-16	0.99194276	-1.52
15	Rpl21	ribosomal protein L21	1.0035106	-1.52
16	RGD1566326	similar to ribosomal protein L21	1.0035106	-1.52
17	RGD1565159	similar to ribosomal protein L21	1.0035106	-1.52
18	RGD1562469	similar to ribosomal protein L21	1.0035106	-1.52
19	Rpl21-ps1	ribosomal protein L21, pseudogene 1	1.0035106	-1.52
20	RGD1309108	similar to hypothetical protein FLJ23554	0.9807649	-1.52
21	Vwa3a	von Willebrand factor A domain containing 3A	0.98419255	-1.53

<b>22</b>	Lrrc8e	leucine rich repeat containing 8 family, member E	1.0034237	-1.53
<b>23</b>	Olr907	olfactory receptor 907	1.0029461	-1.54
<b>24</b>	Olr917	olfactory receptor 917	1.0029461	-1.54
<b>25</b>	Olr883	olfactory receptor 883	1.0029461	-1.54
<b>26</b>	Olr910	olfactory receptor 910	1.0029461	-1.54
<b>27</b>	Olr990	olfactory receptor 990	1.0029461	-1.54
<b>28</b>	Pkib	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta	1.0042293	-1.54
<b>29</b>	Prim1	DNA primase, p49 subunit	0.9813308	-1.56
<b>30</b>	RGD1560825	similar to putative protein kinase	1.0026819	-1.57
<b>31</b>	RGD1564858	similar to putative protein kinase	1.0026819	-1.57
<b>32</b>	RGD1565231	similar to putative protein kinase	1.0026819	-1.57
<b>33</b>	Prom1	prominin 1	1.0051613	-1.57
<b>34</b>	Rpl21	ribosomal protein L21	1.0033706	-1.58
<b>35</b>	RGD1562469	similar to ribosomal protein L21	1.0033706	-1.58
<b>36</b>	RGD1565159	similar to ribosomal protein L21	1.0033706	-1.58
<b>37</b>	Rpl21-ps1	ribosomal protein L21, pseudogene 1	1.0033706	-1.58
<b>38</b>	Nqo2	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2	1.0045748	-1.58
<b>39</b>	H3f3b	H3 histone, family 3B	0.9905904	-1.59
<b>40</b>	LOC686736	similar to H3 histone, family 3B	0.9905904	-1.59
<b>41</b>	Pdk4	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4	1.003173	-1.59
<b>42</b>	Sucnr1	succinate receptor 1	1.002122	-1.60
<b>43</b>	Abcg2	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 2	1.0044818	-1.61
<b>44</b>	Rnf135	ring finger protein 135	1.004105	-1.62
<b>45</b>	Sfrs12ip1	SFRS12-interacting protein 1	1.0046892	-1.62

---

<b>46</b>	Rimklb	ribosomal modification protein rimK-like family member B	1.0042729	-1.66
<b>47</b>	Rpl37	ribosomal protein L37	1.0019737	-1.68
<b>48</b>	RGD1561310	similar to ribosomal protein L37	1.0019737	-1.68
<b>49</b>	RGD1560186	similar to ribosomal protein L37	1.0019737	-1.68
<b>50</b>	LOC690840	similar to ribosomal protein L37	1.0019737	-1.68
<b>51</b>	Xkr8	XK, Kell blood group complex subunit-related family, member 8	0.98558015	-1.72
<b>52</b>	Xk	X-linked Kx blood group (McLeod syndrome) homolog	0.98558015	-1.72
<b>53</b>	Smpdl3b	sphingomyelin phosphodiesterase, acid-like 3B	0.98558015	-1.72
<b>54</b>	LOC688389	similar to solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, $\gamma$ + system), member 12	1.0035477	-1.72
<b>55</b>	Idi2l	isopentenyl-diphosphate delta isomerase 2-like	1.0455029	-1.73
<b>56</b>	RGD1564999	similar to isopentenyl-diphosphate delta isomerase 2	1.0455029	-1.73
<b>57</b>	Gsbs	G substrate	1.0036352	-1.74
<b>58</b>	Pcp2	Purkinje cell protein 2	1.0032631	-1.77
<b>59</b>	LOC686123	similar to leucine rich repeat and coiled-coil domain containing 1	1.0034708	-1.80
<b>60</b>	RGD1564240	similar to T cell receptor V delta 6	0.98328704	-1.82
<b>61</b>	LOC678814	hypothetical protein LOC678814	0.98328704	-1.82
<b>62</b>	LOC689299	similar to serine/threonine kinase	0.99019337	-1.83
<b>63</b>	Car8	carbonic anhydrase 8	1.0011338	-1.83

---

<b>64</b>	Zic1	Zic family member 1 (odd-paired homolog, Drosophila)	1.0015225	-1.83
<b>65</b>	Il16	interleukin 16	1.0021298	-1.90
<b>66</b>	Kat5	K(lysine) acetyltransferase 5	0.9808836	-1.92
<b>67</b>	RGD1565455	similar to 60S ribosomal protein L29 (P23)	0.9808836	-1.92
<b>68</b>	Calb2	calbindin 2	1.0008416	-1.94
<b>69</b>	Cxcl13	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	1.0048788	-2.01
<b>70</b>	Rpl21	ribosomal protein L21	0.9855979	-2.05
<b>71</b>	RGD1566326	similar to ribosomal protein L21	0.9855979	-2.05
<b>72</b>	RGD1562469	similar to ribosomal protein L21	0.9855979	-2.05
<b>73</b>	Rpl21-ps1	ribosomal protein L21, pseudogene 1	0.9855979	-2.05
<b>74</b>	RGD1563738	similar to Discs, large homolog 5 (Placenta and prostate DLG)	0.996334	-2.06
<b>75</b>	LOC681283	similar to Discs large homolog 5 (Placenta and prostate DLG) (Discs large protein P-dlg)	0.996334	-2.06
<b>76</b>	LOC686038	similar to Discs large homolog 5 (Placenta and prostate DLG) (Discs large protein P-dlg)	0.996334	-2.06
<b>77</b>	LOC685965	similar to spermatogenesis associated glutamate (E)-rich protein 4b	0.996334	-2.06
<b>78</b>	Olr779	olfactory receptor 779	1.0006193	-2.15
<b>79</b>	Olr780	olfactory receptor 780	1.0006193	-2.15
<b>80</b>	Cbln1	cerebellin 1 precursor	1.0014884	-2.19
<b>81</b>	RGD1560224	RGD1560224	1.0006505	-2.21
<b>82</b>	Rnf135	ring finger protein 135	1.0006505	-2.27
<b>83</b>	Neurod1	neurogenic differentiation 1	1.0005897	-2.34
<b>84</b>	Sms	spermine synthase	0.97657526	-2.63
<b>85</b>	Mrpl41	mitochondrial ribosomal protein L41	0.9941489	-2.91
<b>86</b>	RGD1560917	similar to mitochondrial ribosomal protein L41	0.9941489	-2.91

---

## ANEXOS

<b>87</b>	LOC501427	similar to Spetex-2F protein	1.0000674	-3.01
<b>88</b>	LOC685904	similar to Spetex-2F protein	1.0000674	-3.01
<b>89</b>	LOC688507	similar to Spetex-2F protein	1.0000674	-3.01
<b>90</b>	Fat2	FAT tumor suppressor homolog 2 (Drosophila)	1.0000964	-3.43
<b>91</b>	Cbln3	cerebellin 3 precursor	0.9999993	-4.71
<b>92</b>	Gabra6	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 6	0.9999653	-6.24
<b>93</b>	LOC499782	similar to 60S ribosomal protein L12	1.004927	-6.51
<b>94</b>	RGD1564883	similar to 60S ribosomal protein L12	1.004927	-6.51
<b>95</b>	Rpl12	ribosomal protein L12	1.004927	-6.51
<b>96</b>	RGD1563956	similar to 60S ribosomal protein L12	1.004927	-6.51
<b>97</b>	LOC685320	similar to 60S ribosomal protein L12	1.004927	-6.51

---

## ANEXO 4

**Producción científica relacionada con el tema de la tesis:****Publicaciones**

1. Pentón-Rol G\*, **Marín-Prida J\***, Pardo-Andreu G, Martínez-Sánchez G, Acosta-Medina EF, Valdivia-Acosta A, Lagumersindez-Denis N, Rodríguez-Jiménez E, Llopiz-Arzuaga A, López-Saura PA, Guillén-Nieto GE, Pentón-Arias E. C-Phycocyanin is neuroprotective against global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils. *Brain Research Bulletin* 2011, Aug 10; 86 (1-2): 42-52. Impact Factor® 2012 Thomson Reuters: 2,935. \*Co-autoría principal compartida.
2. **Marín-Prida J**, Pentón-Rol G, Rodrigues FP, Alberici LC, Stringhetta K, Leopoldino AM, Naal Z, Polizello ACM, Llopiz-Arzuaga A, Rosa MN, Liberato JL, Santos WF, Uyemura SA, Pentón-Arias E, Curti C, Pardo-Andreu GL. C-Phycocyanin protects SH-SY5Y cells from oxidative injury, rat retina from transient ischemia and rat brain mitochondria from Ca<sup>2+</sup>/phosphate-induced impairment. *Brain Research Bulletin* 2012; 89: 159-167.
3. **Marín-Prida J\***, Pavón-Fuentes N\*, Llopiz-Arzuaga A, Massó JR, Roche LD, Mendoza-Marí Y, Santana SP, Cruz-Ramírez A, Valenzuela-Silva C, Nazábal-Gálvez M, Cintado-Benítez A, Pardo-Andreu GL, Polentarutti N, Riva F, Pentón-Arias E, Pentón-Rol G. Phycocyanobilin promotes PC12 cell survival and modulates immune and inflammatory genes and oxidative stress markers in acute cerebral hypoperfusion in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013 Oct 1; 272(1): 49-60. Impact Factor® 2012 Thomson Reuters: 3,975. \*Co-autoría principal compartida.
4. **Marín-Prida J**, Pavón-Fuentes N, Llopiz-Arzuaga A, Fernández-Massó JR, Delgado-Roche L, Mendoza-Marí Y, Polentarutti N, Riva F, Pardo-Andreu GL, Pentón-Arias E, Pentón-Rol G. C-Phycocyanin prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glutamate induced toxicities in PC12 cells and attenuates brain damage in rats with cerebral hypoperfusion. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2014 (En revisión). Impact Factor® 2012 Thomson Reuters: 2,16.
5. **Marín-Prida J**, Liberato JL, Batista Xavier JR, Stringhetta K, Leopoldino AM, Polizello ACM, Llopiz-Arzuaga A, dos Santos WF, Uyemura SA, Curti C, Pentón-Rol G, Pardo-Andreu GL. Post-ischemia C-Phycocyanin therapy protects against endothelin-1 induced cerebral infarction: inhibitory effects on NADPH oxidase. (En preparación)

**Resúmenes publicados de trabajos presentados en eventos científicos**

1. **Marín-Prida J**, Pardo-Andreu GL, Acosta EF, Lagumersindez-Denis N, Martínez-Sánchez G, Pentón-Rol G, Pentón-Arias E. Neuroprotective effect of orally administered C-Phycocyanin against global cerebral ischemic/reperfusion injury in gerbils. *Revista Cubana de Farmacia* 2011; 45 (Supl. 1): 31.
-

2. **Marín-Prida J**, Pavón N, Stringhetta K, Leopoldino AM, Mendoza-Marí Y, Figueredo YN, Llopiz-Arzuaga A, Nunes-Rosa M, Liberato JL, Cruz A, Ferrera dos Santos W, Delgado R, Guillén-Nieto G, Pentón-Arias E, Curti C, Pardo-Andreu GL, Pentón-Rol G. C-Phycocyanin and Phycocyanobilin are neuroprotective in models of Brain Ischemia. *Revista Cubana de Farmacia* 2012; 46 (Suppl. 2): 77.
3. Pentón-Rol G, **Marín-Prida J**, Llopiz-Arzuaga A, Cervantes-Llanos M, Pavón N, Falcón-Cama V, Fernández-Massó J, Nazábal-Gálvez M, Cruz-Ramírez A, Pardo Andreu GL, Pentón-Arias E. Molecular mechanisms associated to new therapies for Multiple Sclerosis and Stroke. *Revista Cubana de Farmacia* 2012; 46 (Suppl. 2): 61.
4. **Marín-Prida J**, Fuentes NP, Arzuaga AL, Massó JR, Ramírez AC, Polentarutti N, Riva F, Arias EP, Mantovani A, Pentón-Rol G (2013). Phycocyanobilin positively modulates inflammatory genes in acute cerebral hypoperfusion in rats. *Front Immunol*. Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI). doi:10.3389/conf.fimmu.2013.02.00391

#### **Presentaciones en eventos científicos**

1. **Marín-Prida J**, Pardo-Andreu GL, Acosta EF, Lagumersindez-Denis N, Martínez-Sánchez G, Pentón-Rol G, Pentón-Arias E. Neuroprotective effect of orally administered C-Phycocyanin against global cerebral ischemic/reperfusion injury in gerbils. 3rd International Congress Havana Redox 2011, January 27-29, Havana, Cuba. Plenary Lecture.
  2. **Marín-Prida J**, Pentón-Rol G, Mendoza-Marí Y, Lagumersindez-Denis N, Llopiz-Arzuaga A, Pardo-Andreu GL. C-Phycocyanin protects PC12 cells against toxicity induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and glutamate. *Immunopharmacology* 2011, 2nd. International Workshop on Neuroimmunology, June 26-30, Varadero, Matanzas, Cuba. Poster.
  3. **Marín-Prida J**, Pentón-Rol G, Pardo-Andreu G, Martínez-Sánchez G, Acosta-Medina EF, Valdivia-Acosta A, Lagumersindez-Denis N, Rodríguez-Jiménez E, Llopiz-Arzuaga A, López-Saura PA, Guillén-Nieto GE, Pentón-Arias E. Therapeutic administration of C-Phycocyanin protects against global cerebral ischemia/reperfusion damage in gerbils. 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences – CIFARP 2011, August 21-24, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. Poster award.
  4. **Marín-Prida J**, Pavón N, Stringhetta K, Leopoldino AM, Mendoza-Marí Y, Figueredo YN, Llopiz-Arzuaga A, Nunes-Rosa M, Liberato JL, Cruz A, Ferrera dos Santos W, Delgado R, Guillén-Nieto G, Pentón-Arias E, Curti C, Pardo-Andreu GL, Pentón-Rol G. Neuroprotective effects of C-Phycocyanin and Phycocyanobilin on in vitro and in vivo models of brain Ischemia. International Congress Biotecnología Habana 2012, March 5-8, Center of Conventions, Havana, Cuba. Poster.
-

5. Pentón-Rol G, **Marín-Prida J**, Llopiz Arzuaga A, Cervantes Llanos M, Pavón Fuentes N, Valenzuela Silva C, Falcón Cama V, Fernández Masso JR, Nazabal Galvez M, Cruz Ramírez A, Pardo Andreu GL, Pentón-Arias E. Molecular mechanisms associated to new therapies for multiple sclerosis and stroke. International Congress Biotecnología Habana 2012, March 5-8, Center of Conventions, Havana, Cuba. Oral presentation.
  6. **Marín-Prida J**, Pavón N, Stringhetta K, Leopoldino AM, Mendoza-Marí Y, Figueredo YN, Llopiz-Arzuaga A, Nunes-Rosa M, Liberato JL, Cruz A, Santos WF, Delgado R, Guillén-Nieto G, Pentón-Arias E, Curti C, Pardo-Andreu GL, Pentón-Rol G. C-Phycocyanin and Phycocyanobilin protect neurons and modulate neuro-immune interactions in models of brain Ischemia. "John Humphrey" Advance Immunology Conference "Adaptive and Innate Immunity", March 19-21, 2012. Foundation for the New Latin-American Cinema, Havana, Cuba. Poster.
  7. **Marín-Prida J**, Pentón-Rol G, Postalli Rodrigues F, Llopiz-Arzuaga A, Curti C, Pardo-Andreu GL. Antioxidant activity of C-Phycocyanin in SH-SY5Y cell line and isolated rat brain mitochondria. Cubafarmacia 2012, XI Congress of the Cuban Society of Pharmaceutical Sciences, Hotel Nacional de Cuba, May 9-11, 2012, Havana, Cuba. Poster.
  8. **Marín-Prida J**, Stringhetta K, Leopoldino AM, Mendoza-Marí Y, Núñez-Figueredo Y, Llopiz-Arzuaga A, Nunes-Rosa M, Liberato JL, Delgado R, Ferreira dos Santos WF, Guillén-Nieto G, Pentón-Arias E, Curti C, Pardo-Andreu GL, Pentón-Rol G. Neuroprotective Effects of C-Phycocyanin in Neuronal Cell Lines and Transient Ischemic Rat Retina. 41 Annual Meeting of the Brazilian Association of Biochemistry and Molecular Biology, Convention Center of the Rafain Palace Hotel, Foz de Iguazú, May 19-22, 2012, Paraná, Brazil. Poster.
  9. **Marín-Prida J**, Pavón N, Stringhetta K, Leopoldino AM, Llopiz-Arzuaga A, Nunes-Rosa M, Liberato JL, Ferreira dos Santos W, Pentón-Arias E, Curti C, Pardo-Andreu GL, Pentón-Rol G. New mechanisms involved in the neuroprotective actions of C-Phycocyanin and Phycocyanobilin in models of brain ischemia. 6th Annual Canadian Neuroscience Meeting, May 20-23, 2012, Sheraton Hotel, Vancouver, British Columbia, Canada. Poster.
  10. **Marín-Prida J**, Pavón N, Stringhetta K, Leopoldino AM, Mendoza-Marí Y, Figueredo YN, Llopiz-Arzuaga A, Nunes-Rosa M, Liberato JL, Cruz A, Ferrera dos Santos W, Delgado R, Guillén-Nieto G, Pentón-Arias E, Curti C, Pardo-Andreu GL, Pentón-Rol G. C-Phycocyanin and Phycocyanobilin are neuroprotective in models of Brain Ischemia. Fapronatura 2012, 3rd. International Congress on Pharmacology of Natural Products, June 6-10, Topes de Collantes, Trinidad, Cuba. Oral Presentation.
  11. **Marín-Prida J**, Pentón-Rol G, Rodrigues FP, Alberici LC, Stringhetta K, Leopoldino AM, Naal Z, Morseli Polizello AC, Llopiz-Arzuaga A, Nunes Rosa M, Liberato JL, Santos WF, Uyemura SA, Pentón-Arias E, Curti C, Pardo-Andreu GL. C-Phycocyanin protects SH-SY5Y cells, rat retina and isolated rat brain mitochondria against ischemic insults. International Workshop on Pharmacy and Food Sciences, 9-10 July, 2012, Hotel Meliá
-

Habana, Cuba. Poster.

12. **Marín-Prida J**, Mendoza-Marí Y, Llopiz-Arzuaga A, Delgado-Roche L, Pardo-Andreu GL, Pentón-Rol G. Standardization of an in vitro neurotoxicity model in PC12 cells to investigate potential treatments for ischemic stroke: effects of C-Phycocyanin. Poster. Scientific Event “Neurosciences in Cuba 1962-2012”, October 17-19, 2012, Higher Institute of Medical Sciences “Victoria de Girón”, Havana, Cuba. Poster.
  13. **Marín-Prida J**, Cruz-Ramírez A, Pavón-Fuentes N, Llopiz-Arzuaga A, Pardo-Andreu GL, Pentón-Arias E, Pentón-Rol G. Therapeutic potentialities of natural products against ischemic stroke. Scientific Event “Girón 2013”, April 15-19, 2013. Higher Institute of Medical Sciences “Victoria de Girón”, Havana, Cuba. Poster.
  14. **Marín-Prida J**, Pavón-Fuentes N, Rodrigues FP, Alberici LC, Stringhetta K, Leopoldino AM, Llopiz-Arzuaga A, Liberato JL, Santos WF, Uyemura SA, Pentón-Arias E, Curti C, Pardo-Andreu GL, Pentón-Rol G. C-Phycocyanin: a new promising therapeutic candidate against ischemic stroke. 42 Annual Meeting of the Brazilian Association of Biochemistry and Molecular Biology, Convention Center of the Rafain Palace Hotel, Foz de Iguazú, 18-21 May, 2013, Paraná, Brazil. Poster award.
  15. **Marín-Prida J**, Pavón-Fuentes N, Llopiz-Arzuaga A, Fernández-Massó JR, Cruz-Ramírez A, Polentarutti N, Riva F, Pentón-Arias E, Mantovani A, Pentón-Rol G. Phycocyanobilin positively modulates inflammatory genes in acute cerebral hypoperfusion in rats. 15th International Congress of Immunology (ICI 2013). Milan Congress Center, Milan, Italy, August 22-27, 2013. Poster.
  16. **Marín-Prida J**. Mitochondria as a therapeutic target for neuroprotection against ischemic stroke. VI MitoMeeting, September 3-6, 2013, Guapé, Minas Gerais, Brazil. Oral presentation.
  17. **Marín-Prida J**, Pavón-Fuentes N, Llopiz-Arzuaga A, Fernández-Massó JR, Delgado-Roche L, Cruz-Ramírez A, Valenzuela-Silva C, Nazábal-Gálvez M, Cintado-Benítez A, Pardo-Andreu GL, Polentarutti N, Riva F, Pentón-Arias E, Pentón-Rol G. Phycocyanobilin induces a protective gene expression profile and restores the redox balance in a model of acute cerebral hypoperfusion in Wistar rats. 20th Latin-American Congress of Pharmacology and Therapeutics (Latinfarma 2013). 21-25 de Octubre, 2013, Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba. Poster award.
  18. **Marín-Prida J**, Pavón-Fuentes N, Llopiz-Arzuaga A, Fernández-Massó JR, Delgado-Roche L, Santana SP, Cruz-Ramírez A, Valenzuela-Silva C, Nazábal-Gálvez M, Cintado-Benítez A, Pardo-Andreu GL, Polentarutti N, Riva F, Pentón-Arias E, Pentón-Rol G. A gene and biochemical study that may justify the application of Phycocyanobilin as a new neuroprotective drug for ischemic stroke. 9th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP 2013), 20-23 November 2013, Ribeirão Preto, Brazil. Oral presentation and poster.
-

## Patentes

WO2013/004203. Pentón-Rol G, Llopiz-Artuaga A, **Marín-Prida J**, Penton-Arias E, Jiménez ER, Mussachio A, Besada V, Pardo-Andreu G, González LJ, Pavón N, Guillén G, López-Saura P. Compounds and pharmaceutical combinations for the treatment of neurodegenerative and ischemic brain diseases. Fecha de prioridad: Julio 1, 2011.

Concedida en Cuba (número de concesión 23963 del 27 de septiembre del 2013) y solicitada en los siguientes países: Argentina, Australia, Brasil, Canadá, China, Europa, India, Japón, Corea del Sur, Sudáfrica, EEUU, Rusia y México.

## Premios

### Institucionales

1. Logros Científico-Técnicos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB)
    - A. 2011 (2). 1) “Mecanismos moleculares y efecto terapéutico de la C-Ficocianina y sus combinaciones en Esclerosis Múltiple e Isquemia Cerebral” (2do. autor); 2) “Demostración del efecto neuroprotector de la Ficocianobilina “in vitro” en células PC12 e “in vivo” en un modelo de isquemia focal en la retina” (autor principal).
    - B. 2012 (2). 1) “Nuevos mecanismos antioxidantes de la C-Ficocianina y demostración de su efecto neuroprotector frente a la isquemia cerebral focal” (autor principal); 2) “Generación de un modelo murino crónico progresivo de Encefalomiелitis Autoinmune Experimental para estudios de farmacología molecular en Esclerosis Múltiple” (co-autor).
  2. Premio Anual 2011 al Mejor Resultado Científico-Investigativo del Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana.
  3. Condición Educador Ejemplar 2011 otorgada por el Buró Sindical del Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana).
  4. 2012. Premio al Mejor Expediente del Sello “Forjadores del Futuro” de las Brigadas Técnicas Juveniles a nivel de la Universidad de La Habana.
  5. Mención en el evento de las Brigadas Técnicas Juveniles 2012 a nivel del Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana.
  6. Premios Anuales de Investigación del Rector de la Universidad de la Habana:
    - A. 2012 (3): 1) Resultado que Refleje el Avance Científico-Técnico de Mayor Trascendencia y Originalidad (Mención, autor principal); 2) Profesor o Investigador más Destacado en el Trabajo Científico (autor); 3) Colectivo de Investigación más Destacado (co-autor).
    - B. 2013. Colectivo de Investigación más Destacado (co-autor).
-

Nacionales

1. Premios Anuales de la Salud en instancias central y nacional:
  - A. 2012. Categoría de Investigación Básica (2do. autor).
  - B. 2013. Categoría de Artículo Científico. **Marín-Prida J**, Pentón-Rol G, Rodrigues FP, Alberici LC, Stringhetta K, Leopoldino AM, Naal Z, Polizello ACM, Llópez-Arzuaga A, Rosa MN, Liberato JL, Santos WF, Uyemura SA, Pentón-Arias E, Curti C, Pardo-Andreu GL. C-Phycocyanin protects SH-SY5Y cells from oxidative injury, rat retina from transient ischemia and rat brain mitochondria from Ca<sup>2+</sup>/phosphate-induced impairment. *Brain Research Bulletin* 2012; 89: 159-167. (autor principal)
2. Premio Nacional de la Academia de Ciencias de Cuba 2011 (2do. autor).
3. Reconocimiento del Consejo Ejecutivo Provincial de La Habana de la ANEC (Asociación Nacional de Economistas y Contadores de Cuba), con motivo del Día de la Ciencia Cubana por los aportes al desarrollo científico y económico, 15 de enero del 2013.

Internacionales

1. Premio al Mejor Cartel en el área de Farmacología y Fisiología en el 8vo. Congreso Internacional de Ciencias Farmacéuticas, CIFARP 2011, 21-24 agosto, Ribeirão Preto, Brasil (autor principal).
  2. Premio al Mejor Cartel, 42 Annual Meeting of the Brazilian Association of Biochemistry and Molecular Biology, Convention Center of the Rafain Palace Hotel, Foz de Iguazú, 18-21 May, 2013, Paraná, Brazil (autor principal).
  3. Premio al Mejor Cartel, 20th Latin-American Congress of Pharmacology and Therapeutics (Latinfarma 2013). 21-25 de Octubre, 2013, Palacio de las Convenciones, La Habana, Cuba (autor principal).
  4. Premio Latinoamericano de Farmacología “Dr. Plutarco Naranjo” in memoriam (auspiciado por la Sociedad Cubana de Farmacología y la Unión Internacional de Farmacología Básica y Clínica) (2do. autor).
-