

Acción neuroinflamatoria y neurotrófica de las quimiocinas durante un proceso isquémico cerebral

RESUMEN

El cerebro es muy vulnerable ante la hipoxia y la isquemia y los mecanismos de daño han sido estudiados; sin embargo, la respuesta neuroinmunológica ha mostrado tener una función dual, donde puede causar tanto inflamación como neurogénesis. El proceso inflamatorio durante la isquemia cerebral implica la participación de la glía y de la microglía, mediando la migración, la infiltración y la acumulación de leucocitos al parénquima cerebral durante la isquemia. En la enfermedad cerebrovascular se ha demostrado la expresión de citocinas (IL-1 β , TNF α , IFN γ) y de quimiocinas como CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES) y CXCL1 (GRO- α) que precede a la infiltración de los leucocitos hacia la lesión isquémica, actuando a través de sus receptores CCR2, CCR5 y de CXCR2, respectivamente. La inflamación contribuye a la lesión tisular durante la fase temprana de la respuesta hipóxica-isquémica y durante el proceso de cicatrización en la fase tardía de la isquemia cerebral. Se ha buscado utilizar nuevos medicamentos que puedan bloquear la respuesta neuroinmunológica, en especial la transcripción de quimiocinas y por ende la activación de glía y microglía que podría ser importante para la recuperación del paciente con ictus isquémico y restaurar la funcionalidad del tejido cerebral; sin embargo, la neurogénesis puede ser afectada. Hemos centrado esta revisión en la acción neuroinflamatoria y neurogénica, incluyendo la acción sobre la proliferación, migración y diferenciación de las células progenitoras neuronales inducidas por quimiocinas CCL2, CCL5 y CXCL1 en la respuesta neuroinflamatoria durante un proceso de isquemia cerebral.

Palabras clave: CCL2, CCL5, CXCL1, receptores, neuroinmunología, isquemia cerebral.

Neuroinflammation and neurotrophic actions of chemokines during a cerebral ischemic process

ABSTRACT

The brain is highly vulnerable to hypoxia and ischemia, damage mechanisms have been studied, but the neuroimmunology response was shown to have a dual function, which can cause inflammation and neurogenesis. The inflammatory process involves the participation of glia and microglia as the principal effectors of immunity within the central nervous system, mediating migration, infiltration and accumulation

Víctor Manuel Blanco-Álvarez¹

Guadalupe Soto-Rodríguez²

Juan Antonio González-Barrios³

Omar Beltrán-Galindo⁴

Daniel Martínez-Fong⁵

Bertha Alicia León-Chávez⁶

^{1,4,6} Posgrado de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

² Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV.

^{3,5} Hospital Regional 1º de Octubre, ISSSTE.

Recibido: 9 septiembre 2014

Aceptado: 20 febrero 2015

Correspondencia: Dra. Bertha Alicia León Chávez

Posgrado de Ciencias Químicas

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

S14 sur y Av. San Claudio, Edif. 138

CP 72570 Puebla, Puebla, México

alileon04@yahoo.com.mx

Este artículo debe citarse como

Blanco-Álvarez VM, Soto-Rodríguez G, González-Barrios JA, Beltrán-Galindo O, Martínez-Fong D, León-Chávez BA. Acción neuroinflamatoria y neurotrófica de las quimiocinas durante un proceso isquémico cerebral. Rev Esp Med Quir 2015;20:184-192.

of leukocytes such as macrophages, neutrophils and lymphocytes to brain parenchyma during ischemia. Cerebrovascular disease has been shown that increases the expression of cytokines (IL-1 β , TNF α , IFN γ) and chemokines such as CCL2 (MCP-1), CCL5 (RANTES) and CXCL1 (GRO- α) preceding the leukocyte infiltration into the ischemic lesion, acting through its receptor CCR2, CCR5 and CXCR2, respectively. The inflammation contributes to tissue damage during the early phase of the hypoxic-ischemic response and healing during the late phase of cerebral ischemia. In therapeutic strategies has been sought to use new drugs that can block the neuroimmunologic response particularly transcription of chemokines and therefore activation of glia and microglial cells, which could be important for the recovery of patients with ischemic stroke and restore functionality of the brain tissue. However, the neurogenesis can be affected. We have focused this review on the neuroinflammatory, neurotrophic, neurogenic action, including action on proliferation, migration and differentiation of neural progenitor cells by chemokines CCL2, CCL5 and CXCL1 induced neuroinflammatory response during the process of cerebral ischemia.

Key words: CCL2, CCL5, CXCL1, receptors, neuroimmunology.

Etiología de la enfermedad cerebrovascular

La enfermedad cerebrovascular comprende un conjunto de signos y síntomas debidos a la disminución del flujo sanguíneo y es la tercera causa de muerte a escala mundial. Se debe a la oclusión de un vaso sanguíneo por un trombo o ateroma, lo que resulta en una pérdida casi inmediata de oxígeno y glucosa en el tejido cerebral, produciendo isquemia cerebral que puede ser clasificada como focal o global. La isquemia focal se limita a una zona específica mientras que la isquemia global abarca una amplia zona del cerebro.¹ Las causas más frecuentes de la enfermedad cerebrovascular son: trombosis ateroesclerótica, hemorragia cerebral hipertensiva, crisis isquémica transitoria, embolia, rotura de aneurismas o malformaciones arteriovenosas, vasculitis, tromboflebitis, alteraciones hematológicas (policitemia, púrpura trombocitopénica), traumatismos de la arteria carótida, aneurisma aórtico disecante, hipotensión sistémica, cefalalgia con déficit neurológico, etcétera.¹

Respuesta inmunológica durante la isquemia

La respuesta inmunológica participa a través de la liberación de mediadores (citocinas y quimiocinas) para activar y atraer a las células inmunológicas al sitio de daño. Las quimiocinas son proteínas de bajo peso molecular que participan en los procesos inflamatorios pero también regulan funciones de comunicación celular y reclutamiento de células no solo leucocitarias sino también precursoras.

Las quimiocinas se subdividen en cuatro familias de acuerdo con la nomenclatura sistemática, considerando el número y el espaciamiento de los 4 residuos de cisteína altamente conservados en el extremo N-terminal de la proteína: 1) la familia CXC o alfa para proteínas quimiotácticas que tienen los residuos de cisteína separados por un aminoácido; 2) la familia CC o beta para proteínas quimiotácticas donde las cisteínas son adyacentes; 3) la familia CX3C o delta para proteínas quimiotácticas que contienen 3 ami-

noácidos entre las cisteínas y 4) la familia C o gamma para la proteína quimiotáctica que sólo tiene 2 de los 4 residuos de cisteína.²

Las principales quimiocinas expresadas durante el infarto cerebral son: CXCL1 que interviene en la quimiotaxis de neutrófilos hacia las zonas dañadas del cerebro y se expresa durante la disrupción de la barrera hematoencefálica; CCL2 que altera la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, implicada en la migración de la microglía y de células madre derivadas de la médula ósea hacia áreas isquémicas cerebrales con el objetivo de colaborar en la regeneración de la zona afectada^{3,4} y CCL5 que participa en la amplificación del proceso inflamatorio. En la Figura 1 se muestra el proceso de migración donde participan las quimiocinas a través de su receptor, los pasos son: rodamiento de los leucocitos a través de la expresión de selectinas por la estimulación de citocinas (IL-1 β , IFN γ y TNF α), la activación de los leucocitos y la expresión de integrinas en el endotelio para que se lleve a cabo la adhesión y la transmigración de los leucocitos al parénquima del cerebro. La expresión de las quimiocinas promueve la quimiotaxis de los leucocitos; CXCL1 de neutrófilos, CCL2 de monocitos/macrófagos y CCL5 de linfocitos.^{3,4}

A continuación se describen las funciones de cada una de estas quimiocinas y sus receptores en la enfermedad cerebrovascular.

La CXCL1 participa en la inflamación

CXCL1 ha sido considerada como una proteína específica para el accidente cerebrovascular debido a que, en pacientes con infarto, se encuentran elevadas concentraciones séricas de IL-9 y CXCL1³ produciendo infiltración de neutrófilos que contribuyen a la lesión tisular. CXCL1 se mantiene aumentada durante la reacción inflamatoria desde las 6 horas y hasta las 24 horas

tras el inicio de la enfermedad cerebrovascular isquémica.^{4,5} Además, las células residentes del cerebro (células gliales y neuronas) también son fuentes locales de CXCL1 durante la enfermedad cerebrovascular, su receptor CXCR2 es expresado predominantemente en neuronas y oligodendrocitos,⁵ así como en neutrófilos, mastocitos, algunos linfocitos T⁶ y en las células microgliales activadas. CXCL1 y CXCL2 son producidas por células periféricas como las endoteliales, fibroblastos, monocitos y macrófagos, así como por los neutrófilos, lo que sugiere que los neutrófilos regulan su propia migración a partir de la expresión tanto del receptor como del ligando.⁷ La expresión de CXCR2 se incrementa en el cerebro después de la isquemia cerebral y esta expresión sigue aumentada por lo menos durante 72 horas después del daño.⁸

La infiltración de neutrófilos es significativa en el cerebro después de la enfermedad cerebrovascular con una duración hasta de 3 días después del daño, incrementando el número de células sanguíneas infiltradas y por lo tanto el edema y la inflamación.⁹

La CCL5 amplifica la respuesta inflamatoria

CCL5 media la inflamación sistémica crónica que exacerba el accidente cerebrovascular.¹⁰ El incremento de CCL5 ha sido eficaz en predecir el riesgo de la enfermedad cerebrovascular isquémica¹¹ durante la inflamación debido a que está relacionada con la liberación de histamina de los basófilos y media la activación de los eosinófilos. CCL5 es capaz de unirse a los receptores CCR1, CCR3, CCR4 y CCR5 siendo este último el principal receptor en el SNC.¹¹

La CCL5 actúa de varias formas: media la quimiotaxis o la migración celular a través de receptores acoplados a proteína Gq (GPCR) en concentraciones nanomolares y, en su forma agregada, induce la activación celular (proli-

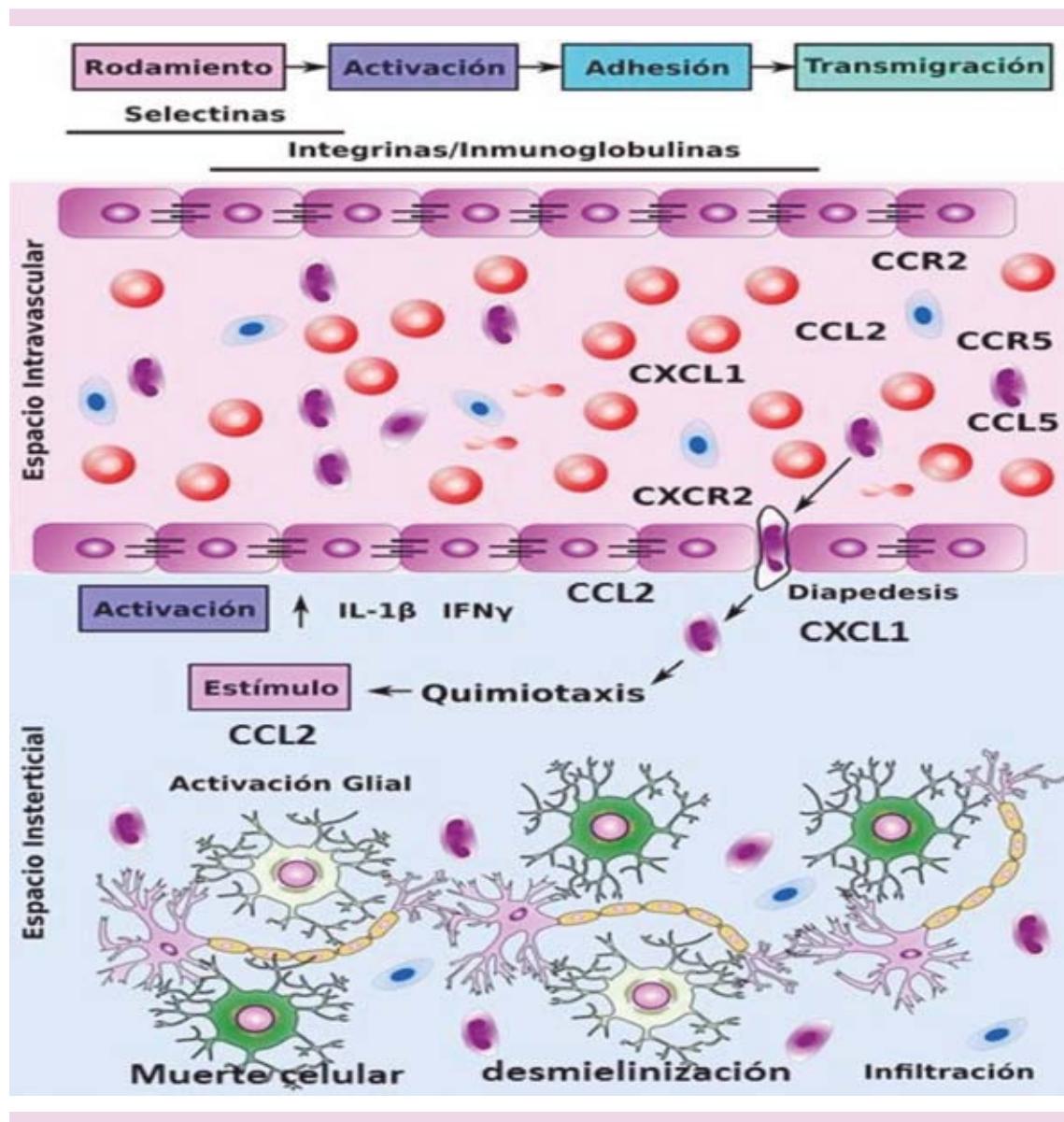


Figura 1. Acción de las quimiocinas durante la isquemia cerebral; inflamación: en la fase temprana se produce la infiltración de leucocitos. Esto consiste en varios procesos: 1) rodamiento donde las citocinas (IL-1 β e IFN γ) inducen la expresión de selectinas en los leucocitos: NE, neutrófilos, linfocitos y macrófagos; 2) activación de las células; 3) adhesión de las células al endotelio a través de la unión a integrinas/inmunoglobulinas y 4) transmigración de las células al parénquima cerebral donde se lleva a cabo la liberación de las quimiocinas por los astrocitos y la microglía. Se produce un proceso inflamatorio que causa desmielinización y muerte celular.

feración, apoptosis y liberación de citocinas) en concentraciones micromolares a través de una trayectoria independiente de GPCR.¹² La

CCL5 se libera a partir de los gránulos- α de las plaquetas activadas o micropartículas de plaquetas que se unen a los glicosaminoglica-

nos en la superficie celular endotelial, donde favorecen la adhesión de leucocitos.¹³ Estudios en pulmón demuestran que la CCL5 es capaz de aumentar la permeabilidad vascular después de la isquemia-reperfusión,¹⁴ además la CCL5 participa como quimiocina aterogénica en la enfermedad vascular y en las morbilidades asociadas con el infarto.¹⁵

La infección crónica periférica exacerba el daño cerebral isquémico por regulación positiva sistémica de CCL5¹⁶ debido a que es una mediadora de la disrupción de la barrera hematoencefálica en la isquemia-reperfusión, en la lesión de los tejidos, en el proceso inflamatorio y la protrombogenia resultado de la microvasculatura cerebral focal después del daño. El efecto protector de la deficiencia de CCL5 ha sido vinculado con los cambios en las concentraciones plasmáticas de ciertas citocinas como son IL-6, IL-10 e IL-12.¹⁵

La CCR5 se ha detectado como una expresión constitutiva en astrocitos, microglía y neuronas.^{15,17} La deficiencia de CCR5 se ha visto que aumenta la lesión posisquémica, sugiriendo un papel neuroprotector.¹⁸ El mecanismo subyacente del efecto protector de la CCR5 después de la enfermedad cerebrovascular es debido a su capacidad de regular la respuesta inflamatoria;¹⁹ además de que la actividad de la CCR5 modifica la supervivencia de neuronas y astrocitos después de la isquemia.¹⁸

La CCL2 participa en la inflamación y la neurogénesis

La CCL2 es miembro de la familia de las CC (β) quimiocinas, un potente quimiotáctico tanto para células precursoras como para monocitos y macrófagos. La CCL2 es producida por una gran variedad de células tanto de forma constitutiva o inducida por estrés oxidativo, citocinas o factores de crecimiento. La CCL2 cuenta con dos

regiones críticas para su actividad biológica:²⁰ la primera región consiste en la secuencia de Thr-10 a Tyr-13, mientras que la segunda región, funcionalmente importante, se encuentra entre los residuos Ser-34 y Lys-35.²¹ En el cerebro la síntesis de CCL2 es inducida rápidamente durante la inflamación.^{22,23} La producción de citocinas en el cerebro coincide con la regulación positiva de CCL2 y precede de la activación microglial o infiltración de macrófagos de la periferia y la microglía residente, es poco probable que la influencia de CCL2 en la producción de forma aguda de citocinas dependa de la quimiotaxis de los leucocitos y la posterior secreción a partir de estas células.²⁴

La CCL2 es una de las quimiocinas más estudiadas en la migración de las células inflamatorias en la patogénesis de la enfermedad cerebrovascular. Su acción biológica la realiza a través de la activación del receptor CCR2, que juega un papel crítico en el desarrollo de la enfermedad cardiovascular. El incremento en los niveles de CCL2 en la circulación de los pacientes con complicaciones asociadas con los procesos inflamatorios contribuye a la patogénesis del infarto de miocardio y de la enfermedad cerebrovascular isquémica; la sobreexpresión de CCL2 en el cerebro agrava la lesión isquémica²⁵ mientras que su deficiencia confiere neuroprotección ante la obliteración permanente de la arteria carótida primitiva.²⁶ Sin embargo, los mecanismos moleculares que subyacen a la función de CCL2 en el desarrollo y la progresión de la enfermedad no han sido completamente dilucidados,²⁷ se sabe que CCL2 cuenta con un papel dual ya que se encuentra involucrada tanto en procesos fisiológicos como patológicos en el sistema nervioso central, su expresión de manera normal comienza en una etapa temprana del desarrollo.²⁸ La CCL2 es producida por muchos tipos celulares incluyendo fibroblastos endoteliales, epiteliales y musculares; células mesangiales, astrocitos, monocitos y microglía.²⁹

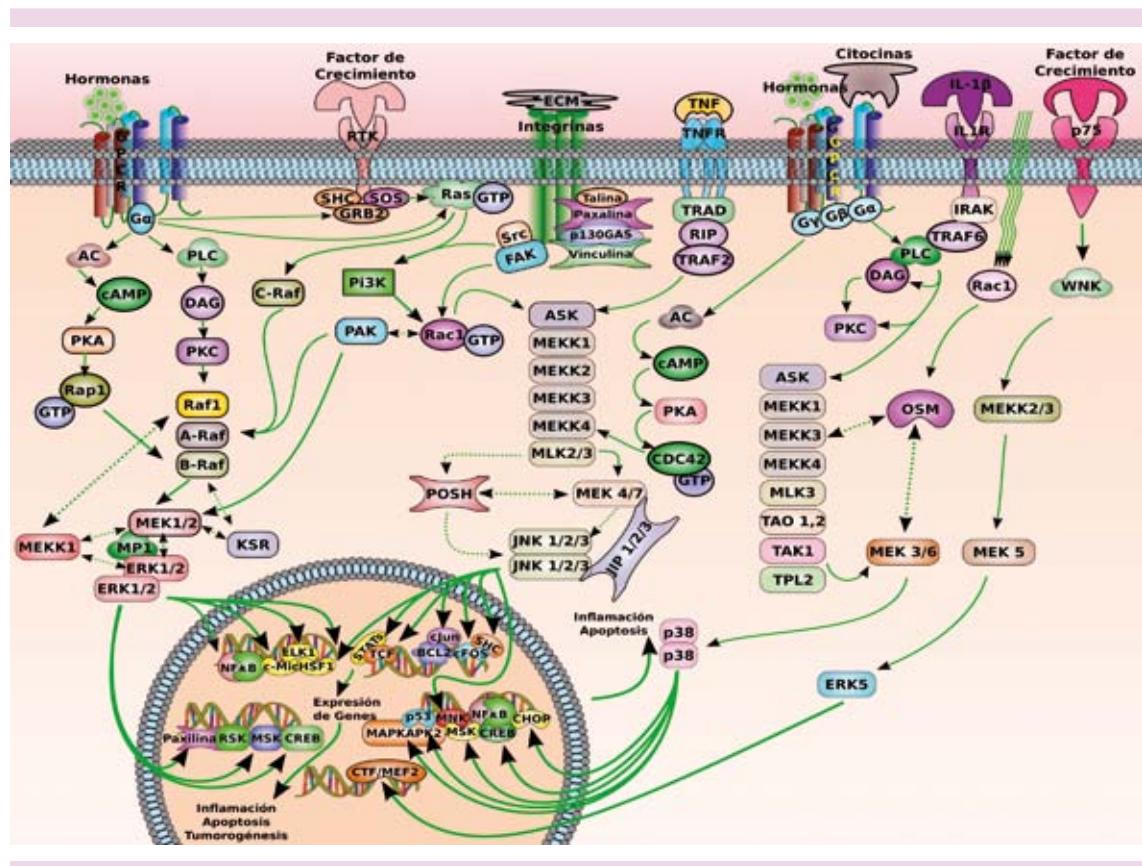


Figura 2. Vía de señalización de quimiocinas y factores de crecimiento. Los factores de crecimiento activan la vía de Raf o Rac para activar MEK1/2 y se lleve a cabo la expresión de genes a través de factores de transcripción como son NF κ B, CREB o por la vía de JNK para activar cFos. Por otro lado, las citocinas se unen a sus receptores acoplados a proteína G que activan la vía de MEKK4, JNK. TNF se une a su receptor acoplados a TRAD, RIP y TRAF2 que activan ASK y la vía de MEKK. La IL-1 β a través de su receptor activa la vía de IRAK, TRAF6, PLC donde DAG activa PKC y activa la vía de MEKK. La expresión de genes puede estar asociada con inflamación, apoptosis o tumorogénesis, dependiendo del proceso de activación de la vía de señalización.

En la Figura 2 se muestra la vía de señalización de citocinas, factores de crecimiento y hormonas, donde se entrelazan las cascadas de señalización y depende de la vía que se active para llevar a cabo ya sea la inflamación o la neurogénesis.

En la isquemia cerebral, la falta del receptor de CCL2, CCR2, reduce en gran medida la formación de edema cerebral y la disrupción de la barrera hematoencefálica, así como la

disminución de la infiltración de leucocitos y la disminución en la expresión de una amplia variedad de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF α , IFN γ) durante la reperfusión. La ausencia de CCR2 reduce la infiltración de neutrófilos y monocitos, disminuye la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales y, en este caso, impide la interacción leucocito-célula endotelial; también puede modular directamente citocinas y quimiocinas CXC que alteran la respuesta inflamatoria.^{30,31}

Sin embargo, se ha demostrado que la CCR2 es necesaria para la migración de células madre neurales para promover la regeneración del sistema nervioso central a través del efecto quimiotáctico de CCL2.³²

En cultivos de neuronas de hipocampo de rata CCL2 y MIP-2 inducen la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (FGF2), el medio condicionado derivado de astrocitos estimulados con CCL2 también facilitó la supervivencia y la diferenciación neuronal dependiente de FGF2, sugiriendo un papel del astrocito como una fuente de soporte trófico. Estos datos apoyan la función autocrina de CCL2 y MIP-2 para inducir la supervivencia de neuronas del hipocampo ante un daño tóxico.³³

Sin embargo, se ha mostrado la acción neurotrófica/neurogénesis de las quimiocinas, promoviendo la neuritogénesis para que cuando

se pierdan neuronas, se lleve a cabo la plasticidad sináptica, la remielinización de aquellas neuronas que realizan nuevos contactos y la supervivencia neuronal (Figura 3).

Perspectivas terapéuticas para inhibir la inflamación en el cerebro

En la actualidad se está investigando la capacidad del fármaco DF2156A para el tratamiento de la enfermedad cerebrovascular. Es un potente y selectivo inhibidor alostérico no competitivo y dual; actúa por interacciones polares estabilizadas por un enlace iónico con Lys99 que es determinante para la unión con el receptor CXCR1 en su dominio transmembranal 2. Por otro lado, en el receptor CXCR2, DF2156A tiene su acción sobre Asp293 en el motivo transmembranal 7, su principal actividad terapéutica se enfoca en disminuir la migración de leucocitos en modelos experimentales de inflamación

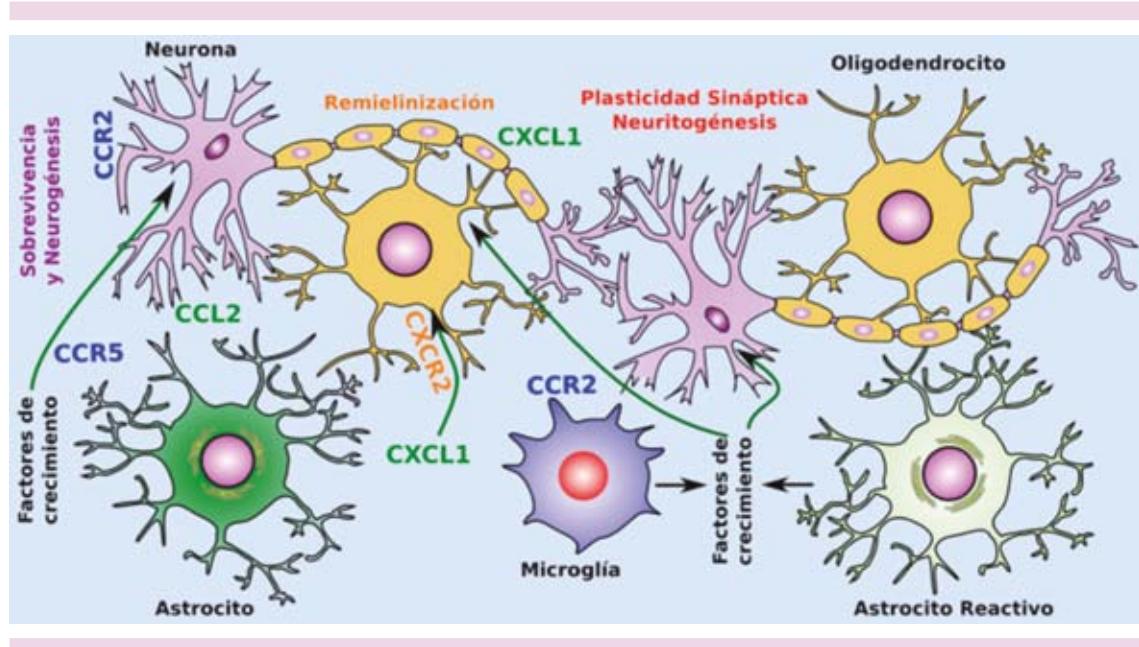


Figura 3. Neuritogénesis y neurogénesis después de un proceso isquémico cerebral. En etapas tardías los astrocitos liberan quimiocinas (CCL2) a través del receptor (CCR2) que activan y causan la migración de la microglía, liberando factores de crecimiento para promover la supervivencia y neuritogénesis promoviendo la plasticidad sináptica y CXCL1, a través de su receptor CXCR2, produce la remielinización.

tanto agudos como crónicos.^{34,35} Este fármaco de segunda generación es un derivado del repaxin (anteriormente repertaxin), antagonista de CXCL8 con un perfil farmacocinético óptimo, tiene un tiempo de vida media larga y alta biodisponibilidad al administrarse por vía oral.³⁴ El DF2156A inhibe eficaz y selectivamente a CXCR1 y CXCR2, mediadores de la quimiotaxis, con una IC_{50} (concentración inhibitoria 50) en el intervalo de 1 a 2 nM; en estudios *in vitro* el DF2156A impide la proliferación, migración y organización de tipo capilar en las células HUVEC ante la respuesta de IL-8 humana. *In vivo*, en un modelo murino DF2156A reduce la afluencia de leucocitos, la producción de TNF- α y la angiogénesis.³⁴ En un modelo de rata con lesión hepática, isquemia cerebral y reperfusión el DF2156A bloquea casi completamente la infiltración de polimorfonucleares y el daño hepatocelular inducido por la reperfusión en la etapa tardía. Los resultados obtenidos con una sola dosis de DF2156A concuerdan con la reducción de la infiltración de los polimorfonucleares y la disminución de daño hepatocelular.³⁵ El DF2156A no mostró toxicidad en roedores ni en especies animales no roedoras después de administraciones agudas y crónicas por vía oral hasta en dosis de 200 mg/kg; tampoco mostró efecto sobre el sistema inmunológico.³⁶ El DF2156A cuenta con un potencial terapéutico en la prevención de la lesión isquémica cerebral y reperfusión y en el rechazo agudo en el trasplante de órganos, así como en las enfermedades inflamatorias crónicas. Sin embargo, no debemos olvidar que la interacción de algunas quimiocinas/receptor tiene efecto en supervivencia y neurogénesis en la enfermedad cerebrovascular.

CONCLUSIÓN

Las quimiocinas ejercen su acción inflamatoria clásica ante un daño cerebral; sin embargo, algunas de ellas han mostrado tener un efecto neuroprotector induciendo la síntesis de factores

de crecimiento para llevar a cabo la regeneración del cerebro. No obstante, esto debe ser llevado a cabo en el tiempo preciso, con las condiciones microambientales adecuadas y con la presencia de células precursoras. Los pacientes durante un proceso isquémico normalmente tardan horas para llegar al hospital y recibir tratamiento, en este tiempo se produce la muerte neuronal y después de algunos días el sistema nervioso responde incrementando factores de crecimiento, actuando en aquellas células sobrevivientes y promoviendo la regeneración llevándose a cabo la plasticidad neuronal, donde se presenta el crecimiento de neuritas y la producción de algunos contactos sinápticos. Se debe de trabajar para establecer estrategias terapéuticas que permitan que se favorezca la supervivencia neuronal y la neurogénesis desde la fase temprana de la isquemia.

REFERENCIAS

1. Gusev EI, Skvortsova VI, & Martynov MI. [Cerebral stroke: problems and solutions]. Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk 44-48 (2003).
2. Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Florio T & Schettini G. Chemokines and their receptors in the central nervous system. Front Neuroendocrinol. 22, 147-184 (2001).
3. Ormstad H, Aass H.C., Amthor K.F., Lund-Sorensen N., & Sandvik L. Serum cytokine and glucose levels as predictors of poststroke fatigue in acute ischemic stroke patients. J Neurol 258, 670-676 (2011).
4. Losy J, Zaremba J & Skrobanski P. CXCL1 (GRO-alpha) chemokine in acute ischaemic stroke patients. Folia Neuropathol 43, 97-102 (2005).
5. Puma C, Danik M, Quirion R, Ramon F, & Williams S. The chemokine interleukin-8 acutely reduces Ca(2+) currents in identified cholinergic septal neurons expressing CXCR1 and CXCR2 receptor mRNAs. J. Neurochem. 78, 960-971 (2001).
6. Lippert U, Zachmann K, Henz BM & Neumann C. Human T lymphocytes and mast cells differentially express and regulate extra- and intracellular CXCR1 and CXCR2. Exp. Dermatol. 13, 520-525 (2004).
7. Brait VH et al. Chemokine-related gene expression in the brain following ischemic stroke: no role for CXCR2 in outcome. Brain Res. 1372, 169-179 (2011).
8. Chapman AL, Skaff O, Senthilmohan R, Kettle AJ & Davies MJ. Hypobromous acid and bromamine production by

- neutrophils and modulation by superoxide. *Biochem. J.* 417, 773-781 (2009).
9. Denes A, Thornton P, Rothwell NJ & Allan SM. Inflammation and brain injury: acute cerebral ischaemia, peripheral and central inflammation. *Brain Behav. Immun.* 24, 708-723 (2010).
 10. Mirabelli-Badenier M, et al. CC and CXC chemokines are pivotal mediators of cerebral injury in ischaemic stroke. *Thromb. Haemost.* 105, 409-420 (2011).
 11. Lim JK, Burns JM, Lu W & DeVico AL. Multiple pathways of amino terminal processing produce two truncated variants of RANTES/CCL5. *J. Leukoc. Biol.* 78, 442-452 (2005).
 12. Appay,V. & Rowland-Jones,S.L. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* 22, 83-87 (2001).
 13. von HP, et al. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation* 103, 1772-1777 (2001).
 14. Krishnadasan B, et al. Beta-chemokine function in experimental lung ischemia-reperfusion injury. *Ann. Thorac. Surg.* 77, 1056-1062 (2004).
 15. Terao S, et al. Blood cell-derived RANTES mediates cerebral microvascular dysfunction, inflammation, and tissue injury after focal ischemia-reperfusion. *Stroke* 39, 2560-2570 (2008).
 16. Denes A, et al. Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 1941-1953 (2007).
 17. Torres-Munoz JE, Van WC, Keegan MG, Bookman RJ & Petito C.K. Gene expression profiles in microdissected neurons from human hippocampal subregions. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 127, 105-114 (2004).
 18. Sorice S, et al. Increased brain damage after ischaemic stroke in mice lacking the chemokine receptor CCR5. *Br. J. Pharmacol.* 160, 311-321 (2010).
 19. Babcock AA, Kuziel WA, Rivest S & Owens T. Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS. *J. Neurosci.* 23, 7922-7930 (2003).
 20. Beall,C.J., Mahajan,S., Kuhn,D.E., &Kolattukudy,P.E. Site-directed mutagenesis of monocyte chemoattractant protein-1 identifies two regions of the polypeptide essential for biological activity. *Biochem. J.* 313 (Pt 2), 633-640 (1996).
 21. Chakravarty,L., Rogers,L., Quach,T., Breckenridge,S., &Kolattukudy,P.E. Lysine 58 and histidine 66 at the C-terminal alpha-helix of monocyte chemoattractant protein-1 are essential for glycosaminoglycan binding. *J. Biol. Chem.* 273, 29641-29647 (1998).
 22. Semple,B.D., Frugier,T., &Morganti-Kossmann,M.C. CCL2 modulates cytokine production in cultured mouse astrocytes. *J. Neuroinflammation*. 7, 67 (2010).
 23. Semple,B.D., Bye,N., Rancan,M., Ziebell,J.M., &Morganti-Kossmann,M.C. Role of CCL2 (MCP-1) in traumatic brain injury (TBI): evidence from severe TBI patients and CCL2-/ mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 30, 769-782 (2010).
 24. Thompson,W.L., Karpus,W.J., & Van Eldik,L.J. MCP-1-deficient mice show reduced neuroinflammatory responses and increased peripheral inflammatory responses to peripheral endotoxin insult. *J. Neuroinflammation*. 5, 35 (2008).
 25. Chen,D. et al. Differential chemokine and chemokine receptor gene induction by ischemia, alloantigen, and gene transfer in cardiac grafts. *Am. J. Transplant.* 3, 1216-1229 (2003).
 26. Hughes,P.M. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 308-317 (2002).
 27. Dawson, J., Miltz,W., Mir,A.K., &Wiessner,C. Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signalling in disease. *Expert. Opin. Ther. Targets.* 7, 35-48 (2003).
 28. Mahad,D.J. &Ransohoff,R.M. The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin. Immunol.* 15, 23-32 (2003).
 29. Barna, B.P. et al. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 expression in adult human non-neoplastic astrocytes is sensitive to tumor necrosis factor (TNF) or antibody to the 55-kDa TNF receptor. *J. Neuroimmunol.* 50, 101-107 (1994).
 30. Dimitrijevic, O.B., Stamatovic, S.M., Keep,R.F., & Andjelkovic, A.V. Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Stroke* 38, 1345-1353 (2007).
 31. Tang,G., Charo,D.N., Wang,R., Charo,I.F., &Messina,L. CCR2-/ knockout mice revascularize normally in response to severe hindlimb ischemia. *J. Vasc. Surg.* 40, 786-795 (2004).
 32. Andres R.H. et al. The CCR2/CCL2 interaction mediates the transendothelial recruitment of intravascularly delivered neural stem cells to the ischemic brain. *Stroke* 42, 2923-2931 (2011).
 33. Kalehua AN, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage inflammatory protein-2 are involved in both excitotoxin-induced neurodegeneration and regeneration. *Exp. Cell Res.* 297, 197-211 (2004).
 34. Bertini R. et al. Receptor binding mode and pharmacological characterization of a potent and selective dual CXCR1/CXCR2 non-competitive allosteric inhibitor. *Br. J. Pharmacol.* 165, 436-454 (2012).
 35. Cavalieri B et al. Neutrophil recruitment in the reperfused-injured rat liver was effectively attenuated by repertaxin, a novel allosteric noncompetitive inhibitor of CXCL8 receptors: a therapeutic approach for the treatment of post-ischemic hepatic syndromes. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 18, 475-486 (2005).
 36. Hirose M, Götz J, Recke A, Zillikens D, Ludwig RJ. The Allosteric CXCR1/2 Inhibitor DF2156A Improves Experimental Epidermolysis Bullosa Acquisita. *J Genet Syndr Gene Ther* 2013 S3:005.