

Efectos de *Achyrocline satureioides* ("marcela") sobre la expresión de citoquinas inflamatorias durante la isquemia focal permanente en ratas

Tesis de grado en Licenciatura en Ciencias Biológicas.
Opción Neurociencias

2013

Vicente Ruiz Viroga
Tutora: Felicia Rivera-Megret



AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo incondicional durante toda mi vida y carrera y fingir que me entendían cada vez que hablaba de temas de facultad y/o mi tesis.

A mi tutora Felicia Rivera, quién no ha hecho más que darme oportunidades y enseñanzas desde que entré al laboratorio y con quién pude y puedo hablar con confianza y plantearle mis molestias, inquietudes y opiniones en general. Por tus enseñanzas laborales y personales:

¡¡¡GRACIAS!!!

A Gustavo Mourglia y Sylvia Dematteis, quiénes me ayudaron con gran parte de este trabajo y me brindaron un pequeño espacio en la Cátedra de Inmunología del Instituto de Higiene.

Al grupo del laboratorio de Neuroquímica, quiénes cedieron parte de su espacio y tiempo para permitirme entrar en el laboratorio y con quienes he compartido buenos momentos tanto de trabajo como de distención. Ha sido (y sigue siendo) realmente enriquecedor trabajar con cada uno de los integrantes del Depto. de Neuroquímica. Especiales agradecimientos a la MSc. Florencia Arredondo por su colaboración en el análisis de los datos y por aportar opiniones sobre la lectura de ésta tesis.

Un agradecimiento particular para el Dr. Federico Dajas, quien permitió mi ingreso al Depto de Neuroquímica para que pudiera llevar a cabo este trabajo.

A mis amigos de liceo y de toda la vida, que si bien no me ayudaron directamente en nada referente al trabajo, me apoyaron en momentos de estrés y me recibieron nuevamente luego de desaparecer por meses por estudio o trabajo.

A mis amigos de facultad con quienes transité desde el comienzo hasta el final de mi carrera y quienes han hecho grandes aportes tanto personales como profesionales.

Ultimo pero no menos importante, a la “Barra de Neuro”, colegas y amigos con quienes comparto el mismo interés por la Neurociencia y con quienes puedo hasta el día de hoy compartir unos minutos de charla y descanso en los pasillos del IIBCE y en la Facultad.

Si me olvido de alguien, sepan que les estoy enormemente agradecido por ayudarme a llegar a esta etapa de mi vida y que los tengo y tendré presentes SIEMPRE.

INDICE

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1-INTRODUCCIÓN | 4 |
| 1.1-ENVEJECIMIENTO: PATOLOGÍAS ASOCIADAS | 4 |
| 1.2-EPIDEMIOLOGÍA DE LOS ACCIDENTES CEREBROVASCULARES | 4 |
| 1.3- ISQUEMIA CEREBRAL | 6 |
| 1.3.1-FISIOPATOLOGÍA | 7 |
| 1.3.2- INFLAMACIÓN ISQUÉMICA | 9 |
| 1.4-TERAPIAS NEUROPROTECTORAS | 12 |
| 1.5-POTENCIAL PROTECTOR DE Achyrocline satureioides | 13 |
| 1.6-FLAVONOIDES COMO AGENTES NEUROPROTECTORES | 13 |
| 1.7-CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS PARA EL PRESENTE ESTUDIO: estudio de la expresión génica por <i>Real-Time</i> PCR | 15 |
| 1.8-HIPOTESIS DE TRABAJO | 21 |
| 1.9-OBJETIVOS | 21 |
| 1.9.1-Objetivo general | 21 |
| 1.9.2-Objetivos específicos | 21 |
| 2-MATERIALES Y MÉTODOS | 21 |
| <u>2.1-MATERIAL BIOLÓGICO</u> | 21 |
| <u>2.2-PREPARACIÓN DE LA DECOCCIÓN DE <i>As</i></u> | 22 |
| <u>2.3-ANIMALES Y PROTOCOLO EXPERIMENTAL</u> | 22 |
| <u>2.4-OCLUSIÓN PERMANENTE DE LA ARTERIA CEREBRAL MEDIA</u> | 22 |
| <u>2.5-TEST DE COMPORTAMIENTO MOTOR</u> | 23 |
| <u>2.6-DISECCIÓN DE TEJIDOS</u> | 23 |
| <u>2.7-qRT-PCR PARA CITOQUINAS</u> | 24 |
| 2.7.1-Extracción de ARN | 24 |
| 2.7.2-Tratamiento con DNasa | 24 |
| 2.7.3-Retrotranscriptasa | 24 |
| 2.7.4-Primers | 25 |
| 2.7.5-PCR | 25 |
| 2.8-ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 25 |
| 3-RESULTADOS | 26 |
| 3.1- TEST COMPORAMENTAL | 26 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------|
| <u>3.2- EXPRESIÓN DE CITOQUINAS</u> | 26 |
| <i><u>3.2.1-IL-6</u></i> | 26 |
| <i><u>3.2.2-TNF-A</u></i> | 27 |
| <u>4-DISCUSIÓN</u> | 28 |
| <i><u>4.1-EXTRACTOS DE PLANTAS CON ACCIONES ANTIINFLAMATORIAS</u></i> | 28 |
| <i><u>4.2-FLAVONOIDES Y NEUROINFLAMACIÓN</u></i> | 30 |
| <i><u>4.3-CITOQUINAS Y NEUROPROTECCIÓN</u></i> | 31 |
| <u>5-CONCLUSIÓN GENERAL</u> | 33 |
| <u>6-PERSPECTIVAS</u> | 33 |
| <u>7-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> | 34 |

1-INTRODUCCIÓN

1.1-ENVEJECIMIENTO: PATOLOGÍAS ASOCIADAS

El envejecimiento ha sido definido por Del Valle (2011) como el deterioro progresivo de los mecanismos biológicos encargados de mantener la homeostasis ¹. Junto con este decrecimiento de las funciones fisiológicas se presenta una mayor vulnerabilidad a distintas enfermedades, un aumento en la dificultad para responder a estímulos del ambiente y en la mortalidad ².

El metabolismo aeróbico que actúa como generador de energía para las células es, al mismo tiempo, el factor responsable del deterioro del organismo. Harman (1956) fue el primero en proponer la acumulación de radicales libres como la clave del envejecimiento celular y del organismo^{3,4}. Se ha postulado que la fuente primordial de dichos radicales son las mitocondrias ^{1,3,5}. Durante la generación de ATP mediante la reducción de O₂ a H₂O, algunos electrones se escapan de la cadena respiratoria y reducen átomos de O₂ dando lugar a especies reactivas de oxígeno (ROS: del inglés *Reactive Oxygen Species*) como el anión superóxido y posteriormente peróxido de hidrógeno (O₂⁻ y H₂O₂) respectivamente^{1,6}. La acumulación de ROS en la célula es capaz de causar daños (muchas veces irreversibles) a elementos de la célula como la membrana plasmática y de otros organelos como proteínas e incluso el ADN, generando mutaciones que podrían desencadenar patologías como el cáncer ^{2,3}. Este ambiente celular altamente oxidativo no solo es responsable del envejecimiento, sino también de deficiencias fisiológicas que desembocan en la aparición de patologías, las cuales presentan una alta prevalencia e incidencia en países industrializados ⁷. Entre estas enfermedades, las más recurrentes son el Parkinson, la demencia senil tipo Alzheimer y las enfermedades cardio y cerebro-vasculares como la isquemia cerebral ⁸.

1.2-EPIDEMIOLOGÍA DE LOS ACCIDENTES CEREBROVASCULARES

De acuerdo a un reporte realizado por American Heart Association (AHA) en el 2012, en Estados Unidos los Accidentes Cerebro-vasculares (ACV) mostraron una prevalencia anual de 7.000.000 personas mayores a los 20 años, siendo mayor el porcentaje de individuos de sexo masculino que femenino ⁹. En comparación con los últimos años, entre el 2010 y el 2011 hubo un aumento de 600.000 individuos, manteniéndose igual entre 2011 y 2012. Los ACV presentan una incidencia de 795.000 individuos por año. De estos 795.000, el 77% sufre un infarto por primera vez y el 23% restante, sufren ataques recurrentes. Estas cifras se han mantenido invariantes en los últimos tres años^{9,10}.

A nivel mundial se estima que cada 4 minutos muere una persona a causa de los ACV y que anualmente 15 millones de personas sufren por estas patologías. De estas 15 millones, 5 millones mueren y otros 5 millones permanecen discapacitados por el resto de sus vidas ¹¹. De todos los casos de ACV mundiales, el 87% corresponde a los ACV isquémicos mientras que el 13% restante abarca todos los casos de ACV del tipo hemorrágico ⁹. Entre los distintos tipos de ACV, el predominante es el ACV trombótico (aproximadamente el 60% de los casos en hombres y mujeres) ⁹ (Figura 1). De los afectados, el 30% requiere asistencia para caminar, 26% sufrieron incapacidad para realizar tareas como cocinar, alimentarse o pagar las cuentas; el 19% sufría dificultades para hablar o entender cuando se les hablaba. El 50% de los pacientes presenta hemiparesis (una forma de parálisis menos severa que la hemiplegia). Debido a las secuelas presentes luego de un ACV isquémico, el costo anual requerido para el tratamiento de esta patología y el cuidado de los pacientes es de entre 20 a 70 billones de dólares americanos.

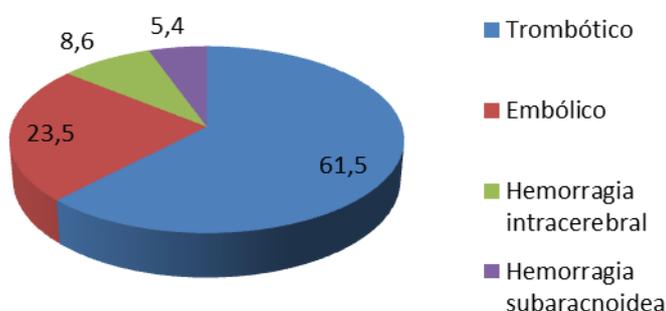


Fig. 1. Se representa la incidencia de los diferentes tipos de ACV a nivel mundial.

Según datos aportados por el Departamento de Epidemiología del Ministerio de Salud Pública (MSP), en nuestro país la incidencia anual de ACV en pacientes mayores a 60 años es de alrededor de 150 a 180 por 100.000 habitantes por año. Se estima que ocurren 5000 casos de mayores de 60 años afectados por un ACV. De estos 5000 casos, el 25% muere y el 75% restante presentan discapacidades y secuelas. Para España y Uruguay se cree que para el 2015, las cifras actuales se cuadruplicarán debido al elevado número de personas envejecidas.

Entre los factores de riesgo más frecuentes, se encuentran: la edad, el género, factores genéticos, vida sedentaria, obesidad y sobrepeso, colesterol alto en sangre, hipertensión, tabaquismo, alcoholismo y la diabetes mellitus ⁹.

La elevada frecuencia de hábitos poco saludables presentes en la población, son los responsables de estos valores epidemiológicos en crecimiento. En este contexto un factor agravante es la carencia de terapias eficientes para el tratamiento del ACV. En casos seleccionados existen fármacos de limitada eficacia como es el tPA (*tissue Plasminogen Activator*) ¹². Esto impulsa a que varios grupos de investigadores dediquen su trabajo a la búsqueda de compuestos naturales o sintéticos que sean capaces de modular los mecanismos moleculares detrás de la progresión de la enfermedad y que logren reducir el daño generado

en la isquemia. De esta forma sería posible aumentar el rango de posibles terapias alternativas y eficientes para el tratamiento de los ACV.

1.3- ISQUEMIA CEREBRAL

La isquemia cerebral consiste en la reducción permanente o transitoria del flujo sanguíneo restringida al tejido adyacente a una arteria cerebral por oclusión de ésta (con mayor frecuencia en la clínica, la arteria cerebral media)^{13,14}. La reducción repentina del flujo sanguíneo desencadena en el tejido condiciones que llevan a la aparición de un desequilibrio tanto iónico como energético, dentro y fuera de las células residentes de la región cerebral afectada¹³. Los efectos de estos desórdenes fisiológicos se ven reflejados en eventos moleculares como: la liberación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato (da lugar a una entrada masiva de calcio que genera un proceso de excitotoxicidad); la activación de vías apoptóticas, estrés oxidativo y procesos inflamatorios^{15,16}.

En esta patología es posible observar dos regiones afectadas por el infarto, de acuerdo al suministro de sangre del tejido^{14,17}. El área donde el flujo sanguíneo es nulo se conoce como el núcleo isquémico o *core*. En esta región, el daño causado por el ACV es irreversible. La región que se encuentra entre el núcleo isquémico y el tejido sano, se conoce con el nombre de *penumbra*^{17,18}. A diferencia del núcleo, esta región es afectada por la isquemia pero al recibir sangre y metabolitos de los vasos sanguíneos del tejido sano adyacente, se mantiene un suministro de sangre suficiente para que el metabolismo energético persista^{18,19}. Si el tejido es re-perfundido rápidamente, las injurias causadas pueden revertirse^{17,20}. Por este motivo, las terapias destinadas al tratamiento de la isquemia cerebral concentran su acción exclusivamente en la penumbra isquémica^{14,19}. Sin embargo, si el flujo sanguíneo que alimenta la penumbra disminuye o los requerimientos energéticos del tejido aumentan, existe el riesgo de que el núcleo isquémico se expanda y aumente el volumen del infarto^{13,14}.

Los modelos animales de isquemia cerebral han sido ampliamente utilizados durante mucho tiempo gracias a la posibilidad que le brinda al investigador para entender la progresión de la enfermedad, al igual que los mecanismos con los que cuenta el tejido dañado para recuperarse luego de ocurrido un ACV. El empleo de modelos de isquemia cerebral en animales de experimentación también ha demostrado ser eficientes para reproducir la patología en humanos.

Se han utilizado cuatro modelos de isquemia cerebral: global completa, global incompleta, focal y multifocal²¹. Los modelos de isquemia focal, han sido descritos como los más eficientes para reproducir las isquemias humanas y en particular el modelo de oclusión permanente o transitoria de la Arteria Cerebral Media (oACM) ya que esta arteria es la que comúnmente se ocluye en las patologías humanas²¹.

1.3.1-FISIOPATOLOGÍA

Los ACV de tipo isquémico son frecuentemente subdivididos en 6 procesos que colaboran con el surgimiento de los signos patológicos y con la muerte del tejido infartado. Cada uno de estos procesos se desencadena de forma secuencial a partir de la reducción parcial o total del flujo sanguíneo que irriga el tejido ¹⁷. La falta de irrigación arterial al tejido cerebral implica una supresión del aporte de O₂ y glucosa, fuentes energéticas exclusivas en el cerebro. Debido a la fuerte dependencia y al alto consumo de O₂ por parte del cerebro, esto conlleva a un fallo energético y metabólico del tejido con consecuencias que se extienden en numerosas afecciones en las funciones basales ^{22,23}. La fuerte disminución de la concentración de ATP en el tejido afecta directamente la homeostasis iónica del tejido ^{17,23,24}. Las bombas Na⁺/K⁺, por ejemplo, requieren del ATP para restablecer el gradiente electroquímico a través de la membrana plasmática perjudicando a su vez el proceso de despolarización de la membrana de las neuronas.

Debido a que la fosforilación oxidativa es un pilar primordial para el metabolismo de glucosa y la producción de más energía, la falta de ATP impide la ejecución de dichos procesos. La falta de oxígeno resulta en glucólisis anaeróbica y acumulación de lactato, el cual no solo es un marcador de metabolismo anaeróbico sino que también podría actuar como un agente nocivo para la célula causando la expansión del infarto ²². La falta de oxígeno y producción de energía, además de interferir con el metabolismo basal del tejido nervioso afecta funciones como la neurotransmisión, las defensas antioxidantes, la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE).

1.3.1.1- Excitotoxicidad

Este evento comienza en los primeros minutos desde que ocurrió la oclusión arterial. El déficit energético local induce despolarizaciones de las neuronas y la glía resultando en la activación de canales Ca²⁺ voltaje-dependientes ¹⁴, lo que provoca la liberación descontrolada de glutamato ¹⁷.

Los altos niveles extracelulares del glutamato llevan a la estimulación sostenida de receptores AMPA/kainato y NMDA, permitiendo la entrada de Ca²⁺ a la célula ²⁵. Lo que desencadena la activación de enzimas proteolíticas y otros mecanismos de degradación del ADN o peroxidación de la membrana de la neurona como son la Oxido Nitrico Sintasa (NOS) o la Fosfolipasa A (PLA2) ^{14,23}.

Por otra parte, la entrada de iones y agua a la célula provoca un aumento en la osmolaridad y tonicidad de éstas, llevando a la formación de edemas citotóxicos causando un aumento de la presión intracraneana y posiblemente afectando zonas lejanas al infarto ^{13,23}. Además, el desequilibrio osmótico, tiene como consecuencia la muerte por necrosis, la cual estimulará indirectamente una respuesta inflamatoria en fases posteriores de la patología ²⁰.

1.3.1.2- Estrés oxidativo y nitrosativo

La excitotoxicidad por glutamato es uno de los factores contribuyentes al aumento del estrés oxidativo (EO). La activación de la nNOS (Óxido Nítrico Sintasa neuronal) y la PLA2 (entre otras), produce un aumento de la producción de radicales libres (RL), los cuales representan uno de los principales factores de daño tisular en numerosas enfermedades neurodegenerativas^{7,8}. Debido a la alta tasa metabólica del cerebro, éste es particularmente susceptible al EO. Este ocurre cuando la producción de RL y especies reactivas O₂ y de N sobrepasan las defensas antioxidantes endógenas, condición denominada estrés oxidativo^{1,25}. La falta de protección suficiente frente al daño oxidativo permite a los ROS dañar estructuras como la membrana lipídica y el ADN, generando mutaciones, a veces irreversibles². La producción de NO y O₂⁻ permite la reacción entre ambos radicales, dando origen al peroxinitrito (ONOO⁻) el cual es altamente reactivo y capaz de reaccionar violentamente con componentes celulares^{14,23}. El estrés oxidativo genera un círculo vicioso en donde la cadena respiratoria de la mitocondria se ve inhibida por la alta producción de radicales, lo cual colabora con la producción adicional de radicales libres de oxígeno (RLO) y de nitrógeno (RLN), aumentando cada vez más el daño oxidativo a la neurona¹⁴.

1.3.1.3- Apoptosis

Impulsada por el EO, la excitotoxicidad, la inflamación y el daño sobre el ADN y las mitocondrias, la apoptosis, una forma de muerte celular programada es el mecanismo de muerte celular predominante en las áreas que abarcan la penumbra del infarto^{17,23}. El resultado final de la apoptosis es la fragmentación celular que resulta en la formación de cuerpos apoptóticos caracterizados por la aglutinación de la cromatina y el corte del ADN entre los nucleosomas, conocido como "DNA Laddering"²⁶.

1.3.1.4-Necrosis

A diferencia de la apoptosis, la necrosis es un mecanismo de muerte celular sin autorregulación por parte de la célula, no es programado, es carente de eventos de señalización celular²³ y no requiere el consumo de energía. Se cree que la célula utiliza un mecanismo dependiente de TNF (*Tumor Necrosis Factor*) para determinar si morirá por necrosis o apoptosis²⁷. La severidad y el tiempo de duración de la isquemia determinará si la célula tendrá una muerte rápida necrótica por lisis o un deterioro lento y controlado terminando en una muerte programada¹⁶. La muerte por lisis es uno de los principales desencadenadores de la respuesta inflamatoria por parte de la glía, al detectar componentes celulares y/u otra señal de daño tisular. Esto tiene como consecuencia la formación de un edema por disrupción de la BHE^{23,25}.

1.3.2- INFLAMACIÓN ISQUÉMICA

La excitotoxicidad y el estrés oxidativo causado en la fase aguda de la isquemia cerebral generan daño a nivel tisular, provocando un estado de hiperpolarización y eventualmente la muerte de las neuronas^{13,28}. Uno de los procesos claves en el deterioro neuronal previo a la muerte, es el rompimiento de la membrana celular, lo que provoca liberación del contenido citosólico¹⁷.

A partir del tejido isquémico se expresan y liberan una familia de péptidos conocidos como citoquinas²⁹. Estos péptidos de acción pleiotrópica (es decir que ejercen diversos efectos dependiendo del tejido blanco) están encargados de regular la activación, proliferación y diferenciación celular¹⁹. En condiciones fisiológicas su expresión en el cerebro es difícilmente detectable y sus funciones en el Sistema Nervioso Central (SNC) son prácticamente nulas, pero una vez que ocurre el ACV su expresión aumenta de forma significativa al igual que la de sus receptores correspondientes^{20,30}. La interacción entre las citoquinas producidas y las células residentes del cerebro provocan la activación del tejido glial y cambios en el endotelio, lo que da lugar a una mayor producción de estos péptidos³¹. En el cerebro son producidas principalmente por la microglía y los astrocitos una vez que estos responden a las señales de estrés^{32,33}.

La producción incrementada de las citoquinas implica la alteración de la permeabilidad de la BHE, un cambio en el perfil fenotípico de la glía y un importante ingreso de células del sistema inmune desde la sangre al tejido dañado^{20,33}. La entrada de los leucocitos hacia el tejido es posible gracias a la expresión de moléculas de adhesión (tales como *Intercellular Adhesion Molecule-1*, ICAM-1) por parte del endotelio^{15,20}. Junto con los neutrófilos y monocitos, grandes volúmenes de plasma ingresan al tejido aumentando la presión intracraneana y posiblemente perjudicando regiones del cerebro no afectadas por el daño isquémico^{17,28}. Las células gliales son las que inicialmente migran hacia la zona dañada provocando que a través del endotelio ocurra la filtración de leucocitos y plasma al tejido cerebral²⁸.

1.3.2.1-Citoquinas proinflamatorias

Este tipo particular de citoquinas es responsable de estimular y agravar la respuesta inflamatoria. Existen numerosos ejemplos de citoquinas proinflamatorias, pero las más estudiadas son la interleucina 6 (IL-6) y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α ; del inglés *Tumor Necrosis Factor-alpha*)¹⁹.

- **IL-6:** Esta citoquina puede ser detectada en el líquido cefalorraquídeo (LCR) en las primeras horas luego de la oclusión permanente de la Arteria Cerebral Media (opACM) y permanecer en altos niveles durante 14 días²⁰. Es un potente pirógeno inflamatorio producido por la microglía activada, astrocitos, células endoteliales y del sistema inmune y neuronas^{32,34}.

La producción de esta citoquina puede ser estimulada por la interleucina 1 β (IL-1 β), TNF- α y prostaglandinas, entre otros mediadores³². En condiciones normales, su concentración se mantiene baja pero esta se incrementa rápidamente frente a desequilibrios fisiológicos. Por esto, la IL-6 ha sido descrita como un adecuado marcador de daño isquémico cerebral tanto en el volumen como en la severidad del infarto^{34,35}. Algunos autores describen una correlación entre los niveles de IL-6 cuantificados en el tejido cerebral en modelos experimentales y en el LCR con relación al volumen y severidad del infarto, aunque algunos autores niegan la relevancia de dicha relación^{30,33}.

En las neuropatologías, la IL-6 participa estimulando la apoptosis neuronal y la filtración de leucocitos al tejido isquémico permitiendo la formación de un edema cerebral^{19,36}. También se han reportado efectos neurotóxicos como neuroprotectoras para esta citoquina^{19,37}. Por ejemplo, se sabe que la IL-6 es uno de los principales estimuladores de la producción de IL-1ra actuando como posible regulador de la respuesta inflamatoria^{20,28}. De hecho, en ratones *knock-out* para IL-6 no se ha observado una recuperación considerable luego de la isquemia^{19,37}.

- **TNF- α :** La TNF- α ha sido blanco de controversia y estudio por varios grupos de investigadores debido a su doble función en los ACV y la neuroinflamación en general¹⁹. Esta citoquina altamente pleiotrópica (un solo gen es responsable de efectos fenotípicos o caracteres distintos y que no están relacionados) tiene numerosos papeles en homeostasis fisiológica, inmunidad, así como en numerosas enfermedades neurodegenerativas^{38,39}.

Esta citoquina es producida en el cerebro por las neuronas, pero sus principales fuentes son la microglía y los astrocitos^{40,41}. Mediante técnicas de inmunohistoquímica y citometría de flujo se identificaron numerosos grupos de macrófagos y microglía responsables de la producción de TNF- α en todo el cerebro luego de la opACM^{38,42}.

Una de las primeras evidencias que apuntan a esta citoquina como una responsable de la inflamación isquémica es la existente correlación entre su expresión y el déficit neurológico causado por el ACV⁴³. Estudios realizados utilizando la técnica de *real-time* PCR en ratas han demostrado un aumento pronunciado en el hemisferio ipsilateral al infarto 3 horas luego de la isquemia y mantenido hasta 24 horas después de ésta⁴³. Algunos autores afirman que la expresión y liberación de dicha citoquina se debe a su liberación de tipo bifásica a las 3 y 24 horas¹⁹. Este aumento se vio acompañado por cambios en la expresión de IL-6, IL-1 β , moléculas de adhesión al endotelio, infiltración de células inflamatorias y expresión del factor de transcripción NF- κ B (del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*.)

También se ha evidenciado que esta citoquina es capaz de inducir la activación y proliferación de la microglía al igual que su actividad fagocítica⁴². Esta acción autocrina se debe a que la misma microglía que produce TNF- α presenta receptores para ella⁴². Sin embargo, se ha hecho especial énfasis en el estudio de dos receptores específicos debido a la capacidad del TNF de unirse a ellos: el TNFR1 y el TNFR2 (p55 y p75 respectivamente)^{27,44}. A pesar de presentar dominios de unión para el mismo ligando (el

TNF- α), estos receptores han sido asociados con distintos efectos celulares tras su activación. Esto se debe a que sus dominios intracelulares casi no presentan homologías entre los dos receptores, lo que permite la unión de distintas moléculas de señalización intracelular, y por ende, el desencadenamiento de diferentes procesos a nivel celular ^{45,46}.

El TNFR1 (o p55) es generalmente relacionado con la modulación de vías apoptóticas por la presencia de varios sitios de unión para el dominio de muerte asociado a TNFR (TRADD, del inglés *TNFR-associated death Domain*) el cual no se encuentra presente en TNFR2. Por este motivo, se le llama a la cola citoplasmática del p55, dominio de muerte (DD, del inglés *Death Domain*)^{27,47}. Considerando estos descubrimientos, se ha asociado a la activación de p55 como un activador de las vías apoptóticas y, por lo tanto, un contribuyente de la neurotoxicidad presente en el caso de la isquemia cerebral y en las patologías neurodegenerativas^{27,48}. La unión de TNF- α a p55 estimula la activación del factor de transcripción NF- κ B, el cual dependiendo del contexto tisular, puede desencadenar procesos apoptóticos o de supervivencia celular^{49,50}. Botchinka y cols. (1997) lograron evidenciar en estudios *in vitro* utilizando técnicas de inmunohistoquímica y marcadores apoptóticos, una correlación entre células positivas para TUNEL y expresión de p55. Por su parte, el receptor TNFR-2 o p75 ha sido vinculado a actividades de sobrevivencia y proliferación celular, generalmente inhibiendo las vías apoptóticas por activación del factor NF- κ B^{27,36}. Es gracias a esta característica en común con p55 que las consecuencias celulares de la unión de TNF- α a sus receptores continúan en discusión. Se ha demostrado que dicho receptor expresado tanto en células endoteliales y microglía, actúa como promotor de la proliferación celular y como control de la respuesta inmune frente al daño tisular. Estudios con animales *knock-out* para p75 o su neutralización con anticuerpos anti-p75 presentaron casos en los que el tamaño del infarto se presentó en un tamaño mayor con respecto a aquellos animales que expresaban dicho receptor ^{43,51}.

Si bien ambos receptores, tras su activación, estimulan la actividad citotóxica o neuroprotectora del factor NF- κ B, no es posible afirmar con certeza qué factores en particular condicionan al TNF- α a ejercer efectos favorables o perjudiciales para el tejido isquémico ³³. Por el momento solo es posible considerar una combinación de las condiciones bajo las cuales se encuentra el tejido luego del ACV: expresión celular específica, tiempo transcurrido desde ocurrido el ACV, concentración del ligando e interacciones posibles entre las dos vías de señalización ³⁶. Este ha sido el motivo por el que terapias que propusieron a agentes proinflamatorios como blanco para disminuir el daño causado por la inflamación han obtenido resultados negativos respecto a la recuperación del animal luego de la oACM¹³.

Las funciones neuroprotectoras del TNF- α se evidenciaron en estudios realizados con animales *knock-out* para TNF- α y sus receptores donde se evidenció un aumento del EO en el cerebro isquémico y una supresión en la activación de la microglía ^{27,52}. De dichos resultados podría inferirse el rol neuroprotector de dicha citoquina y su participación en mecanismos de reparación del tejido y eliminación de desechos celulares, procesos de los cuales depende la mejoría del animal luego del ACV.

Los estudios realizados en cuanto al TNF- α y a su doble rol en la isquemia cerebral continúan dificultando el éxito de las terapias antiinflamatorias para aminorar los daños causados por un ACV, lo que impulsa a continuar en la búsqueda de terapias alternativas o capaces de modular los mecanismos celulares que producen el daño al tejido nervioso ¹³.

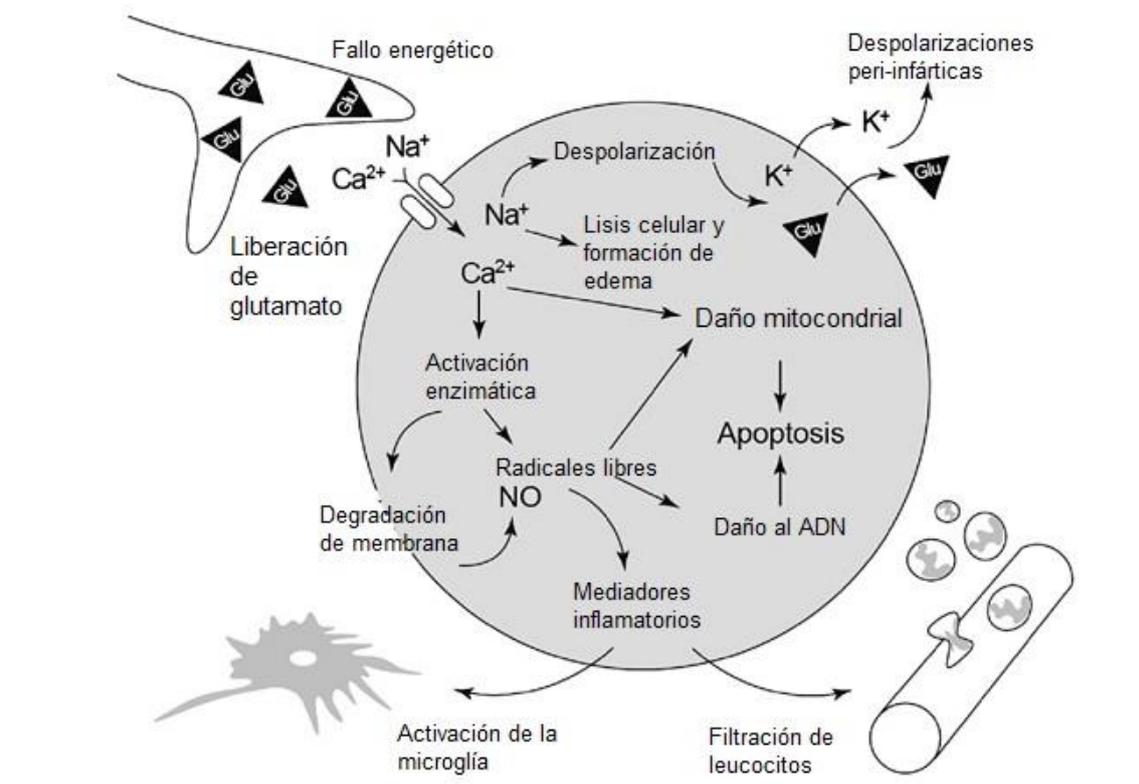


Fig. 2. Esquema simplificado de los mecanismos fisiopatológicos en la isquemia focal del cerebro. El fallo energético provoca la despolarización de las neuronas. La activación de receptores de glutamato (Glu) aumenta drásticamente la concentración intracelular de Ca^{2+} , Na^+ mientras que el K^+ es liberado al espacio extracelular. La difusión de Glu y K^+ por el espacio extracelular propagan una serie de ondas despolarizantes (despolarizaciones peri-infárticas). El agua es transportada al interior celular, causando un aumento osmótico y la formación de un edema. El Ca^{2+} actúa como segundo mensajero activando proteasas, lipasas y endonucleasas. Radicales libres y óxido nítrico (NO) son generados causando daños en la mitocondria y en el ADN, desencadenando la activación de vías apoptóticas. Mediadores inflamatorios son producidos y liberados para activar la microglía y leucocitos provenientes del torrente sanguíneo. Modificado de Kunz y cols. 2010.

1.4-TERAPIAS NEUROPROTECTORAS

Las terapias neuroprotectoras consisten en tratamientos capaces de interrumpir la cascada patológica que da lugar a la muerte del tejido isquémico y así, el avance de la isquemia cerebral. En el caso particular de esta patología, existen moléculas descritas como agentes capaces de reducir el daño isquémico específicamente en la penumbra del infarto, donde el

tejido tiene la posibilidad de ser rescatado del fallo energético ^{25,53}. Al estar identificados numerosos factores responsables del daño isquémico en el tejido, se han probado una importante cantidad de neuroprotectores, entre los que se incluyen: antioxidantes y *scavengers* de radicales libres, bloqueadores de canales de Ca^{2+} , antagonistas de receptores AMPA y NMDA, inhibidores de la NOS, agentes antiinflamatorios y antiapoptóticos, y bloqueadores de canales de Na^+ y K^+ ^{25,53}. A pesar de los prometedores resultados obtenidos en modelos animales de isquemia focal y global, los estudios clínicos para las terapias neuroprotectoras no fueron tan exitosos en el tratamiento de la patología ⁵⁴. Se cree que esto se debe a diferencias entre los animales utilizados y los pacientes afectados por un infarto isquémico (por ejemplo: metabolismo energético, variaciones en la dieta, posibles tratamientos anteriores con fármacos, etc). Otro posible motivo podría deberse a las características farmacológicas de los neuroprotectores como la biodisponibilidad, dosis insuficiente y/o corta duración del tratamiento ⁵⁴.

1.5-POTENCIAL PROTECTOR DE *Achyrocline satureioides*

En países latinoamericanos como Argentina, Uruguay, Paraguay y Brasil, numerosas plantas con una importante capacidad antioxidante son consumidas ampliamente en las poblaciones de los países previamente mencionados. Dentro de la enorme cantidad de plantas consumidas se destaca *Achyrocline satureioides* (As) más comúnmente conocida como “marcela” ^{55,56}. Sus decocciones e infusiones han demostrado ser muy eficientes para aliviar trastornos gastrointestinales debido a sus propiedades antiespasmódicas y vasodilatadoras, además de su efecto sedante ⁵⁷⁻⁵⁹. Numerosos estudios han revelado la importante capacidad antioxidante y de “*scavenging*” de radicales libres ^{59,60}. Otros efectos terapéuticos atribuibles a As fueron observados, como pueden ser las propiedades citoprotectoras frente al daño oxidativo y fotoprotectoras ⁶¹⁻⁶³. También ha sido ampliamente descritas sus propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras ^{64,65}.

Se ha demostrado también la ausencia de efectos tóxicos de un extracto acuoso de As en una dosis máxima de aproximadamente 5 g/Kg ⁶⁶. Se cree que los efectos beneficiosos de las infusiones y extractos de As se deben a su alto contenido en flavonoides entre los que se encuentran la quercetina, luteolina y la 3-o-metilquercetina como los predominantes en la planta ^{56,62}. Si bien no se encuentra descrita en la bibliografía la utilización de As en forma de decocción para el tratamiento de neuropatologías, ésta promete ser efectiva para reducir el daño isquémico considerando al estrés oxidativo y a la inflamación como los principales mecanismos de daño al tejido nervioso.

1.6-FLAVONOIDES COMO AGENTES NEUROPROTECTORES

Como se mencionó anteriormente, As ha sido una planta estudiada debido a sus notorias propiedades antioxidantes e antiinflamatorias. Estas propiedades se le han atribuido a su alto

contenido en flavonoides^{61,63}. Los flavonoides, pertenecientes a la familia de polifenoles que dan olor, color y sabor a las plantas, son productos secundarios ubicuos de las plantas^{67,68}. El interés por estos componentes surgió de la conocida “paradoja francesa”, observada en estudios epidemiológicos del Mediterráneo, donde se correlacionaron dietas ricas en flavonoides con una alta longevidad y una baja incidencia de enfermedades cardiovasculares a pesar del alto consumo de grasas en estas poblaciones^{69,70}.

Muchas de las propiedades descritas para los flavonoides han sido atribuidas a su estructura química. La estructura general de los flavonoides consiste en dos anillos bencénicos a ambos lados de un anillo de tres átomos de carbono (fig. 3)^{71,72}. El alto número de combinaciones de sustituciones posibles incluyen la metilación, hidroxilación, hidroxilación y acetilación entre otras. Es el número y la ubicación de los grupos hidroxilo la que determina el poder antioxidante de los flavonoides.

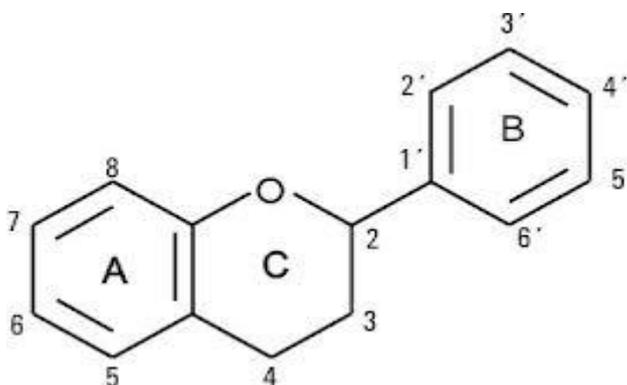


Figura 3: Estructura química de los flavonoides

Existen varias clasificaciones para los flavonoides, pero la más utilizada separa a los flavonoides en distintas subclases dependiendo del estado de oxidación del anillo heterocíclico (anillo C) y de la posición del anillo B. Cada familia abarca una gran variedad de compuestos que difieren en el número, tipo y posición de los grupos funcionales que contienen. Los posibles grupos funcionales pueden ser grupos metilo, azúcares, ácidos orgánicos, etc. Las subclases más estudiadas y mencionadas son: los flavonoles (e.g. la quercetina), las flavonas (luteolina y apigenina), las flavanonas (naringenina y hesperetina), las isoflavonas (genisteína), las antocianidinas (cianidina) y los flavanoles (catequinas)⁷³.

Se ha demostrado que, debido a su estructura, los flavonoides ejercen efectos en cascadas de señalización celular, modificando la localización de ciertos factores de transcripción y generando así respuestas globales en la célula independientemente de su capacidad antioxidante. El efecto de los flavonoides dependerá de la medida en la que se asocian con la célula, ya sea por interacciones con la membrana plasmática o por entrada al citosol⁷⁴. Es sabido también que un típico blanco intracelular de los flavonoides son las MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*)^{75,76}. Esto posiblemente se deba a la capacidad de los flavonoides de interactuar con sitios de unión de ATP a las quinasas^{74,77}. A través de esta interacción es que

los flavonoides son capaces de controlar, entre otros procesos celulares, los mecanismos inflamatorios modulando la producción de citoquinas proinflamatorias. Así la quercetina, indirectamente, ejerce también efectos antioxidantes al inhibir la producción de radicales libres^{72,75}. Se ha visto también que la quercetina es capaz de inhibir la apoptosis neuronal posiblemente actuando sobre la microglía⁷⁰.

Además de su ya conocida capacidad antioxidante y *scavenging* de radicales libres, se sabe que los flavonoides son fuertes inmunomoduladores⁶⁷. Por ejemplo, se ha descrito que la quercetina además de inhibir la producción de citoquinas es capaz de inhibir la expresión de interferón γ (IFN- γ) y la síntesis de leucotrienos y prostaglandinas⁶⁷. La luteolina, uno de los flavonoides presentes en As ha sido reportada como un posible inhibidor de la expresión de COX-2 y la IL-6. En un modelo de isquemia cerebral focal en ratas, la luteolina fue capaz de reducir el volumen del infarto, la formación de un edema cerebral y la activación de vías responsables del inicio de la respuesta proinflamatoria en las primeras etapas de la isquemia.

La participación de la quercetina y otros flavonoides contenidos en As ha permitido describir a los flavonoides como moléculas capaces de influir sobre distintas funciones celulares y mecanismos patológicos, ya sea por su capacidad antioxidante o la influencia de estos en vías de señalización celulares que determinan el futuro de la célula. Esta interacción de los flavonoides con las cascadas intracelulares puede regular la producción de factores proinflamatorios y/o estimular las defensas antioxidantes de la célula para combatir con el estrés oxidativo presente en la isquemia cerebral^{78,79}. Gracias a estas capacidades, los flavonoides han sido descritos en la literatura científica como recurrentes agentes neuroprotectores frente a varias enfermedades neurodegenerativas, donde el estrés oxidativo y la inflamación son procesos que agravan el daño y colaboran con la degeneración progresiva del tejido⁸⁰⁻⁸². Ya se ha demostrado la capacidad de estos de proteger el tejido, favorecer su reparación y así permitir la recuperación rápida de funciones como la memoria, aprendizaje, y funciones motoras^{83,84}.

1.7-CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS PARA EL PRESENTE ESTUDIO: estudio de la expresión génica por Real-Time PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (en inglés: *Polymerase Chain Reaction*; PCR) ha sido una de las herramientas más utilizadas en Biología Molecular para la detección de mutaciones, amplificación de secuencias de ADN o ARN, y genomas. Desde su invención en 1983⁸⁵, dicha técnica ha pasado por modificaciones y/o perfeccionamientos que han permitidos hacerla útil no solo para la detección de secuencias específicas dentro de un genoma, sino también para su cuantificación. Esta última capacidad fue innovada por la PCR *real-time*, desarrollada por Higuchi en 1992, en la cual la secuencia amplificada es detectada debido a cambios en la fluorescencia proporcionales a la cantidad del producto generado^{85,86}. En el caso particular de los modelos de isquemia cerebral en ratas, el estudio de los cambios en el perfil de expresión en el tejido isquémico ha probado ser una útil herramienta para comprender los procesos fisiológicos y patológicos que impulsan dicha condición⁸⁷.

1.7.1-Bases de la PCR real time

1.7.1.1- Amplificación por PCR:

Para realizar la PCR es necesario un ADN molde, los 4 desoxirribonucleotidos trifosfato (dNTP), los dos cebadores que flanquearán la secuencia a amplificar, una polimerasa termoestable (Taq polimerasa) y magnesio (cofactor de la polimerasa). La reacción consiste en un ciclo de temperaturas para: la desnaturalización de la doble hebra de ADN, la hibridación de los primers al molde de ADN (paso comúnmente conocido como *annealing*) y para la actividad óptima de la polimerasa (fig. 4)⁸⁵.

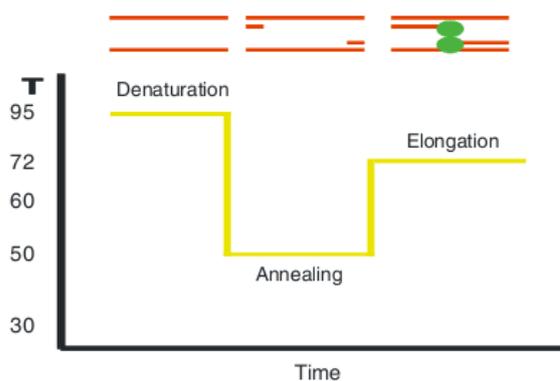


Fig. 4. Ciclado de temperaturas de la PCR: la temperatura se incrementa a 95°C para la desnaturalización del ADN. La temperatura disminuye para permitir el *annealing* de los primers. La temperatura es llevada a 72°C para permitir la elongación de los primers por acción de la ADN polimerasa.

La temperatura necesaria para la desnaturalización completa de la hebra de ADN (temperatura de *melting*) depende de su longitud y en gran medida de su secuencia, mientras que la temperatura para el *annealing* depende de los *primers* pero por lo general se encuentra pocos grados por debajo de la temperatura de *melting*, suficiente para la formación de un complejo estable entre el *primer* y la plantilla de ADN. Existen varios software disponibles para el diseño y estimación de la temperatura de *annealing* de éstos.

1.7.1.2-Monitoreo en tiempo real

Los reporteros fluorescentes son exclusivamente utilizados en las PCR en tiempo real como métodos de detección. La fluorescencia de los colorantes aumenta con la cantidad de ADN doble hebra generado. Debido a la proporción de unión colorante:ADN, el aumento de la fluorescencia no es proporcional a la cantidad de ADN generado en la reacción. Dado que es posible la formación de dímeros entre los cebadores, los cuales pueden interferir con la formación de productos de reacción, es importante controlar la formación de éstos. Para esto existen las curvas de *melting* que nos permiten confirmar la presencia de dímeros y algún potencial contaminante⁸⁸. Debido a que los dímeros presentan una menor longitud que el ADN de interés, estos presentan una temperatura de *melting* (T_m) menor que la del producto deseado. Por esto, la presencia de dímeros en la muestra es fácilmente revelable⁸⁵ (fig. 5).

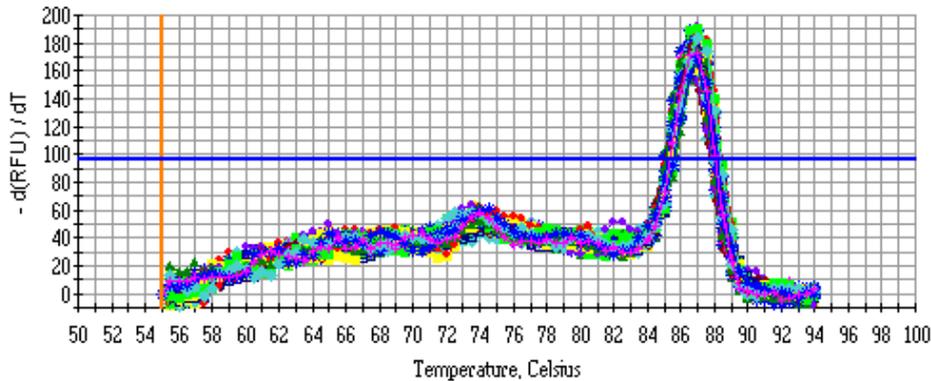


Fig. 5. Ejemplo de curva de *melting*. La gráfica muestra la primera derivada de la fluorescencia en función de la temperatura (° C). La presencia de un solo pico nos demuestra que no hubo formación de dímeros y que los productos de reacción son iguales.

Existen dos tipos de marcadores: i) fluoróforos específicos y ii) fluoróforos inespecíficos (como el intercalante SYBR Green I)^{85,88}. Los primeros fluorescen al reconocer la secuencia específica, mientras que los reporteros inespecíficos son capaces de fluorecer tan solo con unirse al producto de la PCR. El SYBR Green I es un ejemplo por excelencia de éstos últimos (fig. 6)^{87,89}. Su principal desventaja es su inespecificidad, permitiéndole al reportero unirse tanto a dímeros de cebadores, como a productos específicos e inespecíficos de PCR. Como se mencionó anteriormente, las curvas de *melting* nos permiten detectar la presencia de productos inespecíficos y/o dímeros de cebadores⁸⁹.

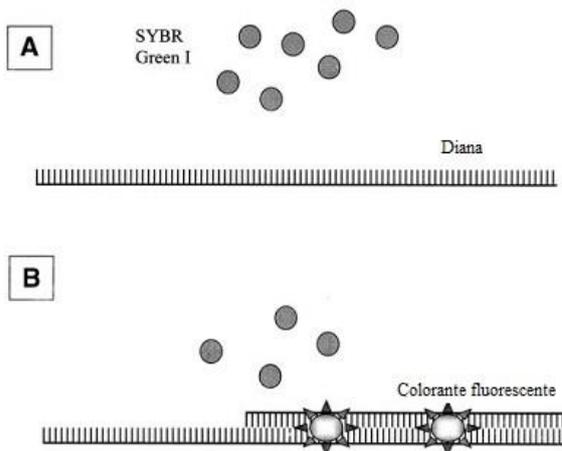
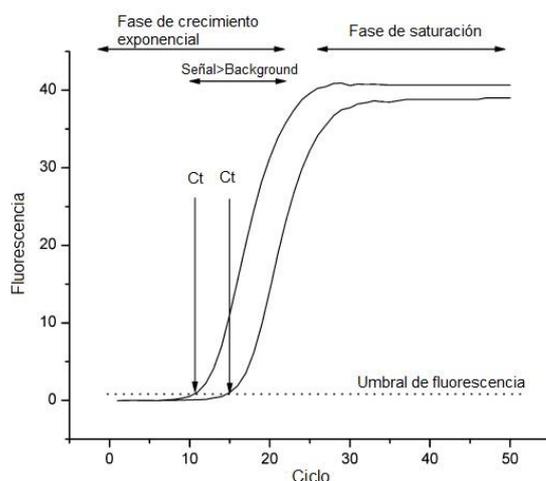


Fig. 6. Colorantes de unión al ADN (SYBR Green I). (A) El colorante en solución no emite fluorescencia. (B) Apenas el SYBR Green se une a la hebra de ADN, emite luz fluorescente.

Como ya se mencionó anteriormente, la diferencia entre la PCR convencional y la *real-time* PCR, está en que esta última nos permite obtener resultados no solo cualitativos sino también cuantitativos. Mientras la reacción transcurre, el *software* que utiliza el termociclador genera una curva de intensidad de fluorescencia en función del número de ciclos de amplificación. Se obtiene la siguiente gráfica:



El cambio en la fluorescencia refleja la cantidad de producto formado en la reacción ⁸⁵. Al comienzo de la reacción los niveles de fluorescencia son poco apreciables pero con el paso del tiempo, ésta aumenta de forma exponencial hasta el punto de saturación. Esta última etapa se debe a que algún reactivo necesario llegó a niveles insuficientes para continuar con la reacción (e.g. dNTPs, reportero, cebadores, etc). La diferencia entre el contenido de material biológico en la muestra es cuantificada comparando el número de ciclos que requieren las curvas de respuesta de la muestra para alcanzar el umbral de absorbancia preestablecido. Al número de ciclos necesarios para alcanzar dicho umbral se le conoce como valor Ct ^{85,86}. Mientras más ADNc exista en la muestra, menor será el valor Ct. El umbral puede ser establecido por el *software* del equipo a través de una serie de algoritmos o bien puede ser programado de forma manual por el usuario. Si bien la selección del umbral no afecta las diferencias entre los distintos Ct, sí afecta los valores individuales de cada muestra ⁸⁵. Por este motivo, no se debe comparar valores Ct de distintos experimentos, dado que las distintas condiciones de los experimentos pueden afectarlo.

1.7.2-Etapas previas a la PCR

Antes de poder realizar el experimento de PCR en tiempo real, el ARN extraído de las muestras debe ser transcrito a ADNc por transcripción reversa (RT). Esta etapa es crucial para la exactitud de la cuantificación dado que las cantidades de ADNc obtenidas deben reflejar con fidelidad las cantidades de ARNm ^{85,87}. La reacción puede darse en ausencia o en presencia de primers (siendo ésta última más eficiente). Existen tres estrategias posibles para usar primers: oligo(dT) primers, primers de secuencias aleatorias y primers específicos para un gen particular ⁸⁸. Los primeros se hibridan con la cola poliadenilada en el extremo 3' del ARNm eucariota y van a realizar la retrotranscripción de éste en su totalidad. Esto puede resultar desventajoso para estudios de expresión génica dado que la transcripción puede no alcanzar la secuencia de interés en caso de que el ARNm haya sido degradado. Los *primers* de secuencia aleatoria consisten en oligómeros de seis o nueve nucleótidos de todas las secuencias posibles. Se producen a partir de síntesis de secuencias al azar dando lugar a todas las secuencias posibles. Estos *primers* darán origen a múltiples transcritos y el rendimiento de la reacción dependerá

de las estructuras secundarias y terciarias que presente el ARNm. La tercera posibilidad es utilizar *primers* específicos de secuencias. Este tipo de *primers* se usa cuando se pretende estudiar un número limitado de ARNm. Al ser tan dependiente de la secuencia, la unión o el *annealing* de los *primers* se verá afectada por la presencia de estructuras secundarias y/o la presencia de proteínas de unión al ARN. Por esto, a altas temperaturas los *primers* tienen más acceso a sus secuencias blanco.

Las reacciones de retrotranscriptasa y las de *real-time* PCR pueden combinarse en una sola reacción RT-PCR. Esta es una forma de reducir las posibilidades de contaminación cruzada entre una reacción y otra. La diferencia entre hacerlo en una sola reacción o en dos es la sensibilidad, siendo menor en el primer caso ⁹⁰.

Existen varias retrotranscriptasas disponibles en el mercado. Las principales diferencias entre ellas son su tamaño y su temperatura óptima. Para evitar obtener resultados erróneos debido a contaminación de la muestra con ADN, es recomendable previo a la RT-PCR, realizar un tratamiento con DNasa I ⁹⁰. Para evitar la degradación de la muestra por RNasa residuales, es aconsejable realizar el tratamiento solamente sobre la muestra a analizar y no sobre el stock.

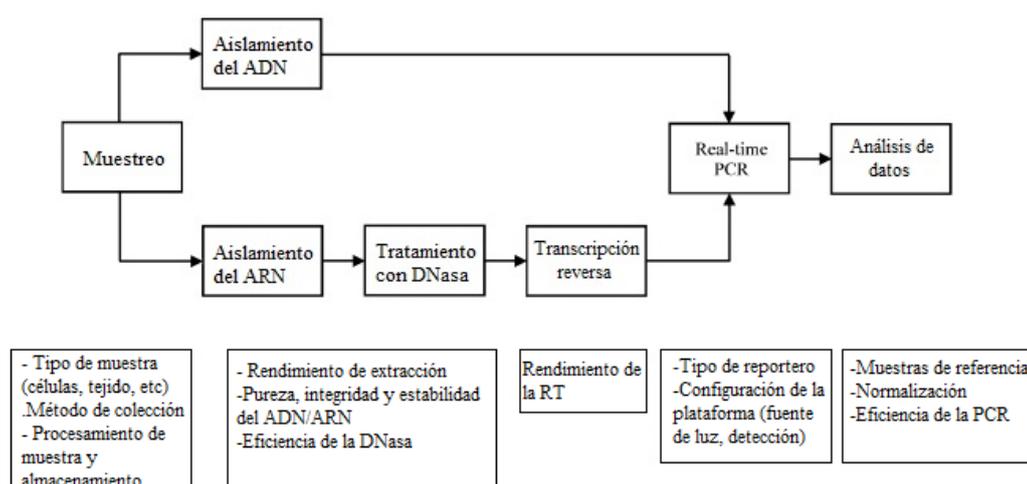


Fig. 7. Esquema de análisis para ADN o ARN de muestras biológicas. Los recuadros inferiores especifican etapas donde se puede generar variación.

1.7.3-Cuantificación de la expresión génica

1.7.3.1-Cuantificación absoluta de la expresión génica

La cuantificación absoluta utiliza una serie de estándares diluidos en concentraciones conocidas para generar una curva estándar (fig. 8). Esta curva produce una relación lineal entre los Ct y las cantidades de ARN o ADNc permitiendo determinar la concentración de las muestras a partir de sus valores Ct ⁸⁸. Este método asume iguales eficiencias de amplificación para todas las muestras y estándares utilizados. Estos estándares suelen ser ADN doble o simple hebra o un fragmento de ARNc conteniendo la secuencia de interés.

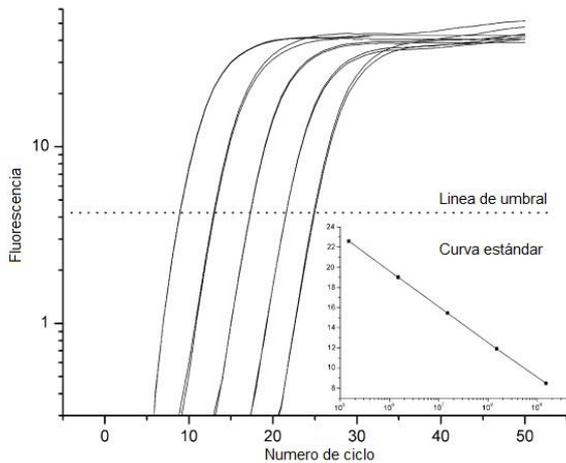


Fig. 8. Curva estándar para PCR en tiempo real. Se muestran las curvas en escala logarítmica para 5 estándares. Los puntos donde las curvas cruzan el umbral corresponden a los valores Ct de cada estándar. En el recuadro los valores Ct son trazados vs. el logaritmo del número inicial de productos de amplificación en las muestras estándar.

1.7.3.2-Cuantificación relativa de la expresión génica

La comparación de muestras requiere la normalización para compensar las diferencias en la cantidad de material biológico que hay en las muestras a estudiar. Para realizar esto, es muy frecuente la normalización utilizando ARN total, ribosómico o genes de referencia ⁸⁵. Estos genes también conocidos como genes *housekeeping* (normalmente de expresión constitutiva) son frecuentemente utilizados como controles para la normalización. Los más utilizados son la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y la β -actina^{88,89}. Dichos genes deben ser seleccionados de acuerdo al tipo de tratamiento que reciba el tejido o células, por este motivo no existe ningún gen *housekeeping* universal aceptado hasta el momento ⁹⁰. Existen disponibles en internet bases de datos de donde uno puede seleccionar su gen de referencia más adecuado para el análisis ⁸⁵.

Para el análisis relativo de la expresión de uno o varios genes, es necesario comparar la expresión de nuestro gen de interés (supuestamente afectado por el tratamiento) y el gen de referencia (de expresión constante). Asumiendo iguales eficiencias de la PCR para las dos muestras (A y B), los resultados se obtienen a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Sample 1}}{\text{Sample 2}} = \frac{(1 + E_B)^{CT_{B1} - CT_{B2}}}{(1 + E_A)^{CT_{A1} - CT_{A2}}}$$

Si se asume una eficiencia del 100%, entonces la ecuación se simplifica a:

$$\frac{\text{Sample 1}}{\text{Sample 2}} = \frac{2^{CT_{B1} - CT_{B2}}}{2^{CT_{A1} - CT_{A2}}} = 2^{(CT_{B1} - CT_{B2}) - (CT_{A1} - CT_{A2})} = 2^{\Delta\Delta CT}$$

1.8-HIPOTESIS DE TRABAJO

Considerando las propiedades antiinflamatorias (y su potencial neuroprotector) ya descritas para la decocción de As y los flavonoides contenidos en ella, proponemos que:

Un pre-tratamiento con una decocción de As durante 21 días podría reducir las deficiencias motoras causadas por la isquemia focal permanente en ratas; en parte modulando la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en el tejido cerebral isquémico.

1.9-OBJETIVOS

1.9.1-Objetivo general:

Estudiar la influencia del pretratamiento con decocción de As 2% durante 21 días sobre las deficiencias motoras y la expresión de citoquinas proinflamatorias en un modelo de isquemia permanente en ratas.

1.9.2-Objetivos específicos:

- Cuantificar mediante un test comportamental, los beneficios del pre-tratamiento con la decocción sobre las deficiencias motoras causadas por la isquemia cerebral en las ratas sometidas a la oclusión permanente de la Arteria Cerebral Media (opACM) durante 24 horas.
- Evaluar la influencia del pre-tratamiento con la decocción durante 21 días sobre la expresión de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6 en la corteza parietal y estriado ipsilateral de animales controles e isquémicos y mediante la técnica de qRT-PCR.

2-MATERIALES Y MÉTODOS

2.1-MATERIAL BIOLÓGICO

Las flores de As se obtuvieron del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), estación "Las Brujas", Canelones, Uruguay. La especie fue identificada taxonómicamente por el Ingeniero Agrónomo P. Davies. Un *voucher* de As se mantiene en Facultad de Agronomía de la Universidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay (MVFA 32796).

2.2-PREPARACIÓN DE LA DECOCCIÓN DE As

Se añadieron 2 gramos de flores de As en 100 mL de agua hirviendo en una decocción durante 30 minutos. Luego se dejó reposar durante 3 horas a temperatura ambiente y las flores fueron exprimidas y retiradas de la decocción.

2.3-ANIMALES Y PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Los experimentos fueron realizados utilizando ratas Sprague-Dawley de entre 280 y 350 gramos y fueron agrupados en un ambiente con temperatura controlada ($22\pm 3^{\circ}\text{C}$) bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los experimentos y procedimientos realizados fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto Clemente Estable.

Para los estudios de comportamiento motor y expresión de citoquinas, los animales fueron separados en 4 grupos experimentales:

- Sham: sometidos a todos los procedimientos previos sin la opACM y tratados durante todo el estudio con agua corriente (n=5)
- Isquémico: sometidos a opACM durante 24 horas (n=9)
- As + Isquémico (As+Isq): pretratado durante 21 días con decocción de As al 2% y posteriormente sometidos a opACM por 24 horas (n=12)
- As: tratado durante 21 días solamente con decocción de As al 2% (n=4)

Para controlar la influencia del tratamiento oral con As sobre el metabolismo general de los animales de experimentación, el peso fue controlado semanalmente y la ingesta de alimento y agua (en caso de los controles) ò decocción fueron controlados diariamente.

2.4-OCCLUSIÓN PERMANENTE DE LA ARTERIA CEREBRAL MEDIA

La opACM fue inducida utilizando el método de introducción de un filamento intraluminal⁹¹. Los animales fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina y Xylasina, se realizó una incisión media en el cuello de los animales y se expusieron la arteria carótida común (ACC), la arteria carótida externa (ACE) y la arteria carótida interna (ACI) del lado izquierdo. La ACE fue ligada en dos secciones y la parte central cauterizada, al igual que la arteria occipital. Se ligó la ACC y la pterigopalatina (APP) y posteriormente se realizó una pequeña incisión en la ACC y se insertó un filamento de 19 mm de longitud de un hilo de sutura de nylon, deslizándolo por la ACI hasta ocluir el origen de la ACM (fig. 9). La herida fue suturada y los animales fueron devueltos a sus jaulas, donde permanecieron por 24 horas hasta el desarrollo del test motor y el posterior sacrificio de las ratas con el propósito de estudiar las citoquina cerebrales propuestas.

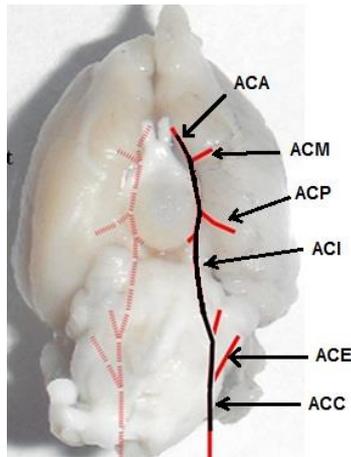


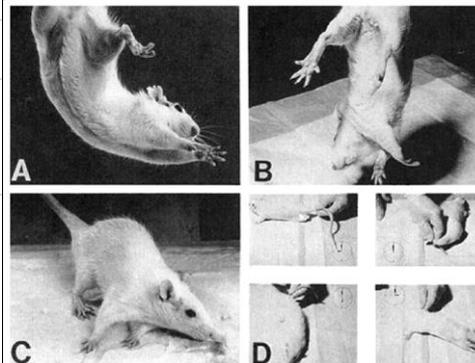
Fig. 9. Esquema de la opACM con un filamento de nylon (negro). Arteria cerebral anterior (ACA), arteria cerebral media (ACM), arteria cerebral posterior (ACP), arteria carótida interna (ACI), arteria carótida externa (ACE), arteria carótida común (ACC).

Zuo y cols. (2012)

2.5-TEST DE COMPORTAMIENTO MOTOR

Este test se realizó 24 horas después de la opACM y consiste en pruebas motoras que implican la activación de áreas del cerebro vinculadas en el control motor, equilibrio y coordinación. Este test neurológico está descrito por Menzies y cols. (Menzies et al. 1992). Un sistema de puntaje entre 0 y 4 es utilizado para evaluar el nivel de afección de la isquemia cerebral en las ratas. Los puntos son atribuidos de acuerdo a cómo las ratas realizan las pruebas, las cuales se encuentran descritas en la siguiente tabla y figura:

| Puntuación | Evaluación | Figura |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 0 | Sin deficiencias observables | A |
| 1 | Flexión del miembro anterior contralateral | B |
| 2 | Reducción de la fuerza de agarre del miembro anterior contralateral cuando se tira a la rata de la cola | C |
| 3 | Movimientos circulares espontáneos hacia el lado contralateral a la lesión cuando se aplicaba un leve tirón de la cola | D |
| 4 | Movimiento circular espontáneo contralateral | |



Tomado de Menzies et al. 1992

2.6-DISECCIÓN DE TEJIDOS

Veinticuatro horas después de la opACM y una vez realizado el test motor, los animales fueron sacrificados mediante una anestesia con uretano (1,2 g/mL) + perfusión por vía transcardíaca con 200 mL de NaCl al 0,9% para remover la sangre del cerebro. Estos fueron extraídos y la corteza parietal y estriado ipsilaterales al infarto fueron conservados en TRIzol a -80°C hasta la extracción de ARN.

2.7-qRT-PCR PARA CITOQUINAS

2.7.1-Extracción de ARN

La extracción de ARNm se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante de TRIzol® (Invitrogen). Los tejidos fueron descongelados y homogenizados utilizando un “ultraturax” Tissue-Ruptor (QIAGEN). Los tejidos se homogenizaron y se los dejó reposar a temperatura ambiente (TA) durante 5 minutos. Luego se centrifugaron los tubos a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C. Posteriormente se tomaron 500 µL del sobrenadante, se le agregó 100 µL de cloroformo (CHCl₃) para la separación de fases y se mezcló por inversión suave hasta alcanzar la “monofase”. Estos tubos fueron centrifugados a 12000 g a 4°C por 15 minutos. Luego se recolectó la fase acuosa (superior), se le agregó 250 µL de isopropanol y se dejó reposar 10 minutos a TA para luego centrifugar bajo las condiciones anteriores. El sobrenadante se descartó y el pellet se lavó con 500 µL EtOH 70%. Se centrifugó nuevamente a 7500 g a 4°C por 5 minutos y el sobrenadante se descartó. El EtOH restante se secó durante 30 minutos y el pellet ya seco se resuspendió en 30 µL de H₂O milliQ autoclavada. Luego se calentaron los tubos a 55°C durante 10 minutos y se homogenizaron los tubos de forma manual y posteriormente se colocaron en hielo durante 5 minutos. Hecho esto, los tubos fueron almacenados a -80°C hasta su uso. La concentración del ARN extraído se determinó mediante el uso de un NanoDrop en base a la relación $A_{260}=1$ correspondiente a 40 µg/mL de ARN simple hebra. Para analizar si el ARN se encontraba contaminado por proteínas se calculó la relación A_{260}/A_{280} .

2.7.2-Tratamiento con DNasa

El ADN potencialmente contaminante de la muestra fue eliminado previo a la transcripción reversa mediante un tratamiento con DNasa I (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ARN se incubó con 1,0 µL de buffer 10x y 0,4 µL de DNasa I y H₂O. La mezcla se incubó durante 15 minutos a TA. Luego se inactivó la DNasa con 1,0 µL de EDTA (2,5 mM) y calentamiento a 65°C por 10 minutos.

2.7.3-Retrotranscriptasa

La síntesis del ADNc se llevó a cabo por utilización de una transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Junto con 1 µg de ARN se incubaron 1,0 µL de dNTPs (Invitrogen), 1,0 µL de RNasaOUT (Invitrogen), *Random primers* (1,0 µL; Invitrogen), 2,0 µL de DTT (Invitrogen), 4,0 µL de buffer 5x y 1,0 µL de la retrotranscriptasa M-MLV (Invitrogen) llegando a un volumen final de 20 µL. La mezcla se incubó durante 15 minutos a 25°C para la desnaturalización de estructuras secundarias; 50 minutos a 37°C (temperatura óptima de la enzima); y 15 minutos a 70°C para desnaturalizar la RTasa. El ADNc obtenido se diluyó a un volumen final de 80 µL en H₂O libre de nucleasas y fue almacenado a -20°C.

2.7.4-Primers

Las secuencias de los primers específicos para la amplificación del ADNc correspondiente a los ARNm de las citoquinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6) se muestran en la siguiente tabla. Se utilizó la GAPDH (*Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) de expresión constitutiva como gen de referencia.

Tabla 1. Secuencias de los primers específicos para el gen *housekeeping* y las citoquinas.

| | Primer Fw (5'-->3') | Primer Rv (5'-->3") |
|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| GAPDH | TGTGAAGCTCATTTCCTGGTATGA | CTCTCTTGCTCTCAGTATCCTTGCT |
| IL-6 | GCCCTTCAGGAACAGCTATGA | TGTCAACAACATCAGTCCCAAGA |
| TNF-α | CGGGCTCAGAATTTCCAACA | CCGCAATCCAGGCCACTA |

2.7.5-PCR

Se realizaron las PCR cuantitativas en tiempo real (qPCR) utilizando un kit QuantiTech SYBR Green (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada tubo se colocaron 5,0 μ L de QuantiTech SYBR Green PCR kit (Qiagen) y 2,0 μ L de ADNc previamente diluido $\frac{1}{4}$, junto a 0,9 μ L de cada primer específico. Las qPCR se realizaron en un Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science) (fig. 10). La temperatura se llevó a 95°C durante 15 minutos para la desnaturalización de las muestras y luego se aplicaron 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. El ADNc correspondiente al GAPDH se utilizó como gen *housekeeping*. Las cantidades relativas de ARNm se calcularon utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, siendo Ct el ciclo en el que la absorbancia de la muestra supera el umbral predeterminado. El *fold-increase* de las muestras fue calculado respecto al grupo sham.



Fig. 10. Termociclador Rotor-Gene Corbett.

2.8-ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados cualitativos relacionados al desempeño neurológico de los animales luego de los diferentes tratamientos se analizaron mediante prueba de χ^2 . Para los estudios de

expresión de citoquinas, los resultados fueron analizados utilizando un test no paramétrico Mann-Whitney con significancia estadística aceptada para $p < 0,05$.

3-RESULTADOS

3.1- Test comportamental

Previo a la opACM, todos los grupos experimentales presentaron una puntuación equivalente a 0, reflejando ausencia de afecciones previas al procedimiento quirúrgico. Veinticuatro horas después y previo al sacrificio, los animales sometidos a la opACM demostraron notorias deficiencias motoras y dificultades en realizar las distintas pruebas que implica el test. Los animales pretratados con decocción durante 21 días mostraron mejoras significativas en las funciones motoras pero aun exhibiendo afecciones mínimas respecto al grupo sometido a opACM sin pretratamiento. Por otro lado es importante destacar que no existieron diferencias significativas entre los resultados correspondientes al grupo Sham y al solo tratado con As (**fig. 11**).

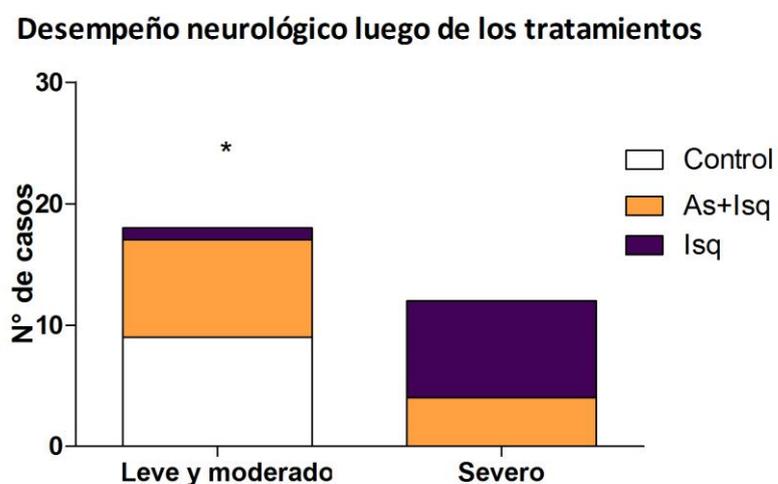


Fig. 11. El test motor se realizó 24 horas después de la opACM. Grupos Sham (n= 5), Isquemia (n=9), pre-tratado con As durante 21 días (n=4) y opACM (As+Isq) (n=12) y As. * = $p < 0,05$ (Isquemia vs. As+Isq). Dado que no se encontraron diferencias significativas entre los grupos Sham y As, se grafican juntos como controles (n=9).

3.2- Expresión de citoquinas

3.2.1-IL-6

Para la IL-6 tanto en la corteza como el estriado ipsilateral al infarto, no se observaron diferencias significativas entre los grupos sometidos a la opACM y los isquémicos pretratados

con decocción (As+Isq)[corteza: (opACM: $289,4 \pm 679$)(As+Isq: $1009,4 \pm 2020$) respectivamente]; [en estriado: (opACM: $980,4 \pm 1259$); (As+Isq: $1200,3 \pm 2377$) respectivamente] (**fig. 12a**). Sin embargo, es posible observar una tendencia al aumento de la producción de ésta citoquina en ambos tejidos. En el estriado, solamente se logró apreciar diferencias significativas entre el grupo Sham ($1 \pm 0,85$) y el As+Isq. Lo mismo pudo observarse entre éste último grupo y el grupo tratado con decocción ($0,2 \pm 0,11$) (**fig 12b**).

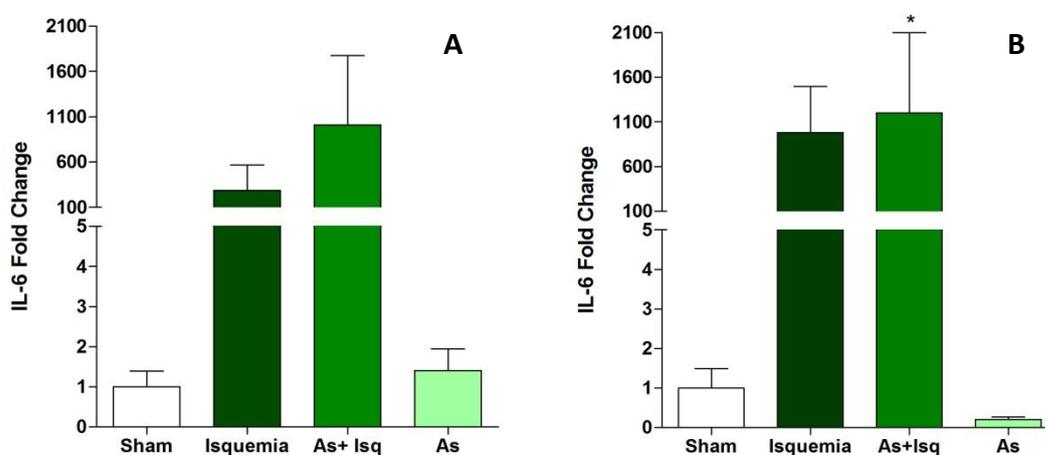


Fig. 12. Las cantidades relativas de ARNm de IL-6 para la corteza (A) y estriado (B) ipsilaterales fueron calculadas mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Grupos Sham (n= 5), Isquemia (n=9), pre-tratado con As durante 21 días y opACM (As+Isq) (n=12) y As (n=4). Los datos representan las medias \pm DS: *, $p < 0,05$ (Sham vs. As+Isq). Las diferencias estadísticas fueron determinadas por el test Mann-Whitney ($p < 0,05$).

3.2.2-TNF- α

En la corteza se observó una tendencia al aumento de la expresión de TNF- α en los grupos isquémicos y los isquémicos pretratados con decocción, tanto en estriado como en corteza (**fig. 13a**). Particularmente en el estriado, se observaron diferencias significativas entre el grupo Sham ($1,0 \pm 0,57$) y los grupos isquémicos no tratados (opACM: $11,72 \pm 8,0$) y pretratados con la decocción (As+Isq: $10 \pm 9,7$) (**fig 13b**). Sin embargo, no lograron observarse diferencias significativas entre el grupo sometido a opACM y el As+Isq (en corteza: $2,1 \pm 1,8$; $5,8 \pm 4,1$ respectivamente). Esto pudo observarse en ambos tejidos analizados.

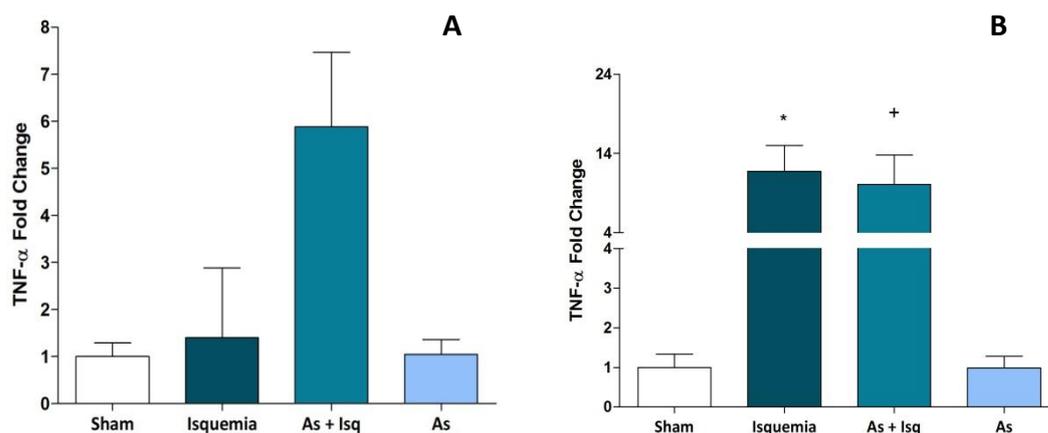


Fig. 13. Las cantidades relativas de ARNm de TNF- α para la corteza (A) y estriado (B) fueron calculadas mediante el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Grupos Sham (n= 5), Isquemia (n=9), pre-tratado con As durante 21 días y opACM (As+Isq) (n=12) y As (n=4). Los datos representan las medias \pm DS: +, $p < 0,05$ (Sham vs. As+Isq); *, $p < 0,05$ (Sham vs. Isquemia). Las diferencias estadísticas fueron determinadas por el test Mann-Whitney ($p < 0.05$).

4-DISCUSIÓN

4.1-Extractos de plantas con acciones antiinflamatorias

La eficacia clínica de las terapias anti-inflamatorias como neuroprotectoras hasta el presente es insatisfactoria, por tanto la búsqueda de nuevos fármacos es objetivo de muchos investigadores en el mundo. En tal sentido muchos extractos de plantas han sido evaluados como posibles agentes antiinflamatorios, centrándose en su capacidad de inhibir la COX-2 y la iNOS, al igual que la producción de citoquinas⁹². Estos extractos mostraron un alto contenido de flavonoides, algunos de los cuales ya habían sido reportados como potenciales antiinflamatorios⁹³.

India y Corea por citar algunos ejemplos, son países que se han caracterizado en aprovechar su rica floral y han reportado efectos anti-inflamatorios en muchas plantas estudiadas en modelos de isquemia cerebral; un ejemplo de esto es *Mimusop selengi Linn (Me)*, una planta medicinal de la India. Un pre-tratamiento con un extracto hidro-alcohólico de Me a ratas durante 7 días y posteriormente sometidas a isquemia/reperfusión mostró una mejoría significativa en los desórdenes motores de los animales que fueron causados por la isquemia, redujo el volumen y el edema cerebral y la extensión del rompimiento de la Barrera Hematoencefálica además de prevenir la alteración del estatus oxidativo. El análisis de HPLC de esta planta reveló su contenido en 5 compuestos polifenólicos bioactivos. Los autores consideran que los efectos protectores y anti-inflamatorios descritos son atribuibles al contenido polifenólico del extracto⁹⁴. También un extracto metanólico de las hojas de la planta india *Phyllanthusacidus* mostró poseer potencial antioxidante, analgésico y anti-inflamatorio⁹⁵.

En Corea un estudio inmunohistoquímico realizado con un extracto etanólico de *Eleutherococcus senticosus*, administrado a ratas sometidas a una isquemia global transitoria, demostró sus efectos anti-inflamatorios evidenciados a través de la inhibición de la expresión de COX-2, de la microglía (OX-42) y de los astrocitos (GFAP) ⁹⁶.

As, la planta objeto de nuestro trabajo, también ha sido estudiada en su potencial antioxidante ^{61,79} y estudios experimentales realizados por nuestro grupo avalan los efectos neuroprotectores de esta decocción ⁹⁷ y de su flavonoide quercetina ⁷⁸, en un modelo de isquemia focal permanente en ratas adultas. Recientemente nuestro grupo de trabajo, logró evidenciar que el pretratamiento con la decocción de As posee un efecto modulador sobre la gliosis reactiva (proliferación de astrocitos en regiones lesionadas del SNC con la finalidad de eliminar restos necróticos), sugiriendo que la glía se encuentra mediando posiblemente mecanismos de neuroprotección y reparación del tejido isquémico (Comunicación personal: Tesis de grado de Darío Tejera (2012)).

Usualmente se utilizan preparados metanólicos e hidro-alcohólicos para demostrar los efectos neuroactivos de las plantas y son escasos los estudios que utilizan preparados acuosos ^{93,95}. Debido a la sencillez de hacer, este trabajo se basó en una decocción de As, cuya elaboración puede ser fácilmente reproducida además de contar con la ventaja de tener muchos menos efectos tóxicos que los preparados mencionados.

Nuestro trabajo con la decocción de As ha permitido evidenciar sus efectos neuroactivos aplicados a un modelo de oclusión permanente de la Arteria Cerebral Media ^{71,78}.

Similarmente a los estudios citados con anterioridad, los datos obtenidos a través del test de comportamiento motor en nuestro estudio reflejan el efecto del pre-tratamiento con As al reducir el puntaje del grupo pre-tratado y posteriormente sometido a opACM en comparación con el grupo isquémico sin pre-tratamiento. Los tejidos cerebrales estudiados (corteza parietal y estriado) se corresponden con las áreas cerebrales lesionadas en la opACM y están encargados del procesamiento e integración de la información sensorio-motriz, por lo que la mejoría en las habilidades motoras de las ratas isquémicas pre-tratadas con As permiten sugerir que las neuronas de las áreas señaladas fueron blanco de las acciones protectoras de los componentes polifenólicos de As.

Hasta el presente, flavonoides que han sido identificados en As como la quercetina y la luteolina, han sido reportados como compuestos no solo capaces de activar las defensas antioxidantes de las neuronas, sino también con propiedades moduladoras sobre la expresión de agentes proinflamatorios ^{77,79}. Se ha descrito que estos flavonoides son capaces de inhibir la expresión de citoquinas como la TNF- α , la IL-6 y factores de transcripción que participan en la respuesta inmune frente al daño isquémico ^{98,99}. Dicha influencia se sabe que es por interacción directa de los flavonoides con las vías de señalización que controlan estos procesos ^{74,77}.

4.2-Flavonoides y neuroinflamación

La interacción entre los flavonoides y el factor de transcripción NF-κB podría ser la explicación de las propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras de estos compuestos. Mediante esta interacción, la quercetina es capaz de regular la expresión de genes de enzimas y citoquinas proinflamatorias y productoras de RL^{100,101}. Nair y cols demostraron que éste mismo flavonoide mediante modulación del NF-κB es capaz de inhibir la expresión de TNF-α⁹⁸. A través de su interacción con el NF-κB la quercetina es capaz de inhibir la diferenciación y activación de células que participan en la respuesta inflamatoria^{75,102}.

Estudios realizados con extractos de arándano ricos en flavonoides lograron la inhibición de la producción de NO, IL-6 y TNF-α al igual que la disminución de la reactividad de la microglia mientras que el flavonoide quercetina (entre otros) logró reducir la inflamación mediada por astrocitos y microglía a través de inhibición de mecanismos dependientes de la producción de NO, y la expresión de la COX-2, NOS y la NADPH oxidasa⁷².

Sin embargo los resultados obtenidos en estudios basados en la inhibición de la producción de citoquinas en modelos de isquemia cerebral, a pesar de haber logrado la reducción del volumen del infarto y el daño general de la isquemia sobre el cerebro, han demostrado la importancia de éstas citoquinas en la posterior reparación del tejido y su restauración^{19,103}.

El conocimiento acerca del vínculo que existe entre las citoquinas, la neuroinflamación y la gliosis reactiva, ha llevado a apostar a los tratamientos antiinflamatorios como una estrategia terapéutica para mejorar las afecciones causadas por la isquemia³⁵. Si bien estudios realizados con ratones *knock-out* para la IL-6 demostraron una importante reducción de la respuesta inflamatoria en el cerebro isquémico, ésta no se encontró relacionada con una reducción en el tamaño del infarto^{103,104}. Existen numerosos estudios que revelan el doble rol de las citoquinas en la isquemia cerebral dejando a la inflamación como un daño necesario para la recuperación del tejido¹⁰⁵. Por este motivo las terapias antiinflamatorias no han tenido éxito en el tratamiento de la isquemia cerebral¹⁰⁵.

Se ha descrito particularmente la interacción entre la quercetina y el factor NF-κB, ya reportado como un mediador de la respuesta inflamatoria frente al daño isquémico⁷⁷. La activación prolongada de dicho factor se ha asociado con una respuesta inflamatoria exacerbada que colabora con la neurodegeneración del tejido isquémico, mientras que una activación atenuada participa en la activación de genes vinculados a la sobrevivencia de las neuronas⁵⁰. Se sabe que a concentraciones nanomolares de quercetina, los efectos beneficiosos observados se deben no a su capacidad de *scavenging* de radicales sino a su influencia sobre la activación de dichas vías⁵⁰. Sin embargo, hasta el momento no es posible predecir si la influencia de los flavonoides promoverá una respuesta antiinflamatoria dado que existen numerosas condiciones del tejido y las células (como el grado en el que se expresan las citoquinas, el tiempo transcurrido desde que ocurrió el ACV y la expresión de los determinados

receptores) que determinan si se activan mecanismos neuroprotectores o degenerativos ¹⁹. También el perfil de expresión de las citoquinas varía de acuerdo al área del cerebro donde se expresen (por ejemplo, se sabe que en el estriado el TNF- α no solo cumple funciones degenerativas sino que se expresa en mayor cantidad que en la corteza) ^{19,52}

4.3-Citoquinas y neuroprotección

Se sabe que las citoquinas estudiadas en este trabajo están directamente implicadas en la activación de la glía, la cual en etapas tardías de la isquemia participará en la reparación del tejido, mediante la producción de factores neurotróficos ¹⁹. En particular, la IL-6 ha sido reportada como un potente inductor de no solo la respuesta inflamatoria sino también como un agente inductor de la proliferación de astrocitos y la producción de factores endoteliales y de proliferación de astrocitos ³⁵. A parte de esto, la IL-6 tiene un importante papel en el mantenimiento de la integridad de la BHE. También se ha vinculado a esta citoquina con la producción de factores de diferenciación celular entre los que se encuentra el *Nerve Growth Factor* (NGF). También se ha demostrado la capacidad de IL-6 de promover la sobrevivencia de varios tipos neuronales y protegerlas contra el estrés oxidativo ³⁵.

En relación con la vinculación de la IL-6 y la quercetina, flavonoide constitutivo de As, es adecuado citar el ejemplo de la planta coreana Chungsim-Yeunja-Tang. Un extracto de esta planta, cuyo componente principal es la quercetina, administrado durante 2 semanas a pacientes que sufrieron un infarto cerebral, fue capaz de inhibir la expresión de la IL-6 en células mono-nucleares periféricas sanguíneas de los pacientes ¹⁰⁶. Entonces si el flavonoide quercetina, contenido también en As actúa como modulador de esta citoquina, esto podría explicar nuestros resultados, especulando sobre el posible efecto de As en estimular la acción neuro-reparadora de esta citoquina. Sin embargo, no podemos considerar con certeza a IL-6 como un promotor de la neuro-reparación dados los resultados obtenidos.

El TNF- α ha sido la citoquina más estudiada y la más discutida acerca de su potencial neurotóxico y/o neuroprotector¹⁹. Su rol en la reparación del tejido luego de la isquemia cerebral pudo revelarse en estudios con animales *knock-out* para el TNF- α y anticuerpos α -TNFR donde la falta de dicha citoquina causó un aumento del volumen del infarto y una reparación tisular y recuperación funcional reducida y lenta ¹³. En el caso del TNF- α se sabe los efectos opuestos que puede presentar su expresión se ven mediados por la expresión de dos receptores (TNFR1 y TNFR2) que, de acuerdo a sus dominios intracelulares, son capaces de desencadenar cascadas apoptóticas o de sobrevivencia celular respectivamente ^{27,45} (**fig. 14**).

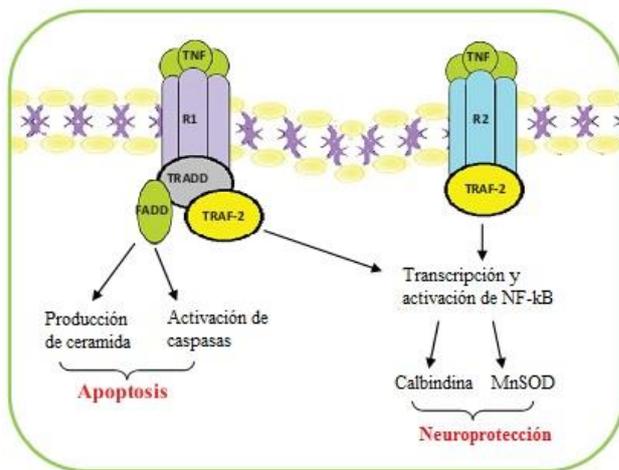


Fig. 14. Las neuronas y la glía expresan dos receptores para TNF- α : R1 y R2. La activación del primero desencadena la activación de caspasas participantes de la apoptosis, por esto al TNFR1 se le conoce como “receptor de la muerte”. Sin embargo, su asociación con el factor TRAF-2 conduce a la transcripción y activación del factor NF- κ B y a la producción de factores neuroprotectores como agentes quelantes como la calbindina y scavengers de radicales libres como la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD).

Modificado Watters y cols. 2011

Se ha reportado que es incluso el mismo TNF- α uno de los responsables de estimular la expresión del TNFR2, estableciendo así un mecanismo de retroalimentación negativa dónde la propia citoquina controla su perfil neurotóxico generando una competencia donde este receptor compite por la unión al TNF- α con el TNFR1¹⁰⁷. Un tipo celular responsable de la expresión del TNF- α y especialmente del TNFR2, es la microglía¹⁰⁷. Al activarse por presencia del TNF- α , ésta expresa TNFR2 para el control de los mecanismos inflamatorios que agravan el daño isquémico. Esta interconexión que existe entre la inflamación y la activación de la glía es la causa de los procesos posteriores encargados de reparar el tejido y controlar los mecanismos de plasticidad neuronal de los cuales depende la recuperación luego de la isquemia cerebral¹³.

Para esclarecer si las propiedades antiinflamatorias descritas para los flavonoides contenidos en As se mantienen en la decocción, decidimos estudiar la influencia del pretratamiento sobre la expresión local de IL-6 y TNF- α , ambas citoquinas para las que se han descrito efectos neuroprotectores en varias enfermedades neurodegenerativas^{19,27,35}.

Por otro lado, nuestros resultados también nos permiten observar un aumento de la expresión de TNF- α en el estriado, tejido donde ya se sabe que la liberación de citoquinas pro-inflamatorias participan en mecanismos de neurodegeneración^{19,52}. Considerando esto, nuestros resultados demuestran que el pre-tratamiento con decocción de As no es capaz de revertir la expresión y liberación de TNF- α en el estriado ipsilateral de ratas isquémicas. Así, se pueden destacar distintas consecuencias del pre-tratamiento con decocción sobre la producción de citoquinas y su perfil de acción (neurotóxico o neuroprotector) dependiendo de la región del cerebro analizada (aludiendo nuevamente a la naturaleza pleiotrópica de las citoquinas, especialmente del TNF- α), siendo neuroprotectora en la corteza y neurotóxica en el estriado. Teniendo en cuenta el factor del tiempo transcurrido desde ocurrido el ACV, el perfil neurodegenerativo de las citoquinas es observable en las primeras horas de isquemia, nuestro modelo de 24 horas posiblemente nos permita ya observar un mecanismo de reparación tisular impulsado por las citoquinas y la glía activada¹⁹(**fig. 15**).

La ausencia de diferencias significativas en la producción de citoquinas, tanto en la corteza como en el estriado ipsilateral al comparar los grupos isquémicos e isquémicos pretratados,

impide asociar las mejoras en las habilidades motoras con procesos de neuro-reparación, que se ha descrito son impulsados por las citoquinas mencionadas. Es necesaria no solo la búsqueda de marcadores que revelen con fidelidad el proceso neuroprotector y reparador sobre el tejido dañado, sino también la relación que existe entre estos procesos y los componentes polifenólicos de la decocción, para los cuales ya hay descritas propiedades neuroprotectoras para el modelo de isquemia cerebral permanente en ratas adultas^{71,78,80,108}.

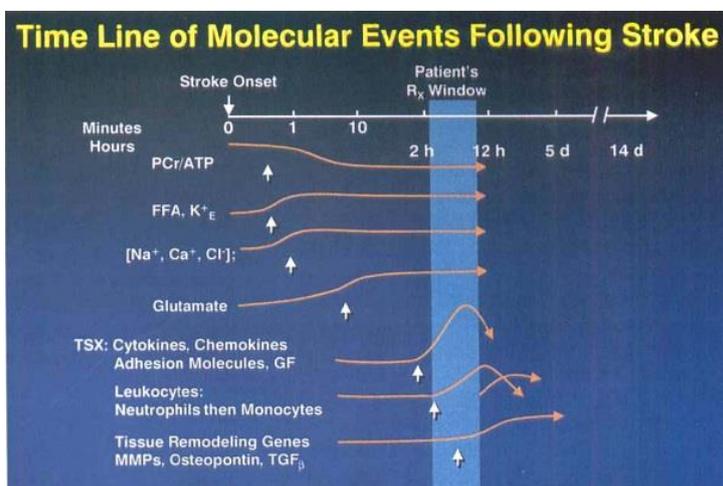


Fig. 15. Marco de tiempo relativo para los eventos que ocurren a partir del infarto. Las fechas verticales indican el comienzo de los cambios individuales.

(Barone y Feuerstein, 1999)

Hasta el momento, no se han reportado trabajos que asocien producción de citoquinas con procesos de neuro-reparación inducida por un pre-tratamiento con extractos de plantas en un modelo de isquemia cerebral. Futuros estudios son necesarios para la confirmación de esta hipótesis.

5-CONCLUSIÓN GENERAL

Este estudio aporta evidencias preliminares de la acción moduladora de *Achyrocline satureioides* sobre la expresión de citoquinas proinflamatorias durante la isquemia cerebral, presumiblemente debido a su contenido en polifenoles como los flavonoides.

6-PERSPECTIVAS

Nuestros resultados reflejan una tendencia al aumento de la expresión de TNF- α e IL-6 en los grupos isquémicos pre-tratados pero sin exhibir diferencias significativas con respecto al isquémico no tratado con As. Es por esa razón que como estrategia de trabajo futura nosotros pretendemos aumentar el número de animales por grupo experimental con el objetivo de confirmar los resultados presentados. Además actualmente nos encontramos estudiando un extracto enriquecido en flavonoides obtenidos a partir de la decocción de As; con el objetivo de dilucidar el papel de éstos compuestos en los efectos moduladores de la respuesta inflamatoria.

7-REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gil del Valle, L. Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans. *Biomedicine & Aging Pathology* **1**, 1–7 (2011).
2. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology* **39**, 44–84 (2007).
3. Harman, D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of gerontology* **11**, 298–300 (1956).
4. Harman, D. The free radical theory of aging. *Antioxidants & redox signaling* **5**, 557–61 (2003).
5. Coyle, J. T. & Puttfarcken, P. Oxidative Stress, Glutamate, Neurodegenerative Disorders. *Science* **262**, 689–695 (1993).
6. Kowaltowski, A. J., De Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F. & Vercesi, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine* **47**, 333–43 (2009).
7. Melo, A. *et al.* Oxidative stress in neurodegenerative diseases: mechanisms and therapeutic perspectives. *Oxidative medicine and cellular longevity* **2011**, 467180 (2011).
8. Malinin, N. L., West, X. Z. & Byzova, T. V Oxidation as “the stress of life”. *Aging* **3**, 906–10 (2011).
9. Roger, V. L. *et al.* Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **125**, e2–e220 (2012).
10. Roger, L. *et al.* Heart Disease and Stroke Statistics — 2011 Update A Report From the American Heart Association. *Circulation* 18–209 (2011).doi:10.1161/CIR.0b013e3182009701
11. Mackay, J. & Mensah, G. A. THE ATLAS OF HEART DISEASE AND STROKE. (2004).
12. Armstead, W. M. *et al.* Signaling, delivery and age as emerging issues in the benefit/risk ratio outcome of tPA for treatment of CNS ischemic disorders. *Journal of Neurochemistry* **113**, 303–312 (2010).
13. Barone, F. C. & Feuerstein, G. Z. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **19**, 819–34 (1999).
14. Kunz, A., Dirnagl, U. & Mergenthaler, P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best practice & research. Clinical anaesthesiology* **24**, 495–509 (2010).

15. Maddahi, A. & Edvinsson, L. Cerebral ischemia induces microvascular pro-inflammatory cytokine expression via the MEK/ERK pathway. *Journal of neuroinflammation* **7**, 14 (2010).
16. Mehta, S. L., Manhas, N. & Raghubir, R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain research reviews* **54**, 34–66 (2007).
17. Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M. a Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences* **22**, 391–7 (1999).
18. Witte, O. W., Bidmon, H. J., Schiene, K., Redecker, C. & Hagemann, G. Functional differentiation of multiple perilesional zones after focal cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **20**, 1149–65 (2000).
19. Ceulemans, A.-G. *et al.* The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. *Journal of neuroinflammation* **7**, 74 (2010).
20. Ceulemans, A.-G. *et al.* The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. *Journal of neuroinflammation* **7**, 74 (2010).
21. Liu, F. & McCullough, L. D. Middle cerebral artery occlusion model in rodents: methods and potential pitfalls. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2011**, 464701 (2011).
22. Brouns, R. & De Deyn, P. P. The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clinical neurology and neurosurgery* **111**, 483–95 (2009).
23. Moskowitz, M. a, Lo, E. H. & Iadecola, C. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* **67**, 181–98 (2010).
24. Lo, E. H., Dalkara, T. & Moskowitz, M. a Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nature reviews. Neuroscience* **4**, 399–415 (2003).
25. Jain, K. K. Neuroprotection in Cerebrovascular Disease. *The Handbook of Neuroprotection* 141–216 (2011).doi:10.1007/978-1-61779-049-2
26. Hossmann, K.-A. Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cellular and molecular neurobiology* **26**, 1057–83 (2006).
27. Watters, O. & O'Connor, J. J. A role for tumor necrosis factor- α in ischemia and ischemic preconditioning. *Journal of neuroinflammation* **8**, 87 (2011).
28. Lucas, S.-M., Rothwell, N. J. & Gibson, R. M. The role of inflammation in CNS injury and disease. *British journal of pharmacology* **147 Suppl** , S232–40 (2006).
29. Huang, J., Upadhyay, U. M. & Tamargo, R. J. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surgical neurology* **66**, 232–45 (2006).
30. Jordán, J., Segura, T., Brea, D., Galindo, M. F. & Castillo, J. Inflammation as therapeutic objective in stroke. *Current pharmaceutical design* **14**, 3549–64 (2008).

31. Bederson, J. B. *et al.* Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **17**, 472–6 (1986).
32. Lakhan, S. E., Kirchgessner, A. & Hofer, M. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *Journal of translational medicine* **7**, 97 (2009).
33. Tuttolomondo, A. *et al.* Inflammation as a therapeutic target in acute ischemic stroke treatment. *Current topics in medicinal chemistry* **9**, 1240–60 (2009).
34. Smith, C. J. *et al.* Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC neurology* **4**, 2 (2004).
35. Spooren, A. *et al.* Interleukin-6, a mental cytokine. *Brain research reviews* **67**, 157–83 (2011).
36. Helmy, A., Simoni, M.-G. De, Guilfoyle, M. R., Carpenter, K. L. & Hutchinson, P. J. Cytokines and innate inflammation in the pathogenesis of human traumatic brain injury. *Progress in neurobiology* **95**, 352–372 (2011).
37. Jordán, J., Segura, T., Brea, D., Galindo, M. F. & Castillo, J. Inflammation as therapeutic objective in stroke. *Current pharmaceutical design* **14**, 3549–64 (2008).
38. Clausen, B. H. *et al.* Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice. *Journal of neuroinflammation* **5**, 46 (2008).
39. Clark, I. a, Alleva, L. M. & Vissel, B. The roles of TNF in brain dysfunction and disease. *Pharmacology & therapeutics* **128**, 519–48 (2010).
40. Jin, R., Yang, G. & Li, G. Inflammatory mechanisms in ischemic.pdf. *Journal of Leukocyte Biology* **87**, 779–789 (2010).
41. Maddahi, A., Kruse, L. S., Chen, Q. & Edvinsson, L. The role of tumor necrosis factor-a and TNF-a receptors in cerebral arteries following cerebral ischemia in rat. *Journal of neuroinflammation* **8**, 1–13 (2011).
42. Lambertsen, K. L. *et al.* Microglia and macrophages express tumor necrosis factor receptor p75 following middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience* **144**, 934–49 (2007).
43. Pan, W. & Kastin, A. J. Tumor necrosis factor and stroke: role of the blood-brain barrier. *Progress in neurobiology* **83**, 363–74 (2007).
44. Botchkina, G. I., Meistrell, M. E., Botchkina, I. L. & Tracey, K. J. Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* **3**, 765–81 (1997).
45. Kadhim, H. J., Duchateau, J. & Sébire, G. Cytokines and brain injury: invited review. *Journal of intensive care medicine* **23**, 236–49 (2008).

46. Dembic, Z. *et al.* TWO HUMAN TNF RECEPTORS HAVE SIMILAR EXTRACELLULAR, BUT DISTINCT INTRACELLULAR, DOMAIN SEQUENCES. *Cytokine* **2**, 231–237 (1990).
47. Tansey, M. G. & Wyss-coray, T. Cytokines in CNS Inflammation and Disease. *Central Nervous System Diseases and Inflammation* 59–106 (2008).
48. MacEwan, D. J. TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cellular signalling* **14**, 477–92 (2002).
49. Pettigrew, L. C. *et al.* Focal cerebral ischemia in the TNFalpha-transgenic rat. *Journal of neuroinflammation* **5**, 47 (2008).
50. Ridder, D. a & Schwaninger, M. NF-kappaB signaling in cerebral ischemia. *Neuroscience* **158**, 995–1006 (2009).
51. Ekdahl, C. T., Kokaia, Z. & Lindvall, O. Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience* **158**, 1021–9 (2009).
52. Sriram, K. & O’Callaghan, J. P. Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* **2**, 140–53 (2007).
53. Pérez de la Ossa, N. & Dávalos, A. Neuroprotection in cerebral infarction: the opportunity of new studies. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)* **24 Suppl 1**, 153–6 (2007).
54. Auriel, E. & Bornstein, N. M. Neuroprotection in acute ischemic stroke--current status. *Journal of cellular and molecular medicine* **14**, 2200–2 (2010).
55. Broussalis, a. M., Ferraro, G. E., Gurni, A. & Coussio, J. D. Aspectos Fitoquímicos de Especies Argentinas del Género Achyrocline. *Acta Farm. Bonaerense* **8**, 11–16 (1989).
56. Broussalis, a. M., Ferraro, G. E., Gurni, a. & Coussio, J. D. Phenolic constituents of four Achyrocline species. *Biochemical Systematics and Ecology* **16**, 401–402 (1988).
57. Simoes, C. M. O., Schenkel, E. P., Bauer, L. & Langeloh, A. PHARMACOLOGICAL INVESTIGATIONS ON ACHYROCLINEJ SATUREIODES (LAM.) DC., COMPOSITAE. *Journal of Ethnopharmacology* **22**, 281–293 (1988).
58. Hnatyszyn, O. *et al.* Flavonoids from Achyrocline satureioides with relaxant effects on the smooth muscle of Guinea pig corpus cavernosum. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **11**, 366–9 (2004).
59. Retta, D., Dellacassa, E., Villamil, J., Suárez, S. a. & Bandoni, A. L. Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review. *Industrial Crops and Products* **38**, 27–38 (2012).
60. Desmarchelier, C., Coussio, J. & Ciccía, G. Antioxidant and free radical scavenging effects in extracts of the medicinal herb Achyrocline satureioides (Lam.) DC. (“marcela”). *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de*

pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.] **31**, 1163–70 (1998).

61. Arredondo, M. F. *et al.* Cytoprotection by Achyrocline satureioides (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *Journal of ethnopharmacology* **91**, 13–20 (2004).
62. Morquio, A., Rivera-Megret, F. & Dajas, F. Photoprotection by topical application of Achyrocline satureioides ('Marcela'). *Phytotherapy research : PTR* **19**, 486–90 (2005).
63. Polydoro, M. *et al.* Antioxidant, a pro-oxidant and cytotoxic effects of Achyrocline satureioides extracts. *Life sciences* **74**, 2815–26 (2004).
64. De Souza, K. C. B., Bassani, V. L. & Schapoval, E. E. S. Influence of excipients and technological process on anti-inflammatory activity of quercetin and Achyrocline satureioides (Lam.) D.C. extracts by oral route. *Phytomedicine* **14**, 108–108 (2007).
65. Cosentino, M. *et al.* Immunomodulatory properties of Achyrocline satureioides (Lam.) D.C. infusion: a study on human leukocytes. *Journal of ethnopharmacology* **116**, 501–7 (2008).
66. Rivera, F., Gervaz, E., Sere, C. & Dajas, F. Toxicological studies of the aqueous extract from Achyrocline satureioides (Lam.) DC (Marcela). *Journal of ethnopharmacology* **95**, 359–62 (2004).
67. Khan, N. *et al.* Resveratrol and Bioactive Flavonoids in Immune Function. *Dietary Components and Immune Function* 397–420 (2010).doi:10.1007/978-1-60761-061-8
68. Procházková, D., Boušová, I. & Wilhelmová, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia* **82**, 513–23 (2011).
69. Prasain, J., Carlson, S. & Wyss, J. Flavonoids and age-related disease Risk, benefits and critical windows. *Maturitas* **66**, 163–171 (2010).
70. González, R. *et al.* Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. *Critical reviews in food science and nutrition* **51**, 331–62 (2011).
71. Dajas, F. *et al.* Flavonoids and the Brain: Evidences and Putative Mechanisms for a Protective Capacity. *Current Neuropharmacology* **3**, 193–205 (2005).
72. Vauzour, D., Vafeiadou, K., Rodriguez-Mateos, A., Rendeiro, C. & Spencer, J. P. E. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. *Genes & nutrition* **3**, 115–126 (2008).
73. Quiñones, M. & Aleixandre, M. M. A. Los polifenoles , compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular COMPOUNDS WITH BENEFICIAL EFFECTS. *Nutricion Hospitalaria* **27**, 76–89 (2012).
74. Williams, R. J., Spencer, J. P. E. & Rice-Evans, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free radical biology & medicine* **36**, 838–49 (2004).

75. Spencer, J. P. E. Beyond antioxidants: the cellular and molecular interactions of flavonoids and how these underpin their actions on the brain. *The Proceedings of the Nutrition Society* **69**, 244–60 (2010).
76. Ebrahimi, A. & Schluesener, H. Natural polyphenols against neurodegenerative disorders: potentials and pitfalls. *Ageing research reviews* **11**, 329–45 (2012).
77. Spencer, J. P. E., Vafeiadou, K., Williams, R. J. & Vauzour, D. Neuroinflammation Modulation by flavonoids and mechanisms of action. *Molecular aspects of medicine* **33**, 83–97 (2012).
78. Rivera, F. *et al.* Reduction of ischemic brain damage and increase of glutathione by a liposomal preparation of quercetin in permanent focal ischemia in rats. *Neurotoxicity research* **13**, 105–14 (2008).
79. Arredondo, F. *et al.* After cellular internalization, quercetin causes Nrf2 nuclear translocation, increases glutathione levels, and prevents neuronal death against an oxidative insult. *Free radical biology & medicine* **49**, 738–47 (2010).
80. Dajas, F. *et al.* Neuroprotection by flavonoids. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]* **36**, 1613–20 (2003).
81. Dajas, F. Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *Journal of ethnopharmacology* **143**, 383–96 (2012).
82. Dajas, F. *et al.* Cell culture protection and in vivo neuroprotective capacity of flavonoids. *Neurotoxicity research* **5**, 425–32 (2003).
83. Joseph, J., Cole, G., Head, E. & Ingram, D. Nutrition, brain aging, and neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**, 12795–801 (2009).
84. Spencer, J. P. E. Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanisms. *Genes & nutrition* **4**, 243–50 (2009).
85. Kubista, M. *et al.* The real-time polymerase chain reaction. *Molecular aspects of medicine* **27**, 95–125 (2006).
86. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequence.pdf. *Biotechnology* **10**, 413–417 (1992).
87. Harrison, D. C. & Bond, B. C. Quantitative analysis of gene transcription in stroke models using real-time RT-PCR. *Methods in molecular medicine* **104**, 265–84 (2005).
88. Wong, M. L. & Medrano, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* **39**, 75–85 (2005).
89. Giulietti, a *et al.* An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods (San Diego, Calif.)* **25**, 386–401 (2001).

90. Bustin, S. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR). *Journal of Molecular Endocrinology* **29**, 23–39 (2002).
91. Chiang, T., Messing, R. O. & Chou, W.-H. Mouse model of middle cerebral artery occlusion. *Journal of visualized experiments : JoVE* **955**, 9–10 (2011).
92. Delporte, C. *et al.* Analgesic–antiinflammatory properties of *Proustia pyrifolia*. *Journal of ethnopharmacology* **99**, 119–124 (2005).
93. Häke, I. *et al.* Neuroprotection and enhanced neurogenesis by extract from the tropical plant *Knema laurina* after inflammatory damage in living brain tissue. *Journal of neuroimmunology* **206**, 91–9 (2009).
94. Nagakannan, P., Shivasharan, B. D., Thippeswamy, B. S., Veerapur, V. P. & Bansal, P. Protective effect of hydroalcoholic extract of *Mimusops elengi* Linn. flowers against middle cerebral artery occlusion induced brain injury in rats. *Journal of ethnopharmacology* **140**, 247–54 (2012).
95. Chakraborty, R., Biplab, D., Devanna, N. & Sen, S. Antiinflammatory, antinociceptive and antioxidant activities of *Phyllanthus acidus* L. extracts. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* **2**, S953–S961 (2012).
96. Lee, D. *et al.* Neuroprotective effects of *Eleutherococcus senticosus* bark on transient global cerebral ischemia in rats. *Journal of ethnopharmacology* **139**, 6–11 (2012).
97. Dajas, F., Abin-Carriquiry, J. A., Arredondo, F., Echeverry, C. & Rivera-Megret, F. Neuroprotective Actions of Flavones and Flavonols : Mechanisms and Relationship to Flavonoid Structural Features. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry* **13**, 1–6 (2013).
98. Nair, M. P. *et al.* The Flavonoid Quercetin Inhibits Proinflammatory Cytokine (Tumor Necrosis Factor Alpha) Gene Expression in Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells via Modulation of the NF- κ B System. *Clinical and Vaccine Immunology* **13**, 319–328 (2006).
99. Min, Y. *et al.* Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF- κ B and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. *Inflammation Research* **56**, 210–215 (2007).
100. Kelly, G. S. Quercetin. **16**, (2011).
101. Russo, M., Spagnuolo, C., Tedesco, I., Bilotto, S. & Russo, G. L. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochemical pharmacology* **83**, 6–15 (2012).
102. Nickel, T. *et al.* Immunoregulatory effects of the flavonol quercetin in vitro and in vivo. *European Journal of Nutrition* **50**, 163–173 (2011).
103. Clark, W. M. *et al.* Lack of Interleukin-6 Expression Is Not Protective Against Focal Central Nervous System Ischemia Editorial Comment. *Stroke* **31**, 1715–1720 (2000).

104. Shichita, T., Sakaguchi, R., Suzuki, M. & Yoshimura, A. Post-ischemic inflammation in the brain. *Frontiers in Immunology* **3**, (2012).
105. Khandelwal, P. J., Herman, A. M. & Moussa, C. E.-H. Inflammation in the early stages of neurodegenerative pathology. *Journal of neuroimmunology* **238**, 1–11 (2011).
106. Jeong, H.-J. *et al.* Chungsim-Yeunja-Tang decreases the inflammatory response in peripheral blood mononuclear cells from patients with cerebral infarction through an NF- κ B dependent mechanism. *Journal of neuroinflammation* **7**, 85 (2010).
107. Veroni, C. *et al.* Activation of TNF receptor 2 in microglia promotes induction of anti-inflammatory pathways. *Molecular and cellular neurosciences* **45**, 234–44 (2010).
108. Rivera, F., Urbanavicius, J., Gervaz, E., Morquio, A. & Dajas, F. Some aspects of the in vivo neuroprotective capacity of flavonoids: bioavailability and structure-activity relationship. *Neurotoxicity research* **6**, 543–53 (2004).