



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 282 405**

⑤1 Int. Cl.:
A61K 35/14 (2006.01)
A61K 41/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **02717908 .4**
⑧6 Fecha de presentación : **08.04.2002**
⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1379260**
⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **14.01.2004**

⑤4 Título: **Método para el tratamiento inflamatorio de una encefalopatía.**

③0 Prioridad: **06.04.2001 US 282120 P**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.10.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.10.2007

⑦3 Titular/es: **Vasogen Ireland Limited**
Shannon Airport House
Shannon, County Clare, IE

⑦2 Inventor/es: **Bolton, Anthony, E. y**
Mandel, Arkady

⑦4 Agente: **Cañadell Isern, Roberto**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para el tratamiento inflamatorio de una encefalopatía.

5 La invención se centra en unos métodos para el tratamiento del componente inflamatorio de encefalopatías en pacientes mamíferos y, más particularmente, para el tratamiento de aquellas neuropatologías del cerebro en las que desempeñan un papel considerable unas especies reactivas del oxígeno en la patología inflamatoria subyacente.

10 No están claras las circunstancias que conducen a neuropatologías, con un componente inflamatorio considerable (que incluyen la miastenia gravis, GBS CIDP y la esclerosis múltiple), aunque parecen ser críticas las siguientes etapas esenciales: (1) la ruptura de tolerancia, un proceso en el que las citoquinas, el mimetismo molecular o los superantígenos pueden desempeñar un papel para hacer que células T previamente energéticas reconozcan autoantígenos neurales. (2) Reconocimiento de antígeno por el complejo receptor de célula T y procesamiento del antígeno por medio del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I o II. (3) Factores co-estimuladores, especialmente B7 y proteínas de fijación B7 (CD28, CTLA-4) y molécula de adhesión intercelular (ICAM-1) y su ligando (LFA)-1 asociado-función leucocito. (4) Tránsito de las células T activadas por la barrera sangre-cerebro o sangre-nervio, a través de una serie de moléculas de adhesión que incluyen selectinas, integrinas celulo-cíticas (LFA-1Mac-1, antígeno de activación muy tardía (VLA-4) y su contrarreceptores (ICAM-1, molécula de adhesión vascular (VCAM)) o sobre las células endoteliales. (5) Daño histológico cuando las células T activadas, macrófagos o auto-anticuerpos específicos encuentran sus "blancos" antigénicos en células glial, mielina, axón, canales de calcio o músculo en el diseño de inmunoterapia específica, es preciso considerar los componentes principales involucrados en cada etapa de la respuesta inmune. Como "blancos" para la terapia específica en neuropatías se pueden citar los agentes y tratamientos que (a) interfieren o compiten con el reconocimiento o la estimulación antigénica; (b) inhiben las señales co-estimuladoras o citoquinas; (c) inhiben el tránsito de las células activadas hacia los tejidos y (d) intervienen en las zonas de reconocimiento antigénico en el órgano al que se apunta.

30 Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son formas activadas de oxígeno, que comprenden anión superóxido (O_2^-) y radicales hidroxilo ($HO^\bullet$) junto con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y diversos intermedios inestables de la peroxidación lipídica. Son generadas como resultado de metabolismo aeróbico. El tejido encefálico neuronal es particularmente susceptible a los daños oxidativos debidos a un consumo de oxígeno elevado y su sistema de defensa antioxidante limitado. La formación de especies reactivas del oxígeno tienen, al parecer, un impacto en la plasticidad sinóptica, la señalización celular y el proceso de envejecimiento. Se ha demostrado que existe un aumento, relacionado con la edad, en la producción de especies reactivas del oxígeno (Martin *et al.*, 2000) y se ha mostrado también que la acumulación de especies reactivas del oxígeno aumenta en el hipocampo como consecuencia de la administración periférica de LPS (Vereker *et al.*, 2000a). Esto es mimetizado por la administración de IL-1 β (Vereker *et al.*, 2000b). O'Donnell y colaboradores (2000) han comunicado cambios paralelos en la formación de especies reactivas del oxígeno y la producción de IL-1 β . Se ha visto que la formación de especies reactivas del oxígeno es la causante de un incremento en la producción de IL-1 β , mientras que IL-1 β tiene la aptitud para inducir la formación de especies reactivas del oxígeno, lo que sugiere la existencia de un bucle de realimentación positiva que resulta potencialmente dañino para las células.

El aumento en las concentraciones de IL-1 β está también estrechamente relacionado con la degeneración neuronal (Mogi *et al.*, 1996, Tanneti *et al.*, 1998).

45 La actividad potenciada de la quinasa activada por estrés c-Jun NH₂-quinasa terminal (JNK) está asociada con la degeneración y la muerte celular (Park *et al.*, 1996; Maroney *et al.*, 1998) y según se ha observado, es activada en el hipocampo por diversos agentes, incluye el peróxido de oxígeno, un inductor de la producción de especies reactivas del oxígeno y citoquinas pro-inflamatorias.

50 Otro ejemplo de déficit encefálico neuronal inducido por IL-1 β y LPS es el deterioro de la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo (Vereker *et al.*, 2000a; Murray & Lynch, 1998). LTP es una forma de plasticidad sinóptica, descrita inicialmente en el hipocampo, una región del cerebro que resulta particularmente vulnerable a la degeneración, asociada con disfunción cognitiva. Sobre la base de esta y ulteriores observaciones, LTP ha sido propuesto como sustrato biológico para el aprendizaje y la memoria (Bliss & Collingridge, 1993).

55 Ciertos trastornos neuroencefálicos, como el síndrome de Down (Layton *et al.*, Kedziora *et al.*, Schchmann *et al.*), epilepsia, traumatismo encefálico (por ejemplo daño físico del cerebro, como conmoción cerebral (Layton *et al.*, Wildburgur *et al.*, Trembovler *et al.*), y la enfermedad de Huntington (chorea) (Green), suponen, según se entiende actualmente, la inflamación de células encefálicas como componente significativo de la patología subyacente del trastorno. Esta inflamación podría ser la consecuencia de una o más variedades de procesos biológicos, tales como la generación de cantidades excesivas de citoquinas inflamatorias, como IL-1 β y TNF- α en las células del cerebro u otros componentes del tejido encefálico, quizás asociado con la presencia de elevadas concentraciones de especies reactivas del oxígeno, en el tejido encefálico, lo cual se correlaciona con niveles elevados de daño histológico o exacerbación de la enfermedad. Las especies reactivas del oxígeno constituyen unos de los efectores de inflamación histológica, como el tejido encefálico.

Otras neuropatías que tienen un componente inflamatorio importante son, entre otras: el síndrome de Guillain-Barré (GBS), la polineuropatía demielinizante inflamatoria crónica (CIDP), la miastenia gravis (MG), la dermato-

miositis, polimiositis, la miositis de cuerpos de inclusión, el post-ictus, la neurosarcoidosis, la demencia vascular, el trauma cerrado de la cabeza, el vasospasmo, la hemorragia subaracnoide, la distrofia leucocítica adrenal (trastornos de almacenamiento/acumulación, la dermatomiositis de cuerpos de inclusión, el deterioro cognitivo mínimo y la distrofia muscular de Duchenne.

La polineuropatía demielinizante inflamatoria crónica (CIDP) es una neuropatología caracterizada por debilidad, de progresión lenta y disfunción sensorial de las piernas y los brazos. La patología, que recibe algunas veces el nombre de polineuropatía de recaída crónica, es causada por daños en la vaina de mielina de los nervios periféricos. La CIDP se puede presentar en cualquier edad y en ambos sexos aunque es más frecuente en adultos jóvenes y en los hombres que en las mujeres. Los síntomas principales son una debilidad muscular de progresión lenta y disfunción sensorial que afecta las extremidades superiores e inferiores. Otros síntomas pueden ser la fatiga; sensaciones anormales que incluyen sensación de quemazón, entumecimiento y/o hormigueo, (que comienza en los dedos del pie y de la mano); parálisis de los brazos y de las piernas; reducción o ausencia de reflejos del tendón profundo (arreflexia) y sensaciones dolorosas que afectan diversos grupos musculares.

CIDP está estrechamente relacionada con la neuropatía demielinizante aguda, más común, conocida con el nombre de Síndrome de Guillain-Barré (GBS). CIDP se considera como el equivalente crónico de la patología aguda GBS. CIDP se distingue de GBS principalmente por el pronóstico y la evolución clínica. No obstante, ambas patologías presentan características clínicas similares y ambas comparten la disociación albúmina-citológica CSF y las anomalías patológicas de la demielinización segmentaria inflamatoria multifocal con las características de conducción nerviosa asociadas que reflejan la demielinización.

El síndrome de Guillain-Barré (GBS) es una polineuropatía aguda predominantemente motora con recuperación espontánea, que puede conducir a cuadriparesis severa y requiere ventilación artificial en el 20-30% de los pacientes. Los trastornos que subyacen a este síndrome han sido clasificados como polineuropatía demielinizante inflamatoria aguda (AIDP), la forma más común, neuropatía axonal sensorial y motriz aguda (AMSAN), y neuropatía axonal motriz aguda (AMAN). El síndrome de Fisher es una variante del nervio craneal de GBS que suele traducirse en oftalmoplejía, ataxia y areflexia. GBS va muchas precedida de infección por *Campylobacter jejuni*, lo más común, citomegalovirus (CMV), virus Epstein-Barr o *Mycoplasma pneumoniae*.

La miastenia gravis autoinmune (MG) es un trastorno de transmisión neuromuscular que conduce a debilidad fluctuante y cansancio anormal. La debilidad se atribuye al bloqueo de receptores de acetilcolina (AChRs) en la placa final neuromuscular por autoanticuerpos circulantes, seguido de activación complementaria local y destrucción de receptores de acetilcolina (Stangel *et al.*, J. Neurol. Sci. 153(2):203-14 (1998)). AChR se expresa sobre mioblastos en regeneración pero en el músculo adulto normal el AChR solo se expresa en la placa final motriz. En pacientes con MG de aparición temprana sin embargo la médula tímica es infiltrada por células T similares a nódulos linfáticos y centro germinales y hay células mioides similares a mioblastos en la médula tímica que expresan AChR. Por consiguiente, la presentación del antígeno AChR por estas células o por mioblastos interviene al parecer en el proceso patológico (Curnow *et al.*, J. Neuroimmunol. 115(1-2):127-134 (2001)). En estudios de miastenia gravis autoinmune experimental (EAMG) se ha visto que la citoquina Th1 INF- γ interviene en la progresión patológica y, según informes, es capaz de inducir la producción por mioblastos de antígenos de histocompatibilidad mayor de clase I y clase II, AChR e ICAM-1. IL-1 desempeña, como se ha visto también, un papel en EAMG donde al parecer la interrupción/alteración del gen beta IL-1 disminuye las respuestas inducidas por el receptor de acetilcolina (García *et al.*, J. Neuroimmunol. 120(1-2):103-11 (2001); Stegall *et al.*, J. Neuroimmunol. 119(2):377-386 (2001)).

Las causas de patologías inflamatorias de los músculos, dermatomiositis, polimiositis y miositis de cuerpos de inclusión (IBM) son desconocidas aunque se encuentran fuertemente implicados mecanismos inmunológicos. Aunque diferentes desde el punto de vista clínico e inmunopatológico, estas patologías comparten tres características histológicas dominantes: inflamación, fibrosis y pérdida de fibras musculares. La dermatomiositis, la inflamación endomisial y la destrucción de fibra muscular van precedidas de activación del sistema complementario de proteínas de plasma y deposición de complejo de ataque membranólítico sobre los capilares endomisiales (Dalakas, Curr. Opin. Pharmacol. 1(3):300-306(2001)). Existen evidencias de que este ataque puede involucrar también los vasos sanguíneos en la dermis (Dalakas, Curr. Opin. Pharmacol. 9(3):235-239 (1996)). El factor de crecimiento beta al estar sobre expresado en el tejido conectivo perimisial en dermatomiositis se reduce tras inmunoterapia con éxito y reducción de inflamación y fibrosis (Dalakas, Arch. Neurol. 55(12):1509-1512 (1998)).

En la polimiositis y en IBM, la enfermedad comienza con la activación de las células T CD8. Estas células T citotóxicas alcanzan el parenquima endomisial para reconocer antígeno(s) muscular(es) asociado(s) con la regulación por incremento del complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) I en fibras musculares. Las células T autoinvasoras muestran reordenación génica de sus receptores de célula T (TCR) y son elegidas específicamente y expandidas clonalmente *in situ* por antígenos desconocidos hasta ahora. Las células musculares no suelen expresar MHC I y II pero en caso de polimiositis e IBM la sobre expresión de MHC es un evento temprano que se puede detectar incluso en áreas alejadas de la inflamación. Se han encontrado INF γ y TNF α , citoquinas que inducen MHC en pacientes con polimiositis activa (Dalakas, Curr. Opin. Pharmacol. 1(3):300-306 (2001)).

No se ha detectado ningún signo de apoptosis en pacientes con miopatías inflamatorias y, de hecho, se ha comprobado recientemente que dos moléculas fuertemente antiapoptóticas están expresadas en las fibras musculares. Una de

ellas es la proteína inhibidora de enzima convertidora IL-1 afín a dominio muerte asociada a Fas-(FLIP) y la otra es la proteína humana afín a IAP humano (inhibidor de proteína de apoptosis). El resultado del fracaso de la depuración apoptótica de células inflamatorias es probablemente la causa del daño de fibra muscular citotóxico crónico sostenido (Vattemi *et al.*, J. Neuroimmunol. 111(1-2):146-151 (2000)).

La sarcoidosis es un trastorno crónico multisistema, de causa desconocida y se distribuye por todo el mundo. La neurosarcoidosis es una complicación de la sarcoidosis, que supone la inflamación y depósitos anormales en los tejidos del sistema nervioso. Lo habitual es que aparezca de pronto parálisis facial pasajera con implicación del nervio craneal VII. Otras manifestaciones pueden ser la meningitis aséptica, hidrocefalia, enfermedad parenquimatosa del sistema nervioso central, neuropatía y miopatía periférica. La sarcoide intracraneal puede mimetizar diversas formas de meningitis, incluso lesiones de la masa intracraneal y carcinomatosa como meningioma, linfoma y glioma, sobre la base de la visualización neurorradiológica. Una punción lumbar puede mostrar signos de inflamación. Niveles elevados de enzima convertidora de angiotensina pueden aparecer en la sangre o CSF. La terapia consiste en agentes inmunosupresivos y corticosteroides (Nowak *et al.*, Neurol. 248(5):363-372(2001); Stern *et al.*, Arch. Neurol. 42(9):909-917(1985)).

La demencia vascular (VaD) es el término general para la demencia causada por lesiones orgánicas de origen vascular, como infarto cerebral, hemorragia intracerebral o alteraciones isquémicas en la materia blanca subcortical. Es la causa más frecuente de demencia tras la AD que constituye aproximadamente el 20% de los casos y afecta al 50% de las personas de más de 80 años (Dib, Arch. Gerontol. Geriatr. 33(1):71-80 (2001); Parnetti *et al.*, Int. J. Clin. Lab. Res. 24(1):15-22 (1994)). La distinción clínica entre AD y VaD puede ser difícil y existen pautas normalizadas para los estudios de investigación. VaD y AD pueden coexistir como "demencia mixta" donde la presencia de patología cerebrovascular puede empeorar la demencia de Alzheimer. Tradicionalmente, AD se caracteriza por la aparición insidiosa de pérdida de memoria, seguida de una progresión gradual hacia la demencia presentando resultados normales en el reconocimiento neurológico. VaD por otra parte se caracteriza por un declive cognitivo gradual puntuado por episodios de ictus que van acompañados de déficits focales en el reconocimiento neurológico y evidencia de ictus en la topografía computerizada (CI) o visualización por resonancia magnética (Jagust, Lancet 358(9299): 2097-2098 (2001)). Se supone que los factores de riesgo para el ictus y la patología vascular son también factores para VaD. Estos son, entre otros: la hipertensión, el tabaco, la diabetes, la obesidad, los trastornos del ritmo cardiaco, la hiperlipidemia, la hipercolesterolemia y la hiperhomocisteinemia. El genotipo E4 apolipoproteína se considera también como factor de riesgo para VaD, Ad y para el ictus isquémico (Dib Arch. Gerontol. Geriatr. 33(1):71-80(2001)). Entre los tratamientos actuales de la demencia vascular se encuentran los agentes anti-plaqueta y/o la cirugía y el tratamiento de síntomas cognitivos (Parnetti *et al.*, Int. J. Clin. Lab. Res. 24(1):15-22(1994)).

El traumatismo de la cabeza viene asociado con una variedad de fenómenos fisiológicos y celulares como la isquemia, incremento de la permeabilidad de la barrera sangrecerebro (BBB), edema, necrosis y disfunción motriz y de la memoria (Moor *et al.*, Neurosci. Lett. 316(3):169-172 (2001); Shohami *et al.*, J. Neuroimmunol. 72(2):169-177 (1997)). La isquemia causada por el daño inicial del cerebro induce una cascada de eventos secundarios y la liberación de aminoácidos excitatorios (EAA) tales como el glutamato y el aspartato. La alteración en los niveles de iones y de euomoduladores conduce a la oxidación y al daño de la membrana celular y finalmente a la muerte celular (Stahel *et al.*, Brain Res. Rev. 27(3):243-256(1998)). Los modelos experimentales para herida cerrada de la cabeza (CHI) desarrollados en la rata muestran la inducción espacial y temporal de transcripción de IL-1, IL-6 y TNF- α gen mRNA junto con una inducción de actividad de IL-6 y TNF- α en el cerebro de la rata (Shohami *et al.*, J. Neuroimmunol. 72(2): 169-177 (1997)). También se ha visto cómo se libera IL-1 β y es la presencia de estas citoquinas junto con el daño a las células endoteliales las que producen la interrupción de la integridad de BBB.

Se han identificado TNF- α en el cerebro en varios estados patológicos y se ha visto que los inhibidores de TNF- α como dexametabol (HU-211) mejoran las consecuencias neurológicas tras CHI (Shohami *et al.*, J. Neuroimmunol. 72(2):169-177 (1997)).

El vasospasmo cerebral es la aparición retardada de estrechamiento de la arteria cerebral en respuesta a coágulos sanguíneos que quedan en el espacio subaracnoideo tras una hemorragia aracnoidea aneurismal espontánea (SAH) (Ogihara *et al.*, Brain Res. 889(1-2):89-97(2001)). Se caracteriza angiográficamente como el estrechamiento luminal persistente de las arterias cerebrales extraparenquimales principales y afecta la microcirculación cerebral y causa una reducción en el flujo de la sangre del cerebro (CBF) y unos déficits neurológicos isquémicos retardados. Ciertos estudios han demostrado cambios morfológicos en arterias cerebrales tras SAH. Las células de la musculatura lisa mostraron alteraciones necróticas, tales como cuerpos densos, degeneración de mitocondrias, lisosomas condensados y disolución de sustancias nucleares y la aparición de residuos celulares (Sobey *et al.*, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 25(11):867-876(1998)). El deterioro de los mecanismos dilator y el aumento del mecanismo constrictor que se producen después de SAH puede ser causado por oxihemoglobina producida por eritrocitos que inactivas NO en el espacio subaracnoideo. Alternativamente, puede ser debido al deterioro de la actividad del guanilato ciclasa soluble que se traduce en niveles basales reducidos de cGMP en vasos cerebrales y en una capacidad de respuesta reducida a NO (Ogihara *et al.*, Brain Res. 889(1-2):89-97(2001)). También se ha demostrado la producción de IL-6 e IL-8 en el fluido cerebroespinal tras SAH. Se piensa que IL-6 puede desempeñar un papel particular en el vasospasmo, como en la vasoconstricción inducida en una arteria cerebral canina (Osaka *et al.*, Acta Neurochir 140(9):943-951(1998)).

La distrofia muscular de Duchenne (DMD) es uno de los trastornos letales heredados más comunes de la infancia. Es una patología neuromuscular ligada a X que afecta a uno de cada 3500 varones. La debilidad muscular progresiva

comienza entre los dos y los cinco años de edad y conduce finalmente a la muerte prematura por fallo respiratorio o cardíaco desde mediados hasta finales de los 20 años. Aproximadamente el 30% de los casos se debe a mutación espontánea de los genes distrofinicos mientras que el resto es hereditario (Spencer *et al.*, Neuromuscul. Disord. 11(6-7): 556-564 (2001)). Por consiguiente, los pacientes de DMD carecen de la proteína distrofina que es un enlace esencial en el complejo de proteínas que conectan el citoesqueleto con la matriz extracelular (Alderton *et al.*, Trends Cardiovascular Med. 10(6):268-272(2000)). Aunque la terapia génica es la única cura para DMD, se cree que las intervenciones inmunológicas pueden producir la regresión de la enfermedad. La razón de ello es que se ha demostrado que las interacciones celulares inmunológicas con músculos deficientes en distrofina pueden contribuir a la muerte celular en distrofinopatías. También se ha visto que la población de células inmunes en músculos distrofinicos no solamente es diferente de las encontradas que invaden tejido dañado mecánicamente; son similares a las encontradas en enfermedades inflamatorias como la poliomiositis. La investigación actual indica que las células T pueden desempeñar un papel en la patología de la deficiencia de distrofina y que pueden ser un componente autoinmune para la enfermedad donde las células T son activadas por un antígeno común (Spencer *et al.*, Neuromuscular Disord. 11(6-7):556-564 (2001)).

La patente US 5,834,030 (Bolton) describe un proceso para el tratamiento de un paciente para combatir la vasculopatía periférica, que comprende la extracción de una muestra de sangre del paciente, el tratamiento de la muestra de sangre extracorporalmente con factores estresantes tales como entorno oxidativo (mezcla de gas ozono/oxígeno que se introduce por burbujeo), luz UV incidente y temperatura elevada.

La patente US 5,980,954 (Bolton) describe procesos similares para el tratamiento de patologías autoinmunes en pacientes mamíferos.

El documento WO 00/41705 describe la utilización de una muestra de sangre que ha sido sometida *ex vivo* a un factor estresante oxidativo, el factor estresante de temperatura y luz ultravioleta para tratar trastornos relacionados con apoptosis y/o necrosis en el cuerpo de un mamífero.

Uno de los objetos de la presente descripción es ofrecer un tratamiento novedoso o la profilaxis de neuropatías que tienen un componente inflamatorio importante como la polineuropatía demielinizante inflamatoria crónica y el síndrome de Guillain-Barré.

La "terapia de modulación inmune", término usado aquí es un protocolo de tratamiento *ex vivo* que supone la exposición de sangre periférica autóloga a combinaciones de al menos dos factores estresantes físico-químicos, es decir el calor, factor estresante oxidativo como ozonación y radiación electromagnética, como radiación ultravioleta y Administración ulterior de la sangre tratada al paciente, por inyección intramuscular. Se ha demostrado recientemente que dicha terapia de modulación inmune suprime la hipersensibilidad de contacto (Shivji *et al.*, 2000) y se muestra como respuesta hipertérmica atenuada a estrés por inmovilización en ratas espontáneamente hipertensas (Kouamé *et al.*, 1997), lo cual sugiere una posible función protectora. En apoyo de lo anterior se encuentra el informe según el cual, tras dicha terapia de modulación inmune se ha observado una reducción en el número relativo de células TH1 pro-inflamatorias y un aumento de células TH2 en seres humanos, lo que significa una reducción de la respuesta inflamatoria (Rabinovitch *et al.*, 1998).

Según la presente invención, se presenta la utilización de una muestra de sangre de mamífero compatible que ha sido tratada *ex vivo* con al menos dos factores estresantes, elegidos dentro del grupo formado por un entorno oxidativo, factor estresante térmico y radiación electromagnética para la obtención de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una neuropatía enumerada en la reivindicación 1.

La presente invención se centra en el descubrimiento sorprendente e inesperado de que dicha terapia de modulación inmune puede ejercer efectos antiinflamatorios beneficios en la barrera sangre-cerebro de un paciente mamífero, aparentemente a través de una notable reducción de la acumulación de especies reactivas del oxígeno y una notable regulación reductora de citoquinas inflamatorias asociadas tales como TNF- α , particularmente en el tejido cortical de mamíferos. Por consiguiente, la terapia resulta adecuada tanto para el tratamiento terapéutico como el profiláctico del componente inflamatorio de neuropatías del cerebro tales como el síndrome de Down, epilepsia, enfermedad de Huntington y traumatismo encefálico, mediante el desarrollo o la actividad de especies reactivas del oxígeno que desempeñan un papel en el desarrollo o la manifestación de dicha inflamación.

La presente descripción presenta un método para el tratamiento profiláctico o terapéutico de componentes inflamatorios y aspectos inflamatorios de una neuropatía en un paciente mamífero al que se la ha diagnosticado, o corre el riesgo de que se le diagnostique, dicha enfermedad. Dicho método comprende: la administración a dicho paciente de una muestra de sangre que ha sido tratada *ex vivo* con por lo menos dos factores estresantes elegidos dentro del grupo formado por un entorno oxidativo, factor estresante térmico y radiación electromagnética, donde la concentración de las especies reactivas del oxígeno en células o tejidos neuronales de dicho paciente se reduce, con una reducción asociada de efectos inflamatorios nocivos.

Desde otro aspecto, la presente descripción presenta un proceso para aliviar los síntomas de neuropatías del cerebro que tienen un componente inflamatorio importante asociado con un exceso de especies activas del oxígeno (especies reactivas del oxígeno y radicales libres oxidantes) como el síndrome de Down, la enfermedad de Huntington, la epilepsia y el traumatismo craneal que comprende la remoción de especies activas del oxígeno del cerebro de un

paciente mamífero, administrando a dicho paciente una muestra de sangre que ha sido tratada *ex vivo* con al menos dos factores estresantes elegidos dentro del grupo formado por un entorno oxidativo, factor estresante térmico y radiación electromagnética.

5 Por consiguiente, la presente descripción presenta un método para aliviar, una profilaxis contra o un preacondicionamiento para impedir la aparición y la progresión de neuropatías que tienen un componente inflamatorio importante tales como el síndrome de Guillain-Barré (GBS), la polineuropatía demielinizante inflamatoria crónica (CIDP), la miastenia gravis (MG), la dermatomiositis, la polimiositis, la miositis de cuerpos de inclusión, el post ictus, la neurosarcoidosis, la demencia vascular, el trauma cerrado de la cabeza, el vasospasmo, la hemorragia subaracnoide, la
10 distrofia leucocítica adrenal (trastornos de almacenamiento), la dermatomiositis de cuerpos de inclusión, el deterioro cognitivo mínimo y la distrofia muscular de Duchenne, donde dicho método comprende el tratamiento de un paciente que ha contraído o que puede contraer dicha patología y tiene una función endotelial deteriorada en los vasos sanguíneos, para mejorar el funcionamiento de la función endotelial en la barrera sangre-cerebro o en la barrera sangrenervio con vistas a restablecer una función endotelial normal. Esto representa un enfoque novedoso e innovador de la gestión
15 y tratamiento de neuropatías.

En las figuras adjuntas:

Fig. 1 es una presentación gráfica del efecto del tratamiento según una realización preferida de la invención en el
20 peso corporal de animales de ensayo tal como se describe en la sección experimental específica a continuación;

Fig. 2 es la presentación gráfica de los resultados de la prueba de deterioro inducido por LPS de LTP descrito en la sección experimental siguiente;

25 Fig. 3 es una presentación gráfica de las medidas de la acumulación de especies reactivas del oxígeno descritas en la sección experimental siguiente;

Fig. 4 es una presentación gráfica de las medidas de TNF2 de citoquina inflamatoria y las medidas de IL-10 de citoquina anti-inflamatoria en el cortex de animales de ensayo, que se describe en la sección experimental siguiente;

30 Fig. 5 es una presentación gráfica de las medidas de la actividad de c-Jun NH₂-quinasa terminal (JNK) en el cortex de animales experimentales tratados tal como se describe en la sección experimental siguiente;

Fig. 6 es una presentación gráfica de los resultados de medidas de concentración de IL-1 receptor tipo 1 en el tejido
35 cortical de animales de prueba tratados tal como se describe en la sección experimental siguiente.

En uno de los métodos preferidos de la presente descripción, se identifica primero un paciente que tiene una neuropatía encefálica con un componente inflamatorio importante, mediada por especies reactivas del oxígeno o que corre el riesgo de desarrollar una patología encefálica de este tipo. Dicho paciente puede tener un riesgo notablemente
40 mayor que el riesgo que presenta la media de la población, es decir como resultado de un traumatismo anterior, indicación hereditaria y similares. Dicho paciente es evaluado para determinar si dicha patología o riesgo de contraer la patología se puede tratar de modo eficaz reduciendo la concentración de especies reactivas del oxígeno. Si, en opinión del médico que lo atiende, resulta conveniente una reducción de la concentración de especies reactivas del oxígeno y una reducción asociada de la inflamación neurológica para el tratamiento profiláctico y terapéutico de dicha
45 neuropatología, se administra a dicho paciente una terapia de modulación inmune.

Por consiguiente, se describe un método para el tratamiento profiláctico y terapéutico de los aspectos asociados con inflamación de una neuropatología del cerebro que tiene un componente inflamatorio importante y mediada en
50 parte por especies reactivas del oxígeno, método que comprende:

(a) la identificación de un paciente que tiene una neuropatología encefálica o corre el riesgo de desarrollar una neuropatología encefálica con un componente inflamatorio importante y mediada por especies reactivas del oxígeno;

55 (b) evaluación del paciente identificado en (a) anterior para determinar si dicha patología o riesgo de contraer dicha patología se puede tratar de modo eficaz reduciendo la concentración de especies reactivas del oxígeno; y

(c) si una reducción en la concentración de especies reactivas del oxígeno resulta adecuada para el tratamiento profiláctico o terapéutico de dicha enfermedad, luego

60 (d) administración a dicho paciente de una muestra de sangre que ha sido tratada *ex vivo* con por lo menos dos factores estresantes elegidos dentro del grupo formado por un entorno oxidativo, un factor estresante térmico y radiación electromagnética,

65 donde, tras dicha administración, se reduce la inflamación del tejido neurológico del cerebro y/o la concentración de las especies reactivas del oxígeno en el tejido neurológico del cerebro de dicho paciente.

El paciente es un mamífero y de preferencia un ser humano.

La muestra de sangre se trata sometiénola a factores estresantes que, según se ha comprobado, modifican la sangre. Según la presente invención, la muestra de sangre se puede modificar sometiendo la sangre, o fracciones celulares o no celulares separadas de la sangre o mezclas de las células separadas y/o fracciones no celulares de la sangre, a factores estresantes elegidos entre factores estresantes de temperatura, emisiones electromagnéticas y entornos oxidativos, o cualquier combinación de dichos factores estresantes, de forma simultánea o secuencial.

Se definen los siguientes términos con respecto a la presente invención:

“Tratamiento terapéutico” se refiere al tratamiento de una enfermedad en la que el tratamiento reduce o elimina los síntomas de dicha enfermedad.

“Tratamiento profiláctico” o “profilaxis” se refiere a evitar o prevenir el desarrollo de la enfermedad.

El término “muestra” “muestra de sangre” o los términos similares utilizados aquí se refieren a sangre completa, fracciones celulares separadas de la sangre, inclusive plaquetas, fracciones no celulares separadas de la sangre inclusive plasma y combinaciones de lo anterior.

El método de la presente descripción ofrece el tratamiento profiláctico o terapéutico de una neuropatología encefálica mediada por especies reactivas del oxígeno. En dicho método, se identifica primero un paciente que tiene dicha enfermedad o corre el riesgo de contraerla, patología mediada por especies reactivas del oxígeno. El paciente se evalúa entonces para determinar si dicha patología o riesgo de contraer la enfermedad puede tratarse de modo eficaz reduciendo la concentración de especies reactivas del oxígeno. Dicha evaluación es realizada por el médico que lo atiende tomando como base la enfermedad que se va a tratar y que lo atiende, es conveniente una reducción en la concentración de especies reactivas del oxígeno para el tratamiento profiláctico o terapéutico de dicha enfermedad, entonces se administra al paciente una muestra de sangre que ha sido tratada *ex vivo* con por lo menos dos factores estresantes elegidos dentro del grupo formado por un entorno oxidativo, un factor estresante térmico y radiación electromagnética. El tratamiento *ex vivo* de la muestra de sangre se describe a continuación. El método presenta una reducción en la concentración de las especies reactivas del oxígeno en dicho paciente.

En el método preferido, se evalúa al paciente para determinar si la neuropatía encefálica o el riesgo de contraerla se puede tratar de modo eficaz reduciendo la concentración de especies reactivas del oxígeno, por ejemplo si el componente inflamatorio asociado con la presencia de especies reactivas del oxígeno se puede reducir de modo eficaz reduciendo la concentración de especies reactivas del oxígeno. En este sentido, la reducción de las especies reactivas del oxígeno se realiza en el paciente en el momento en que una reducción de especies reactivas del oxígeno trata de modo eficaz (ya sea profiláctica o terapéuticamente) la enfermedad.

La concentración de especies reactivas del oxígeno se puede medir utilizando toda una serie de métodos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, se pueden determinar a partir de medidas de la reducción de enzimas antioxidativas (glutathiona, catalasa) en la sangre del paciente (véase Layton *et al.*). Una alternativa consiste en comprobar el suero de un paciente para determinar las lipoproteínas de baja densidad oxidadas utilizando el inmunoensayo anti-oxLDL ELISA (véase Wilburgur *et al.*). También se pueden medir los productos de peroxidación lipídica tales como el ácido tiobarbitúrico y sus derivados en el plasma, o medir los productos de oxidación del ácido araquidónico en la sangre de un paciente.

La sangre tratada se administra al mamífero utilizando un método adecuado para la vacunación elegida dentro del grupo formado por inyección intra-arterial, inyección intramuscular, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intraperitoneal, y administración oral, nasal o rectal. Se prefiere la inyección intramuscular.

Tratamiento ex vivo de la sangre

Según una utilización preferida de la presente invención, se extrae una muestra de sangre de un mamífero, de preferencia un ser humano, y la muestra de sangre se trata *ex vivo* con ciertos factores estresantes, descritos de forma detallada en lo que sigue. El efecto de los factores estresantes consiste en modificar la sangre y/o las fracciones celulares y/o no celulares de la misma, contenidas en la muestra. La muestra modificada se reintroduce entonces en el cuerpo del sujeto por cualquier vía adecuada para la vacunación.

Los agentes estresantes a los que se somete *ex vivo* la muestra de sangre según el método de la presente invención, se eligen entre los siguientes: factor estresante de temperatura (temperatura de la sangre por encima o por debajo de la temperatura del cuerpo), un entorno oxidativo y una emisión electromagnética, individualmente o en cualquier combinación, de forma simultánea o secuencial. En los seres humanos, la muestra tiene convenientemente un volumen suficiente que al ser reintroducida en el cuerpo del sujeto se consigue en el mismo, al menos un alivio parcial del trastorno debido a las especies reactivas del oxígeno.

De preferencia, el volumen de la muestra es de hasta aproximadamente 400 ml, de preferencia de 0,1 a 100 ml aproximadamente y todavía mejor de 5 a 15 ml aproximadamente y todavía mucho mejor de 8 a 12 ml aproximadamente y muchísimo mejor, aproximadamente 10 ml junto con un anticoagulante, por ejemplo 2 ml de citrato sódico.

ES 2 282 405 T3

Según la utilización de la invención se prefiere aplicar los tres factores estresantes antes citados de modo simultáneo a la muestra que se encuentra en tratamiento, con el objeto de garantizar la modificación adecuada de la sangre. También se puede preferir en algunas realizaciones de la invención aplicar dos cualesquiera de los factores estresantes anteriores, por ejemplo aplicar el factor estresante de temperatura y oxidativo, estrés de temperatura y emisión electromagnética o emisión electromagnética y estrés oxidativo. Habrá que llevar cuidado para utilizar un nivel adecuado de los factores estresantes que permita modificar de modo eficaz la sangre para aliviar el trastorno debido a especies reactivas del oxígeno en su sujeto.

El factor estresante de temperatura calienta la muestra que se está tratando hasta una temperatura por encima de la temperatura normal del cuerpo o enfría la muestra por debajo de la temperatura normal del cuerpo. La temperatura se elige de forma que el factor estresante de temperatura no cause una hemólisis excesiva en la sangre contenida en la muestra y de modo que, cuando se inyecta la muestra en un sujeto, se consiga aliviar el trastorno mediado por especies reactivas del oxígeno. De preferencia, el factor estresante de temperatura se aplica de modo que la temperatura de la totalidad o de una parte de la muestra llegue hasta 55°C aproximadamente y todavía mejor oscila entre -5°C y 55°C aproximadamente.

En algunas realizaciones de la invención, la temperatura de la muestra se eleva por encima de la temperatura normal del cuerpo, de forma que la temperatura media de la muestra no exceda de una temperatura de aproximadamente 55°C, de preferencia entre 40°C y 50°C aproximadamente, todavía mejor de 40°C a 44°C aproximadamente y de forma óptima en torno a $42,5 \pm 1^\circ\text{C}$.

En otras realizaciones preferidas, la muestra se enfría por debajo de la temperatura normal del cuerpo, de modo que la temperatura media de la muestra está comprendida entre -5°C y 36,5°C aproximadamente, de preferencia entre 10°C y 30°C aproximadamente y todavía mejor entre 15°C y 25°C aproximadamente.

El factor estresante de entorno oxidativo puede consistir en aplicar a la muestra agentes oxidantes sólidos, líquidos o gaseosos. De preferencia, supone la exposición de la muestra a una mezcla de gas ozono y oxígeno de Calidad médica, de preferencia haciendo pasar por borboteo a través de la muestra dentro de las temperaturas antes citadas, una corriente de gas oxígeno de calidad médica que contiene algo de ozono como componente. El contenido de ozono de la corriente de gas y el caudal de dicha corriente se elige de preferencia de forma que la cantidad de ozono introducida en la muestra de sangre, por si solo o en combinación con otros factores estresantes no de lugar a niveles excesivos de daño celular, lo cual haría que la terapia resultase ineficaz.

La corriente de gas tiene convenientemente un contenido de ozono de hasta aproximadamente 300 $\mu\text{g/ml}$, de preferencia hasta 100 $\mu\text{g/ml}$, aún mejor aproximadamente 30 $\mu\text{g/ml}$, mucho mejor hasta aproximadamente 20 $\mu\text{g/ml}$, de modo particularmente preferido entre 10 $\mu\text{g/ml}$ y 20 $\mu\text{g/ml}$ aproximadamente y de forma óptima en torno a $14,5 \pm 1,0 \mu\text{g/ml}$. La corriente de gas se suministra convenientemente a la muestra a una velocidad de hasta aproximadamente 2,0 litros/minuto, de preferencia hasta aproximadamente 0,4 litros/minuto, todavía mejor hasta aproximadamente 0,4 litros/minuto, mucho mejor hasta aproximadamente 0,33 litros/minuto y de forma óptima en torno a $0,24 \pm 0,24$ litros/minutos a STP (temperatura estándar). El límite inferior del caudal de la corriente de gas será de preferencia no inferior a 0,01 litros/minuto, todavía mejor no inferior a 0,1 litro/minuto y mucho mejor, no inferior a 0,2 litros/minuto.

El factor estresante de emisión electromagnética se aplica convenientemente irradiando la muestra que se encuentra en tratamiento desde una fuente de emisión electromagnética, mientras se mantiene la muestra a la temperatura antes citada y se va introduciendo por borboteo a través de la muestra la mezcla de gas ozono/oxígeno. Las emisiones electromagnéticas preferidas se eligen dentro del grupo formado por radiación fotónica, de preferencia UV, luz infrarroja y visible y todavía mejor luz UV. Las fuentes de UV preferidas son lámparas UV que emiten principalmente longitudes de onda de banda UV-C es decir a longitudes de onda más cortas que aproximadamente 280 nm. Estas lámparas también puede emitir cantidades de luz visible e infrarroja. También se puede utilizar luz ultravioleta que corresponde a fuentes de UV-A standard (longitudes de onda de aproximadamente 315 a 400 nm) y UV-B (longitudes de onda de aproximadamente 280 a 315). Por ejemplo, una dosificación adecuada de dicha luz UV, aplicada simultáneamente con los factores estresantes antes mencionados de temperatura y entorno oxidativo, se puede obtener con lámparas con una potencia de salida combinada que oscila entre 15 y 25 vatios aproximadamente, dispuestas para rodear el contenedor en el que está la muestra, donde cada lámpara proporciona una intensidad, a una distancia de un metro, de aproximadamente 45-65 mW/cm^2 . Se pueden usar ventajosamente 8 de estas lámparas que rodean la botella en la que está la muestra, con una salida combinada a 253,7 nm de 15-25 vatios, con una intensidad que permite ofrecer una energía luminosa UV total en la superficie de la sangre de aproximadamente 0,025 a 10 julios/ cm^2 , de preferencia de 0,1 a 3,0 julios/ cm^2 aproximadamente. De preferencia, se usan cuatro de esas lámparas.

El tiempo durante el cual se somete la muestra a los factores estresantes suele ser de aproximadamente 60 minutos. El tiempo depende en alguna medida de la intensidad de emisión electromagnética elegida, de la temperatura, la concentración del agente oxidante y de la velocidad a la que se suministra a la muestra. Puede resultar necesario para el operario realizar alguna experimentación para establecer los tiempos óptimos una vez establecidos los demás niveles de factores estresantes. En la mayoría de las condiciones estresantes, los tiempos preferidos oscilarán aproximadamente entre 2 y 5 minutos, de preferencia en torno a 3 o 3 ½ minutos. La temperatura inicial de la sangre y la velocidad a la que se puede calentar o enfriar hasta una temperatura predeterminada tiende a variar de un sujeto a otro. Este tipo de tratamientos proporciona una muestra de sangre modificada, lista para inyectar al sujeto.

En la práctica de las realizaciones preferidas de la presente invención, la muestra de sangre se puede tratar con los factores estresantes utilizando un dispositivo del tipo descrito en la patente US 4,968,483 de Mueller. La muestra se coloca en un contenedor adecuado, estéril, que transmite luz UV, que se ajusta dentro de la máquina. Las lámparas UV están conectadas durante un período de tiempo fijo antes de que se aplique la corriente de gas a la muestra, que proporciona el factor estresante oxidativo, para permitir que se estabilice la salida de las lámparas UV. Las lámparas UV se suelen conectar mientras se ajusta la temperatura de la muestra al valor predeterminado, p. ej. $42,5 \pm 1^\circ\text{C}$. Luego la mezcla de gas ozono/oxígeno, de composición conocida y caudal controlado, se aplica a la muestra durante el período de tiempo predeterminado de hasta 60 minutos aproximadamente, de preferencia 2 a 5 minutos y aún mejor en torno a 3 minutos según lo indicado anteriormente, de forma que la muestra esté sometida a los tres factores estresantes simultáneamente. De este modo, la sangre queda adecuadamente modificada para lograr los efectos deseados.

Se somete de preferencia al sujeto a una tanda de tratamientos, y dicho tratamiento individual comprende la remoción de una muestra de sangre, el tratamiento de la misma en la forma descrita anteriormente y la nueva administración de la muestra tratada al sujeto. Una tanda de tratamientos de este tipo puede comprender la administración diaria de muestras de sangre tratada durante varios días consecutivos, o puede comprender una primera tanda de tratamientos diarios durante un período de tiempo determinado, seguido de un intervalo y luego una o más tandas adicionales de tratamientos diarios.

En una realización preferida, se somete al sujeto a una tanda inicial de tratamientos que comprende la administración de 4 a 6 muestras de sangre tratada. En otra realización preferida, se somete al sujeto a una tanda inicial de terapia que comprende la administración de 2 a 4 muestras de sangre tratada, y la administración de cualquier par de muestras consecutivas se puede realizar en días consecutivos o separarse durante un período de descanso de 1 a 21 días durante los cuales no se administrará ninguna muestra al paciente; el período de descanso que separa un par de muestras consecutivas elegido es de aproximadamente de 3 a 15 días. En una realización preferida, más específica, el régimen de dosificación de la tanda inicial de tratamientos comprende un total de tres muestras, administrándose la primera y la segunda muestras en días consecutivos y estableciéndose un período de descanso de 11 días entre la administración de la segunda y la tercera muestras.

Se puede preferir administrar ulteriormente tandas adicionales de tratamientos que siguen a la tanda inicial de tratamientos. De preferencia, las tandas subsiguientes de tratamientos se administran por lo menos unas 3 semanas después de haber finalizado la tanda inicial de tratamientos. En una realización particularmente preferida, el sujeto recibe una segunda tanda de tratamiento que comprende la administración de una muestra de sangre tratada cada 30 días a partir del final de la tanda inicial de tratamientos durante un período de 6 meses.

Se observará que la separación entre tandas sucesivas de tratamientos deberá ser de tal índole que los efectos positivos del tratamiento de la invención se mantenga y se puedan observar sobre la base de la respuesta observada en sujetos individuales.

Ejemplos

La invención se demuestra e ilustra con los siguientes experimentos en animales, realizados en ratas alistar, según los procedimientos y protocolos de ética aprobados.

Los experimentos investigaron el efecto del tratamiento previo de sangre periférica expuesta a terapia de inmuno modulación en deterioro inducido por LPS de LTP en tejido de hipocampo de rata. Se realizaron también estudios preliminares en tejido cortical para explorar la consecuencia de la terapia de inmuno modulación en la acumulación de ROS, la concentración de la citoquinas TNF α e IL-10, así como IL-1 receptor tipo I y en la actividad de la proteína activada por estrés quinasa, JNK.

Procedimiento experimental

Animales

En estos experimentos se utilizaron grupos de ocho ratas machos Wistar (300-350 g; BioResources Unit, Trinity College Dublin, República de Irlanda). Los animales se alojaron en grupos de cuatro con un programa de 12 horas de luz, se controló la temperatura ambiente manteniéndola entre 22 y 23°C y se mantuvieron las ratas bajo supervisión veterinaria.

Protocolo de tratamiento

Se obtuvo sangre completa por punción cardiaca de la rata donante y se anticoaguló con citrato sódico (10 ml de sangre + 2 ml de solución de citrato sódico al 3,13%). La sangre anticoagulada se dividió en dos muestras; 2 ml se utilizaron para el tratamiento simulado y 10 ml se sometieron a tratamiento de inmuno modulación. Para el tratamiento de inmuno modulación, se llevaron 10 ml de sangre anticoagulada a un contenedor de sangre desechable de polietileno de baja densidad, estéril, fabricado para la ocasión (Vasogen Inc. Toronto, ON, Canadá) y se expusieron a una combinación de factores estresantes fisicoquímicos controlados en un dispositivo médico (Vasogen Inc.).

Durante el procesamiento, la temperatura de la sangre se elevó hasta 42,5°C, y durante este tiempo se expuso la sangre a luz UV (espectro máximo de emisión a 254 nm). Una vez alcanzada esta temperatura, se introdujo por borboteo una mezcla de gas de $14,5 \pm 1,0 \mu\text{g/ml}$ de ozono en oxígeno médico a través de la sangre a una velocidad de $240 \pm 24 \text{ ml}$ por minuto durante 3 minutos, después de lo cual se desconectó el calor y las fuentes de luz UVC. La acción espumante causada por el borboteo del gas a través de la sangre aumentó la superficie expuesta a la luz UVC. Se dejó entonces que la sangre se depositara en la parte inferior del contenedor de sangre y quedó entonces lista para el uso. Se trataron dos grupos de 16 ratas mediante inyección intramuscular con $150 \mu\text{l}$ de sangre procesada o sangre no tratada (tratamiento simulado). Se administraron inyecciones durante 14 días, 13 días y 1 día antes de la exposición/inducción a LPS de LTP.

Inducción de LTP en sinapsis célula granulosa-vía perforante in vivo

Se anestesiaron las ratas con inyección intraperitoneal de uretano ($1,5 \text{ g/Kg.}$). Todas las ratas recibieron LPS ($100 \mu\text{g/Kg}$) o salino, por vía intraperitoneal y se controló durante 3 horas. Se colocó un electrodo de estimulación bipolar y un electrodo de registro unipolar en la vía perforante ($4,4 \text{ mm}$ lateral a Lambda) y en la región del cuerpo celular dorsal del dentate gyrus ($2,5 \text{ mm}$ lateral y $3,9 \text{ mm}$ posterior a Bregma), respectivamente, y se realizaron choques de prueba $0,033\text{-Hz}$ durante 10 minutos antes y 40 minutos después de la estimulación tónica (tres trenes de estímulos suministrados a intervalos de 30 segundos, 250 Hz durante 200 ms (McGahon & Lynch, 1996)). Las ratas se mataron por decapitación, se prepararon porciones troceadas (cross-chopped) ($350 \times 350 \text{ gm}$) de dentate gyri, cortex entorrinal, hipocampo y cortex que se usaron para preparar células disociadas (ver más abajo) o se congelaron por separado en solución Krebs que contenía 10% dimetil sulfoxido (Haan & Bowen, 1981) y se almacenó a -80°C . Para el análisis, se descongelaron rápidamente porciones (slices) y se lavaron en solución Krebs recién oxigenada antes de preparar homogenato o el gránulo sinaptosomal crudo P_2 (McGahon & Lynch, 1996).

Análisis de la formación de especies reactivas del oxígeno

La formación de especies reactivas del oxígeno se evaluó realizando la formación de la 2'-7-dicloro fluoresceína altamente fluorescente (DCF) a partir de la sonda no fluorescente, 2'-7-dicloro fluoresceína diacetato (DCFH-DA; sondas moleculares EE.UU.; LeBel *et al.*, 1992). El granulato sinaptosomal P_2 preparado a partir de cortex se volvió a suspender en 1 ml de 40 mM tris tampón helado ($\text{pH } 7,4$), se incubó a 37°C durante 15 minutos con DCFH-DA ($10 \mu\text{l}$; concentración final $5 \mu\text{l}$; de una solución de stock de 500 gM en metanol) y la reacción se terminó por centrifugación a $13.000 \times \text{g}$ durante 8 minutos a 4°C . Se volvieron a suspender los granulados en $1,5 \text{ mL}$ de 40 mM tris tampón helado, $\text{pH } 7,4$ y se controló su fluorescencia a 37°C (excitación, 488 nm ; emisión, 525 nm). La formación de especies reactivas del oxígeno se cuantificó a partir de una curva estándar de DCF en metanol (de 0 a $5 \mu\text{M}$). Se determinó la concertación proteínica (Bradford, 1976) y los resultados se expresaron como nmol/mg proteína/min.

Análisis de concentración de $\text{TNF}\alpha$ e IL-10

Se utilizó un ensayo inmunosorbente relativo a enzima, disponible en el comercio para analizar $\text{TNF}\alpha$ cortical (Biosource International Inc.) y se midió el IL-10 cortical utilizando un par Anticuerpos Cytoset IL-10 (Biosource International Inc.). Cada uno de los tejidos se añadió a 1 mL de medio de cultivo de Iscove que contenía 5% de suero bovino fetal y un inhibidor de enzima cocktail (100 mM amino-n-ácido caproico, 10 mM Na_2EDTA , 5 mM benzamidina HCl, $0,2 \text{ mM}$ fenil metil sulfonil fluoruro). Se homogenizó y centrifugó el tejido a 10.000 rpm a 4°C durante 10 minutos. Se quitaron los sobrenadantes y analizó para comprobar la presencia de $\text{TNF}\alpha$ utilizando ELISA. Se determinó la concentración proteínica (Bradford, 1976) y los resultados se expresaron como pg/mg proteína.

Análisis de la actividad de JNK y concentraron de IL-1 receptor tipo I

Se analizó la actividad JNK y la concentración de un IL-10 receptor tipo I utilizando técnicas de transferencia Western en muestras preparadas a partir de tejido cortical. Se diluyeron homogenatos de tejido para igualar la concentración proteínica (Bradford, 1976) y se añadieron $10 \mu\text{l}$ de muestras (1 mg/ml) a $5 \mu\text{l}$ de tampón de muestra ($0,5 \text{ mM}$ Tris-HCl, $\text{pH } 6,8$, 10% glicerol, 10% SDS, 5% b-mercapto etanol, $0,05\%$ bromo fenol azul p/v) y se puso a ebullición durante 5 minutos. Las muestras se congelaron hasta realizar la transferencia Western. Se depositó $10 \mu\text{l}$ de cada muestra sobre geles (10% SDS) para cada análisis. Las proteínas se separaron por aplicación de una corriente constante de 32-mA durante 25-30 minutos, se trasladaron y colocaron sobre tiras de microcelulosa (225 mA durante 75 minutos) y se realizó la inmuno transferencia con el anticuerpo adecuado. Para evaluar la actividad de JNK, se procedió a la inmuno transferencia de proteínas con un anticuerpo que apunta específicamente al JNK fosforilado (Santa Cruz Biotechnology, Inc; $1:100$ en TBS y $0,1\%$ Tween 20 que contenía 1% BSA) durante 2 horas a temperatura ambiente.

Se evaluó la concentración de IL-1 receptor tipo I procediendo a la inmuno transferencia de proteínas con un anticuerpo policlonal de conejo producido por cartografía de epítipo en el término carboxi de IL-1RI procedente de ratón (Santa Cruz Biotechnology, Inc.; $1:2000$ en PBS y $0,1\%$ Tween 20 que contenía 2% de leche seca no grasa) durante 45 minutos a temperatura ambiente y 45 minutos a 37°C . Se lavaron tiras de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpo secundario [IgG anti ratón asociado a peróxido; $1:300$ dilución (Sigma) durante 2 horas a temperatura ambiente en el caso de JNK y con anticuerpo anti conejo relacionado con HRP; $1:2000$ dilución (Amersham, UK) durante 60 minutos a temperatura ambiente y 30 minutos a 37°C en el caso de IL-1 receptor tipo I. La visualización de JNK fosforilado se logró utilizando SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Pierce, EE.UU.), se sumergieron inmunotrans-

ferencias en sustratos durante 5 minutos y posteriormente se expusieron a película durante 1 segundo. Se visualizaron complejos proteínicos de IL-1 receptor Tipo I por detección ECL (Amersham, RU) y se expusieron inmunotransferencias a película durante la noche a 4°C. En ambos casos, las películas se procesaron utilizando un procesador de rayos X Fuji. La cuantificación de las bandas proteínicas se realizó por análisis densitométrico usando dos paquetes de software, Grab It (Grab It Annotating Grabber, versión 2.04.7, Synotics; UVP Ltd) y Gelworks (Gelworks ID, versión 2.51; UVP Ltd) para fotografía y densitometría, respectivamente. Gelworks ofrece un solo valor (en unidades arbitrarias) que representa la densidad de cada mancha de transferencia.

Análisis de liberación de glutamato

Se evaluó la liberación de glutamato en la preparación sinaptosomal impura, P₂ obtenida de dentate gyrus; se utilizó tejido recién preparado o alternativamente se preparó P₂ a partir de porciones congeladas de dentado gyri que se obtuvieron de ratas en las que se realizaron registros electrofisiológicos (McGahon and Lynch, 1996). En ambos casos, las preparaciones de P₂ se volvieron a suspender en solución Krebs oxigenada que contenía 2 mM CaCl₂ y se evaluó la liberación de glutamato en la forma descrita anteriormente (McGahon *et al.*, 1996). En resumen, se colocaron partes iguales de tejido sinaptosomal sobre filtros miliporos (045 µm), se lavó bajo vacío y el filtrado se eliminó. Se incubaron luego sinaptosomas en 250 µl de disolución Krebs oxigenada a 37°C durante 3 minutos, en presencia o ausencia de 40 mM KCl, y se recogió y almacenó filtrado para su análisis, tal como se ha descrito (Ordroneau *et al.*, 1991). En algunos experimentos se incubaron sinaptosomas a 37°C durante 20 minutos en solución Krebs que contenía IL-1β (1 ng/ml) en presencia o ausencia de péptido intestinal vasoactivo (VIP; 1 µM). Se añadieron muestras triplicadas (50 µl) o estándares de glutamato (50 µl; 25 nM a 1 µM preparado en 100 mM de tampón NaH₂PO₄, pH 8,0) a placas de 96 pocillos recubiertas de glutar aldehído, se incubaron durante 60 minutos a 37°C y se lavaron con 100 mM de tampón NaH₂PO₄. Se utilizó etanol amina (250 µl; 0,1 M en 100 mM de tampón NaH₂PO₄) para ligar aldehídos que no habían reaccionado y se añadió suero de asno (200 µl; 3% en PBS-T) para bloquear la fijación no específica. Las muestras se incubaron durante la noche a 4°C en presencia de anticuerpo antiglutamato (producido en conejo 100, µl; 1:5000 en PBS-T; Sigma, RU), se lavaron y se hicieron reaccionar con anticuerpo secundario (anticuerpo secundario relacionado con (HRP) de peroxidasa rábano picante anti conejo; 100 µl; 1: 10.000 en PBS-T; Amersham, RU) durante 60 minutos a temperatura ambiente. Se añadió sustrato líquido de 3,3', 4,4'-tetra metil bencidina como cromógeno y prosiguió la incubación durante exactamente 60 minutos a temperatura ambiente, cuando se detuvo la reacción mediante H₂SO₄ (4M; 30 µl). Las densidades ópticas se determinaron a 450 nm usando un lector de placa multipocillo y se calcularon los valores con referencia a la curva standard corregida para proteína (Bradford 1976), expresada como pinol glutamato/mg proteína.

Análisis de concentración de IL-1β

La concentración de IL-β en hipocampo se analizó mediante ELISA (R & D Systems, RU). Se incubaron durante la noche a temperatura ambiente placas de 96 pocillos recubiertas de anticuerpo (100 µl; 1.0 µg/ml concentración final, diluido en salino con tampón de fosfato (PBS), pH 7,3, anticuerpo IL-1β anti-rata cabra), se lavaron varias veces con PBS que contenía 0,05% Tween 20, se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente con 300 µl de tampón de bloqueo (PBS, pH 7,3 que contenía 5% de sucrosa, 1% de albumina de suero bovino (BSA) y 0,05% NaN₃). Tras varios lavados, las placas se incubaron con standards de IL-1β (100 µl; 0-1000 pg/ml en PBS que contenía 1% BSA) o muestras homogenizadas en solución Krebs que contenía 2 mM Ca Cl₂ durante 2 horas a temperatura ambiente. Las muestras se incubaron con anticuerpos secundarios (100 µl; concentración final 350 ng/ml en PBS que contenía 1% BSA y 2% suero normal de cabra; anticuerpo IL-1β cabra biotinilado) durante 2 horas a temperatura ambiente, se lavó e incubó en agente de detección (100 µl; estreptavidina conjugada de peroxidada de rábano picante; 1:200 dilución en PBS que contenía 1% BSA) durante 20 min. a temperatura ambiente. Se añadió solución de sustrato (100 µl; 1:1 mezcla de H₂O₂ y tetra metil bencidina), se incubaron muestras a temperatura ambiente en la oscuridad durante 1 h, tras lo que se detuvo la reacción usando 50 µl; de 1M H₂SO₄. Se lavó la absorbancia a 450 nm, los valores fueron corregidos para la proteína (Bradford, 1976) y se expresaron pg IL-1β/mg proteína.

Tinción TUNEL

Se prepararon células disociadas por digestión enzimática y mecánica de porciones hipocampales recientes. Las porciones se incubaron con collagenasa (0,125%) en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con PBS para terminar la digestión de collagenasa y luego se trituraron suavemente con una pipeta de cristal Pasteur, antes de pasar a través de un filtro de malla de nylon para eliminar los grumos de tejido. Las células se sometieron entonces a cito-rotación sobre portaobjetos de microscopio de cristal, se fijaron con metanol y se almacenaron hasta que se fueran a utilizar.

La tinción TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl Transferasa (TdT)-mediated dUTP Nick-End Labeling) que identifica núcleos con ADN fragmentado (una característica de células apoptóticas) se realizó según las instrucciones del fabricante. En suma, se lavaron y permeabilizaron células citorotadas fijas. Las células se equilibraron en tampón (200 mM cacodilato potásico (pH 6.6 a 25°C), 25 mM Tris-HCl (pH 5,5 a 25°C), 0,2 mM DTT, 0,25 mg/ml BSA, 2,5 mM CoCl₂) durante 5 minutos a temperatura ambiente y se incubaron en mezcla de reacción TdT (30 Al; 98 µl; de tampón de equilibrio, 1 µl de mezcla de nucleótido biotinilado, 1 µl TdT enzima) a 37°C durante 1 hora. La reacción se terminó añadiendo 100 µl 2XSCC (1:10; 2XSCC:agua desionizada), se bloquearon peroxidases endógenas incubando con H₂O₂ (100 µl; 0,3% en PBS) durante 5 minutos a temperatura ambiente, y las células lavadas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en solución HRP estreptavidina (100 µl; 1:500 en PBS), para permitir la fijación

a nucleótidos biotinilados. Se añadió solución de diaminobencidina a células lavadas y se procedió a la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células se lavaron con agua desionizada, se deshidrataron con etanol graduado y luego se aclararon con xileno tras lo cual se montaron portaobjetos en medio de montaje DPX y se recubrieron con el cubreobjetos. Las células positivas TUNEL se expresaron como porcentaje del total.

5 *Análisis estadísticos*

Se analizaron los datos en la forma adecuada usando el test t de Student para medios independientes o utilizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de análisis *post hoc* utilizando el test de Student Newman Keuls.

10 *Resultados*

A: Hipocampo

15 Se calcularon el peso corporal medio, la dosis de uretano administrada para inducir anestesia y la fuerza del estímulo requerido para inducir un epso spike. No existía ninguna diferencia notable entre los grupos en peso corporal (figura 1A) o concentración de uretano (figura 1B) administrada debido a la terapia de inmuno modulación.

20 La figura 1 muestra que la terapia de inmuno modulación no altera de forma notable el peso corporal (a) o la dosis de uretano administrada para inducir la anestesia (b). No obstante, existe un incremento en la amplitud requerida para inducir un potencial de acción (c). Los datos se expresan como medias con errores standard.

25 La estimulación tetánica suministrada a la vía perforante 3 horas después de la inyección intraperitoneal de LPS tuvo como resultado un incremento en la pendiente media del potencial post-sináptico excitatorio de la población (epso). El cambio de porcentaje medio en los 2 minutos que siguen de inmediato a la estimulación tetánica ($\pm$ SEM; comparado con los 5 minutos inmediatamente antes de la estimulación tetánica) fue de 114,49 ($\pm$ 2,79), pero esto no se mantuvo, de forma que el cambio porcentual medio en la pendiente epsp de población en los últimos 5 minutos del experimento fue de 90,32 ($\pm$ 2,42). Los valores correspondientes en las ratas de control tratadas con salino fueron de 170,15 ($\pm$ 10,16) y 121,28 ($\pm$ 1,20), respectivamente (figura 2). La inhibición inducida por LPS de LTP fue bloqueada por el tratamiento previo con terapia de inmuno modulación.

35 La figura 2 demuestra que el deterioro inducido por LPS de LTP fue inhibido por el tratamiento previo con terapia de inmuno modulación. La pendiente epsp de población media inmediatamente después de la estimulación tetánica se atenuó en ratas tratadas con LPS comparado con ratas tratadas con salino y se acercó al nivel inicial al final del período de registro *post-tetanus* de 40 minutos. El efecto inhibitorio de LPS sobre LTP fue bloqueado por el tratamiento previo con terapia de inmuno modulación, que no ejerció ningún efecto notable en ratas expuestas a salino. Los datos presentados son medias de siete a ocho observaciones en cada grupo de tratamiento.

40 El cambio porcentual medio en la pendiente epsp de población ($\pm$ SEM) en los dos minutos inmediatamente posteriores a la estimulación tetánica fue de 166,85 ($\pm$ 4,54) en el grupo expuesto a salino, pretratado “simulado” comparado con 147,44 ($\pm$ 5,84) en el grupo pretratado con terapia de inmuno modulación y expuesto a LPS. En los últimos 5 minutos del experimento los valores fueron de 121,96 ($\pm$ 0,85) y 128,07 ($\pm$ 1,46), respectivamente (n = 7-8).

45 Las células disociadas preparadas a partir de tejido de hipocampo reciente presentaron un mayor número de células apoptóticas después de la inyección de LPS como lo demuestra el número elevado de células que presentan núcleos de coloración marrón oscura, es decir células positivas TUNEL. Esto contrasta con las células preparadas a partir de hipocampo de ratas tratadas con salino y ratas tratadas con terapia de inmuno modulación. El tratamiento con terapia de inmuno modulación invirtió los efectos de LPS tal como lo muestra una reducción en el número de células que presentan tinción positiva TUNEL. El porcentaje de células positivas TUNEL se incrementó notablemente en el grupo tratado con LPS si se compara con el grupo tratado de control ($p \leq 0,01$; ANOVA) y muestra que la terapia de inmuno modulación invirtió el efecto degenerativo de LPS ($p \leq 0,01$; ANOVA).

B: Cortex

55 Se administraron a los animales terapia de inmuno modulación o tratamientos simulados según lo anteriormente descrito y se realizaron las siguientes medidas en el cortex: acumulación de ROS, niveles de TNF- α e IL-10. Estos experimentos se realizaron sin estimulación LPS de los animales.

60 La figura 3 indica que la terapia de inmuno modulación reduce notablemente la acumulación de especies reactivas del oxígeno en el cortex ($p < 0,05$; test t de Student para medias independientes, n = 7-8). Los datos se expresan como medias con errores standard.

65 La concentración de citoquina pro-inflamatoria, TNF- α se reduce notablemente en el cortex como resultado de la terapia de inmuno modulación ($p < 0,01$; test t de Student para medias independientes, fig. 4a). Como contraste, la concentración de IL-10 aumentó notablemente ($p < 0,01$; test t de Student para medias independientes) (fig. 4b). Las figuras 4a y 4b muestran que la terapia de inmuno modulación reduce notablemente la concentración de TNF- α (a) y aumenta de forma notable la de IL-1 β (b) en el cortex ($p < 0,01$; test t de Student para medias independientes; n = 7-8). Los datos se expresan como medias con errores standard.

La figura 5 ilustra que la terapia de inmuno modulación redujo la actividad de JNK como lo indica una disminución en la forma fosforilada de JNK. El análisis de los datos medios obtenidos en el análisis densitométrico indica que la terapia de inmuno modulaciónTM redujo notablemente la actividad de la quinasa ($p < 0,005$; test t de Student para medias independientes). La figura 5 indica que la terapia de inmuno modulación reduce notablemente la actividad de JNK en el cortex ($p < 0,05$; test t de Student para medias independientes; $n = 7-8$). Los datos se expresan como medias con errores standard.

Con respecto a la concentración de IL-1 receptor tipo I en tejido cortical, en el trabajo piloto indica que la terapia de inmuno modulación reduce la expresión de IL-1 receptor tipo I (fig. 6). La concentración de IL-1 β proinflamatorio de ligando por su parte se espera que sea inferior y se encuentra bajo examen. La figura 6 muestra que la terapia de inmuno modulación reduce la concentración de IL-1 receptor tipo I (datos preliminares; $n = 0-3$). Los datos se expresan como medias con errores standard.

El análisis de liberación de glutamato endógeno en sinaptosomas preparados a partir de tejido tetanizado y no tetanizado de estas ratas reveló un efecto notable de la elección de LPS. La adición de 40 mM KC1 a sinaptosomas preparados a partir de dentado gyrus no tetanizado obtenido de ratas de control tratadas con salino incrementó notablemente la liberación de glutamato ($p \leq 0,05$; test t de student para medias emparejadas) aunque de forma atenuada. Esta terapia de inmuno modulación invirtió el bloqueo inducido por LPS de liberación de glutamato estimulado por KC1 en dentado gyrus no tetanizado y de forma más notable en tejido tetanizado ($p < 0,01$; test de t student para medias emparejadas). Esta terapia de inmuno modulación puede ejercer su efecto protector en la función sincística que actúa para prevenir este evento de señalización inducido por LPS.

Bibliografía

Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993 361 (6407):31-9.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 72:248-54.

Green LN. Corticosteroids in the treatment of Sydenham's chorea. *Arch. Neurol*. 1978 Jan.; 35(1): 53-4.

Haan EA, Bowen DM. Protection of neocortical tissue prisms from freeze-thaw injury by dimethyl sulphoxide. *J Neurochem*. 1981 37(1):243-6.

Kedziora J, Bartosz G. Down's syndrome: a pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species. *Free Radic. Biol. Med.*, 1988; 4(5): 317-30.

Kouamé N, Carioto S, Hamet P, Tremblay J. Vasocare-therapy attenuates telemetered temperature response to stress in SHR. 9th International Symposium on SHR and Cardiovascular Genetics, Montreal, Canada, #P-136, November 13-16, 1997.

Layton ME, Pazdemik TL. Reactive oxidant species in piriform cortex extracellular fluid during seizures induced by systemic kainic acid in rats. *J. Mol. Neurosci* 1999 Aug-Oct., 13(1-2): 63-8.

LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol*. 1992 5(2):227-31.

Maroney AC, Glicksman MA, Basma AN, Walton KM, Knight E, Murphy CA, Bartlett BA, Finn JP, Angeles T, Matsuda Y, Neff NT, Dionne CA. Motoneuron apoptosis is blocked by CEP-1347 (KT 7515), a novel inhibitor of the JNK signaling pathway. *J Neurosci*. 1998 18(1):104-11.

Martin DSD, Towey M, Horrobin DF, Lynch MA. A diet enriched in α -lipoic acid reverses the age-related compromise in antioxidant defenses in rat cortical 30 tissue. *Nutritional Neuroscience* 2000 3: 193-206.

McGahon B, Lynch MA. The synergism between metabotropic glutamate receptor activation and arachidonic acid on glutamate release is occluded by induction of long-term potentiation in the dentate gyrus. *Neuroscience*. 1996 72(3):847-55.

Mogi M, Harada M, Narabayashi H, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor- α levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 1996 211(1):13-6.

Murray CA, Lynch MA. Evidence that increased hippocampal expression of the cytokine interleukin-1 β is a common trigger for age- and stress-induced impairments in long-term potentiation. *J Neurosci*. 1998 18(8):2974-81.

O'Donnell E, Vereker E, Lynch MA. Age-related impairment in LTP is accompanied by enhanced activity of stress-activated protein kinases: analysis of underlying mechanisms. *Eur J Neurosci*. 2000 12(1):345-52.

Park DS, Stefanis L, Yan CY, Farinelli SE, Greene LA. Ordering the cell death pathway. Differential effects of BCL2, an interleukin-1-converting enzyme family protease inhibitor, and other survival agents on JNK activation in serum/nerve growth factor-deprived PC12 cells. *J Biol Chem.* 1996 271 (36):21898-905.

5 **Rabinovitch BA, Matukas L, Raju K, Punhani T, deVeber G, Keystone E.** Immune modulation PSCT normalizes the Th2 cell subset in scleroderma. XII Pan-American Congress of Rheumatology, Montreal, Canada, 1998.

Schuchmann S, Heinemann U. Increased mitochondrial superoxide generation in neurons from trisomy 16 mice: a model of Down's syndrome. *Free Radic. Biol. Med* 2000 Jan 15; 28(2): 235-50

10 **Shivji GM, Suzuki H, Mandel AS, Bolton AE, Sauder DN.** The effect of VAS972 on allergic contact hypersensitivity *J Cutan Med Surg.* 2000 4(3):132-7.

15 **Tenneti L, D'Emilia DM, Troy CM, Lipton SA.** Role of caspases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *J Neurochem.* 1998 71 (3):946-59.

Trembovler V, Beit-Yannai E, Younis F, Gallily R, Horowitz M, Shohami E. Antioxidants attenuate acute toxicity of tumor necrosis factor-alpha induced by brain injury in rat. *J. Interferon Cytokine Res* 1999 Jul; 19(7): 791-5.

20 **Vereker E, Campbell V, Roche E, McEntee E, Lynch MA.** Lipopolysaccharide inhibits long term potentiation in the rat dentate gyrus by activating caspase-1. *J Biol Chem.* 2000a 275(34):26252-8.

25 **Vereker E, O'Donnell E, Lynch MA.** The inhibitory effect of interleukin-1b on long-term potentiation is coupled with increased activity of stress-activated protein kinases. *J Neurosci.* 2000b 20(18):6811-9.

Wildburger R, Borovic S, Zarkovic N, and Tatzber F. Post-traumatic dynamic changes in the antibody titer against oxidized low density lipoproteins. *Wien Klin Wochenshr* 2000 Sep 29; 112(18) 798-803.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de una muestra de sangre de mamífero compatible que ha sido tratada *ex vivo* con por lo menos dos factores estresantes elegidos dentro del grupo formado por un entorno oxidativo, estrés térmico y radiación electromagnética, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento profiláctico o terapéutico de una neuropatología cerebral del grupo constituido por el síndrome de Down, la enfermedad de Huntington, el traumatismo encefálico y la epilepsia, la miastenia gravis, la dermatomiositis, la poliomiositis, la miositis de cuerpos de inclusión, el post ictus, la neurosarcooidosis, la demencia vascular, el traumatismo cerrado de la cabeza, el vasospasmo, la hemorragia subaracnoide, la distrofia leucocítica adrenal, la dermatomiositis de cuerpos de inclusión, el deterioro cognitivo mínimo, la distrofia muscular de Duchenne, la polineuropatía demielinizante inflamatoria crónica y el síndrome de Guillain-Barré.
2. La utilización de la reivindicación 1, donde la patología se elige entre el síndrome de Down, la enfermedad de Huntington, el traumatismo encefálico y la epilepsia.
3. La utilización de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el entorno oxidativo comprende la aplicación de un agente oxidante a la muestra.
4. La utilización según la reivindicación 3, donde el agente oxidante contiene gas ozono.
5. La utilización según la reivindicación 3, donde el agente oxidante comprende una mezcla de gas ozono y oxígeno de calidad médica, encontrándose el gas ozono dentro de una mezcla en una concentración de hasta 300 microgramos/ml.
6. La utilización según la reivindicación 5, donde el gas ozono se encuentra dentro de la mezcla en una concentración de hasta 30 microgramos/ml.
7. La utilización según la reivindicación 6, donde el gas ozono se encuentra dentro de la mezcla en una concentración de 13,5 microgramos/ml hasta 15,5 microgramos/ml.
8. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, donde la mezcla se aplica a la muestra con un caudal de hasta 0,33 litros/minuto.
9. La utilización según la reivindicación 8, donde la mezcla se aplica a la muestra con un caudal de 0,21 litros/minuto a 0,27 litros/minuto.
10. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la radiación electromagnética comprende luz ultravioleta que tiene una o más longitudes de onda de banda UV-C.
11. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el factor estresante de temperatura se aplica de forma que la temperatura de por lo menos parte de la muestra esté comprendida entre -5°C y 55°C.
12. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la temperatura media de la sangre en la muestra es del orden de 37°C a 44°C.
13. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde la temperatura media de la sangre en la muestra es del orden de 0°C a 36,5°C.
14. La utilización según la reivindicación 13, donde la temperatura es de $42,5 \pm 1^\circ\text{C}$.
15. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el volumen de la muestra es de hasta 400 ml.
16. La utilización según la reivindicación 15, donde el volumen de la muestra es de 5-15 ml.
17. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra está sometida a los factores estresantes durante 60 minutos como máximo.
18. La utilización según la reivindicación 17, donde la muestra se somete a los factores estresantes durante un período de 2 a 5 minutos.
19. La utilización según la reivindicación 18, donde la muestra se somete a los factores estresantes durante un período de tiempo de 3 minutos.
20. La utilización según la reivindicación 18, donde la muestra se somete a los factores estresantes durante un período de tiempo de 3,5 minutos.
21. La utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde todos los factores estresantes se administran de forma simultanea a la muestra.

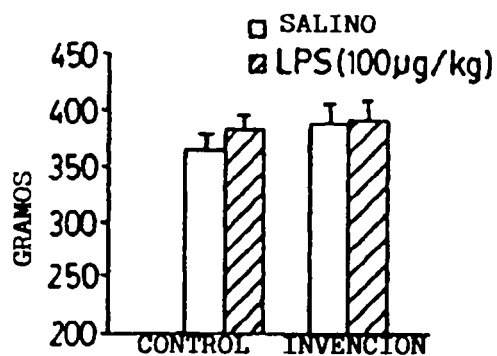


FIG. 1a

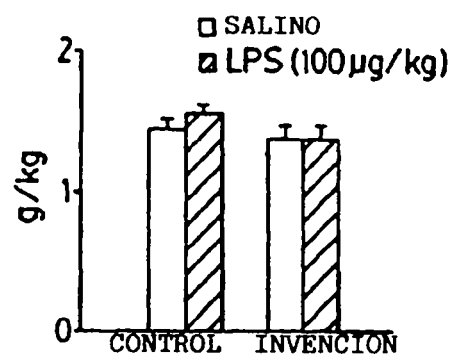


FIG. 1b

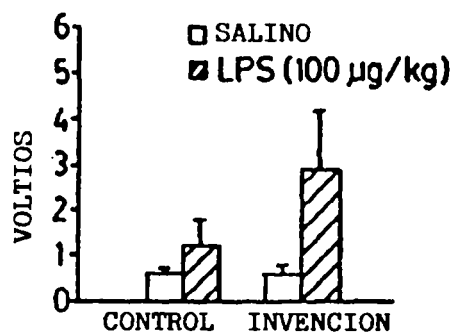
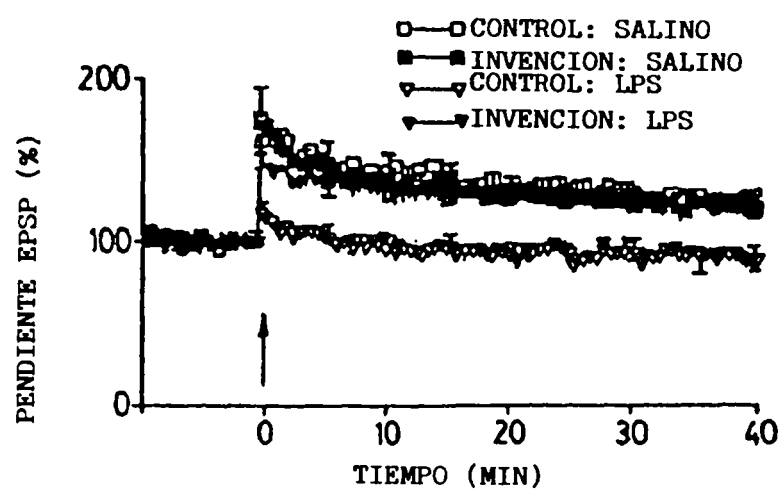


FIG. 1c



PENDIENTE MEDIA EPSP PRE-TETANOS

FIG. 1d

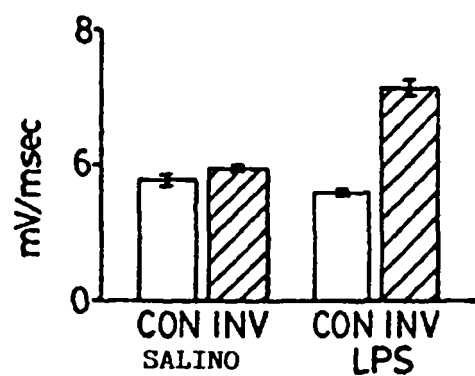


FIG. 2a

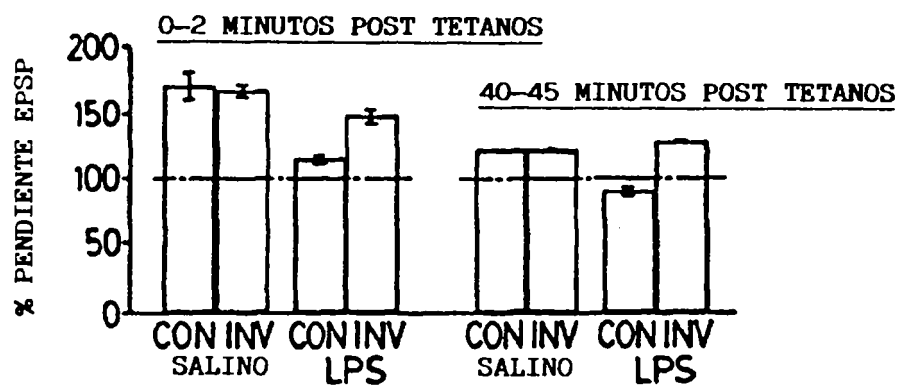


FIG. 2b

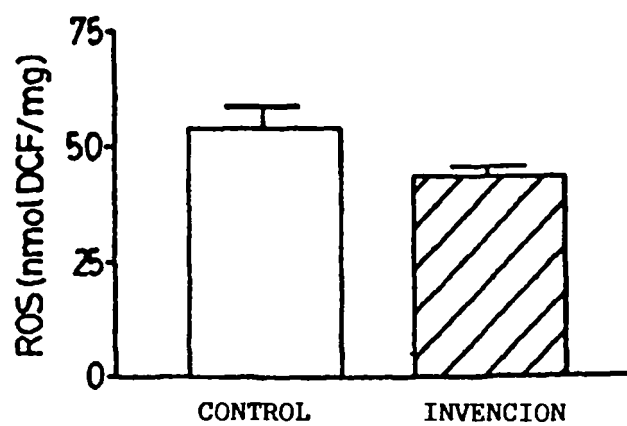


FIG. 3

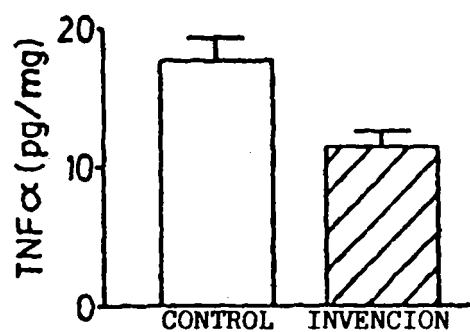


FIG. 4a

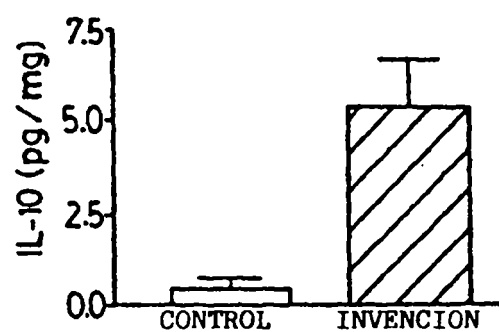


FIG. 4b

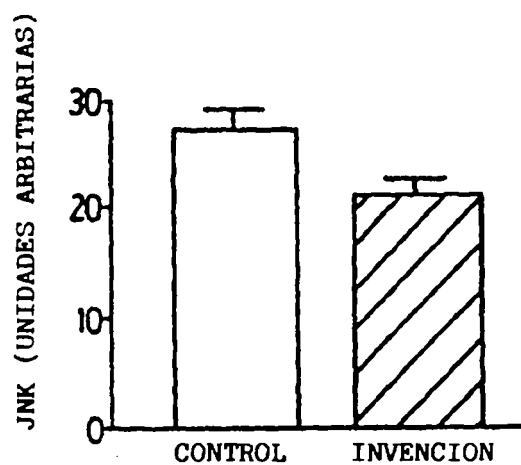


FIG. 5

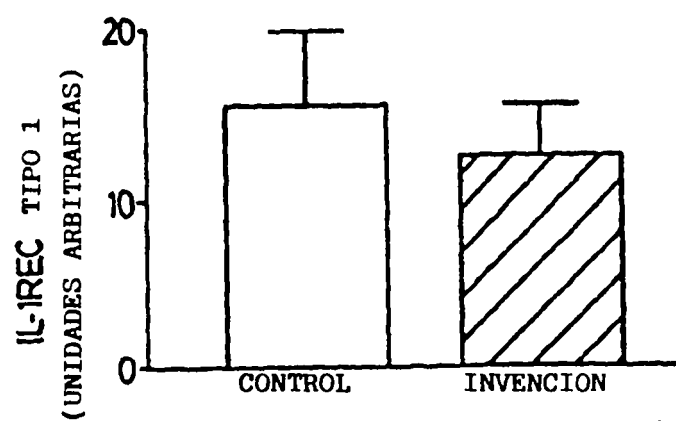


FIG. 6