

TÍTULO. Nuevos mecanismos moleculares y efecto terapéutico de la Ficocianina y sus combinaciones en la Esclerosis Múltiple e Isquemia cerebral.

AUTORES: Giselle Pentón Rol (giselle.penton@cigb.edu.cu)

Otros Autores: Javier Marín Prida, Majel Cervantes Llanos, Alexey Llopiz Arzuaga, Gilberto Pardo Andreu, Nancy Pavón Fuentes, Carmen Valenzuela Silva, Viviana Falcón Cama, Ignacio Hernández González, Eduardo Pentón Arias.

Colaboradores científicos: 42

Centro de trabajo: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

PALABRAS CLAVES: Esclerosis Múltiple, Isquemia cerebral, células T reguladoras, estrés oxidativo, desmielinización, modelos animales

INTRODUCCIÓN

La incidencia de trastornos neurológicos a nivel mundial se ha incrementado en los últimos añosⁱ, por lo que se hace necesaria la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas enfocadas hacia la neuroprotección y la neuroregeneración del tejido dañado.

La Esclerosis Múltiple (EM), es una enfermedad inflamatoria crónica desmielinizante y neurodegenerativa del sistema nervioso central (SNC), que afecta alrededor de 2.5 millones de personas en el mundo, constituyendo la causa más frecuente de alto grado de invalidez neurológica en adultos jóvenesⁱⁱ, especialmente en países desarrollados del hemisferio norte. La forma clínica más frecuente de esta enfermedad (80% de los pacientes) es EM recaída-remisión (EMRR). La cifras de prevalencia de EM en nuestro país se encuentran entre 10-25.5 / 100 000 habitantesⁱⁱⁱ.

Las terapias internacionalmente aprobadas para el período inter-crisis en la EM son el interferón-beta (IFN-beta), Copaxone, Natalizumab y la recién aprobada terapia oral Fingolimod o Gilenya. Estos fármacos son altamente costosos (entre 20 y 60 mil dólares anuales por paciente^{iv}), y tienen relativamente modesto efecto terapéutico, por lo que la búsqueda de nuevos tratamientos constituye un área de investigación de fuerte competitividad^v.

Por otra parte, los Accidentes Cerebro-Vasculares (ACVs) constituyen la tercera causa de muerte en Cuba^{vi} y en el mundo industrializado^{vii}, siendo la primera causa de invalidez y de demencia vascular asociado a un alto costo socioeconómico^{viii}. La estrategia para el tratamiento de la isquemia cerebral en su fase aguda tiene dos objetivos principales: la restauración del flujo sanguíneo cerebral (trombolisis) y la limitación de la pérdida neuronal (neuroprotección). La terapia trombolítica con el factor activador del plasminógeno tisular (t-PA) es hasta el momento el único tratamiento farmacológico aprobado en humanos para las primeras horas después del daño isquémico, pero solamente un 10% de los pacientes logran ser intervenidos a tiempo debido, entre otras causas, a la relativamente corta ventana terapéutica (4.5 h)⁸, y su aplicación se asocia con el riesgo de hemorragia intracerebral. A pesar del entendimiento cada vez mayor de los procesos bioquímicos, genéticos y moleculares que tienen lugar durante el proceso isquémico cerebral, el desarrollo de nuevas estrategias neuroprotectoras eficaces ha sido largamente infructuoso^{ix,x,xi}.

Evidencias tanto de tipo circunstancial como de carácter experimental sugieren el uso de un grupo de productos de origen natural con propiedades potencialmente terapéuticas.

Entre los posibles candidatos del repertorio de productos naturales se ha escogido especialmente la biliproteína C-Ficocianina (C-Fc).

La C-Fc es la principal ficobiliproteína presente en la cianobacteria *Spirulina platensis*. Posee una subunidad α y una β con un peso molecular de 20.5 y 23.5 kDa respectivamente.

Desde la década de 1970 y con mucha más fuerza en la década de los años '90, se han llevado a cabo numerosos estudios tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”, que avalan un grupo importante de propiedades farmacológicas tanto de la Espirulina[®] (extracto proteico obtenido de la *S. platensis*) como de la C-Fc, donde varios de los protagonistas de dichos estudios han sido

investigadores cubanos. De este amplio arsenal, se destacan entre otras, sus propiedades como antioxidante y anti-inflamatorio^{xii,xiii,xiv}.

El efecto antioxidante de la C-Fc ha sido evaluado “*in vitro*” a partir de diferentes técnicas. Se ha demostrado la capacidad de esta molécula para actuar como secuestrador de radicales peroxilos (ROO[·])^{xv}, hidroxilos (·OH), y alcoxilos (RO[·])¹⁴, así como inhibidora de la peroxidación lipídica (POL)^{xvi}.

Entre los resultados que avalan las propiedades anti-inflamatorias de la C-Fc, destacan entre otros, los obtenidos por González y col.^{xvii} en un modelo de colitis inducida en ratas por ácido acético. Los estudios histopatológicos y ultraestructurales en tejido proveniente del colon, mostraron una inhibición de infiltrados inflamatorios y una reducción del daño en las ratas tratadas con C-Fc

El papel neuroprotector de la C-Fc ha sido examinado en modelos “*in vitro*” e “*in vivo*”. Tanto en cultivos de células granulares cerebrales expuestas a un ambiente neurotóxico de ausencia de potasio y suero, como en el neuroblastoma humano SH-SY5Y bajo la toxicidad del hierro, la C-Fc fue capaz de prevenir la muerte neuronal^{xviii,xix}. En ratas sometidas a un daño cerebral excitotóxico inducido por ácido kaínico, agonista del glutamato, las alteraciones conductuales características de este modelo (que incluyen sacudidas y temblores) fueron significativamente atenuados por efecto de la C-Fc^{xx}.

Los antecedentes previamente expuestos, acerca de las propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias y citoprotectoras (incluyendo neuroprotectoras) reportadas para la C-Fc nos plantearon una racional hipótesis sobre la evaluación de su uso en la EM, enfermedad desmielinizante con un fuerte componente neurodegenerativo, y en la Isquemia Cerebral, trastorno cerebrovascular asociado a una alta mortalidad.

OBJETIVOS

La presente investigación tuvo como objetivo general evaluar el posible efecto neuroprotector de la C-Fc y combinaciones con la misma, en modelos experimentales de EM y de IC, así como determinar los mecanismos moleculares implicados.

FLUJO EXPERIMENTAL

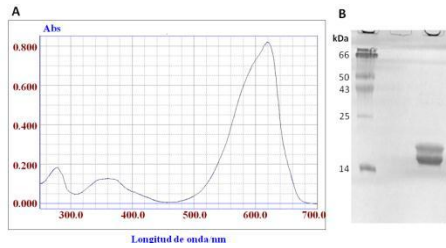
1. Obtención y caracterización de C-Fc.
2. Demostración de inducción de células T reguladoras.
3. Evaluación de la C-Fc en modelo animal de EAE.
4. Combinaciones con C-Fc para la EM.
5. Demostración del efecto neuroprotector de la C-Fc en modelos experimentales de Isquemia Cerebral

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Obtención y caracterización de C-Fc

La C-Fc fue purificada según Rito-Palomares y cols.^{xxi} con algunas modificaciones, logrando una preparación con calidad analítica (relación $A_{620}/A_{280} > 4$, indicativo de una pureza superior de 90%). Su caracterización, demostró que predominaba la forma trimérica de la proteína. Además, por espectrometría de masas de una digestión triptica de la proteína se identificaron **17 péptidos diferentes de ambas cadenas polipeptídicas α y β , lo cual constituye un aporte novedoso del presente estudio.** (Figura 1)

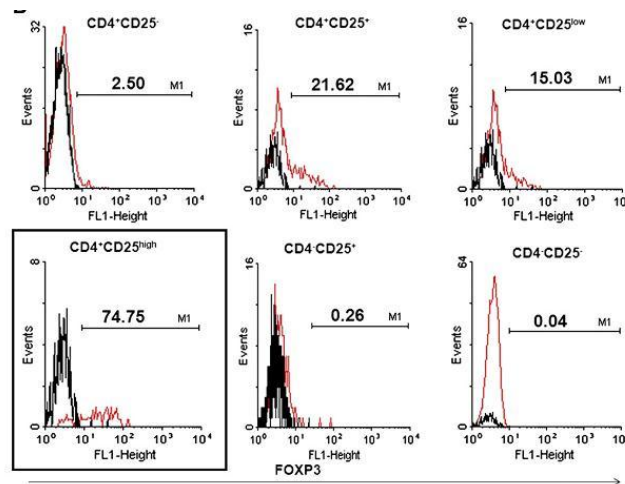
Figura 1



2. C-Fc induce células T reguladoras a partir de células mononucleares de pacientes EM

Varios estudios realizados tanto en roedores con Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE), modelo que remeda la fisiopatología de la EM, como en pacientes de esta enfermedad, sugieren que las denominadas células T reguladoras (Treg) son responsables de mantener la tolerancia a los antígenos propios durante el ataque inmunológico agudo, logrando modificar y atenuar la severidad del daño tisular^{xxii}. En nuestra investigación, se identificó que la C-Fc era capaz de inducir una población de Treg “*in vitro*” en células mononucleares (CMN) aisladas de pacientes EM recaída-remisión (EMRR). Utilizando la técnica “Real Time PCR semi-cuantitativo”, encontramos que la C-Fc moduló positivamente la expresión génica de marcadores de células Treg: CD25, Foxp3, TGF-β e IL-10. Este resultado fue corroborado mediante citometría de flujo al identificar una población de células CD4+CD25^{high} correspondiente a fenotipo Treg, la cual se incrementó de manera dosis-dependiente por efecto de la C-Fc. Para demostrar que la C-Fc inducía una población reguladora (y no una activada), se midió la expresión de CD69, marcador de activación temprana, sin observarse modulación de este marcador como era esperado. Finalmente, la demostración de que el 74,25% de las células CD4+CD25^{high} eran Foxp3+, indicaba que C-Fc inducía una población de células Treg auténticas (Figura 2).

Figura 2



En nuestro estudio demostramos una nueva propiedad de la C-Fc: la inducción de células T reguladoras. Este es, quizás, el principal aporte desde el punto de vista mecanístico realizado por esta investigación que revela la aplicación de enfoques relativamente recientes, confirmando la autenticidad del paradigma de la Tolerancia Dominante en las enfermedades autoinmunes.

3. Efecto de la C-Fc en modelos de EAE

Las potencialidades terapéuticas de la C-Fc para la EM se exploraron en dos modelos experimentales que reproducen diversos patrones de la enfermedad: el modelo de EAE agudo monofásico en ratas Lewis y el crónico progresivo en ratones C57BL6.

En ratas Lewis con EAE, la administración terapéutica diaria de C-Fc (25 mg/Kg) por vía i.p. a partir del día 0 (inmunización con el encefalitógeno) hasta el día 12 post-inducción redujo significativamente el puntaje clínico promedio respecto al grupo EAE, el cual por el contrario, mostró un agravamiento de los signos clínicos. El esquema profiláctico comenzó 12 días antes y se extendió hasta el día de la inmunización usando las mismas condiciones, y logró prevenir el desarrollo de la enfermedad en todos los animales. Este efecto clínico positivo fue acompañado por una reducción significativa del daño oxidativo a lípidos y a proteínas en ambos esquemas, tanto en homogenado de cerebro como en suero. El análisis ultraestructural de tejido cerebral por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) mostró desorganización de la vaina de mielina

daño axonal hipertrofia de mitocondrias EAE, que el con C-Fc integridad de la VM sin signos de axonal con similar a los normales.

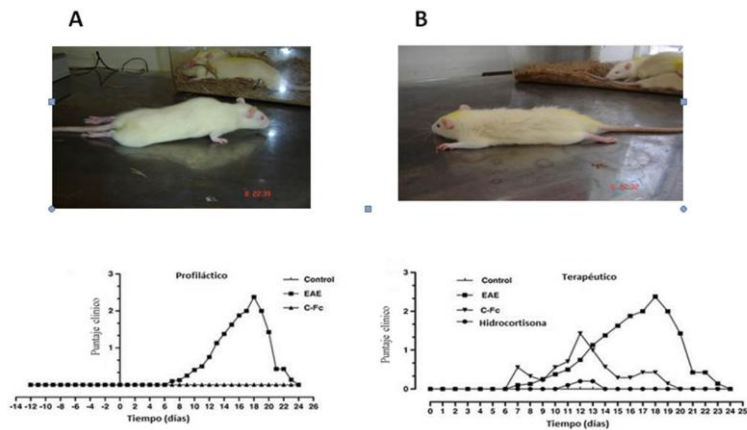
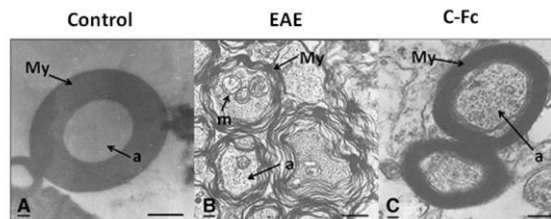


Figura 3



(VM), e las mientras tratamiento mantuvo la estructural mostrar daño un patrón animales (Figura 3)

Utilizando los mismos esquemas de tratamientos anteriores, se evaluó la C-Fc con un 30% de pureza obtenida de dos fuentes diferentes: una de la empresa Bidelta Ltd., Sudáfrica, y la otra nacional producida en el CIGB, ambas administradas por vía oral a una dosis de 200 mg/Kg. El tratamiento oral mostró un comportamiento clínico similar al de la vía i.p. Asimismo, ambas formulaciones en un mismo esquema de tratamiento no mostraron diferencias clínicas estadísticamente significativas, lo que indica que ambas fueron igualmente efectivas. Los

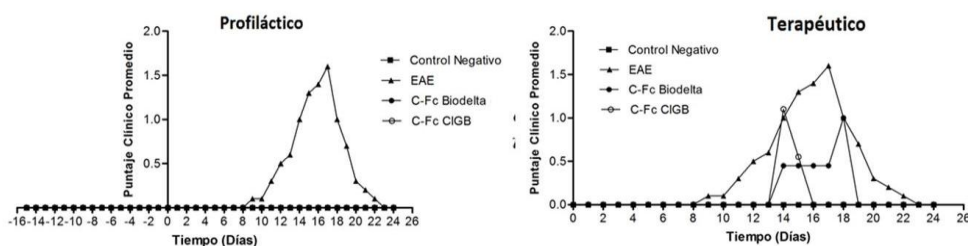
patrones ultraestructurales estudiados por MET demostraron que ambos productos, “C-Fc Biodelta” y “C-Fc CIGB”, fueron efectivos en la preservación anatómica y/o restauración de la VM, así como en la conservación adecuada de la estructura axonal. (Figura 4)

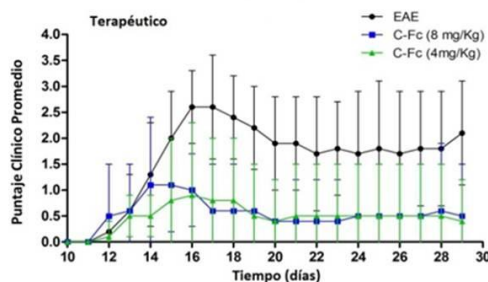
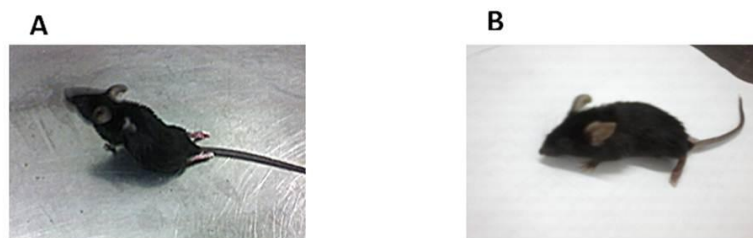
Figura 4

En conjunto, estas evidencias corroboran el efecto neuroprotector de C-Fc en el modelo de EAE en ratas Lewis con independencia de la vía de administración y la procedencia de la misma.

En el modelo de EAE en ratones C57BL6, la C-Fc (dosis de 4 y 8 mg/Kg) fue administrada diariamente por vía i.p. a partir del comienzo de los signos clínicos para cada animal individualmente. Ambas dosis evaluadas de C-Fc redujeron significativamente el puntaje clínico respecto al grupo EAE, sin evidenciarse diferencias entre ellas. El estudio histológico e inmunohistoquímico de médula espinal reveló efectos positivos de la C-Fc. Ambas dosis evaluadas disminuyeron la presencia de infiltrados inflamatorios, a expensas de linfocitos, macrófagos y microglía activada (evidenciado por inmunomarcaje con CD3 y MAC3 respectivamente), el daño neuronal (evidenciado por acumulación de la Proteína Precursora Amiloide) y la desmielinización. (Figura 5)

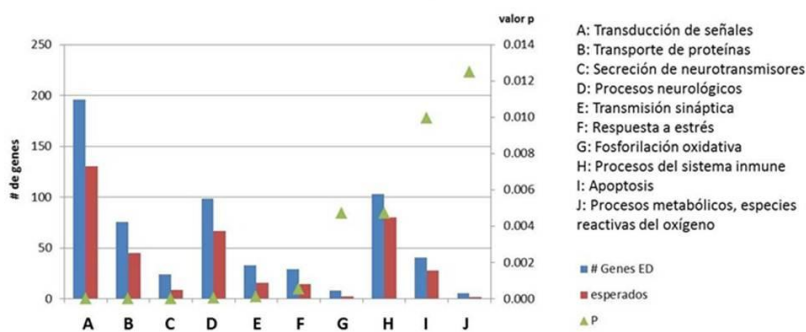
Figura 5





De esta forma, aporte novedoso este estudio la

otro de fue



demonstración de la acción positiva de la C-Fc una vez que los signos clínicos se habían instaurado en el animal, lo que sugiere un efecto neuroregenerador y de recuperación, además de protector.

En nuestro estudio también realizamos un “Microarray (Illumina MouseWG-6_V2)” que midió el perfil de expresión del genoma completo en ratones C57BL6 tratados con C-Fc en tejido cerebral, observándose la modificación significativa en la expresión de 918 genes. De esta manera, en el presente estudio se describen, por primera vez, un grupo de genes modulados por C-Fc, asociados a procesos de remielinización, interacción axón-glia y gliogénesis.

4. Combinaciones con la C-Fc para el tratamiento de la Esclerosis Múltiple

La combinación de inmunomoduladores aprobados para la EM con la C-Fc, molécula con capacidad neuroprotectora, permitiría actuar simultáneamente sobre diferentes blancos fisiopatológicos de la enfermedad. En la siguiente etapa de nuestro estudio se evaluó la combinación de los interferones tipo I (IFN-alfa e IFN-beta) con la C-Fc en ratones C57BL6 con EAE. El IFN-alfa resulta de gran importancia estratégica para nuestro país ya que se produce en territorio nacional, específicamente en el CIGB. Los resultados revelaron que **la combinación IFN-alfa/C-Fc tuvo un efecto clínico superior a los principios activos independientes (IFN-alfa y C-Fc) y al IFN-beta solo**. Además, se evaluó por citometría de flujo la presencia de una población reguladora en células esplénicas de los animales tratados con la combinación IFN-alfa/C-Fc o sus principios activos independientes. Los resultados indican un aumento estadísticamente significativo de células de fenotipo CD4+Foxp3+ (Treg) por efecto de la combinación IFN-alfa/C-Fc. De esta forma, **corroboramos “in vivo” la inducción de células Treg por C-Fc observada “in vitro” en CMN de pacientes con EMRR. La inducción de células Treg por C-Fc “in vitro” e “in vivo” y su potenciación por la combinación con IFN-alfa, constituye uno de los aportes mayores de este trabajo, al evidenciar que la restauración del equilibrio efector-regulador por inducción del componente regulador es una de las estrategias terapéuticas plausibles en las enfermedades autoinmunes y uno de los mecanismos moleculares de acción de la C-Fc que se potencia en la combinación con IFN-alfa.**

La identificación del patrón de citoquinas asociado a cada tratamiento mediante “Real Time PCR cuantitativo” mostró una expresión elevada del gen de IL-17 en los ratones EAE, de forma similar a reportes previos^{xxiii}, y disminuida por efecto de ambos IFNs tipo I, así como de la C-Fc. La combinación IFN-alfa/C-Fc abolió la expresión de IL-17. Este resultado fue corroborado al medir los niveles séricos de la proteína de IL-17 por “Bioplex”. Otras mediciones reflejaron un aumento de citoquinas pro-inflamatorias (TNF-alfa e IL-1beta) en animales con EAE, la cual fue disminuida con los tratamientos independientes y con la combinación IFN-alfa/C-Fc.

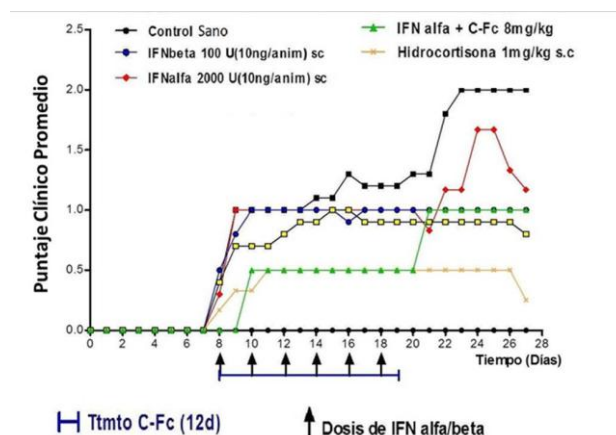
Por otro lado, la MET mostró que el patrón de desmielinización asociado a la EAE no fue modificado por el IFN-alfa solo, mientras que la C-Fc individual o la combinación mostraron un patrón similar al del animal control negativo (o sano), con mielina densa y compacta, reflejando que la C-Fc remieliniza, aspecto muy importante en una terapia para la EM.

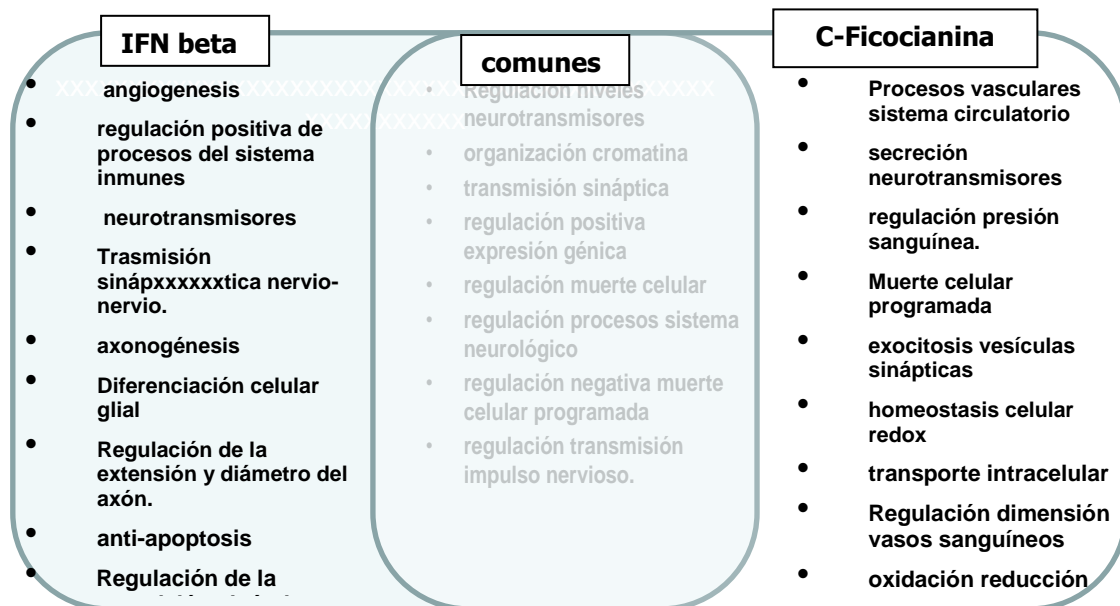
Utilizando también un “Microarray (Illumina MouseWG-6_V2)” del genoma completo a partir de tejido cerebral, **se identificaron procesos biológicos específicos para IFN-beta y para C-Fc, y comunes para ambos, dirigidos a diferentes puntos del mecanismo fisiopatológico de la EM, de manera que se potencian en algunas propiedades y se complementan en otras, constituyendo una combinación terapéutica potencialmente más efectiva.**

En conclusión, nuestra investigación aporta evidencias experimentales que avalan la racionalidad de una terapia combinada de los IFNs tipo I con la C-Fc en EM.

(Figura 6)

Figura 6





5. Efecto neuroprotector de la C-Fc en modelos experimentales de Isquemia Cerebral

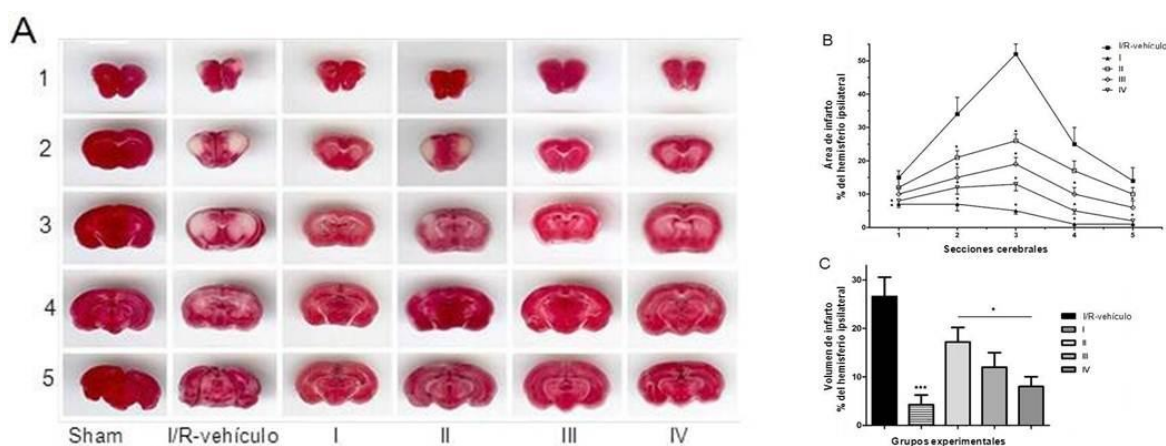
En la presente investigación se utilizaron varios sistemas experimentales descritos, tanto *in vitro* como *in vivo*, que reproducen diversos aspectos fisiopatológicos de la IC. La mitocondria regula las cascadas intracelulares de muerte celular, especialmente en el ictus isquémico. En este estudio hemos observado un hinchamiento significativo de mitocondrias cerebrales sometidas a una sobrecarga de Ca^{2+} y fosfato inorgánico (Pi), posiblemente debido a la denominada Transición de Permeabilidad Mitocondrial (TPM)^{xxiv}. La C-Fc previno este proceso de forma dosis-dependiente, llegando a su completa inhibición. En experimentos electroquímicos, demostramos que la disipación del potencial de membrana mitocondrial por efecto del Ca^{2+} (hasta un 42,1% del control sin daño), fue prevenido parcialmente por la C-Fc hasta un 65,6%. Mediante “western blot”, se detectó una importante liberación del citocromo *c* en presencia de Ca^{2+} /Pi, mientras que el tratamiento con la C-Fc produjo una inhibición dosis-dependiente de este evento pro-apoptótico llegando hasta un 40% del nivel de Ca^{2+} /Pi. Además, demostramos que la C-Fc logró disminuir la acumulación de Especies Reactivas del Oxígeno inducida por Ca^{2+} /Pi de manera dosis-dependiente, lo cual a su vez inhibe la TPM. **Estos resultados demuestran, por primera vez, que la C-Fc es capaz de prevenir eventos pro-apoptóticos en mitocondrias aisladas de cerebro de rata que juegan un papel fundamental en la fisiopatología de la isquemia cerebral.**

En experimentos con líneas neuronales, la C-Fc fue capaz de proteger y recuperar completamente la viabilidad celular de forma dosis-dependiente, tanto en las células PC12 (feocromocitoma de rata) frente al H_2O_2 o a la excitotoxicidad inducida por el glutamato, como en las SH-SY5Y (neuroblastoma humano) sometidas al efecto pro-oxidante del peróxido de terbutilo.

Por otro lado, en gerbils de Mongolia sometidos a una Isquemia/Reperusión (I/R) Cerebral global, observamos un deterioro neurológico significativo en el grupo I/R-vehículo a las 24h después de la cirugía. La C-Fc_{30%} (Biodelta Ltd.), tanto en esquema profiláctico oral diario por una semana (200 mg/Kg) como en dosis terapéuticas por vía i.p. (50, 75 y 100 mg/Kg, 30 min, 3, 6 y 12 h después de la I/R), produjeron una notable mejoría neurológica en los animales. Al mismo tiempo, se evaluó el volumen de infarto cerebral (VIC) usando la tinción con TTC. El grupo sham no mostró daño isquémico. La C-Fc_{30%} redujo significativamente el VIC hasta 4,3% (profiláctico), y hasta 17,2%, 12% y 8% (terapéutico con 50, 75 y 100 mg/Kg, respectivamente), comparado con los 26,6% del grupo I/R-vehículo. El estudio de sobrevivencia durante 7 días mostró una disminución significativa en el grupo I/R-vehículo (37,1%), efecto significativamente revertido por la C-Fc_{30%} (profiláctico: 63,3%; terapéutico: 51,3%, 61,5 y 65%, respectivamente). La histología con H/E en el hipocampo, arrojó efectos

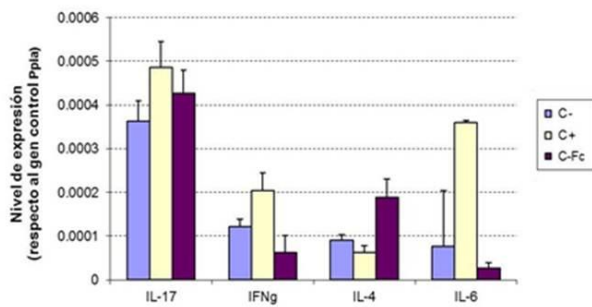
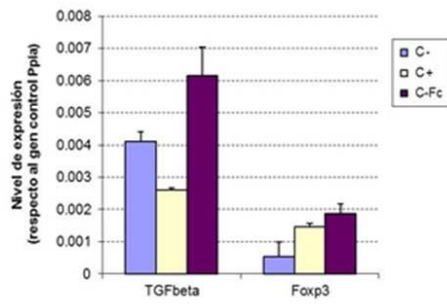
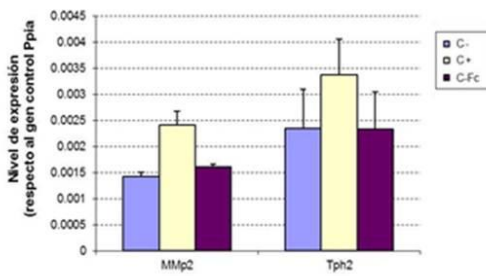
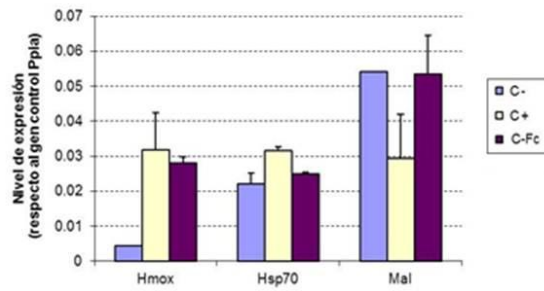
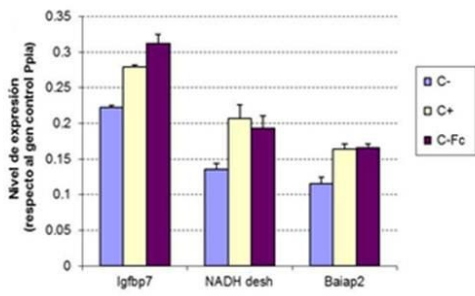
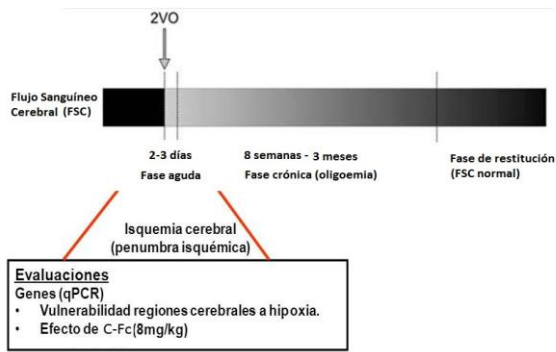
neurodegenerativos significativos en sus cuatro regiones (CA1-4) como consecuencia del evento isquémico, mientras que ambos esquemas con C-Fc_{30%} previnieron la pérdida neuronal en CA2, CA3 y CA4. La evaluación de dosis equivalentes de C-Fc_{30%} y C-Fc_{90%} (CIGB, Cuba) sobre el VIC, mostró una disminución similar de esta variable a las 24 h después de la I/R. **Este resultado demuestra que la C-Fc es el principio activo responsable del poderoso efecto neuroprotector frente a la IC observado con la C-Fc_{30%}.** Además, la C-Fc_{30%} logró reducir significativamente marcadores de daño oxidativo en suero y en cerebro, así como la hiperactividad y la dificultad para adaptarse a un ambiente nuevo observado en el grupo I/R-vehículo. En conjunto, **nuestro estudio constituye el primer reporte donde se demuestra el efecto neuroprotector, tanto profiláctico como terapéutico, de la C-Fc en el modelo de IC global en gerbils de Mongolia, mediante variables neurológicas, conductuales, histológicas y bioquímicas.** (Figura 7)

Figura 7



Por otro lado, también evaluamos la modulación de un grupo de genes utilizando la técnica “Real Time PCR cuantitativo”, en ratas sometidas a una Hipoperfusión Cerebral Crónica (HCC), situación que remeda las condiciones de la “zona de penumbra”. Al evaluar la expresión de 7 genes relacionados con la IC (Gfap, MMP-2, Tph2, NADH desh, Baiap2, Hmox y Hsp70) en 6 regiones cerebrales diferentes (corteza anterior, corteza posterior, cuerpo estriado, hipocampo, bulbo olfatorio y cerebelo), encontramos que **en la fase aguda del modelo de HCC, la corteza anterior es una de las zonas más vulnerables a la hipoxia.** A partir de este resultado, se evaluó el efecto de la C-Fc (8 mg/Kg i.p., similar al esquema terapéutico en gerbils) sobre la expresión de 14 genes. Los animales lesionados mostraron una modulación positiva de algunos genes en respuesta a la hipoxia, lo que refleja mecanismos de neuroprotección endógena, y que a su vez, también fueron inducidos por C-Fc, tales como NADH desh (metabolismo energético), Baiap2 (aclaramiento de células apoptóticas), Igfbp7 (regulación de la apoptosis), Hmox (degradación del grupo hemo y regulación del hierro) y Hsp70 (chaperona intracelular). La C-Fc también moduló positivamente el gen Mal (biogénesis de la mielina), al contrario del grupo HCC, sugiriendo un rol positivo en la remielinización. Además, observamos un incremento de la expresión de genes para citoquinas pro-inflamatorias por efecto de la HCC (IL-17, IFN γ e IL-6) y para MMP-2 (degradación de la matriz extracelular asociada a la disrupción de la Barrera Hematoencefálica), que fue disminuido por la C-Fc. Este resultado (IL-6 disminuida y TGF-beta aumentado) por efecto de la C-Fc, sugiere la polarización de la respuesta inmune hacia un fenotipo regulador, lo cual es beneficioso en el contexto de la IC^{xxv}. En resumen, **este es el primer estudio que identifica modulación génica por C-Fc en el modelo de HCC, que contribuyen a explicar el efecto neuroprotector descrito para esta molécula.** (Figura 8)

Figura 8



CONCLUSIONES

En esta investigación se hacen los siguientes aportes:

- Se demuestra una nueva propiedad para la C-Ficocianina (C-Fc) en EM: inducción de células T reguladoras, que confirma la autenticidad del paradigma de la Tolerancia Dominante en las enfermedades autoinmunes.
- Se evidencia el efecto neuroprotector de C-Fc en modelos de Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (EAE) monofásico agudo y crónico progresivo, lo que constituye el primer reporte del efecto de C-Fc en un modelo animal de EM.
- Se describen, por primera vez, un grupo de genes modulados por C-Fc, asociados a procesos de remielinización, interacción axón-glia y gliogénesis.
- Se demuestra superioridad de la combinación C-Fc con IFNs tipo I, que justifica la racionalidad de una novedosa terapia combinada.
- Se evidencia, por primera vez, un efecto protector de la C-Fc en mitocondrias de cerebro, al prevenir la muerte celular y la ocurrencia de eventos pro-apoptóticos mitocondriales.
- Se demuestra, por primera vez, que el tratamiento con la C-Fc ejerce un potente efecto neuroprotector en un modelo de isquemia/reperfusión (I/R) global y en un modelo de hipoperfusión cerebral crónica. Estos resultados convierten a la C-Fc en un fuerte candidato terapéutico para la IC.

Los resultados están avalados por 4 publicaciones internacionales, 19 participaciones en eventos, 2 Posters premiados, 5 Tesis de Maestría y 2 de Diploma, 2 Logros Institucionales CIGB y 2 Patentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

-
- ⁱ Organización Mundial de la Salud. Atlas: Country resources for neurological disorders, 2011. (Folleto en Internet) (acceso 28 abril 2011). Disponible en: http://www.who.int/mental_health/neurology/epidemiology/en/index.html
- ⁱⁱ Holmøy T y Vartdal F. *Scand J Immunol* 2007; 66: 374–382.
- ⁱⁱⁱ Cabrera-Gómez JA y López O. *Rev Cub Med* 1985, 24: 58-69.
- ^{iv} WAC derived from Red Book, April 2009. Drug Topics Red Book. 112 ed. Montvale, NJ: Thomson Healthcare; 2008.
- ^v Huynh T. *Nat Rev Drug Disc* 2010; 9: 759-760.
- ^{vi} Ministerio de Salud Pública, Cuba. Anuario estadístico de salud, 2010. (Folleto en internet) (acceso 24 abril 2011.) Disponible en: www.infomed.sld.cu/servicios/estadisticas/.
- ^{vii} Organización Mundial de la Salud. Global Status Report on Noncommunicable Diseases, 2010. (Folleto en Internet) (acceso 28 abril 2011). Disponible en: http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/.
- ^{viii} Payne KA y cols. *Pharmacoeconomics* 2002; 20: 813–825.
- ^{ix} Yepes MS. *Rev Neurol* 2001; 32: 259-266.
- ^x Ginsberg MD. *Neuropharmacol* 2008; 55: 363-389.
- ^{xi} O'Collins VE y cols. *Ann Neurol* 2006; 59: 467–477.
- ^{xii} Romay C y cols. *Inflamm Res* 1998a; 47: 36-41.
- ^{xiii} Upasani CD y Balaraman R. *Phytother Res* 2003; 17: 330-334.
- ^{xiv} Wu LC y cols. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 4207-4212.
- ^{xv} Bhat VB y Madyastha KM. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 275: 20-25.
- ^{xvi} Romay C y cols. *Inflamm Res* 1998b; 47: 334-338.
- ^{xvii} González R y cols. *Pharmacol Res* 1999; 39: 55-59.
- ^{xviii} Rimbau V y cols. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001; 364: 96-104.
- ^{xix} Bermejo P y cols. *Food Chem* 2008; 110: 436-445.
- ^{xx} Rimbau V y cols. *Neurosci Lett* 1999; 276: 75-78.
- ^{xxi} Rito-Palomares y cols. *J Chem Tech Biotech* 2001; 76: 1273–1280.
- ^{xxii} Viglietta V y cols. *J Exp Med* 2004; 199: 971–979.
- ^{xxiii} Komiyama Y y cols. *J Immunol* 2006; 177: 566-573.
- ^{xxiv} Kristal BS y Dubinsky JM. *J Neurochem* 1997; 69: 524-538.
- ^{xxv} Planas AM y cols. *Nat Med* 2009; 15: 138 – 139.