

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA CELULAR A LA CONTUSION
CORTICAL EN HUMANOS: ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE TEJIDO
DERIVADO DE CRANIOECTOMÍA DECOMPRESIVA**



EFRAÍN BURITICÁ RAMÍREZ

Tesis de Doctorado en Ciencias Básicas Médicas

Universidad del Valle
Facultad de Salud
Escuela de Ciencias Básicas
Centro de Estudios Cerebrales
Santiago de Cali, Enero de 2015

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA CELULAR A LA CONTUSION
CORTICAL EN HUMANOS: ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE TEJIDO
DERIVADO DE CRANIOECTOMÍA DECOMPRESIVA**



EFRAÍN BURITICÁ RAMÍREZ

Tesis de Doctorado en Ciencias Básicas Médicas

Director:

Hernán José Pimiento Jiménez, Magister en Morfología

Asesora:

Martha Isabel Escobar Betancourt, Magister en Morfología

Universidad del Valle

Facultad de Salud – Escuela de Ciencias Básicas

Centro de Estudios Cerebrales

Santiago de Cali, Enero de 2015

**ESTUDIO DE LA RESPUESTA CELULAR A LA CONTUSION
CORTICAL EN HUMANOS: ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE TEJIDO
DERIVADO DE CRANIOECTOMÍA DECOMPRESIVA**

EFRAÍN BURITICÁ RAMÍREZ

Tesis de Doctorado presentada como requisito para optar por el título de:

Doctor en Ciencias Básicas Médicas

Director:

Hernán José Pimienta Jiménez, Magister en Morfología

Asesora:

Martha Isabel Escobar Betancourt, Magister en Morfología

Línea de investigación:

Respuesta celular a la lesión cerebral

Grupo de investigación:

Centro de Estudios Cerebrales

Universidad del Valle

Facultad de Salud

Escuela de Ciencias Básicas

Santiago de Cali, Enero de 2015

*A mi señora madre,
Martha Lucía Ramírez
Q.E.P.D.*

Agradecimientos

El autor desea expresar sus agradecimientos a las siguientes personas:

- Al Dr. Hernán José Pimiento Jiménez, director del Centro de Estudios Cerebrales, por su amor y dedicación a la investigación, permanente orientación y exigencia, por su instrucción tanto personal como profesional, en la ciencia y en la docencia.
- A la Dra. Martha Isabel Escobar Betancourt, por su amor y dedicación a la investigación, permanente orientación y exigencia, por su instrucción tanto personal como profesional, en la ciencia y en la docencia, y por sus valiosos aportes en la revisión del presente manuscrito.
- A mis compañeros en la línea de investigación “Respuesta Celular a la Lesión Cerebral” del Centro de Estudios Cerebrales, David Riascos, Liliana Villamil, Francisco Guzmán, Mauricio Palacios, Eliecer Jiménez, Lina Becerra, Diana González, Gloria Aldana, Isaac Arbeláez, con quienes aprendí acerca del trabajo en equipo y compartí el gusto por obtener datos en busca de más preguntas.
- A mis demás compañeros y amigos del postgrado en el Centro de Estudios Cerebrales.

- Al Dr. Norberto García-Cairasco, director del Laboratorio de Neurofisiología y Neuroetología Comportamental de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sao Paulo, por facilitar la realización de una pasantía en su laboratorio durante los años 2008 y 2009, y permitirnos trabajar en colaboración aprendiendo mutuamente nuevas técnicas en neurociencias.
- A los Dres. Olagide Wagner Castro, Victor Rodrigues do Santos, Artur Fernandes y Simone Marrone, estudiantes de postgrado del *Laboratorio de Neurofisiología y Neuroetología Comportamental* de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sao Paulo, por su excelente soporte técnico y entrenamiento en marcaciones fluorescentes, la microscopía de confocal y el sistema de captura de deconvolución.
- Al Dr. Changuiz Geula, del *Cognitive and Neurology Alzheimer's Disease Center*, en la Escuela de Medicina de Feinberg de la Northwestern University, por su revisión crítica, comentarios y demás aportes para la elaboración de uno de los manuscritos publicados.
- A mi esposa Patricia, a mi señor padre José Efraín, a mis hermanos John Freddy y Alexander, a mi sobrino Juan Miguel, a mi abuela Satoria, y demás familiares y amigos, quienes siempre han manifestado su apoyo permanente y preocupación por mi desarrollo personal y profesional, así como su orgullo y alegría por mis logros académicos.
- A todas las demás personas que de alguna manera, colaboraron en este proceso.

Igualmente, el autor expresa sus agradecimientos a las siguientes instituciones:

- Al *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Programa Sud-Americano* (CNPq-PROSUL), Brazil Project (grant No. 490660/2007-0), que aprobó el proyecto y los recursos económicos para realizar la pasantía en el *Laboratorio de Neurofisiología y Neuroetología Comportamental* de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sao Paulo.
- Al *Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología, Francisco José de Caldas - COLCIENCIAS*, por la financiación del proyecto “Estudio cualitativo y cuantitativo del trauma craneoencefálico en humanos” del Centro de Estudios Cerebrales de la Universidad del Valle, en el que se enmarca el desarrollo del presente trabajo.
- Al *Instituto Nacional de Medicina Legal y Ciencias Forenses*, seccional Cali, por su valiosa colaboración al proporcionar las muestras de tejido nervioso para el presente estudio.
- A la *International Brain Research Organization - IBRO* y *FUNDADESARROLLO* de Venezuela, por la beca otorgada para complementar mi formación en el curso “Bases Celulares y Moleculares de las Enfermedades Neurodegenerativas”, llevado a cabo en Maracaibo - Venezuela, 2004.
- Al Departamento de Morfología, al Programa de Postgrado de la Escuela de Ciencias Básicas, a la Facultad de Salud y a la Universidad del Valle por su colaboración, apoyo y formación.

Resumen

Introducción: El trauma craneoencefálico (TCE) es la alteración anatómica y/o funcional del cráneo y sus estructuras internas, entre ellas el encéfalo, producto de fuerzas mecánicas externas como los golpes. El TCE es la causa de muerte más común después del trauma en general, y la principal causa de discapacidad y morbilidad en la población menor de 45 años que le sobrevive. Las contusiones cerebrales (CCs) son lesiones primarias y focales que ocurren principalmente en la corteza cerebral por el TCE. La mayoría de los estudios sobre los cambios histopatológicos de las CCs en humanos han sido hechos en tejido post-mortem con diferentes intervalos post-traumáticos (de horas hasta años), por lo que aún no hay un consenso sobre los cambios observados. El estudio histológico y celular de las diferentes poblaciones neuronales dentro de las contusiones, permitiría la identificación de posibles vulnerabilidades selectivas, o la identificación de regiones corticales microscópicamente hablando, susceptibles de intervención temprana focalizada, para prevenir una extensión o perpetuación del daño celular después de la lesión traumática.

Objetivos: 1. Establecer cuál es la integridad cito- y dendro-arquitectónica de las zonas contusas y la presencia o no de vulnerabilidad laminar selectiva. 2. Analizar la respuesta de las subpoblaciones de interneuronas Gabaérgicas corticales, así como la de los astrocitos, al TCE. 3. Determinar la viabilidad del tejido contuso a través de la valoración de los cambios citoarquitectónicos y en la expresión subcelular de marcadores neuronales, y su posible relación con procesos de muerte y/o neurodegeneración celular.

Métodos: Muestras de CCs obtenidas de 12 pacientes con TCE severo a través de craniectomía decompresiva y 12 muestras de tejido cortical sano post-mortem, se procesaron histológicamente con anticuerpos contra NeuN, MAP2, PV, CB, CR y

GFAP, y con las tinciones de Nissl y Fluoro-Jade C. También se hizo Western Blot para NeuN. Los dos grupos de muestras se compararon para establecer diferencias cualitativas y cuantitativas en los marcadores y técnicas mencionadas.

Resultados: 1. Dentro una misma región de la contusión, se encuentran sectores con diferentes grados de compromiso celular, desde sectores con aparente conservación de la citoarquitectura, tal cual se observa en el tejido control post-mortem, hasta sectores con parches de pérdida total de la IR para todos estos marcadores. 2. Las láminas corticales más afectadas son la III y la V. 3. Las neuronas piramidales presentan entorchamiento de las dendritas apicales y fragmentación de los fascículos apicales. 4. Disminución de las interneuronas PV-positivas en la lámina II e incrementos de las CB-positivas en III y V, y CR-positivas en II. 5. Reactividad glial alrededor de los parches y en la sustancia blanca, y ausencia de marcación dentro de los parches. 6. Nivel de neurodegeneración celular dentro y fuera de los parches, dependiente del grado de compromiso de la citoarquitectura neuronal. 7. La cantidad de proteína NeuN, está reducida significativamente en las muestras contusas.

Conclusiones: La heterogeneidad en la respuesta celular, es la norma dentro de las CCs en el TCE humano. En ellas se encuentran sectores de parche, con pérdida generalizada de células y presencia de neuronas en degeneración; y sectores con citoarquitectura conservada, los cuales podrían ser candidatos a la “penumbra traumática”. La “penumbra traumática” no correspondería histológicamente con la penumbra isquémica. Los cambios en la expresión de las proteínas que ligan calcio implican una alteración generalizada del componente inhibitorio de la corteza cerebral y podrían ser una posible fuente de sobre-excitación en el tejido *in situ*. Los sectores preservados de la contusión son susceptibles de ser estudiados en búsqueda de alternativas terapéuticas para menguar las lesiones secundarias del TCE, y podría considerarse su extracción quirúrgica como una medida para prevenir la extensión de la lesión.

Palabras clave: TCE en humanos, Contusión Cerebral, Neurodegeneración, NeuN, Fluoro-Jade, Proteínas que Ligan Calcio

Abstract

Introduction: Traumatic brain injury (TBI) is anatomical and/or functional impairment of skull and internal structures, including the brain, due to external mechanical forces as strikes. The TBI is the most common cause of death after trauma in general and the leading cause of disability and morbidity in the population under 45 years who survives it. Cerebral contusions (CCs) are primary and focal lesions that occur mainly in the cerebral cortex due to TBI. Most studies on the histopathological changes of the CCs in humans have been made in postmortem tissue with different post-traumatic intervals (from hours to years), so there is still no consensus on the changes observed. The histological and cellular study of different neuronal populations within the contusions, may allow the identification of possible selective vulnerabilities, or identifying microscopic cortical regions for early intervention to prevent an extension or perpetuation of cell damage after TBI.

Objectives: 1. To establish what is the cyto- and dendro-architectural integrity of the contused regions and the presence or absence of laminar selective vulnerability. 2. To analyze the response of subpopulations of cortical GABAergic interneurons as well as astrocytes after TBI. 3. To determine the viability of the contused tissue through the assessment of cyto-architectural changes and subcellular expression of neuronal markers and their possible relation to processes of cell death and/or neurodegeneration.

Methods: CCs samples obtained from 12 patients with severe head injury by decompressive craniectomy and 12 samples from healthy post-mortem cortical tissue was processed histologically with antibodies against NeuN, MAP2, PV, CB,

CR and GFAP, and Nissl and Fluoro-Jade C staining. We also did Western Blot for NeuN. The two groups of samples were compared to establish qualitative and quantitative differences in markers and techniques mentioned.

Results: 1. Within a contusion region, we distinguish areas with different degrees of cell disturbances, from sectors with apparent structural conservation, as observed in post-mortem tissue control, to sectors with patches of total IR loss for all these markers. 2. The cortical layers III and V were most affected. 3. The pyramidal neurons have twisted apical dendrites and fragmented apical fascicles. 4. We found decreases of PV-positive cells in layer II, and increases of CB-positive neurons in layers III and V and CR-positive in layer II. 5. Glial reactivity around patches and white matter, and no staining within the patches were observed. 6. Neurodegeneration levels in and out of the patches were observed, depending on the degree of neuronal cyto-architecture alterations. 7. The amount of protein NeuN is significantly reduced in the TBI samples.

Conclusions: The heterogeneity in the cellular response is the rule within the CCs after human TBI. CCs have sectors with patch of widespread loss of cells and presence of degenerating neurons; and sectors with preserved cyto-architecture, which could be candidates to constitute a “traumatic penumbra”. The “traumatic penumbra” do not constitute a histologically to ischemic penumbra. Changes in the expression of Calcium-Binding Proteins involve widespread disruption of the inhibitory component of the cerebral cortex and could be a potential source of over-excitation of tissue *in situ*. The preserved sectors of a contusion may be studied in order to search therapeutic alternatives to reduce secondary injury after TBI, and remove them surgically may be considered as a measure to prevent the extension of the lesion.

Keywords: Human TBI, Cerebral Contusion, Neurodegeneration, NeuN, Fluoro Jade, Calcium-Binding Proteins

Contenido

	Pág.
Lista de figuras	IV
Lista de tablas	VI
Lista de abreviaturas	VII
INTRODUCCIÓN	1
Definición y fisiopatología del TCE	1
Epidemiología y secuelas del TCE	3
Contusiones cerebrales	5
Justificación y objetivos	8
CAPÍTULO 1.	
ALTERACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN LAMINAR Y DE LA DENDROARQUITECTURA DE LA CORTEZA CEREBRAL DEL HUMANO POST- TRAUMA CRANEOENCEFÁLICO	11
1.1 Antecedentes	11
1.2 Materiales y Métodos	16
1.2.1 Los pacientes con TCE y las muestras de tejido contuso	16
1.2.2 Los sujetos control y las muestras de tejido sin TCE	17
1.2.3 Procesamiento histológico de las muestras	19
1.2.4 Registro y análisis de imágenes	20
1.3 Resultados	22
1.4 Discusión	27
CAPÍTULO 2.	
CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS QUE LIGAN CALCIO EN LAS CONTUSIONES CORTICALES DE HUMANO	34
2.1 Antecedentes	34

2.2 Materiales y Métodos	38
2.2.1 Los pacientes con TCE y las muestras de tejido contuso	38
2.2.2 Los sujetos control y las muestras de tejido sin TCE	39
2.2.3 Procesamiento histológico de las muestras	40
2.2.4 Registro fotográfico y análisis de imágenes	41
2.2.5 Conteos celulares y análisis de datos	42
2.3 Resultados	43
2.3.1 Expresión de GFAP	44
2.3.2 Expresión de PV	45
2.3.3 Expresión de CB	50
2.3.4 Expresión de CR	53
2.4 Discusión	55
CAPÍTULO 3.	
DIVERSIDAD NEURODEGENERATIVA EN LAS CONTUSIONES	
CORTICALES DE HUMANO: UN ANÁLISIS HISTOLÓGICO DE TEJIDO	
DERIVADO DE CRANIECTOMÍA DECOMPRESIVA	63
3.1 Antecedentes	63
3.2 Materiales y Métodos	66
3.2.1 Los pacientes con TCE y las muestras de tejido contuso	66
3.2.2 Los sujetos control y las muestras de tejido sin TCE	67
3.2.3 Procesamiento de las muestras	68
3.2.4 Análisis de la calidad de la expresión histológica de NeuN	69
3.2.5 Tinción de Nissl	71
3.2.6 Western Blot de NeuN	71
3.2.7 Histofluorescencia para Fluoro-Jade C	73
3.2.8 Presentación y análisis de datos	74
3.3 Resultados	76
3.3.1 Inmunorreactividad de NeuN en el tejido post-mortem	76

3.3.2 Inmunorreactividad de NeuN en las muestras con contusión cerebral	77
3.3.3 Marcación con Fluoro-Jade C en el tejido contuso	78
3.4 Discusión	85
3.4.1 Diversidad estructural en el compartimiento neuronal de la contusión cerebral del humano: distinguiendo el TCE de la isquemia	89
3.4.2 Relación entre los parches de pérdida de la IR para NeuN y el daño celular irreversible	91
3.4.3 Estado de las zonas con citoarquitectura conservada en las contusiones cerebrales	92
CONCLUSIONES	96
PERSPECTIVAS	100
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
ANEXOS	139
Anexo A. Publicaciones asociadas al trabajo de doctorado	139
Anexo B. Ponencias asociadas al trabajo de doctorado	143

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Heterogeneidad en la expresión de NeuN de la corteza cerebral de humano en respuesta a la contusión cerebral	24
Figura 2. Alteración de la expresión de NeuN en neuronas de zonas de citoarquitectura conservada, en la contusión cerebral	26
Figura 3. Pérdida de la IR para MAP2 en tejido cortical contuso de humano	28
Figura 4. Alteraciones celulares en la expresión de MAP2	29
Figura 5. Variaciones en la expresión de NeuN después del TCE en humanos	46
Figura 6. Cambios en la expresión de PV, CB, CR y GFAP después del TCE en humanos	48
Figura 7. Parches de pérdida masiva de la IR de PV, CB y CR en tejido contuso de humano	49
Figura 8. Detalles morfológicos de alteraciones celulares de las interneuronas corticales en tejido contuso humano	52
Figura 9. Cuantificación de las neuronas PV-, CB-, y CR-positivas en las láminas corticales de tejido humano control post-mortem y con TCE severo	54
Figura 10. Inmunorreactividad de NeuN en el tejido control post-mortem	79
Figura 11. Expresión de NeuN en diferentes sectores de las muestras con contusión cerebral	81
Figura 12. Comparación de cortes de tejido contuso marcados consecutivamente con NeuN y Nissl	83
Figura 13. Pérdida de los niveles de la proteína NeuN en tejido contuso de humano	84

Figura 14.	Anormalidades en la marcación celular de NeuN en el tejido con contusión cerebral	86
Figura 15.	Expresión de Fluoro-Jade C en tejido con contusión cerebral	87
Figura 16.	Relación directa entre el tamaño del parche y la densidad de neuronas en degeneración en el tejido contuso	88

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Características de los pacientes con TCE para el estudio 1	17
Tabla 2. Características de los sujetos post-mortem para el estudio 1	18
Tabla 3. Nivel de compromiso de la IR en el tejido contuso	23
Tabla 4. Características de los pacientes con TCE para el estudio 2	39
Tabla 5. Características de los sujetos post-mortem para el estudio 2 y 3	40
Tabla 6. Características de los pacientes con TCE para el estudio 3	67
Tabla 7. Técnicas aplicadas a cada muestra de tejido contuso	69
Tabla 8. Análisis cuantitativo de la calidad de la IR para NeuN	80
Tabla 9. Cuantificación de las marcaciones de NeuN y Fluoro-Jade C en las muestras con contusión cerebral	85

Lista de abreviaturas

ABREVIATURA	DEFINICIÓN
TCE	Trauma Craneoencefálico
CCs	Contusiones Cerebrales
NeuN	Antígeno Neuronal Nuclear
MAP2	Proteína Asociada a Microtúbulos-2
IR	Inmunorreactividad
GI	Glasgow de ingreso al servicio de urgencias
GOS	Glasgow de egreso del Hospital (Glasgow Outcome Score)
Temp	Lóbulo Temporal
Fron	Lóbulo Frontal
Hem	Hemisferio
Der	Derecho
Izq	Izquierdo
TPT	Intervalo post-trauma
HN	Otros hallazgos neurológicos
HSDA	Hemorragia Subdural Aguda
HSA	Hemorragia Subaracnoidea
HP	Hemiparesia
HU	Herniación Uncal
AF	Afasia
HSF	Herniación Subfalcina

BDP	Bradipsiquia
PMI	Intervalo post-mortem
LPC	Corteza Prefrontal Lateral
LTC	Corteza Temporal Lateral
HG	Homicidio con arma de fuego
PLP	Paraformaldehido, L-Lisina, Metaperiodato de Sodio
PBS	Buffer Fosfato Salino
Anti-NeuN	Anticuerpo contra NeuN
Anti-MAP2	Anticuerpo contra MAP2
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
TUNEL	Terminal deoxyribonucleotidyl transferase (TDT)-mediated dUTP-digoxigenin nick end labeling
APP	Proteína Precursora de Amiloide
CaBPs	Proteínas que ligan Calcio
PV	Parvalbúmina
CB	Calbindina
CR	Calretinina
GFAP	Proteína Acídica Glial Fibrilar
DAI	Lesión Axonal Difusa
NH	Nistagmos Horizontal
HS	Homicidio por apuñalamiento
RA	Ruptura de aneurisma
Anti-parvalbúmina	Anticuerpo contra Parvalbúmina
Anti-Calbindina	Anticuerpo contra Calbindina
Anti-Calretinina	Anticuerpo contra Calretinina
TCE-CC	Sectores de Citoarquitectura Conservada
TCE-PAR	Sectores de Parche
FJC	Fluoro Jade C

IHQ	Inmunohistoquímica
WB	Western Blot
NeuN-N	Neuronas con patron normal de marcación de NeuN
NeuN+	Neuronas positivas para NeuN
FPN	Neuronas positivas para Fluoro-Jade C
%NeuN-N/NeuN+	Porcentaje de neuronas con patrón normal de la marcación para NeuN respecto del total de marcadas
Background	Marcación de fondo o extracelular

Introducción

Definición y fisiopatología del TCE

El trauma craneoencefálico (TCE) es definido como la alteración anatómica y/o funcional del cráneo y sus estructuras internas, entre ellas el encéfalo, producto de fuerzas mecánicas externas como los golpes. Aunque siempre se le ha considerado como un evento, en la actualidad se empieza a tratar como el comienzo de un proceso crónico ya que cumple con los criterios que la Organización Mundial de la Salud establece para el concepto de enfermedad crónica, es decir, permanente, está causada por alteraciones patológicas no reversibles, requiere entrenamiento especial del paciente durante su rehabilitación y puede requerir largos periodos de observación, supervisión o cuidado (Masel & DeWitt, 2010). A pesar de la atención primaria, los cuidados durante la hospitalización y la rehabilitación, la morbilidad y mortalidad del TCE se extienden durante varios años después del evento inicial debido a que es fuente potencial de múltiples tipos de alteraciones que contribuyen a empeorar el pronóstico (Masel & DeWitt, 2010).

La lesión cerebral resultado del trauma craneoencefálico, de acuerdo con la secuencia de eventos que se suceden, se clasifica en dos tipos: lesión primaria y secundaria (Graham, Gennarelli, & McIntosh, 2002). La lesión primaria es un trastorno heterogéneo resultante de la lesión directa o indirecta del encéfalo por fuerzas mecánicas externas aplicadas sobre el cráneo, como consecuencia de un impacto directo, la rápida aceleración o desaceleración, un objeto penetrante u ondas explosivas (Maas, Stocchetti, & Bullock, 2008). El patrón y extensión del

daño dependen de la naturaleza, intensidad, dirección y duración de estas fuerzas; así como de factores intrínsecos de quien la padece como la edad, raza, el sexo, predisposiciones genéticas, patologías adquiridas previamente, consumo de fármacos y/o sustancias psicoactivas (Maas et al., 2008). Desde el punto de vista macroscópico, la lesión primaria incluye rompimiento de tractos en la sustancia blanca (también conocido como lesión axonal difusa) (Povlishock, 1992), contusiones cerebrales focales (es el tipo más común de lesión por TCE) (Ragaisis, 2002), hematomas (intra y extracerebrales) e inflamación difusa. En el nivel microscópico se podrán apreciar micro-porosidades en las membranas celulares, aumento de la permeabilidad de los canales iónicos (Nilsson, Laursen, Hillered, & Hansen, 1996), cambios conformacionales de las proteínas y micro-hemorragias por rompimiento de pequeños vasos. Los hematomas y las micro-hemorragias, que contribuyen a la inflamación, pueden ser fuente de una lesión hipóxico-isquémica que comúnmente afecta a las zonas perilesionales del evento primario (Bouma & Muizelaar, 1992; Budohoski et al., 2012; Povlishock & Katz, 2005). La lesión directa del tejido cerebral durante el evento inicial trae como consecuencia muerte celular de tipo necrótica (Galluzzi et al., 2007).

Las alteraciones secundarias en el TCE, dependerán del tipo de lesión primaria que las origine, de su duración y extensión. Estos mecanismos fisiopatológicos son concurrentes, de efectos sinérgicos y se desarrollan de horas a días, y pueden extenderse por años (D. H. Smith et al., 1997). Entre las lesiones secundarias encontramos liberación excesiva de neurotransmisores excitatorios (excitotoxicidad), alteración del metabolismo celular, disfunción mitocondrial, flujo de calcio y sodio al interior de la células (Nilsson et al., 1996), activación génica y alteraciones del ADN, respuestas inflamatorias, generación de radicales libres y la eventual muerte celular tanto necrótica como apoptótica y autofágica (Helen M Bramlett & Dietrich, 2004; Clausen, 2004; Galluzzi et al., 2007; Povlishock & Katz, 2005; Raghupathi, 2004; Singleton & Povlishock, 2004).

Epidemiología y secuelas del TCE

El TCE es uno de los problemas de salud pública más importantes del mundo, ya que es la causa de muerte más común después del trauma en general (Bruns & Hauser, 2003; Coronado et al., 2011; Jennett, 1996; Langlois, Rutland-Brown, & Wald, 2006; Lu et al., 2005; Masel & DeWitt, 2010), estimándose que al menos 10 millones de personas anualmente terminan hospitalizadas o muertas por esta causa. Las causas más frecuentes que conducen al TCE son las caídas, los accidentes de tránsito y los disparos con arma de fuego (Coronado et al., 2011; Langlois et al., 2006). En países desarrollados, el TCE es la principal causa de discapacidad y morbilidad en la población menor de 45 años que le sobrevive (Bruns & Hauser, 2003; Coronado et al., 2011; Langlois et al., 2006; Masel & DeWitt, 2010). Los costos socioeconómicos del TCE son sustanciales tanto para los gobiernos como para las familias de los pacientes; por ejemplo en los Estados Unidos se ha estimado en 10 billones de dólares el costo de la hospitalización y rehabilitación de los casos severos, sin contar con los 3 billones de dólares de los cuidados en la fase aguda inicial (Corrigan, Selassie, & Orman, 2010; McGarry et al., 2002).

En Colombia, los accidentes de tránsito constituyen la principal causa del TCE, los cuales aportan un 22% al total de muertes por causa violenta (Valbuena, 2012), por tal razón aparecen entre las 10 primeras causas de muerte y representan la tercera causa de años de vida potencialmente perdidos (Instituto Nacional de Salud & Observatorio Nacional de Salud, 2013). La población más vulnerable al TCE corresponde a aquella del grupo etario comprendido entre 20 y 59 años, es decir, la población laboralmente activa (Moreno & Carreño, 2012). Las secuelas del TCE constituyen un trastorno neurológico poco prevalente en Colombia entre quienes le sobreviven (dada la alta mortalidad del mismo), observándose en 6,4 personas por cada 1000 habitantes (Pradilla, Vesga, & León-Sarmiento, 2003); y aunque no hay estadísticas recientes sobre el impacto del TCE a nivel nacional, el último reporte local, que analizó datos obtenidos entre el 2003 y el 2004 en un periodo de 12 meses, mostró que de los 2.049 pacientes ingresados por TCE al

Hospital Universitario del Valle, 52.3% tenían TCE leve, 30% TCE moderado y 14,5% TCE severo con una mortalidad del 0,3%, 1,4% y 8,1% respectivamente (Guzmán, Moreno, & Montoya, 2008).

Aunque muchos individuos sobreviven a la lesión inicial, el TCE desencadena procesos secundarios crónicos que pueden conllevar a su muerte meses o años después (Masel & DeWitt, 2010). En los últimos 35 años, se ha evidenciado una disminución de las muertes relacionadas con TCE, pero el número de personas lesionadas va en aumento, lo que significa que cada vez hay más sobrevivientes con algún grado de discapacidad o alguna morbilidad secundaria (Coronado et al., 2011; Masel & DeWitt, 2010). Entre las consecuencias del TCE para los pacientes, se encuentran trastornos neurológicos como la epilepsia (Annegers & Coan, 2000; D'Ambrosio & Perucca, 2004; Ferguson et al., 2010; Frey, 2003; Kharatishvili & Pitkänen, 2010; Kuzniecky & Barkovich, 2001; D. H. Lowenstein, 2009; Szaflarski, Nazzari, & Dreier, 2014; Verellen & Cavazos, 2010) y trastornos del sueño (Orff, Ayalon, & Drummond, 2009; Verma, Anand, & Verma, 2007; Viola-Saltzman & Watson, 2012), el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer (Chauhan, 2014; Jellinger, Paulus, Wrocklage, & Litvan, 2001a, 2001b; Lye & Shores, 2000; Nemetz et al., 1999; Nordström, Michaëlsson, Gustafson, & Nordström, 2014; Sundman, Hall, & Chen, 2014), Parkinson (Bower et al., 2003; Chauhan, 2014; Goldman et al., 2012; Harris, Shen, Marion, Tsui, & Teschke, 2013; Jafari, Etminan, Aminzadeh, & Samii, 2013; Marras et al., 2014; Rughjerg, Ritz, Korbo, Martinussen, & Olsen, 2008; Sundman et al., 2014) y encefalopatía post-traumática crónica (Baugh et al., 2012; Chauhan, 2014; Gardner, Iverson, & McCrory, 2014; McKee et al., 2013; Omalu et al., 2006; Sundman et al., 2014), los desórdenes neuroendocrinos como el hipotiroidismo post-traumático (Agha & Thompson, 2006; Agha, Rogers, Mylotte, et al., 2004; Agha, Rogers, Sherlock, et al., 2004; Aimaretti & Ghigo, 2005; Baxter et al., 2013; Bondanelli, Ambrosio, Zatelli, De Marinis, & degli Uberti, 2005; Herrmann et al., 2006; Sundaram, Geer, & Greenwald, 2013), trastornos psiquiátricos como la depresión (Bryant et al., 2010; Fleminger, 2008; Hart et al., 2011; Jorge et al., 2004; Rapoport, 2012), la psicosis

(Fleminger, 2008; Molloy, Conroy, Cotter, & Cannon, 2011; Rao & Lyketsos, 2000; Schwarzbald et al., 2008; Q. Zhang & Sachdev, 2003), el abuso de sustancias (Kolakowsky-Hayner et al., 2002; Ponsford, Whelan-Goodinson, & Bahar-Fuchs, 2007; Taylor, Kreutzer, Demm, & Meade, 2003) y el suicidio (Reeves & Laizer, 2012; Simpson & Tate, 2002; Teasdale & Engberg, 2001; Tsaousides, Cantor, & Gordon, 2011; Wasserman et al., 2008), así como otros trastornos motores, cognitivos y comportamentales que generan discapacidad (Ashman, Gordon, Cantor, & Hibbard, 2006; Kinnunen et al., 2011; Masel & DeWitt, 2010; Milders, Fuchs, & Crawford, 2003; Moretti et al., 2012; Rao & Lyketsos, 2000; Riggio & Wong, 2009; Schretlen & Shapiro, 2003; Spikman, Timmerman, Milders, Veenstra, & van der Naalt, 2012).

Contusiones cerebrales

Las contusiones cerebrales (CCs) son lesiones primarias y focales que ocurren principalmente en la corteza cerebral. Las CCs son causadas por las fuerzas de golpe y contragolpe sin laceración de la dura madre (Ribas & Jane, 1992). Este tipo de lesiones muestran una apariencia morfológica de amplio espectro, variando desde micro-hemorragias solo visibles bajo el microscopio hasta lesiones hemorrágicas necróticas que se extienden a lo largo de la corteza cerebral y la sustancia gris subyacente (Graham et al., 2002; Taiushev, Zotov, Kaganovskaia, Kasumov, & Shustova, 1990). Las CCs son lesiones dinámicas, cuyo tamaño puede aumentar con el paso de las horas o días, aumento que está relacionado con la inflamación, el aumento de la presión intracraneana, e incluso la herniación (Bullock, Maxwell, Graham, Teasdale, & Adams, 1991; Kawamata, Mori, Sato, & Katayama, 2007; Schröder, Muizelaar, Bullock, Salvant, & Povlishock, 1995).

Hasta la fecha los trabajos de investigación que intentan simular las lesiones primaria y secundaria, propias del TCE, y que evalúan la muerte y la neurodegeneración celular se han realizado básicamente en modelos animales (Adamchik, Frantseva, Weisspapir, Carlen, & Perez-Velazquez, 2000; Kane et al., 2012; Lauret, 2006; Morales et al., 2005; Xiong, Mahmood, & Chopp, 2013). En

ellos, se ha descrito pérdida neuronal en el foco de la lesión principalmente de tipo necrótico, como consecuencia de la lesión primaria en el momento del trauma (generada por la disrupción física del tejido); así como diversos procesos secundarios en zonas aledañas e incluso distantes del foco, los cuales pueden perpetuarse en el tiempo. Tanto los sectores de pérdida celular como aquellos de penumbra (sometidos a mecanismos de lesión secundarios), son fuente de disfunción de la actividad neuronal, la cual se ve reflejada en las alteraciones clínicas manifestadas por los pacientes que sobreviven al trauma (Helen M Bramlett & Dietrich, 2004; Clausen, 2004; D. H. Smith et al., 1997).

El principal propósito del manejo de los pacientes con TCE es la prevención o la mejoría de las lesiones neuronales secundarias, las cuales están asociadas con las secuelas comportamentales, psiquiátricas y neurológicas ya mencionadas (Ashman et al., 2006; McAllister, 2011; Rao & Lyketsos, 2000; Riggio & Wong, 2009). De acuerdo con esto, el cuidado de los pacientes con CCs gira en torno al dilema de si preservar el tejido viable que será más afectado por los cambios fisiopatológicos o implementar medidas terapéuticas. Por lo tanto, implementar un monitoreo complejo y terapia médica avanzada y/o control de la presión intracraneana a través de la evacuación de la lesión de masa mediante craniectomía decompresiva, es la medida básica en estos casos (Chieragato & Fainardi, 2008; Cooper & Rosenfeld, 2011; Huang et al., 2008; Mazher, Ahmed, & Ali, 2014; Sadoughi, Rybinnik, & Cohen, 2013).

Los intentos por identificar el tejido viable en el TCE provienen de los estudios de accidentes cerebrovasculares. En estos eventos, se ha reconocido una región de penumbra isquémica, la cual está morfológicamente preservada y es susceptible de recuperarse (Astrup, Siesjö, & Symon, 1981; Ginsberg, Belayev, Zhao, Huh, & Busto, 1999; Hakim, 1987; Hossmann, 1994). La posible identificación temprana de una “penumbra traumática” tendría grandes implicaciones terapéuticas y en el pronóstico de los pacientes, y los médicos podrían enfocarse en determinar los umbrales fisiológicos de dicho tejido (Cunningham et al., 2005), pero

infortunadamente esta aproximación aún carece de correlato histológico.

Las muestras de tejido contuso proveen la evidencia de algunos de los eventos fisiopatológicos secundarios que ocurren después del TCE, como la muerte celular apoptótica y necrótica (Clark et al., 1999; Xiaopeng Zhang et al., 2003), el estrés metabólico (Seidberg et al., 2003), amiloidogénesis (Ikonovic et al., 2004), e inflamación (L. Zhang et al., 2006); pero hasta el momento no se ha hecho una descripción detallada de la citoarquitectura de este tejido. Quizá esta pueda ser la principal explicación de la ausencia de correlaciones apropiadas entre la histología y la imagenología del TCE. Además, la mayoría de los estudios sobre los cambios histopatológicos de las CCs en humanos han sido hechos en tejido post-mortem con diferentes intervalos post-traumáticos (de horas hasta años) (Graham et al., 2002; Løberg & Torvik, 1989; Oehmichen & Raff, 1980; Ribas & Jane, 1992; F. M. Smith et al., 2000), por lo que aún no hay un consenso sobre los cambios observados.

Datos provenientes de estudios que utilizan tinciones clásicas tales como la tinción de Nissl y la de Hematoxilina-Eosina o de descripciones de la ultraestructura celular (Bullock et al., 1991; Løberg & Torvik, 1989; Oehmichen & Raff, 1980; Ribas & Jane, 1992), han permitido conocer algunos aspectos histopatológicos de las CCs, así como sobre su evolución temporal; sin embargo, no aportan información sobre el comportamiento de los diferentes tipos celulares presentes en el tejido. Estas aproximaciones infortunadamente no tienen en cuenta el hecho de que las relaciones ontogenéticas de las neuronas y su localización espacial en los circuitos neuronales, los cuales son factores que pueden contribuir a la susceptibilidad o resistencia de subconjuntos específicos de células (Mattson, 1988). Además, la vulnerabilidad neuronal selectiva es el sello distintivo del vínculo entre el TCE y la neurodegeneración celular; por lo tanto, una aproximación enfocada a la valoración histopatológica con marcadores de subpoblaciones celulares y de la citoarquitectura neuronal, nos permitiría adentrarnos en el comportamiento celular de manera específica.

Justificación y objetivos

El tamaño y nivel del daño así como la región y el tipo celular comprometidos en la lesión, pueden dar cuenta de las alteraciones en la conectividad y por ende, de la funcionalidad en los pacientes que sobreviven al TCE. El tipo de células comprometidas por la lesión se hace importante en el estudio del TCE en la corteza cerebral, dada la gran diversidad de formas, blancos sinápticos, perfil neuroquímico, ubicación laminar y propiedades electrofisiológicas que pueden presentar las neuronas en esta compleja estructura. El estudio histológico y celular de las diferentes poblaciones neuronales permitiría la identificación de posibles vulnerabilidades selectivas, o la identificación de regiones corticales microscópicamente hablando, susceptibles de intervención temprana focalizada, para prevenir una extensión o perpetuación del daño celular después de la lesión traumática.

Evidencia de lo anterior, es el desarrollo de epilepsia tanto en modelos experimentales de trauma con largos periodos de sobrevida como en una proporción importante de sujetos humanos que han sufrido TCE. Lo anterior se correlaciona con algunas alteraciones histológicas descritas en los modelos experimentales tales como el desarrollo de una cicatriz glial, la pérdida de la regulación inhibitoria y un aumento de la actividad excitatoria (Avramescu, Nita, & Timofeev, 2009; D'Ambrosio & Perucca, 2004; Hunt, Scheff, & Smith, 2009; Jin, Prince, & Huguenard, 2006; Kharatishvili & Pitkänen, 2010; Pitkänen et al., 2007; Salin, Tseng, Hoffman, Parada, & Prince, 1995; L. Yang & Benardo, 1997).

Poco se conoce acerca de los cambios en las diferentes poblaciones neuronales corticales durante los periodos agudos y subagudos de la lesión traumática, que sugieran pérdida, procesos de muerte y de neurodegeneración celulares, y por tanto, alteraciones en la conectividad y funcionalidad del tejido *in situ*.

Por lo tanto, en el presente trabajo de investigación se hizo un estudio cualitativo y cuantitativo de las variaciones morfológicas, tanto histológicas generales como celulares específicas (de poblaciones y subpoblaciones celulares, así como de cambios subcelulares en las mismas) del tejido cortical contuso proveniente de pacientes que sufrieron TCE severo, que debieron ser llevados a cirugía decompresiva y finalmente les fue extraído un sector contuso para ayudar a aliviar la hipertensión endocraneana. La presente tesis doctoral así como las publicaciones científicas relacionadas con la mismas, se enmarcaron dentro del macroproyecto de investigación **“Estudio cualitativo y cuantitativo del trauma craneoencefálico en humanos”**, ejecutado por el Centro de Estudios Cerebrales como parte de su línea de investigación *“Respuesta celular a la lesión cerebral”*, y financiado por el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas” – Colciencias (Código No. 1106-04-16329).

El primer capítulo del presente documento presenta los resultados relacionados con el grado de lesión del tejido cortical contuso de humano, extraído durante cirugía decompresiva en un momento agudo (primeras 24 horas) o subagudo (entre las 24 y las 96 horas) post-TCE, a nivel microscópico, con el propósito de establecer cuál es la integridad cito y dendroarquitectónica de las zonas contusas y la presencia o no de vulnerabilidad laminar (de alguna o algunas de las láminas de la corteza cerebral) selectiva.

Con la finalidad de ahondar en la valoración del grado de lesión del tejido cortical contuso de humano, a continuación se procedió a analizar la respuesta de diferentes poblaciones celulares al TCE. De esta manera, en el capítulo 2 se expone la respuesta de cada una de las subpoblaciones de interneuronas GABAérgicas corticales, así como de una de las poblaciones gliales (los astrocitos) al trauma cerebral. Como se apreciará en los resultados mostrados en el primer capítulo, existe una variabilidad regional en el nivel de compromiso tisular

dentro de una misma muestra contusa, por lo que la observación de la respuesta de las subpoblaciones celulares del segundo capítulo tuvo en cuenta esta heterogeneidad.

El tercer capítulo, centra la atención en determinar si los cambios citoarquitectónicos generales y en la expresión subcelular de marcadores neuronales reseñados en los 2 primeros capítulos, están relacionados con procesos de muerte y/o neurodegeneración celular, lo cual daría luces sobre la viabilidad o no del tejido contuso en fases agudas del TCE.

Capítulo 1

Alteración de la organización laminar y de la dendroarquitectura de la corteza cerebral del humano post-trauma craneoencefálico

1.1 Antecedentes

El TCE es una de las principales causas de muerte, de morbilidad y discapacidad en el mundo, y las CCs son el hallazgo clínico más frecuente entre quienes lo padecen (Bruns & Hauser, 2003; Graham et al., 2002; Jennett, 1996; Masei & DeWitt, 2010); no obstante, la investigación de los mecanismos neurobiológicos que subyacen al TCE es la de más reciente aparición histórica con respecto a la de los demás padecimientos neurológicos, y aún más, el estudio de las CCs. En la actualidad son abundantes los estudios de los eventos histopatológicos del TCE con modelos animales, y de CCs en particular (Albert-Weissenberger & Sirén, 2010; K. Anderson, Miller, Fugaccia, & Scheff, 2005; Beer et al., 2002; H M Bramlett, Dietrich, Green, & Busto, 1997; Carbonell & Grady, 1999; Cernak, 2005; S. Chen, Pickard, & Harris, 2003; Clark et al., 2001; Colicos, Dixon, & Dash, 1996;

Conti & Raghupathi, 1998; Dennis et al., 2009; Dietrich, Alonso, & Halley, 1994; Dixon, Clifton, Lighthall, Yaghmai, & Hayes, 1991; Finnie, 2001; Gennarelli, 1994; Hall, Bryant, Cho, & Sullivan, 2008; Hall & Sullivan, 2005; Hicks, Soares, Smith, & McIntosh, 1996; Kawamata et al., 2007; Kaya et al., 1999; Kochanek et al., 1995; Lighthall, 1988; H. Liu, Yang, Qiu, Zhuo, & Yu, 2012; Marciano et al., 2004; Napieralski, Raghupathi, & McIntosh, 1999; Newcomb, Zhao, Pike, & Hayes, 1999; Nilsson et al., 1996; O'Connor, Smyth, & Gilchrist, 2011; Onyszchuk, He, Berman, & Brooks, 2008; Qiu et al., 2002; Rola et al., 2006; Sato, Chang, Igarashi, & Noble, 2001; Shapira et al., 1988; Shreiber et al., 1999; Sutton, Lescaudron, & Stein, 1993; Xiong et al., 2013), pero son pocos aquellos hechos en tejido humano.

Dentro de los estudios realizados en tejido contuso humano, la mayoría han sido realizados en tejido post-mortem (Adams et al., 2011; R. Anderson & Opekin, 1998; Beschorner et al., 2002; Clark et al., 1999; Frugier, Morganti-Kossmann, O'Reilly, & McLean, 2010; Hausmann, Riess, Fieguth, & Betz, 2000; V. E. Johnson, Stewart, Trojanowski, & Smith, 2011; D.-R. Li et al., 2009, 2012; Løberg & Torvik, 1989; Oehmichen, Eisenmenger, Raff, & Berghaus, 1986; Oehmichen & Raff, 1980; Onaya, 2002; Ribas & Jane, 1992; C. Smith et al., 2013; F. M. Smith et al., 2000; Uryu et al., 2007; Williams et al., 2001), o se concentran en otras fuentes de evidencia como los datos sociodemográficos, las historias clínicas, muestras de sangre o líquido cefalorraquídeo, micro-diálisis o pruebas moleculares (Cunningham et al., 2005; Hergenroeder et al., 2010; Magnoni et al., 2012; Mazher et al., 2014; Nathoo et al., 2004; Petzold et al., 2011; Schröder et al., 1995; Stefini et al., 2008; Wagner et al., 2011), y aquellos con tejido proveniente de biopsias quirúrgicas son raros. Estos últimos han permitido corroborar la presencia de células que mueren por apoptosis (Clark et al., 1999; Miñambres et al., 2008; Ng et al., 2000; Xiaopeng Zhang et al., 2003), de procesos inflamatorios en curso (Bellander, Singhrao, Ohlsson, Mattsson, & Svensson, 2001; Bullock et al., 1991; Holmin & Höjeberg, 2004; Holmin, Söderlund, Biberfeld, & Mathiesen, 1998), de estrés celular (Seidberg et al., 2003), la expresión de moléculas mediadoras de algunos procesos celulares (Gahm, Holmin, & Mathiesen, 2002; Hang, Chen, Shi,

Zhang, & Li, 2006) y la valoración de organelas mediante técnicas ultraestructurales (Balan et al., 2013; Vaz, Sarmiento, Borges, Cruz, & Azevedo, 1997).

Estos tipos de abordaje al estudio de los procesos neurobiológicos de las contusiones cerebrales, hasta ahora han dejado de lado las relaciones morfológicas y fisiológicas de las diferentes poblaciones celulares de la corteza cerebral, su organización espacial y su conectividad; aspectos importantes para establecer un vínculo entre la lesión traumática microscópica y los hallazgos anatómicos clínicos, así como entre estos últimos y las secuelas del TCE manifestadas en los sobrevivientes. Por lo tanto, en la primera fase de este estudio, nos preguntamos ¿cuál es el comportamiento histológico de las contusiones corticales en humanos extraídas mediante cirugía decompresiva en los momentos agudos y subagudos del TCE? La respuesta a esta pregunta estará dada por la respuesta a preguntas más concretas, tales como:

- ¿Es homogénea la alteración de la citoarquitectura cortical dentro de la contusión?
- ¿Existe compromiso específico de alguna o algunas de las láminas corticales?
- ¿Qué ocurre con la organización dendroarquitectónica de los fascículos de dendritas apicales de las neuronas piramidales?

El estudio de la citoarquitectura y la dendroarquitectura cortical en las muestras de tejido contuso se llevó a cabo mediante la valoración cualitativa de la expresión de la inmunorreactividad (IR) de los anticuerpos contra las proteínas NeuN (Antígeno Específico para Núcleos Neuronales) y MAP2 (Proteína Asociada a Microtúbulos 2), comparándola con la expresión de los mismos anticuerpos en tejido cortical post-mortem “control” también de humano. El anticuerpo Anti-NeuN es un marcador exclusivo de la población neuronal. En la corteza cerebral marca la población total de neuronas (excluyendo a las Células Horizontales de Cajal-

Retzius) (Kim, Adelstein, & Kawamoto, 2009; Mullen, Buck, & Smith, 1992), por lo cual se le ha utilizado para estudiar la organización laminar de la corteza cerebral en condiciones no-patológicas (Buriticá & Pimienta, 2007; Fajardo et al., 2008; Gittins & Harrison, 2004; Lyck, Dalmau, Chemnitz, Finsen, & Schrøder, 2008), así como la disminución de su IR ha sido indicativo de la intensidad de la lesión o predictor de muerte neuronal en varias condiciones patológicas como trauma, isquemia, epilepsia, intoxicación por organofosforados y algunas enfermedades inflamatorias (Arango-Dávila, Cardona-Gomez, Gallego-Gomez, Garcia-Segura, & Pimienta, 2004; Bao et al., 2011; Carbonell & Grady, 1999; Collombet et al., 2006; Conti & Raghupathi, 1998; Igarashi, Huang, & Noble, 2001; Lind, Franken, Kappler, Jankowski, & Schilling, 2005; F. Liu, Schafer, & McCullough, 2009; Swartz et al., 2006; Unal-Cevik, Kiliç, Gürsoy-Ozdemir, Gurer, & Dalkara, 2004; Verwer et al., 2002; Wolf & Buslei, 1996). La marcación histológica “normal” para NeuN (también llamado *Gold Standard*), se podría observar en tejido procedente de un espécimen sano, vivo y perfundido de forma transcardiaca, en el que las neuronas marcan de color casi marrón o azul intenso (casi negro) y con casi nulo *background* (Robertson et al., 2006); y a nivel subcelular se aprecia una marcación íntegra, compacta, sin grumos ni fragmentación, con mayor intensidad en el núcleo que en el citoplasma y más leve en el segmento inicial de la dendrita apical de las neuronas piramidales (Gittins & Harrison, 2004; Robertson et al., 2006).

La proteína asociada a los microtúbulos-2 posee múltiples dominios en su estructura susceptibles de ser fosforilados por varias quinasas y fosfatasas. El nivel de fosforilación que presente determina la afinidad por los microtúbulos así como la dinámica de estos, y en consecuencia, la IR de la proteína MAP2 variará conforme su estado de fosforilación (Kühn, Meissner, & Oehmichen, 2005; Sanchez, Diaz-Nido, & Avila, 2000). El anticuerpo contra MAP2 (Anti-MAP2) que empleamos en este estudio (5F9), reconoce la proteína independiente de su estado de fosforilación y de la integridad de su estructura; a su vez permite observar las neuronas tanto piramidales como no-piramidales de la corteza cerebral, con preferencia por las primeras. Anti-MAP2 también permite apreciar la

organización de fascículos de dendritas apicales, como se describió inicialmente en el ratón (Escobar et al., 1986) y luego en la neocorteza de humano (Akulinin & Dahlstrom, 2003). En estudios que han empleado animales perfundidos transcardiacamente, se ha podido apreciar la marcación normal típica contra MAP2, la cual incluye predominantemente neuronas piramidales de las láminas II, III y V de la corteza cerebral, junto con sus dendritas apicales. A nivel subcelular la IR es intensa en el citoplasma del soma y de las dendritas, ausente en el núcleo y el axón, de textura homogénea, sin varicosidades, abultamientos o fragmentos (Escobar et al., 1986; Riascos et al., 2008).

Los cambios en la IR para MAP2 han sido asociados con alteraciones neuronales como la pérdida de la integridad del citoesqueleto (Furutani & Kibayashi, 2012; Kühn et al., 2005; Saatman, Bareyre, Grady, & McIntosh, 2001). La disminución o la pérdida de la IR para MAP2 se ha vinculado con procesos de neurodegeneración celular como consecuencia de una isquemia cerebral, excitotoxicidad, estrés oxidativo o trauma experimental (Furutani & Kibayashi, 2012; Haranishi et al., 2005; Huh, Raghupathi, Laurer, Helfaer, & Saatman, 2003; Posmantur et al., 1996; X Zhang, Liu, Liu, & Dai, 2001). En el humano se han observado disminuciones de la IR para MAP2 en la corteza prefrontal derivada de cerebros post-mortem de individuos autistas y esquizofrénicos (Jones, Johnson, & Byne, 2002; Mukaetova-Ladinska, Arnold, Jaros, Perry, & Perry, 2004), así como en personas que sufrieron eventos isquémicos (Akulinin & Dahlstrom, 2003; Gemmell, 2013; Kühn et al., 2005). De acuerdo con el conocimiento del autor, hasta el momento de la publicación del artículo relacionado con el presente capítulo de este estudio (Escobar et al., 2008), no se han hecho valoraciones de la expresión histológica de MAP2 en tejido humano *ex vivo* de sujetos con contusiones cerebrales producto de un TCE, por lo que los resultados aquí presentados solo son comparables con aquellos derivados de estudios en modelos experimentales de trauma cerebral o en tejido post-mortem de humanos con neuropatologías diferentes del TCE.

1.2 Materiales y Métodos

1.2.1 Los pacientes con TCE y las muestras de tejido contuso

Para responder a las preguntas del presente capítulo, se analizaron muestras de tejido cerebral contuso, provenientes de 6 pacientes (en la Tabla 1, se muestran las características clínicas de los pacientes) con diagnóstico de contusión cerebral focal y con hipertensión endocraneana severa. De acuerdo con el criterio del neurocirujano tratante, se les podía ofrecer a estos pacientes como posible solución una craniectomía decompresiva con apertura y/o plastia de la dura madre, y/o drenaje del parénquima cerebral contuso para el manejo de la hipertensión, la cual era secundaria al efecto masa de la contusión y a las hemorragias intracerebrales. En ningún caso se hizo remoción adicional de tejido cerebral para efectos del presente estudio. Todos los procedimientos para la recolección de las muestras y su posterior análisis, fueron aprobados por el Comité de Ética del Hospital Universitario del Valle y por el Comité Institucional de Revisión de Ética Humana de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle (Acta No. 045, de 2004), los cuales respetan los principios y procedimientos de la Declaración de Helsinki de la Asamblea Médica Mundial y de la Ley 44 de 1993 de la República de Colombia.

Los criterios de inclusión de los pacientes en el presente estudio fueron:

- A. Que el paciente hubiese ingresado al Hospital Universitario del Valle y estar a cargo del Instituto Neuroquirúrgico del mismo.
- B. Haber sufrido un TCE entre moderado y severo.
- C. Tener una contusión cerebral con criterios quirúrgicos para el neurocirujano tratante.

- D. Tener consentimiento informado por el paciente o acudiente tanto para la realización de la cirugía como para la inclusión en el presente estudio.
- E. No tener contraindicaciones para la cirugía.
- F. No cumplir con los criterios de exclusión.

Tabla 1. Características de los pacientes con TCE para el estudio 1

Muestra	Sexo	Edad	GI	GOS	Lóbulo	Hem	TPT	HN
T05	M	71	6	4	Temp	Der	2	HSDA, HSA, HP, HU
T06	M	73	10	1	Temp	Izq	2	AF, HP
T07	M	22	12	5	Fron	Der	3	HSDA, HP, HSF
T08	M	28	13	5	Fron	Izq	3	BDP, II par
T12	M	53	5	1	Temp	Der	1	HSDA, HSF, HU
T14	M	42	8	5	Temp	Izq	2	HSDA, HSF, HU

GI: Glasgow de Ingreso al servicio de urgencias; GOS: Glasgow Outcome Score; Temp: Lóbulo Temporal; Fron: Lóbulo Frontal; Hem: Hemisferio; Der: Derecho; Izq: Izquierdo; TPT: Tiempo entre el trauma y la cirugía (en días); HN: Otros hallazgos neurológicos adicionales a la contusión; HSDA: Hemorragia Subdural Aguda; HSA: Hemorragia Subaracnoidea; HP: Hemiparesia; HU: Herniación Uncal; AF: Afasia; HSF: Herniación Subfalcina; BDP: Bradipsiquia; II par: compromiso del II par craneal.

Los criterios de exclusión de los pacientes en el presente estudio fueron:

- A. Antecedentes de consumo de psicotrópicos o alcoholismo.
- B. Antecedentes de accidente cerebro-vascular, malformaciones vasculares cerebrales, angiopatía amiloidea, aneurismas o tumores cerebrales.
- C. Glasgow de ingreso de 3 y/o ausencia de reflejos de tallo cerebral.
- D. Coagulopatías.
- E. Hipoxia cerebral o hipotensión durante más de 10 minutos confirmada desde el trauma hasta el momento de la cirugía.

1.2.2 Los sujetos control y las muestras de tejido sin TCE

La expresión histológica de los inmunomarcadores de interés en el tejido contuso fue comparada con la expresión de los mismos en tejido post-mortem sin TCE, dada la imposibilidad de obtener tejido sano a través de una biopsia. Estas últimas muestras fueron obtenidas de 4 sujetos (ver Tabla 2) del Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Cali.

Los criterios de inclusión de los sujetos post-mortem en el presente estudio fueron:

- A. El cadáver debe haber ingresado al Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Cali
- B. Edad entre 18 y 60 años al momento de morir
- C. Haber transcurrido menos de 18 horas después del deceso
- D. La causa de muerte comprometa los miembros, el tórax y/o abdomen

Tabla 2. Características de los sujetos post-mortem para el estudio 1

Muestra	Sexo	Edad	PMI	Región	Causa de muerte
C1	M	45	12	LPC	HG
C3	M	18	10	LPC	HG
C4	M	32	12	LTC	HG
C9	M	29	8	LPC	HG

PMI: Intervalo post-mortem; LPC: Corteza Prefrontal Lateral;
LTC: Corteza Temporal Lateral; HG: Homicidio con arma de fuego.

Los criterios de exclusión de los pacientes en el presente estudio fueron:

- A. Menor de 18 años o mayor de 60 años
- B. Haber muerto después de estar hospitalizado
- C. Haber transcurrido más de 18 horas desde el deceso
- D. Lesión en la cabeza
- E. Signos de lesión o edema cerebral
- F. Antecedentes de enfermedad neurológica, psiquiátrica, TCE, accidente cerebro-vascular, trastorno del neurodesarrollo.

Estas condiciones eran establecidas a criterio del dictamen forense y se procuró su estricto cumplimiento para evitar la degradación del tejido y garantizar la conservación macroscópica del mismo y de la citoarquitectura cortical.

1.2.3 Procesamiento histológico de las muestras

Todos los procedimientos descritos a continuación, se realizaron en condiciones estándar de laboratorio, tanto para las muestras post-mortem como para las muestras contusas. Al momento de extracción de la muestra, ésta era incluida en solución salina al 0,9%, mientras era llevada al laboratorio (entre 5 y 10 minutos). Dependiendo de la disponibilidad de la muestra (estado y tamaño), esta se dividía para el análisis con las diferentes técnicas descritas en este capítulo. Luego de lavarse el exceso de sangre y detritos de la muestra, se incluyó en la solución fijadora PLP (Paraformaldehído, L-lisina, Meta-Periodato de Sodio, en buffer fosfato salino, pH 7.4, a 4° C) por un periodo máximo de 10 días. Alrededor del quinto día de fijación, se hacía un recambio de la solución y una disección macroscópica de la muestra, extrayendo coágulos, tejido necrótico o licuado y grandes vasos, para obtener bloques de mayor consistencia sólida. A estos bloques se les hizo cortes coronales de 50 µm en un vibrátomo (Vibratome Lancer serie 1000®), descartando las primeras y las últimas 200 µm de cada bloque para evitar las regiones afectadas por la extracción o la disección de la muestra. Los cortes se hicieron seriados para luego ser procesados de forma consecutiva con los anticuerpos primarios de interés mediante inmunohistoquímica.

Todas las soluciones de anticuerpos y sueros de bloqueo fueron preparadas en Buffer Fosfato Salino (PBS, por sus siglas en inglés) con pH de 7,4; solución que también fue utilizada para realizar los lavados (3 lavados cada uno de 5 minutos) de los reactivos, entre un paso y otro de la inmunohistoquímica. Inicialmente las secciones de tejido se sumergieron en una solución de metanol (al 30%) y

peróxido de hidrógeno (al 0,3%) durante 12 minutos, luego se bloqueó la adhesión de antígenos específicos con suero normal de caballo (Vectastain Elite ABC, PK-6102 Mouse IgG®, Vector Laboratories, Southfield, Michigan, USA) al 1,5% durante 40 minutos. Después se incubaron los cortes por 18 horas en los anticuerpos Anti-MAP2 (clon 5f9, cedido por Kenneth Kosik, Santa Bárbara, CA, USA) en una dilución de 1:100, y Anti-NeuN (Mouse Anti-Neuronal Nuclei Monoclonal Antibody, Chemicon International-MAB377®, Temecula, CA, USA) en una dilución de 1:2500. Acto seguido se agregó el complejo Avidina/Biotina (Vectastain Elite ABC, PK-6102 Mouse IgG®, Vector Laboratories, Southfield, Michigan, USA) durante 40 minutos. Finalmente, se adicionó una solución que contenía Diaminobencidina al 4%, peróxido de hidrógeno al 2% y níquel al 2% en PBS (Peroxidase Substrate Kit, DAB SK-4100®, Vector Laboratories, Southfield, Michigan, USA). Como controles negativos del procedimiento, algunos cortes fueron procesados de la manera arriba descrita pero omitiendo agregar el anticuerpo primario.

Terminada la inmunomarcación, los cortes fueron montados en láminas portaobjetos previamente cromoaluminadas, secados a temperatura ambiente, lavados para eliminar los excesos de sal del buffer, se deshidrataron progresivamente en alcoholes y xiloles, y finalmente se cubrieron con un medio de montaje (Fisher Permount Mounting Media®) y laminillas cubreobjetos.

1.2.4 Registro y análisis de imágenes

Se hicieron registros fotográficos panorámicos (2,5x y 4x) y de mayor magnificación (10x y 40x) de las secciones completas de tejido procesado, con la cámara Canon Power Shot A-85 (Canon, Tokyo, Japón), acoplada al microscopio óptico Olympus CH-2 (Olympus, Tokyo, Japón). Las imágenes de 10x fueron fusionadas con la asistencia del programa Photo-Stitch de Canon (versión 3.1, 2000®) para reconstruir imágenes completas de columnas corticales que

abarcaban desde la superficie pial hasta la sustancia blanca subcortical. Las imágenes digitalizadas, se analizaron con la asistencia del programa Sigma ScanPro 5® (SPSS, Chicago, Illinois, USA) y se calibraron con un micrómetro objetivo en portaobjetos de Nikon (Nikon, tipo A, MBM11100®, Tokyo, Japón), de 1 mm y subdivisiones de 10 μm .

De cada muestra de tejido se obtuvo 5 secciones procesadas con cada anticuerpo. El análisis de las imágenes fue hecho por 3 observadores independientes, expertos en la organización celular de la corteza cerebral y en la apariencia de la marcación normal de los anticuerpos Anti-MAP2 y Anti-NeuN. Los límites entre las láminas corticales fueron establecidos de acuerdo con las densidades y formas celulares propias de cada lámina (Barbas & Pandya, 1989; Gittins & Harrison, 2004), observadas en las secciones marcadas con Anti-NeuN y estos límites se superponían en las secciones consecutivas marcadas con Anti-MAP2. Cada observador debió realizar el siguiente procedimiento:

- A. Identificar cada lámina cortical y los límites entre estas en las secciones marcadas contra NeuN
- B. Superponer la organización laminar (identificada en las secciones de NeuN) en las secciones marcadas contra MAP2
- C. Establecer el área total (en μm^2) de sustancia gris cortical en cada sección.
- D. Establecer el área total (en μm^2) ocupada por cada lámina cortical en cada sección.
- E. Identificar sectores de las secciones con algún grado de disminución o pérdida de la intensidad de la IR.
- F. Establecer el área (en μm^2) de sustancia gris cortical con el mayor grado de preservación de la IR en todas las láminas corticales.
- G. Identificar la(s) lámina(s) cortical(es) comprometida(s) en la expresión de la IR.

H. Establecer el área (en μm^2) de cada lámina cortical con algún grado de pérdida de la IR.

Con los datos de los literales C, D, F y H, se obtuvieron los porcentajes de tejido cortical con preservación de la citoarquitectura, los porcentajes de tejido con pérdida de la IR en forma de *parche* (pérdida parcial o total de la IR, de forma circunscrita que afecta un sector con un radio no mayor a los 2 mm) y los porcentajes de alteración de las láminas corticales. Los datos proporcionados por los 3 observadores no presentaron diferencias mayores al 5% entre uno y otro; por lo tanto, los datos que se presentarán en los resultados corresponden a los promedios de las 3 observaciones independientes.

1.3 Resultados

En la Tabla 3, se presentan los datos semi-cuantitativos de los principales hallazgos derivados de las observaciones consolidadas para los dos anticuerpos empleados, NeuN y MAP2, en las seis muestras de tejido contuso.

En resumen se encontró que:

- A. Todas las muestras de tejido contuso presentaron disminuciones o alteraciones de la IR, en algún grado, para las marcaciones de los dos anticuerpos (en al menos un 5% de su superficie).
- B. La pérdida de la IR de MAP2 es más severa, extensa (de un 5% al 100% de la extensión del tejido contuso) y homogénea que la de NeuN (de un 5% al 33% de la extensión del tejido contuso).
- C. La disminución de la IR de NeuN es bastante heterogénea a lo largo de toda la contusión. En una misma sección de tejido se pueden encontrar

sectores con pérdida total de la IR, sectores con disminución de la IR en forma de parche y sectores con neuronas presentes en todas las láminas corticales con suficiente densidad como para determinar los límites entre estas (zonas aparentemente “normales” o similares a la de los tejidos post-mortem, en microfotografías de baja magnificación) (ver Figura 1B, 1D, 1E).

Tabla 3. Nivel de compromiso de la IR en el tejido contuso

Muestra	NeuN					MAP2					LAM
	PC	PS	PI	PT	IP	PC	PS	PI	PT	IP	
T05	80,0	10,0	10,0	0,0	20,0	66,7	20,0	11,1	2,2	33,3	V
T06	90,0	3,3	6,7	0,0	10,0	66,7	25,0	8,3	0,0	33,3	III
T07	95,0	5,0	0,0	0,0	5,0	80,0	20,0	0,0	0,0	20,0	III
T08	95,0	5,0	0,0	0,0	5,0	95,0	3,3	1,7	0,0	5,0	III
T12	-	-	-	-	-	0,0	-	-	-	100,0	-
T14	66,7	13,0	9,0	8,0	33,3	0,0	-	-	-	100,0	-

PC: Porcentaje (%) de tejido con alguna preservación de la IR en todas las láminas corticales; PS: Porcentaje (%) de tejido con pérdida o disminución de la IR en forma de parche en las capas supragranulares (láminas II y III); PI: Porcentaje (%) de tejido con pérdida o disminución de la IR en forma de parche en las capas infragranulares (láminas V y VI); PT: Porcentaje (%) de tejido con pérdida de la IR en forma de parche que compromete tanto las capas supragranulares y a las infragranulares simultáneamente; IP: Porcentaje (%) total de tejido con disminución o pérdida de la IR. LAM: Lámina cortical con mayor porcentaje de área afectada. La muestra T12 no presentó pérdida de la IR en forma de parche, pero si una disminución generalizada y homogénea de la misma para NeuN, y una pérdida total para MAP2.

- D. Dentro de las zonas de parche, se encontraron micro-hemorragias (ver Figura 1D).
- E. Se encontraron zonas de pérdida de la IR para NeuN en forma de parche, algunos circunscritos a las capas supragranulares (láminas corticales II y III), otros a las infragranulares (láminas corticales V y VI) y en algunos casos, cubriendo casi la extensión total de la sustancia gris cortical. Fueron más frecuentes los “parches” en las capas supragranulares (3 de 5 casos con NeuN, y 4 de 4 casos con MAP2).

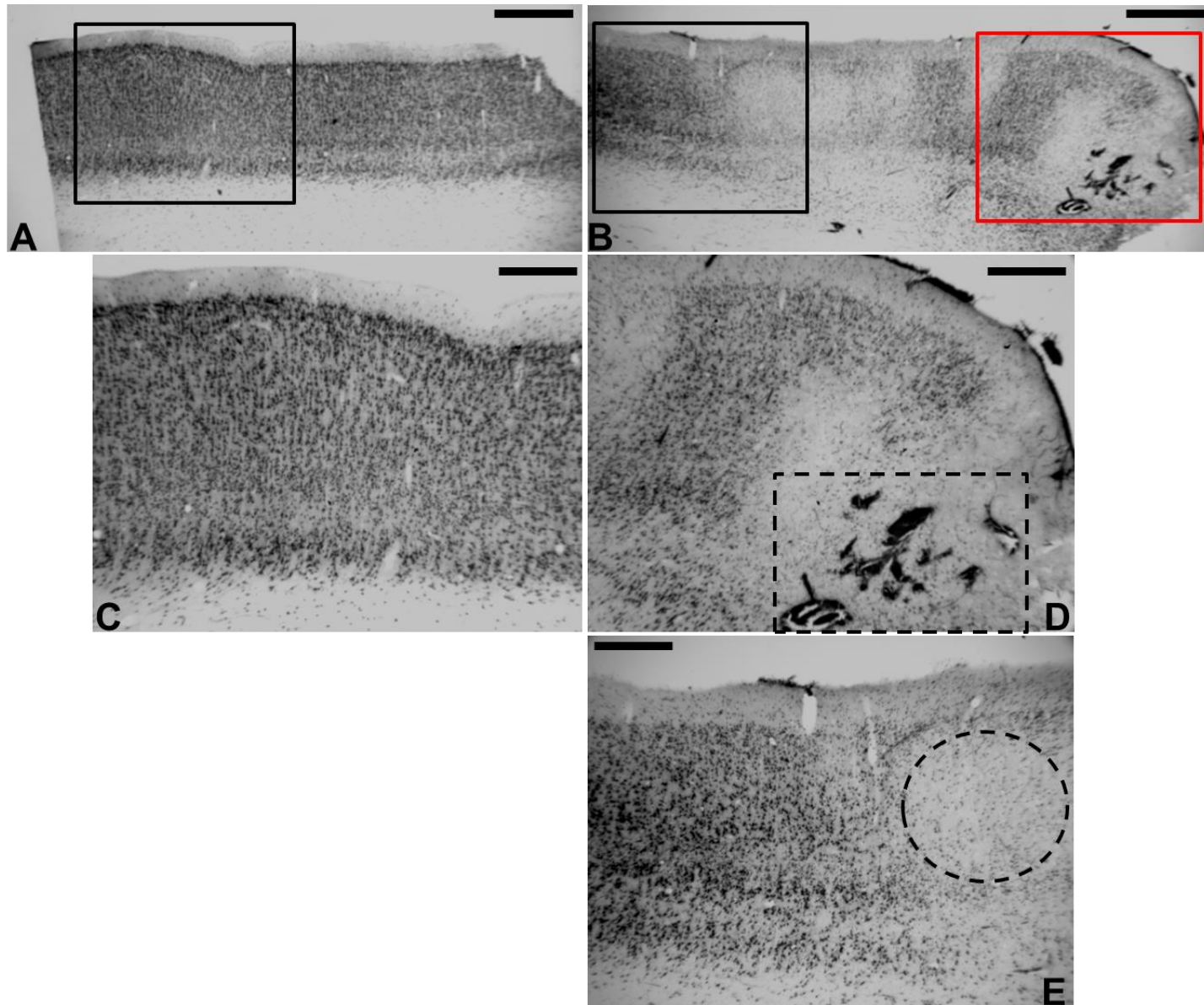


Figura 1. Heterogeneidad en la expresión de NeuN de la corteza cerebral de humano en respuesta a la contusión cerebral

Figura 1. Heterogeneidad en la expresión de NeuN de la corteza cerebral de humano en respuesta a la contusión cerebral

A y C corresponden a tejido control post-mortem. B, D y E son tejido contuso. En B se reconocen los diferentes grados de compromiso de la IR para NeuN dentro una misma sección de tejido contuso: zonas preservadas, zonas de parche supragranular y zonas de parche supra e infragranular. C es una magnificación del recuadro negro en A. D es una magnificación del recuadro rojo en B. E es una magnificación del recuadro negro en B, en el que se aprecia la continuidad entre un sector de parche (dentro de círculo de línea discontinua) y otro de preservación de la citoarquitectura. El recuadro de línea discontinua en D, demarca una micro-hemorragia dentro de una zona de parche de pérdida de la IR para NeuN. Barra de A y B = 1 mm. Barra de C, D y E = 500 μ m.

- F. Las láminas corticales con mayor grado de compromiso de la IR para ambos marcadores fueron la III y la V, en particular la primera de estas (en 3 de 4 casos).
- G. Los sectores con mayor pérdida de la IR para NeuN están contenidos dentro de los sectores con mayor pérdida de la IR para MAP2.
- H. Aquellos sectores donde se aprecia una aparente normalidad en la marcación (NeuN) o preservación de la laminaridad (en fotografías de baja magnificación), al observarse con mayor magnificación (40x) se encuentra que el patrón de la IR a nivel subcelular se aleja del patrón normal. Las neuronas presentan disminución de la intensidad de la marcación, discontinuidad o fragmentación de la misma a nivel nuclear; y en algunas neuronas, la marcación citoplasmática parece incrementarse, aunque igualmente fragmentada (ver Figura 2).
- I. La marcación de MAP2, además de disminuir en intensidad (ver Figura 3), también se aprecia fragmentada tanto en el soma como a lo largo de las dendritas apicales de las neuronas piramidales. Los fascículos apicales se observan interrumpidos, edematizados, tortuosos, y en algunos sectores, con cambios en su dirección (de ser vertical pasó a ser oblicua) (ver Figura 4).

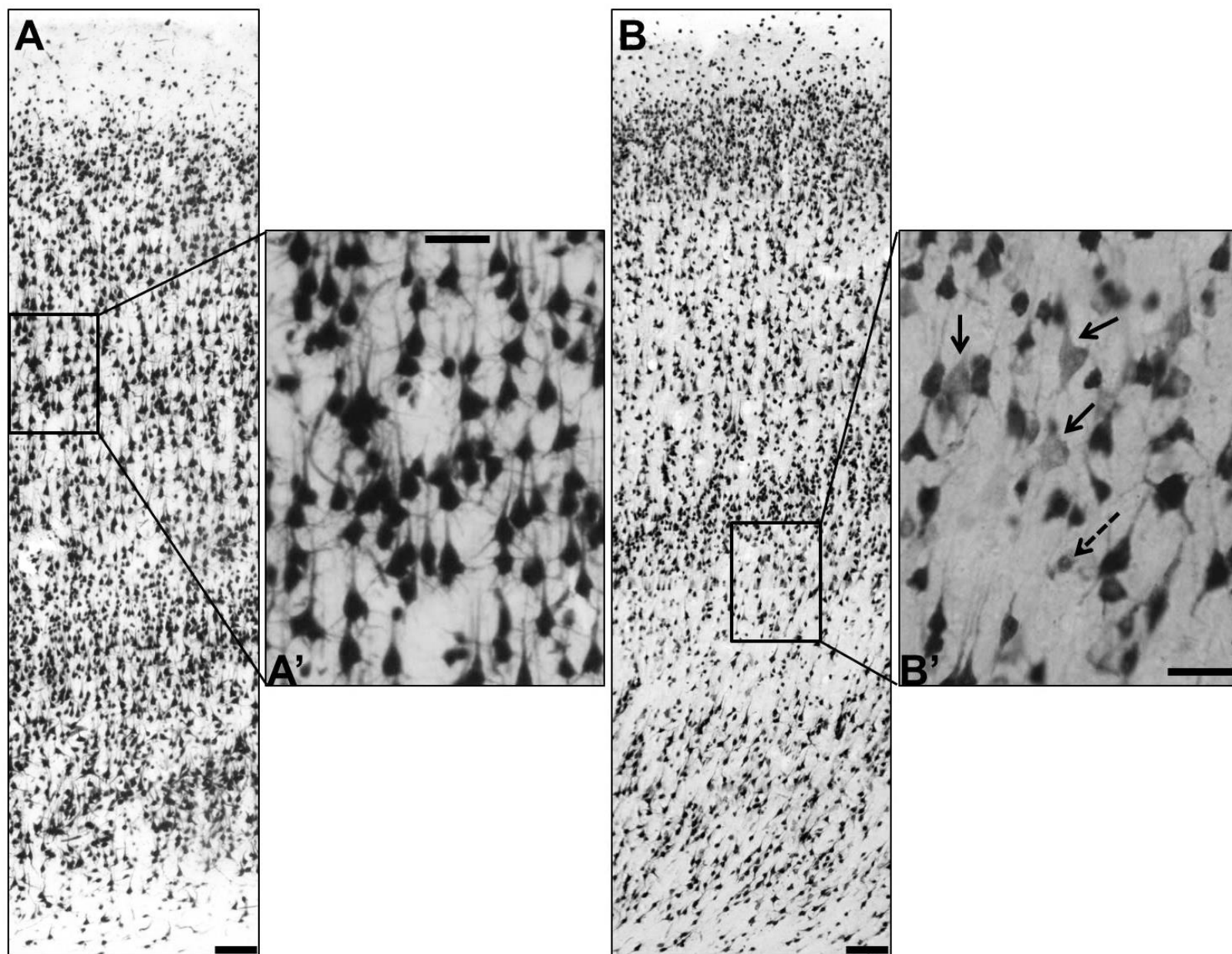


Figura 2. Alteración de la expresión de NeuN en neuronas de zonas de citoarquitectura conservada, en la contusión cerebral.

Figura 2. Alteración de la expresión de NeuN en neuronas de zonas de citoarquitectura conservada, en la contusión cerebral.

A y A' corresponden a imágenes de tejido control post-mortem; B y B' a imágenes de tejido contuso, en un sector que conserva la citoarquitectura. A y B son imágenes de columnas corticales completas. A' y B' son magnificaciones de los respectivos recuadros de A y B. Las flechas en B' señalan neuronas con cambios significativos en la IR para NeuN comparada con la marcación de las neuronas de A'. Estos cambios se reflejan en disminución de la marcación, predominantemente en el núcleo (flechas continuas), o fragmentación de la misma (flecha discontinua). La barra en A y B = 100 μm ; la barra en A' y B' = 30 μm .

1.4 Discusión

En el presente apartado se logró caracterizar de forma general, la presentación histológica de la contusión cortical en estado agudo del humano, con dos marcadores sensibles a la lesión cerebral como Anti-NeuN y Anti-MAP2. Dentro una misma región de la contusión, se encontraron sectores con diferentes grado de compromiso por el TCE, manifestados en los cambios en la expresión de estos marcadores. La marcación de NeuN es bastante heterogénea, apreciándose desde sectores con aparente conservación de la citoarquitectura, tal cual se observa en el tejido control post-mortem, hasta sectores con pérdida total de la IR. Estos tipos de sectores extremos se presentan simultáneamente en el nivel microscópico, adyacentes uno del otro, incluso intercalados entre ellos.

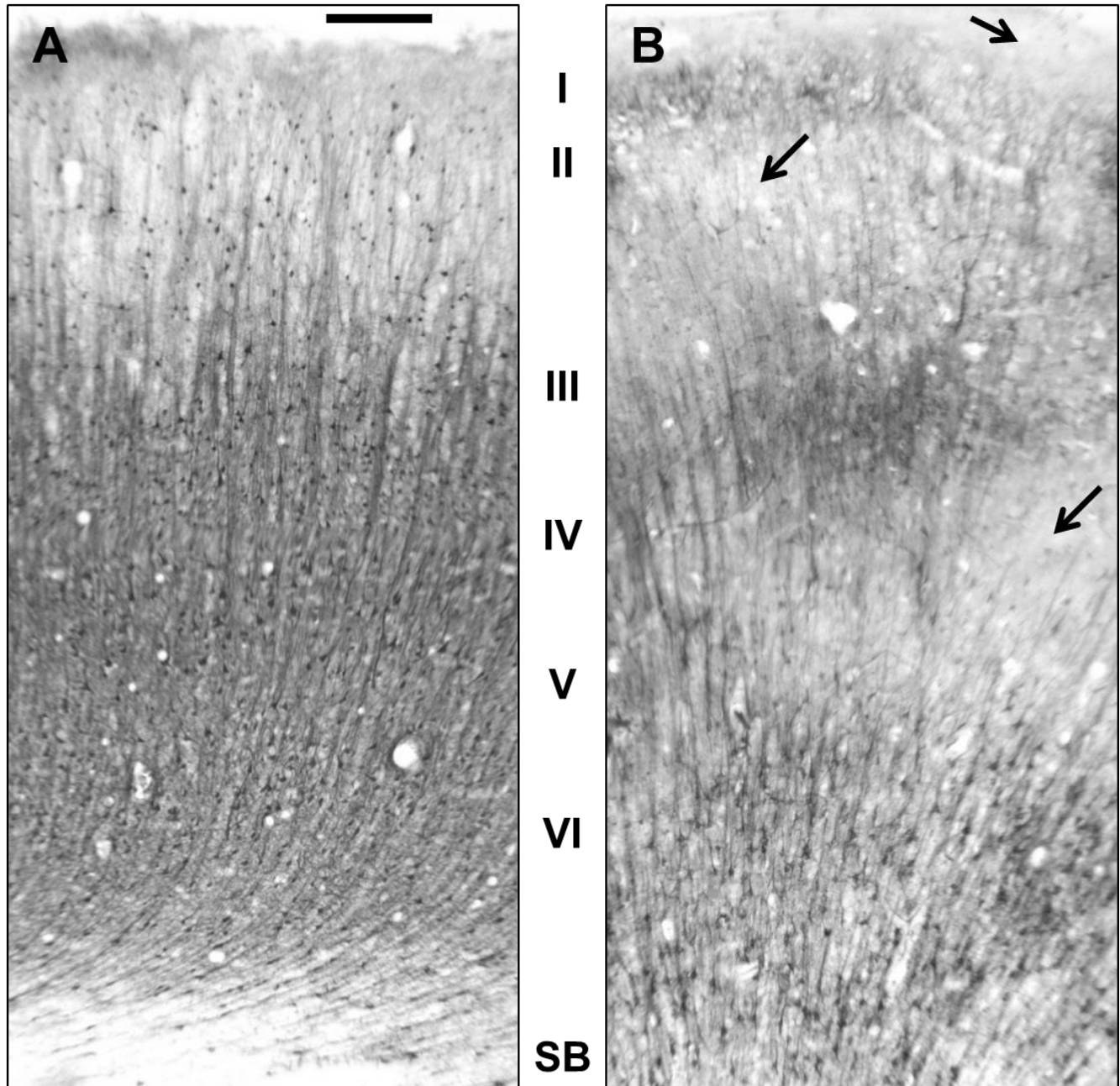


Figura 3. Pérdida de la IR para MAP2 en tejido cortical contuso de humano. En la imagen A se presenta una sección de tejido cortical post-mortem control, y en B, una imagen de tejido cortical contuso. Las flechas señalan aquellos sectores donde la disminución de la IR fue severa, generando “parches” de casi ausencia total de expresión de MAP2. Barra en A y B = 200 μm .

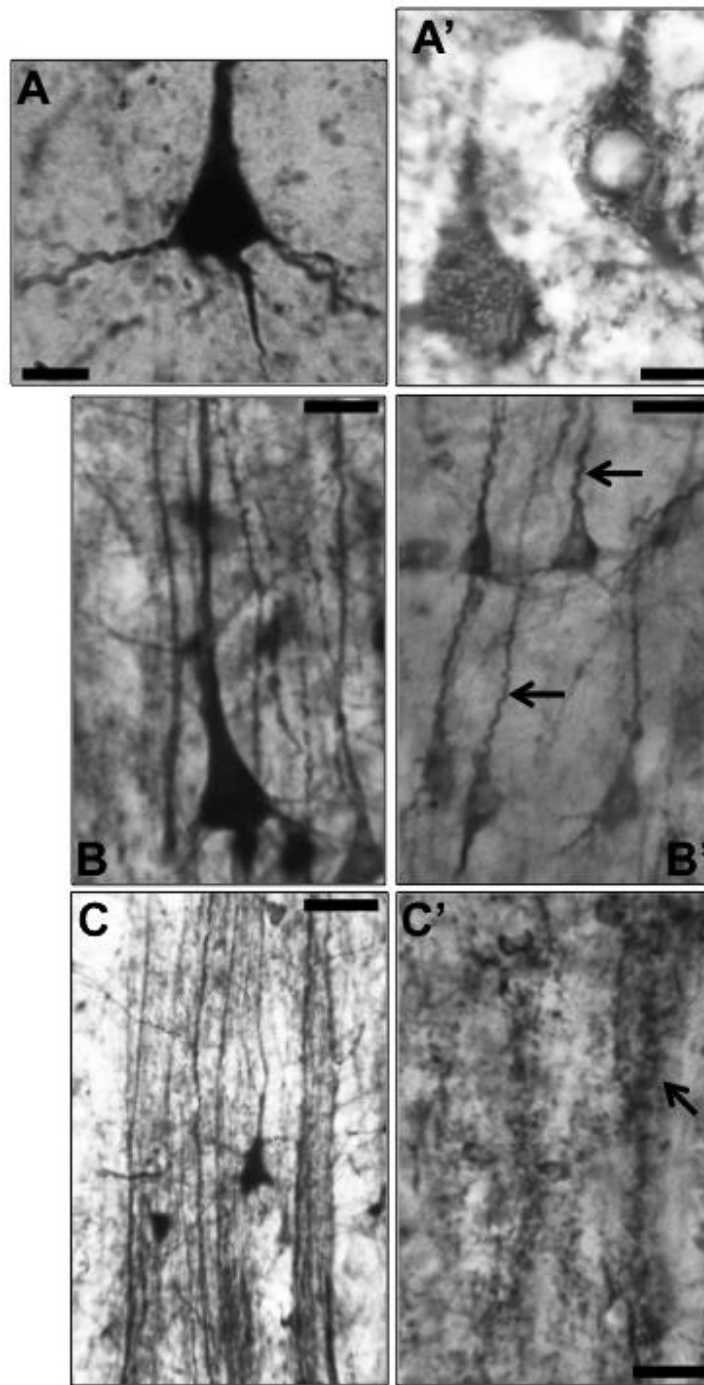


Figura 4. Alteraciones celulares en la expresión de MAP2.

A, B y C corresponde a imágenes de tejido post-mortem control, en las que se exhiben las características de expresión normal de MAP2, como marcación compacta e intensa en el citoplasma somático (A) y dendrítico (A y B), así como continuidad de los fascículos apicales (C). A', B' y C' son imágenes de tejido contuso, en el que aprecian algunas características de la alteración de la expresión de MAP2, como fragmentación citoplasmática (A'), entorchamiento de las dendritas apicales (B') o discontinuidad de las mismas (C'). La barra en A y A' = 10 μ m. La barra en B, B', C y C' = 30 μ m.

En los sectores con disminución de la IR para NeuN, se observó disminución de la densidad neuronal, pérdida de los límites entre las láminas corticales, neuronas “fantasma” (tenuemente marcadas), con fragmentación nuclear y citoplasmática. Estas alteraciones se encontraron circunscritas (en forma de “parche”) a una lámina cortical o a varias de estas, e incluso abarcando una columna cortical completa. Dentro de estas zonas de parche, fue común encontrar micro-hemorragias intraparenquimatosas, las cuales podrían ser el origen de la alteración a su alrededor. La reducción en la IR de NeuN se ha considerado por parte de varios autores, como un indicativo de pérdida neuronal (Collombet et al., 2006; Robertson et al., 2006; Swartz et al., 2006). No obstante, otros afirman que esta disminución de la IR es un evento transitorio y reversible, que reflejaría solo un cambio en el estado de fosforilación de la proteína NeuN (Lind et al., 2005). De todas maneras, determinar si la disminución de la IR para NeuN corresponde a una pérdida de la proteína efectivamente, y no a una disminución de la antigenicidad, no era un propósito de éste apartado del estudio, pero volveremos sobre este asunto en el tercer capítulo del documento.

Es importante señalar que en nuestro estudio, al valorar secciones consecutivas de tejido marcadas con NeuN y MAP2, encontramos que la ausencia de marcación de NeuN siempre se acompañó de una concomitante ausencia de la de MAP2, pero la presencia de neuronas que expresan NeuN no era un prerrequisito de la presencia de neuronas que expresaran MAP2 en el tejido contuso. Por lo tanto, es importante valorar la respuesta tisular temprana a la lesión traumática con los dos marcadores aquí empleados, y de esta manera definir la magnitud de la lesión y las posibles zonas en riesgo de posterior degeneración o muerte tardía, como ya lo reveló un estudio con fragmentación del ADN (revelado por la técnica de TUNEL) en neuronas que pierden la IR para NeuN (Collombet et al., 2006).

El único antecedente de disminución de la expresión tisular de NeuN en seres humanos relacionada con trauma, proviene de un reporte de tejido del lóbulo temporal extraído por cirugía de epilepsia 19 años después de un TCE (Swartz et

al., 2006). Todo lo anterior podría indicar que si bien la pérdida de la IR para NeuN no necesariamente se corresponde con una pérdida de la célula, esta pérdida si podría ser indicativo de alteraciones metabólicas y neurodegeneración celulares en curso, procesos que a futuro podrían terminar con la muerte de las neuronas.

Otro aspecto importante de nuestros hallazgos, fue identificar el compromiso preponderante de dos láminas corticales dado la pérdida de la IR para NeuN, las láminas III y V, principalmente de la lámina III. La mayoría de las neuronas ubicadas en estas láminas corticales (neuronas piramidales) poseen axones largos a través de los cuales una área cortical realiza sus conexiones cortico-corticales y cortico-subcorticales (Barbas & Rempel-Clower, 1997) a través de la sustancia blanca subcortical. Estos axones estarían expuestos no sólo a las fuerzas de golpe y contragolpe del encéfalo (con la consecuente micro-hemorragia) propias de la contusión, sino también a un efecto adicional de axotomía generado por las fuerzas de aceleración y desaceleración. No obstante, no tenemos evidencia del mecanismo del trauma de nuestros pacientes y solo existe evidencia parcial de que la axotomía (en nervios periféricos) altere la expresión de la proteína NeuN (McPhail, McBride, McGraw, Steeves, & Tetzlaff, 2004).

En el presente estudio, aquellos sectores donde la citoarquitectura se apreciaba conservada en imágenes de baja magnificación, al incrementar la magnificación se observan neuronas con alteración de la expresión de NeuN. Otro estudio llevado a cabo por el Centro de Estudios Cerebrales con algunas de estas muestras (Riascos et al., 2008), encontró que justamente las láminas III y V son las que poseen la mayor cantidad de neuronas con la IR para NeuN alterada al momento de extracción del tejido contuso; y además, después de cultivarlas en tajadas agudas (mediante cultivo organotípico), se determinó que los sectores con mejor apariencia histológica inicial, poco a poco pierden la IR para NeuN empezando por estas mismas láminas corticales. Estos hallazgos, más la probable vulnerabilidad

de la lámina III (principal fuente de las conexiones asociativas e interhemisféricas entre áreas corticales), y el hecho de que en el tejido cerebral extraído quirúrgicamente de pacientes con TCE severo se acumula la Proteína Precursora de Amiloide (APP, por sus siglas en inglés, que es la proteína base para la producción del péptido β -Amiloide y la consecuente placa senil en la enfermedad de Alzheimer) (Ikonomic et al., 2004; Palacios, 2014; Palacios et al., 2011), podría explicar las secuelas neurológicas, psiquiátricas y comportamentales (como por ejemplo: psicosis, demencia, amnesias, etc.) que presentan los pacientes que han sufrido un TCE severo.

En el caso de la expresión de MAP2 en el tejido contuso de humano, su alteración fue más extensa y generalizada que la de NeuN, y no necesariamente asociada a una micro-hemorragia y a los parches de ausencia de NeuN. El hallazgo más importante con esta marcación, fue la observación de la alteración de la organización de los fascículos dendríticos de las neuronas piramidales. Estas neuronas, además de presentar una disminución y/o fragmentación en la marcación para MAP2 en su soma, exhibían tortuosidades en los segmentos proximales de sus dendritas apicales (en algunos casos cambios de orientación vertical por orientación oblicua de las mismas) así como discontinuidad o fragmentación en los segmentos distales de las mismas. Aunque la disminución de la IR para MAP2 se ha vinculado con alteración temporal de sus epítopes como consecuencia de una lesión o por cambios en su estado de fosforilación (Huh et al., 2003; Kühn et al., 2005; Sanchez et al., 2000), el anticuerpo que empleamos en el presente estudio (5F9) permite reconocer la proteína aún fragmentada e independiente de su estado de fosforilación; por lo tanto, las alteraciones observadas en su expresión representan una pérdida de la proteína y por ende una inestabilidad del citoesqueleto. Esta degradación de MAP2 probablemente puede ser ocasionada por la activación de calpainas inducidas por las altas concentraciones de calcio al interior de las células, a partir de fenómenos excitotóxicos propios del TCE (G. V Johnson & Foley, 1993; G. V Johnson,

Litersky, & Jope, 1991; Kampfl et al., 1996, 1997; Palmer et al., 1993; Saatman, Bozyczko-Coyne, Marcy, Siman, & McIntosh, 1996).

Las modificaciones de las proteínas del citoesqueleto neuronal podrían explicar las alteraciones observadas en la dirección y forma de las dendritas apicales de las neuronas piramidales, así como la fragmentación de las mismas en sus porciones distales. Dichas modificaciones se traducen en un encogimiento de la dendrita y sus ramificaciones, lo que conlleva a la desconexión de sus espinas dendríticas y a la consecuente pérdida de sus aferencias corticales y talámicas. Estos fenómenos observados tanto en los fascículos apicales que ascienden desde la lámina V como en aquellos que se originan a partir de la lámina III, fortalecerían la idea de una vulnerabilidad de estas capas corticales durante una contusión, así como daría mayor soporte neurobiológico al resultado clínico de quienes sobreviven al TCE.

Finalmente, es necesario destacar que el hallazgo de sectores que conservan la organización laminar dentro del tejido contuso podría representar la presencia de zonas perilesionales e incluso exofocales a la lesión, las cuales en otras condiciones no es posible evaluar por el difícil acceso a este tipo de muestras biológicas. Estos sectores son susceptibles de ser estudiados para buscar alternativas terapéuticas al TCE (Riascos et al., 2008), al tiempo que su extracción podría resultar en la prevención de la extensión de la lesión de continuar *in situ*, desde las zonas micro-hemorrágicas y de parche.

Capítulo 2

Cambios en la expresión de las proteínas que ligan calcio en las contusiones corticales de humano

2.1 Antecedentes

En el capítulo anterior mostramos el comportamiento histológico general del tejido contuso obtenido a partir de cirugía decompresiva en humanos, durante los periodos agudo y subagudo después del TCE. Así mismo, encontramos que el compromiso tisular (analizado por la expresión de marcadores selectivos de neuronas) es muy heterogéneo y lamino-específico dentro de la población global neuronal. Por esta razón, las siguientes preguntas que nos hicimos fueron:

- ¿Cuál es el compromiso del componente neuronal GABAérgico o inhibitorio de la corteza cerebral en los periodos agudos y subagudo del TCE en humanos?
- ¿Habrá diferencias en la respuesta a la lesión traumática entre diferentes subpoblaciones de interneuronas?

- ¿Este posible compromiso de las subpoblaciones neuronales está relacionado espacialmente con la ubicación de los parches de pérdida de IR y de las zonas de citoarquitectura conservada, vistos en la primera parte del presente estudio?
- Analizado el componente neuronal, ¿qué ocurre con la población de astrocitos? ¿Cuál es su respuesta tisular a la lesión traumática en relación con los hallazgos histológicos del capítulo 1?

Bien conocida es la influencia que tiene el TCE en el eventual desarrollo de neuropatologías como la epilepsia, ya que entre el 7% y el 39% de los casos de ésta son secundarios a lesiones severas que comprometen el sistema nervioso central (Annegers & Coan, 2000; D'Ambrosio & Perucca, 2004; Frey, 2003; Hunt et al., 2009; Kharatishvili & Pitkänen, 2010; D. H. Lowenstein, 2009; Pitkänen, Immonen, Gröhn, & Kharatishvili, 2009; Swartz et al., 2006; Verellen & Cavazos, 2010). El TCE es responsable de al menos el 20% de la epilepsia sintomática en la población mundial, y del 5% de todos los tipos de epilepsia (D'Ambrosio & Perucca, 2004; Frey, 2003). Los pacientes que sobreviven al TCE tienen tres veces mayor riesgo de desarrollar epilepsia que aquel que no lo padece, y este riesgo incrementa conforme lo hace la severidad del TCE, siendo los pacientes con TCE leve los de menor riesgo (0,5%) y aquellos con TCE severo (incluyendo contusiones y hematomas intracerebrales) los de mayor (10%); además, el riesgo de presentar crisis convulsivas post-traumáticas persiste hasta por 20 años después de un TCE severo (Annegers, Hauser, Coan, & Rocca, 1998).

Aunque los mecanismos neurobiológicos comprometidos en la generación de la epilepsia después del TCE no están claramente dilucidados, la lesión de las láminas superficiales de la corteza cerebral podrían ser un factor común en varias formas de trauma que incluyen hematoma subdural o epidural y/o fractura del cráneo (L. Yang, Benardo, Valsamis, & Ling, 2007). La epilepsia después del TCE puede desarrollarse en tres fases: la lesión, la epileptogénesis y la generación de crisis espontáneas recurrentes. Durante la fase de la epileptogénesis ocurren

varios cambios celulares tales como gliosis, neurogénesis, plasticidad axonal y dendrítica, re-arreglo de la matriz extracelular, angiogénesis y/o muerte celular (Graef & Godwin, 2010; Pitkänen et al., 2007; Timofeev, Bazhenov, Avramescu, & Nita, 2010). Estos cambios celulares pueden estar acompañados de otros a nivel bioquímico y fisiológico en la corteza cerebral, los cuales producirían una alteración en el balance excitación/inhibición a través de la disminución de la frecuencia en las corrientes inhibitorias y en la liberación sináptica de GABA (Avramescu et al., 2009; Pavlov et al., 2011; L. Yang & Benardo, 1997). Al respecto, se ha reportado que un decremento en la inhibición cortical después de una lesión cortical aguda, es generada por pérdida de neuronas inhibitorias en las láminas superficiales, las cuales se encargarían de controlar sincrónicamente la actividad de las dendritas apicales de las neuronas piramidales que ascienden desde las láminas IV y V (L. Yang et al., 2007; L. Yang & Benardo, 1997, 1998). Infortunadamente, todos los hallazgos sobre un compromiso del componente inhibitorio de las células corticales después de una lesión cortical y la subsecuente generación de epilepsia (como los previamente mencionados), solo han sido hechos en modelos experimentales de epilepsia o de TCE.

Para cumplir con este propósito, empleamos anticuerpos contra tres proteínas que ligan el calcio (CaBPs, por su sigla en inglés) intracelular: parvalbúmina (PV), calbindina (CB) y calretinina (CR). Estas proteínas se expresan específicamente en 3 poblaciones diferentes de interneuronas Gabaérgicas corticales (Andressen, Blümcke, & Celio, 1993; Dombrowski, Hilgetag, & Barbas, 2001; Hof, Mufson, & Morrison, 1995; Ongür, Ferry, & Price, 2003; Zaitsev et al., 2005). Estos marcadores de subpoblaciones de interneuronas generalmente han sido empleados en el estudio de la citoarquitectura cortical de roedores, primates no-humanos y humanos en condiciones no patológicas (Buriticá & Pimienta, 2007; DeFelipe, 1997; Dombrowski et al., 2001; Hilgetag, Dombrowski, & Barbas, 2002; Hof et al., 1999, 1995; Ongür et al., 2003), y en condiciones patológicas como la esquizofrenia (Beasley & Reynolds, 1997; Beasley, Zhang, Patten, & Reynolds, 2002; Reynolds, Zhang, & Beasley, 2001; Sakai et al., 2008; Tooney & Chahl,

2004), la epilepsia (Río & DeFelipe, 1997b; Valencia et al., 2006), la isquemia (Freund, Buzsáki, Leon, Baimbridge, & Somogyi, 1990), la demencia relacionada con Esclerosis Lateral Amiotrófica (Ferrer et al., 1993) e hidrocefalia (Tashiro, Chakraborty, Drake, & Hattori, 1997); pero no en TCE o en la valoración del tejido cortical contuso de humanos.

Igualmente importante, es la respuesta glial al TCE ya que los astrocitos regulan el microambiente alrededor de las neuronas. Entre sus funciones más importantes se cuenta la recaptura y metabolización del glutamato, la liberación del mismo, el barrido de las especies reactivas de oxígeno, el control de la barrera hematoencefálica, la regulación de la concentración e intercambio iónicos y el transporte de agua (Yongmei Chen & Swanson, 2003). Estas funciones son cruciales para la supervivencia neuronal ante cualquier tipo de lesión cerebral. Aunque en el momento mismo del TCE hay muerte tanto de neuronas como de glías, aquellos astrocitos que sobreviven conservan su capacidad proliferativa y capacidad de respuesta ante los eventos fisiopatológicos desencadenados (gliosis reactiva) (Pekny & Nilsson, 2005). Dicha respuesta astrocítica supone un arma de doble filo para el tejido lesionado de los supervivientes al TCE dependiendo de la extensión y del momento de su valoración. De un lado permite la formación de la cicatriz glial que puede proteger al tejido intacto de las lesiones secundarias (C. M. Anderson & Swanson, 2000; Y Chen et al., 2001; Iwata-Ichikawa, Kondo, Miyazaki, Asanuma, & Ogawa, 1999), y de otro lado se convierte en el mayor impedimento para la regeneración axonal después del trauma o incluso, si la liberación de glutamato excede la capacidad de recaptura de los astrocitos, pueden reversar su función, exacerbando el daño neuronal (Parpura, Scemes, & Spray, 2004; Takahashi et al., 1997). Como se mencionó más arriba, la gliosis hace parte del proceso epileptogénico post-traumático (Pitkänen & McIntosh, 2006; Pitkänen et al., 2007; Swartz et al., 2006), y ha sido valorado en varios estudios a través de la observación de la expresión de la Proteína Ácida Glial Fibrilar (GFAP, por su sigla en inglés) en modelos animales de epilepsia y TCE (Carbonell & Grady, 1999; Hamberger, Viano, Säljö, & Bolouri, 2009; D.

Lowenstein, Thomas, Smith, & McIntosh, 1992), así como en tejido traumático post-mortem de humano con tiempos de supervivencia generalmente extensos (Bigler & Maxwell, 2012; Dressler, Hanisch, Kuhlisch, & Geiger, 2007; Hausmann et al., 2000; D.-R. Li et al., 2012; Onaya, 2002; F. M. Smith et al., 2000; Swartz et al., 2006), pero en tejido contuso de humano obtenido por cirugía decompresiva durante la fase aguda del TCE son muy escasos o utilizan el marcador para colocalizar otros (Holmin et al., 1998); haciéndose importante su estudio con nuestras muestras, considerando la heterogeneidad en la respuesta histológica a la contusión evidenciada en el capítulo 1.

2.2 Materiales y Métodos

Las muestras de tejido de TCE y las de los controles post-mortem de este apartado incluyen aquellas del apartado anterior y otras adicionales, conservando los mismos criterios de inclusión y exclusión para ambos grupos de muestras. Los procedimientos descritos para el procesamiento histológico de las muestras en el presente estudio también fueron los mismos del capítulo 1, de tal manera que sólo se hará énfasis en aquellos puntos de los *materiales y métodos* donde sea necesario especificar o diferenciar ambos estudios.

2.2.1 Los pacientes con TCE y las muestras de tejido contuso

Para responder a las preguntas del presente capítulo, se analizaron muestras de tejido cerebral contuso, provenientes de 12 pacientes (en la Tabla 4, se muestran las características clínicas de los pacientes) con diagnóstico de contusión cerebral focal y con hipertensión endocraneana severa. En ningún caso se hizo remoción adicional de tejido cerebral para efectos del presente estudio. Todos los procedimientos para la recolección de las muestras y su posterior análisis, fueron

aprobados por los Comités de Ética del Hospital Universitario del Valle y de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle (Acta No. 045, de 2004).

Tabla 4. Características de los pacientes con TCE para el estudio 2

Muestra	Sexo	Edad	GI	GOS	Lóbulo	Hem	TPT	HN
T05	M	71	6	4	Temp	Der	2	HSDA, HSA, HP, HU
T06	M	73	10	1	Temp	Izq	2	AF, HP
T07	M	22	12	5	Fron	Der	3	HSDA, HP, HSF
T08	M	28	13	5	Fron	Izq	3	BDP, II par
T09	M	30	14	5	Fron	Izq	2	HSF
T10	M	35	10	1	Fron	Izq	3	DAI, II par
T13	M	48	13	5	Fron	Izq	4	HSDA
T14	M	42	8	5	Temp	Izq	2	HSDA, HSF, HU, AF, HP, III par
T15	M	16	8	4	Temp	Der	3	HP, III par
T16	F	72	13	5	Fron	Izq	3	-
T17	M	22	14	5	Temp	Izq	4	HSDA
T19	F	39	11	3	Temp	Izq	2	HSDA, AF, NH

GI: Glasgow de Ingreso al servicio de urgencias; GOS: Glasgow Outcome Score; Temp: Lóbulo Temporal; Fron: Lóbulo Frontal; Hem: Hemisferio; Der: Derecho; Izq: Izquierdo; TPT: Tiempo entre el trauma y la cirugía (en días); HN: Otros hallazgos neurológicos adicionales a la contusión; HSDA: Hemorragia Subdural Aguda; HSA: Hemorragia Subaracnoidea; HP: Hemiparesia; HU: Herniación Uncal; AF: Afasia; HSF: Herniación Subfalcina; BDP: Bradipsiquia; II par: compromiso del II par craneal; III par: compromiso del III par craneal; NH: Nistagmos Horizontal; DAI: Lesión Axonal Difusa.

2.2.2 Los sujetos control y las muestras de tejido sin TCE

La expresión histológica de los inmunomarcadores de interés en el tejido contuso fue comparada con la expresión de los mismos en tejido post-mortem sin TCE, dada la imposibilidad de obtener tejido sano a través de una biopsia. Estas últimas muestras fueron obtenidas de 12 sujetos (ver Tabla 5) del Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Cali.

Tabla 5. Características de los sujetos post-mortem para el estudio 2 y 3

Muestra	Sexo	Edad	PMI	Región	Causa de muerte
C1	M	45	12	LPC	HG
C3	M	18	10	LPC	HG
C4	M	32	12	LTC	HG
C5	M	24	14	LPC	HG
C6	M	33	15	LTC	HS
C7	M	53	12	LPC	RA
C8	M	37	14	LTC	HG
C9	M	29	8	LPC	HG
C11	M	26	10	LPC	HG
C12	M	50	10	LTC	HS
C13	M	37	7	LPC	HS
C14	M	47	14	LTC	HG

PMI: Intervalo post-mortem; LPC: Corteza Prefrontal Lateral; LTC: Corteza Temporal Lateral; HG: Homicidio con arma de fuego; HS: Homicidio por apuñalamiento; RA: Ruptura de aneurisma aórtico.

Estas condiciones eran establecidas a criterio del dictamen forense y se procuró su estricto cumplimiento para evitar la degradación del tejido y garantizar la conservación macroscópica del mismo y de la citoarquitectura cortical.

2.2.3 Procesamiento histológico de las muestras

Todos los procedimientos descritos a continuación, se realizaron en condiciones estándar de laboratorio, tanto para las muestras post-mortem como para las muestras contusas. Para mayor detalle del procesamiento, remitirse al apartado 1.2.3 del capítulo 1 de este documento. Los cortes se hicieron seriados para luego ser procesados de forma consecutiva con los anticuerpos primarios de interés mediante inmunohistoquímica.

Los cortes se incubaron por 18 horas en los anticuerpos Anti-NeuN (Mouse Anti-Neuronal Nuclei Monoclonal Antibody, Chemicon International-MAB377®, Temecula, CA, USA) en una dilución de 1:2500, Anti-GFAP (Monoclonal Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein, Clone G-A-5®, Sigma, Saint Louis, MO, USA) diluido 1:400, Anti-Parvalbúmina (Monoclonal Anti-parvalbumin clone PARV-19 P-3088®, Sigma, St. Louis, MO, USA), Anti-Calbindina (Monoclonal Anti-calbindin D-28K clone CB-955®, Sigma, St. Louis, MO, USA) y Anti-Calretinina (Polyclonal Anti-calretinin clone AB-149®, Chemicon International, Temecula, CA, USA). Todos los anticuerpos para proteínas que ligan calcio fueron diluidos 1:5000. Acto seguido la inmunohistoquímica continuó como ya fue descrita previamente.

2.2.4 Registro fotográfico y análisis de imágenes

Se hizo el registro fotográfico a 10x con la cámara Canon Power Shot A-85 (Canon, Tokyo, Japón), acoplada al microscopio óptico Olympus CH-2 (Olympus, Tokyo, Japón). Estas fueron fusionadas con la asistencia del programa Photo-Stitch de Canon (versión 3.1, 2000®) para reconstruir imágenes completas de columnas corticales que abarcaban desde la superficie pial hasta la sustancia blanca subcortical. Para las imágenes de alta resolución con objetivos de 40x y 100x, se utilizó un microscopio BX-60 Olympus (Tokyo, Japón) acoplado a una cámara Cool CCD Optronics (Goleta, CA, USA) y a un computador con el programa Image Pro Plus (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Los múltiples planos focales fueron adheridos para crear un mosaico del campo microscópico deseado.

De cada muestra de tejido se obtuvo 3 secciones procesadas con cada anticuerpo. El análisis de las imágenes fue hecho por 3 observadores independientes, expertos en la organización celular de la corteza cerebral y en la apariencia de la marcación normal de los anticuerpos Anti-NeuN, Anti-parvalbúmina, Anti-calbindina y Anti-calretinina. Los límites entre las láminas

corticales fueron establecidos de acuerdo con las densidades y formas celulares propias de cada lámina (Barbas & Pandya, 1989; Gittins & Harrison, 2004), observadas en las secciones marcadas con Anti-NeuN y estos límites se superponían en las secciones consecutivas marcadas con los otros tres anticuerpos.

2.2.5 Conteos celulares y análisis de datos

Teniendo en cuenta el hallazgo del estudio previo sobre la heterogeneidad de la respuesta del tejido a la contusión, observado en la marcación de NeuN y MAP2 (ver capítulo 1 o remitirse a la siguiente referencia) (Escobar et al., 2008), en el presente trabajo decidimos realizar observaciones independientes (para cada anticuerpo contra: PV, CB y CR) a dos tipos de sectores: aquellos con aparente citoarquitectura conservada y aquellos con “parches” de pérdida de la IR para NeuN. Se cuantificaron las células positivas para cada proteína que liga calcio en cada lámina cortical, tanto en las muestras post-mortem como en las muestras contusas, para luego hacer comparaciones entre los tipos de muestras, entre las láminas corticales y entre las subpoblaciones de interneuronas. En las imágenes a 10x fusionadas y marcadas con cada anticuerpo, se realizó el siguiente procedimiento:

- A. Distinguir un sector con citoarquitectura conservada de otro con parche, para seleccionar solo los primeros para conteo celular. En las zonas de parche, dada la obvia disminución de la densidad celular, no se le realizaron análisis cuantitativos.
- B. Identificación de los límites entre las láminas corticales (usando imágenes consecutivas superpuestas de NeuN) con los criterios previamente establecidos por miembros del grupo de investigación (Buriticá & Pimienta, 2007; Fajardo et al., 2008).

- C. Ubicación de una caja de conteo, de 300 μm de ancho y 100 μm (medidas en el sentido tangencial del corte histológico) de profundidad en el centro de cada lámina cortical.
- D. Contar las células (somas completos) positivas dentro de la caja de conteo.
- E. Contar las células inmunorreactivas en toda una columna cortical de 100 μm de ancho, desde la lámina I hasta el límite con la sustancia blanca.

Estos conteos y el cálculo de las respectivas densidades (utilizando el área de la caja de conteo), se realizaron con la asistencia del programa Sigma ScanPro 5® (SPSS, Chicago, Illinois, USA). También se calculó el número de neuronas positivas de las capas supragranulares y de las infragranulares, sumando los valores ya obtenidos de las láminas II y III para las primeras, y de las láminas V y VI para las segundas.

Los conteos de neuronas PV-, CB- y CR-positivas en cada lámina cortical son presentados con la media y la desviación estándar entre muestras control y muestras con TCE. Para establecer si habían diferencias entre láminas corticales homólogas, entre grupos de capas y entre las muestras control y con TCE, comparamos las medias de los conteos en cada lámina usando la prueba *t-student* de una cola, con un nivel de significancia de $p < 0,05$. El análisis estadístico de los datos se llevó a cabo con la asistencia del programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, Ca, USA).

2.3 Resultados

Las muestras de tejido control marcadas para NeuN, nos permitieron identificar la población neuronal global, los límites entre las láminas corticales claramente delineados (ver Figura 5A) y con células de soma bien definido, núcleo oscuro y el

citoplasma un poco más tenue (ver Figura 6). En las muestras contusas, las áreas con preservación de la laminaridad (ver Figura 5B) mostraron *background* uniforme con células NeuN-positivas visibles, pero con menor marcación nuclear y citoplasma más oscuro. Los bordes de las células aparecen interrumpidos en muchos casos y los procesos no son visibles en toda su extensión. Estas neuronas estaban homogéneamente distribuidas, con una ligera tendencia a aparecer con mayor frecuencia en las capas supragranulares (ver Figura 6). Las áreas sin preservación de la citoarquitectura (sectores de parche), mostraron tanto sectores con disminución de la intensidad de la marcación como sectores con pérdida significativa de la NeuN-IR, particularmente en la transición entre las láminas II y III (ver Figuras 5C-D y 6). La IR para GFAP, PV, CB y CR también fue analizada cualitativamente en los dos tipos de sectores, pero los análisis cuantitativos se llevaron a cabo solo en las áreas de citoarquitectura conservada para las proteínas que ligan calcio. La distribución laminar de las células positivas para las CaBPs vista en las muestras control post-mortem fue similar a la descrita por otros investigadores (DeFelipe, 1997; Hof et al., 1995; Tooney & Chahl, 2004).

2.3.1 Expresión de GFAP

En las muestras post-mortem se observaron muy pocas células GFAP-positivas (ver Figura 6). Ocasionalmente, algunos somas mostraron abundantes procesos, pero delgados y asociados a vasos sanguíneos, o en la transición entre la sustancia gris cortical y la sustancia blanca subcortical. En la lámina I, se apreciaron muchos procesos con múltiples varicosidades adosados a la capa limitante de la membrana pial.

En general, las muestras con contusión mostraron un incremento de la IR para GFAP, y los cuerpos celulares eran más grandes y con procesos más vigorosos (ver Figura 6). La lámina I y la sustancia blanca subcortical exhibieron la más alta densidad de procesos en el tejido, con algunos somas hipertróficos en esta última.

Algunos de estos procesos se bifurcaban, con una rama perpendicular a los vasos sanguíneos y otra hacia la cresta del giro o circunvolución.

Aquellos sectores con citoarquitectura conservada tenían procesos hiperreactivos un poco más delgados en la lámina I y sin las varicosidades que presentaban los astrocitos del tejido control. Adicionalmente, nosotros observamos un incremento en los astrocitos hipertróficos asociados a los vasos, especialmente en los sectores circundantes a la zona de parche de pérdida de la IR de NeuN, así como en la transición entre la sustancia gris y la blanca.

Los sectores alrededor de las micro-hemorragias (coincidentes con zonas de parche vistas con NeuN) mostraron cavitaciones con algunas zonas pálidas, desprovistas de somas y/o procesos, y en los sectores vecinos a estos se observaron astrocitos GFAP-positivos de soma pequeño y sin procesos, así como algunas células hipertróficas alrededor de los vasos sanguíneos (ver figura 6). En estos sectores, también estaban disminuidos los procesos celulares de la lámina I. Cuando los parches estaban localizados en las capas infragranulares, los astrocitos hipertróficos que normalmente abundan en la transición entre la sustancia gris y la blanca, ahora no aparecen.

2.3.2 Expresión de PV

En las muestras control, la IR para PV estuvo presente desde la lámina II hasta la lámina VI (ver Figura 7). Las neuronas incluyeron somas con formas irregulares y tendientes a ser esféricas, multipolares y 3 o 4 procesos primarios distribuidos radialmente. Algunas células de soma grande también se observaron. Estos tipos de neuronas corresponderían a las células en cesta y en candelabro (DeFelipe, 1997; González-Albo, Elston, & DeFelipe, 2001; Yasuo Kawaguchi & Kubota, 1997). En las láminas V y VI, la IR para PV fue escasa, manifiesta en celulares con formas predominantemente ovoides y sus procesos distribuidos verticalmente (ver Figura 6).

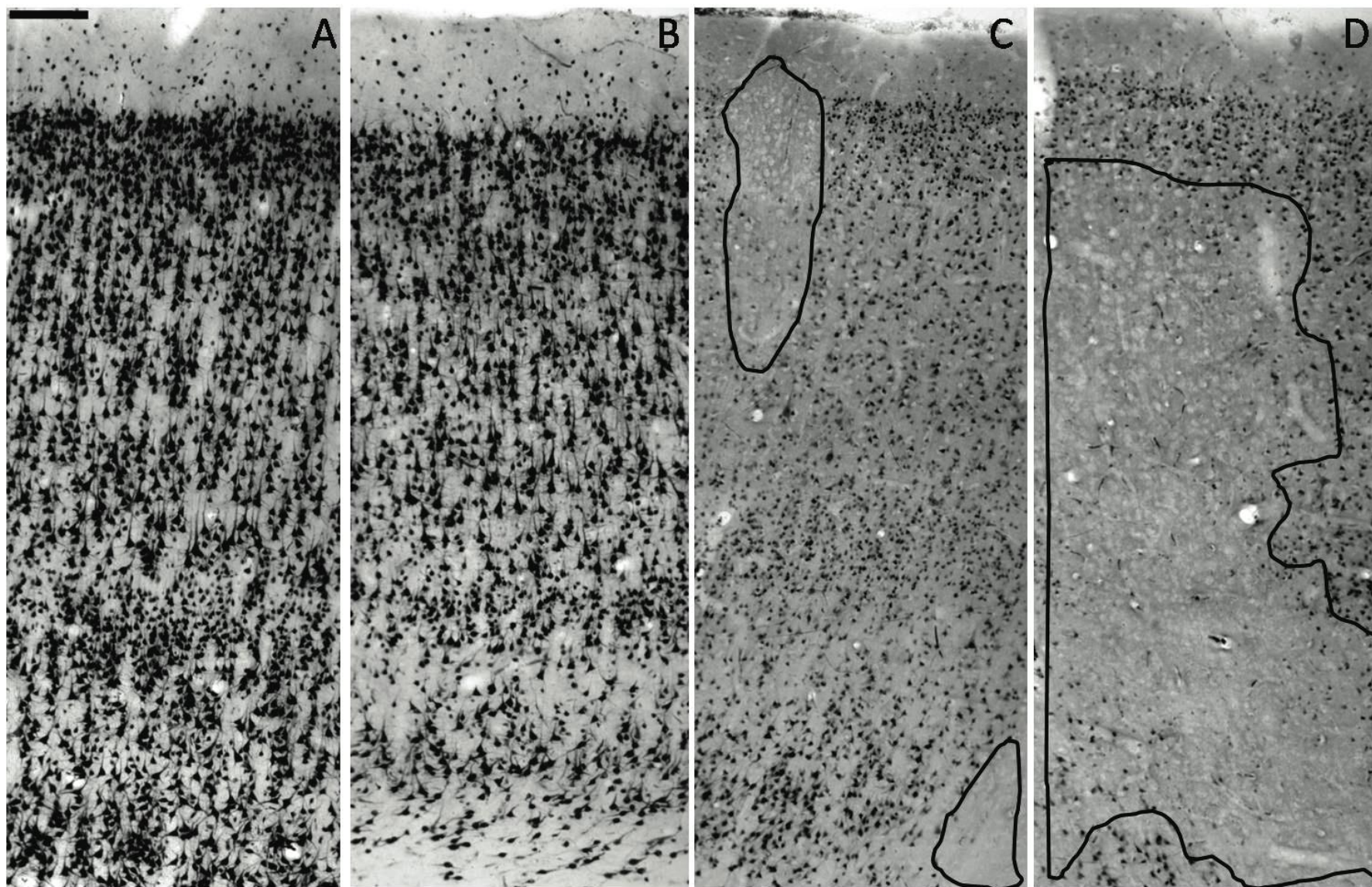


Figura 5. Variaciones en la expresión de NeuN después del TCE en humanos.

Figura 5. Variaciones en la expresión de NeuN después del TCE en humanos.

A, corresponde a una imagen del tejido control post-mortem. B, C y D corresponden a imágenes el tejido contuso. B, es una imagen del sector contuso pero con preservación de la citoarquitectura. C, es una imagen del sector contuso con un parche de pérdida de la IR para NeuN en las capas supragranulares. D, es una imagen del sector contuso con un parche de pérdida de la IR para NeuN en las capas supra- e infragranulares. La barra = 200 μ m.

En las muestras de contusión con preservación de la citoarquitectura, la IR para PV estaba presente igualmente entre las láminas II y VI, pero con una disminución en el número de neuronas positivas, especialmente en la lámina III (ver Figura 7). Los somas de las células tenían forma ovoide principalmente, con un tamaño ligeramente menor en comparación con los de los controles. La IR en los procesos primarios de las neuronas de la lámina III, estaba notablemente disminuida. Cuando era posible ver los procesos, estos aparecían cortos, discontinuos y con abultamientos (ver Figura 8). El neuropilo, que era claramente visible en las muestras control entre las láminas III y IV y entre las láminas I y II, estaba ausente en las muestras contusas (ver Figura 7).

Los sectores contusos sin preservación de la citoarquitectura, mostraron parches de pérdida de la IR para PV, principalmente ubicados en las capas supragranulares (ver Figura 7). Las neuronas de estos sectores exhibían una IR irregular, entre prácticamente ausente hasta moderada, con somas pequeños y sin procesos. Cuando los procesos eran visibles, aparecían dilatados y con abultamientos (ver Figuras 6 y 8). Los procesos de orientación vertical observados normalmente en la lámina I, que tienen origen en las láminas II y III, estaban también notablemente disminuidos en densidad (ver Figura 7), al igual que los procesos de orientación tangencial de esta lámina.

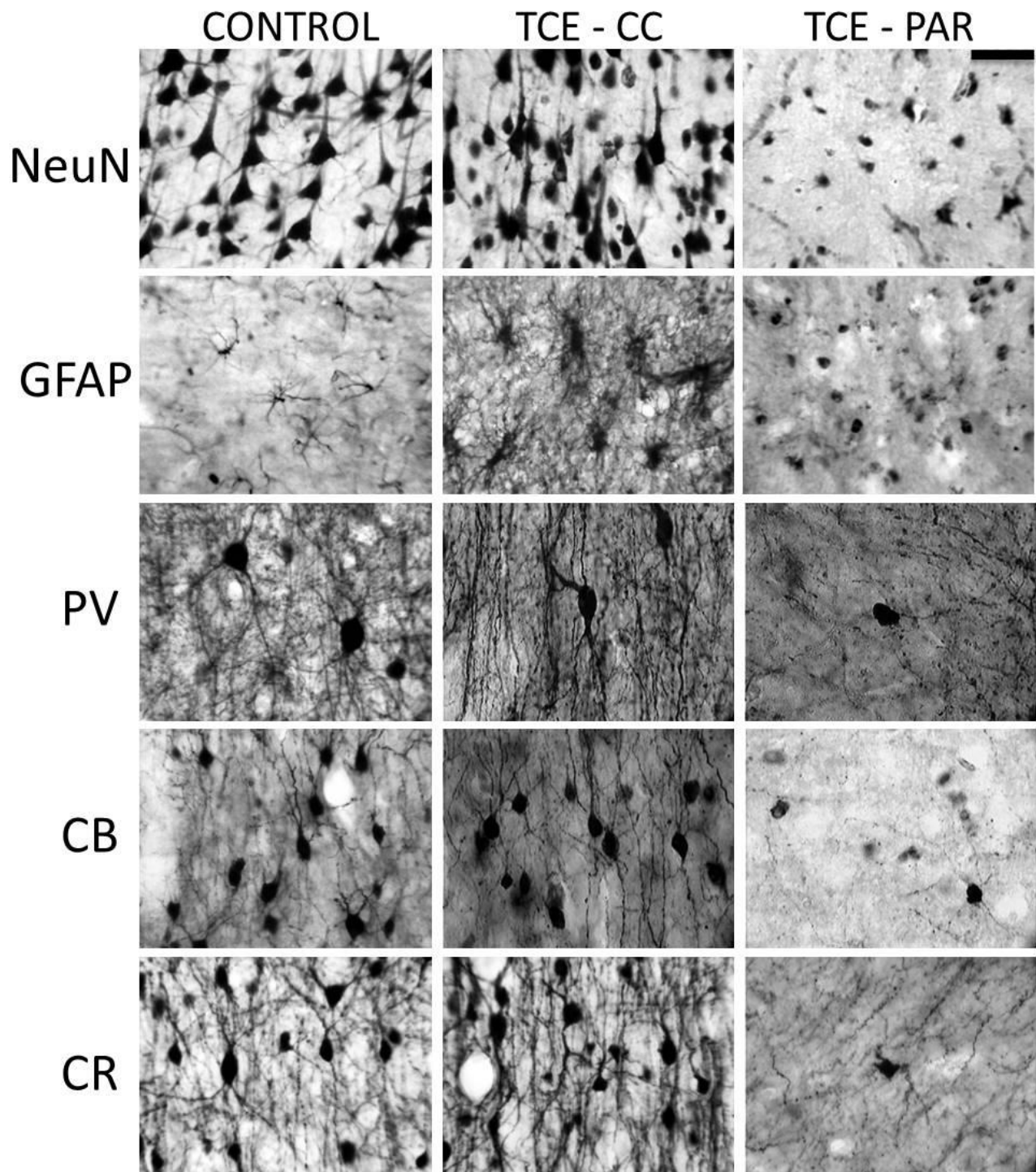


Figura 6. Cambios en la expresión de PV, CB, CR y GFAP después del TCE en humanos.

Las imágenes de la columna de lado izquierdo corresponden al tejido control post-mortem (CONTROL), las de la columna del centro a tejido contuso en sectores de citoarquitectura conservada (TCE-CC) y las de la columna del lado derecho a tejido contuso en sectores de parche de pérdida de la IR (TCE-PAR). La barra = 50 μ m.

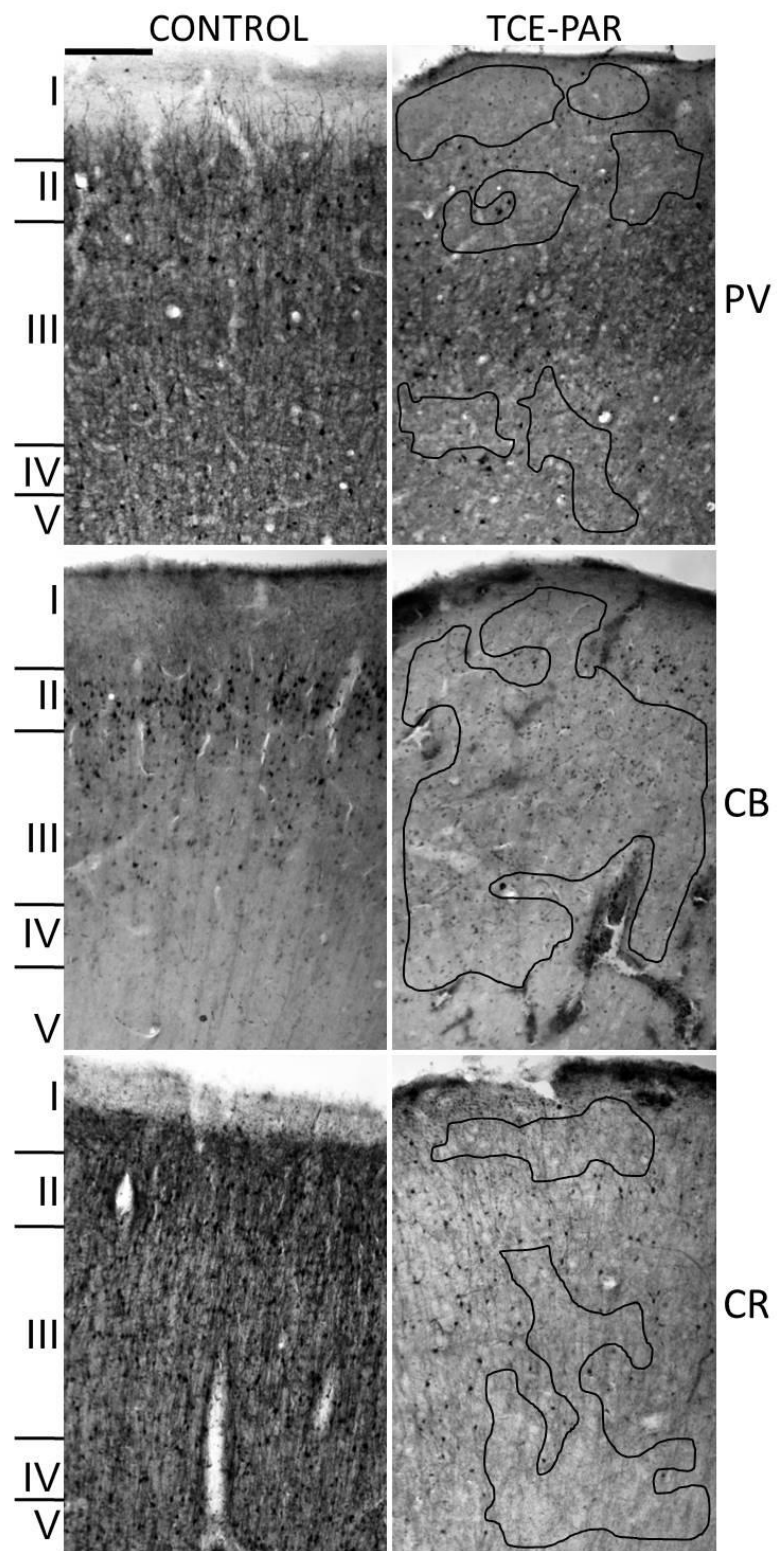


Figura 7. Parches de pérdida masiva de la IR de PV, CB y CR en tejido contuso de humano.

Figura 7. Parches de pérdida masiva de la IR de PV, CB y CR en tejido contuso de humano.

Las imágenes de la columna de lado izquierdo corresponden al tejido control post-mortem (CONTROL) y las de la columna del lado derecho a tejido contuso en sectores de parche de pérdida de la IR (TCE-PAR). Todas las imágenes son composiciones de múltiples micro-fotografías de baja magnificación. La barra = 100 μ m.

Cuando se compararon la cantidad de somas entre láminas homólogas de las muestras control y las contusas (en sectores de preservación laminar), no encontramos diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de neuronas PV-positivas en las láminas I, III, IV, V y VI. Solo la lámina II presentó menor cantidad de somas PV-positivos ($p < 0,05$) (ver Figura 9). Al comparar la población total de neuronas PV-positivas de una columna cortical completa, no encontramos diferencias entre muestras control y con TCE. Cuando comparamos las neuronas de las capas supragranulares e infragranulares, entre las muestras control y con trauma, tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas.

2.3.3 Expresión de CB

En las muestras post-mortem, las neuronas CB-positivas estaban presentes entre las láminas II y VI, pero densamente agrupadas en las láminas II y III, con procesos que constituían una banda densa de neuropilo intensamente marcado (ver Figura 7); ocasionalmente células Horizontales de Cajal Retzius fueron vistas en la lámina I, con su soma ovoide y sus procesos orientados paralelos a la superficie pial. Las células CB-positivas se caracterizan por tener soma entre ovoide y esférico y sus procesos orientados verticalmente (tanto ascendentes como descendentes); su morfología corresponde a las neuronas bipolares, doble buquet o bipenachadas (ver Figuras 6 y 8). Algunas neuronas multipolares (células en cesta) y células doble buquet presentan sus procesos primarios originándose en el soma de forma radial. Esporádicamente, algunas células neurogliaformes fueron identificadas (Condé, Lund, Jacobowitz, Baimbridge, & Lewis, 1994; Hof et

al., 1999). El anticuerpo utilizado para marcar la CB, también permitió identificar unas pocas neuronas piramidales, ubicadas en la parte profunda de la lámina III de tamaño mediano, y otras en la lámina V un poco más grandes (Condé et al., 1994); todas de marcación tenue.

En las nuestras con TCE, los sectores de conservación de la citoarquitectura mostraron un incremento de la cantidad de neuronas piramidales CB-positivas en la lámina III y de formas no-piramidales en la transición entre la lámina VI y la sustancia blanca. Ocasionalmente, también se observaron astrocitos CB-positivos en las capas infragranulares.

Los sectores con parches mostraron un decremento notable de la inmunorreactividad para CB (ver Figuras 6 y 7), especialmente entre las láminas II y IV. Cuando aparecían somas CB-positivos en estas láminas, fueron observados en la parte superficial de la lámina III, y principalmente correspondían a células no-piramidales (ver Figuras 6 y 8). Las láminas infragranulares mostraron un leve incremento de somas inmunorreactivos para CB.

La cantidad de neuronas CB-positivas en las láminas I, II, IV y VI en las muestras control vs las muestras con TCE (en los sectores de citoarquitectura preservada), no mostraron diferencias estadísticamente significativas. La cantidad total de somas con IR para CB en una columna cortical completa fue mayor en las muestras con TCE ($p < 0,05$). Las láminas III y V mostraron mayor cantidad de neuronas CB-positivas en las muestras contusas ($p < 0,01$) (ver Figura 9). Adicionalmente, las capas infragranulares (V-VI) presentaron más neuronas de este tipo en las muestras con TCE que sus homólogas en las muestras post-mortem ($p < 0,05$). Las capas supragranulares no mostraron variaciones en la cantidad de células CB-positivas entre los dos tipos de muestras.

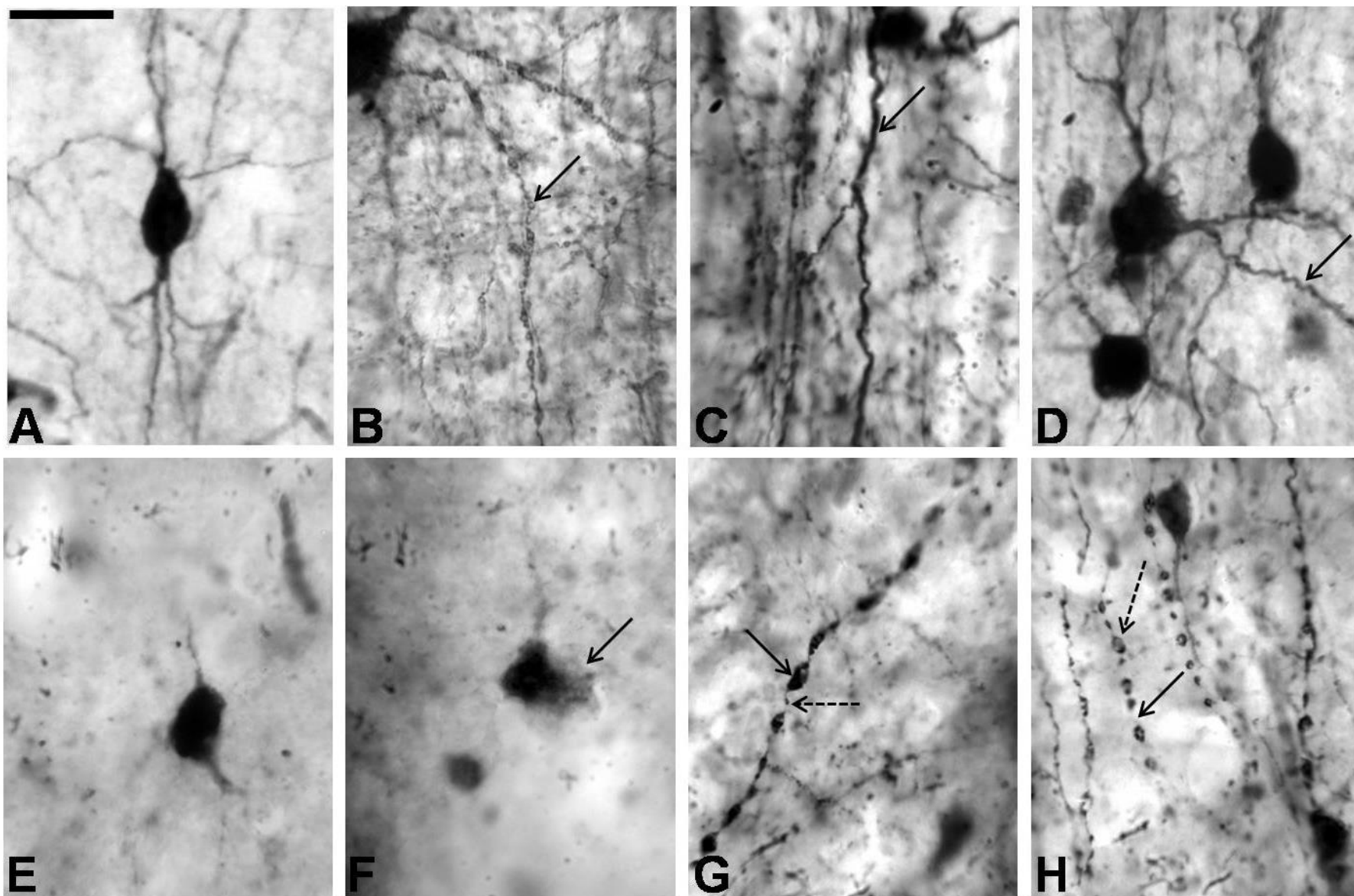


Figura 8. Detalles morfológicos de alteraciones celulares de las interneuronas corticales en tejido contuso humano.

Figura 8. Detalles morfológicos de alteraciones celulares de las interneuronas corticales en tejido contuso humano.

A-C, corresponden a imágenes de tejido control post-mortem. D-H, corresponden a imágenes de tejido contuso de humano. A, es la imagen de una célula Doble buquet CB-positiva con una marcación compacta y uniforme del soma y de sus procesos. B, es la imagen de procesos varicosos y delgados de una célula PV-positiva, con marcación continua. C, es la imagen de procesos CR-positivos con marcación intensa e ininterrumpida. D, es una imagen de una célula CB-positiva con sus procesos entorchados. E y F, son imágenes de neuronas CB-positivas localizadas en las zonas de parche, con pérdida de la marcación de sus procesos y de los límites celulares (flecha en F). G, es una imagen de procesos CR-positivos delgados (flecha punteada), pero con sectores que exhiben dilataciones (flecha continua). H, es una imagen de procesos CR-positivos que se observan discontinuos (flecha continua) y con varicosidades (flecha punteada). La barra = 20 μ m.

2.3.4 Expresión de CR

Las neuronas inmunorreactivas para CR en las muestras de tejido control se encontraron desde la lámina I hasta la lámina VI, y sus somas poseen frecuentemente formas bipolares, bipenachadas y en menor cantidad, esféricas multipolares (ver Figuras 6 y 7). La mayor densidad de estas células se encontró en las láminas I-III, principalmente en la transición entre II y III; al igual que la mayor cantidad de neuropilo. Aquellos somas ubicados en las partes media y profunda de la lámina III estaban intensamente marcados (ver Figura 7). Las láminas infragranulares también presentaron somas CR-positivas pero en menor cantidad que las supragranulares.

Los sectores con preservación laminar en el tejido contuso, también mostraron neuronas CR-positivas en todas las láminas corticales, con un ligero incremento en la intensidad de la IR en las capas supragranulares, particularmente en la lámina II (ver Figura 6). Los somas también tenían formas ovoides pero de menor tamaño que en las muestras control, con bordes irregulares y dilataciones en sus procesos (ver Figuras 6 y 8).

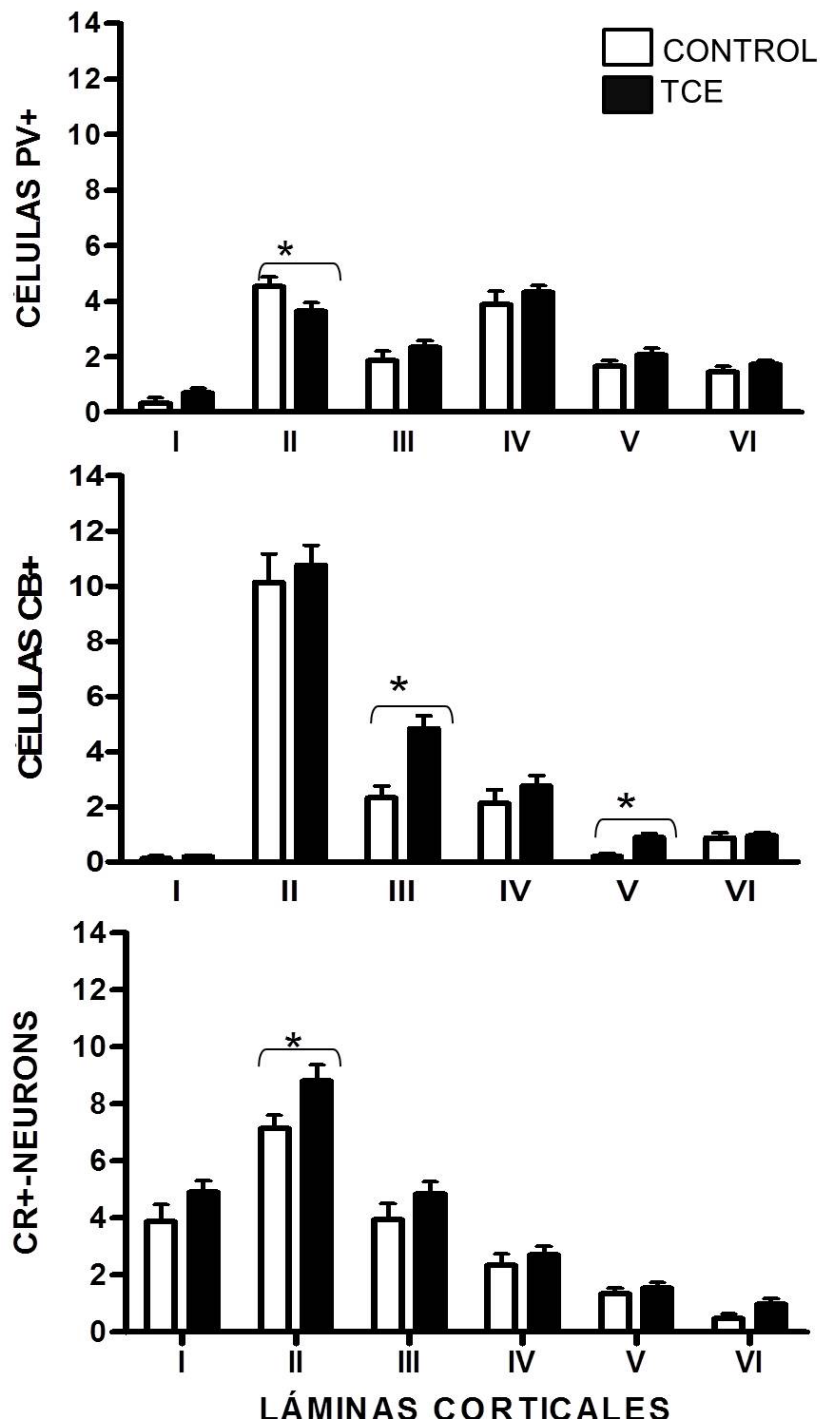


Figura 9. Cuantificación de las neuronas PV-, CB-, y CR-positivas en las láminas corticales de tejido humano control post-mortem y con TCE severo.

Las zonas cuantificadas en el tejido contuso corresponden a aquellos que preservaban su organización laminar. Los conteos fueron hechos en cajas de 300x100 μm , ubicadas en el centro de cada lámina cortical. Los asteriscos indican aquellas comparaciones donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$ para PV y CR; $p < 0,01$ para CB).

Los sectores con pérdida de la citoarquitectura, mostraron una notable disminución de la IR, especialmente entre las láminas II y IV (ver Figuras 6 y 7). Alrededor de los parches, se observó un incremento en la cantidad de somas CR-positivos con algunos de sus procesos dilatados (ver Figura 8). Los somas mantuvieron su morfología ovoide o fusiforme y escasos procesos en orientación vertical. Cualitativamente, la mayor pérdida de neuronas CR-positivas se apreció en las láminas III (en la parte media y profunda) y IV (ver Figura 7).

Aunque los conteos celulares mostraron tendencias a una mayor cantidad de somas CR-positivos en todas las láminas corticales de las muestras con TCE comparadas con sus homólogas de las muestras control, sólo la lámina II mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) (ver Figura 9). El número total de neuronas inmunorreactivas para CR en una columna cortical también fue mayor en las muestras contusas ($p < 0,05$), diferencia que fue aportada por las capas supragranulares. Las capas infragranulares mantuvieron constantes sus cantidades de somas CR-positivos entre los dos tipos de muestras analizadas.

2.4 Discusión

En el presente estudio identificamos claramente que el TCE severo, en su fase aguda y subaguda en el humano, tiene un efecto deletéreo sobre el patrón de expresión de las CaBPs. Este efecto no es tisularmente homogéneo a lo largo de las secciones de tejido contuso, y presenta una estructura similar a la encontrada en la marcación para NeuN. Además, estos cambios en la expresión de las CaBPs implican una alteración generalizada de las neuronas inhibitorias de la corteza cerebral, siendo específicos para cada subpoblación de interneuronas identificadas con cada CaBP.

El patrón de expresión de las CaBPs fue heterogéneo en las muestras contusas. Algunas zonas estaban desprovistas completamente de la IR (zonas de parche, como aquellos vistos en NeuN), rodeadas de otras con IR leve y menor cantidad de neuropilo y de somas para PV, y un ligero incremento en la cantidad de somas CB- y CR-positivos. Adyacente a estas últimas zonas, encontramos sectores con un patrón de expresión similar al de los especímenes post-mortem, pero con somas celulares de menor tamaño y procesos cortos y fragmentados.

Dado que nuestros cortes eran consecutivos, logramos superponer tejido marcado para NeuN y para las CaBPs y verificar la coincidencia de los parches de pérdida total de la IR para NeuN y para las CaBPs. Por lo tanto, en mismo sector del tejido contuso encontramos pérdida de la IR para NeuN, MAP2 (ver capítulo 1 y (Escobar et al., 2008), CB, CR y PV, lo cual refuerza la idea acerca de que esta pérdida de la IR podría significar una pérdida celular como lo han sugerido otros autores (Collombet et al., 2006; Robertson et al., 2006; Swartz et al., 2006), al menos para este tipo de eventos patológicos, con esta intensidad y periodo de tiempo analizados.

Las zonas con citoarquitectura conservada en el tejido contuso mostraron en la marcación para NeuN una leve disminución en la intensidad de la IR, pero la organización laminar se preservaba. En estos mismos sectores, pero marcados para PV, se observó una reducción significativa de la cantidad de somas en la lámina II, y una ligera tendencia (no significativa) al incremento en las demás láminas. Las neuronas CB-positivas se incrementaron significativamente en las láminas III y V; y las CR-positivas en la lámina II, con una tendencia no significativa en el mismo sentido en las demás láminas corticales. Por lo tanto, la respuesta a la lesión traumática, en el tejido contuso, de la expresión de las CaBPs es diferente entre ellas y además, es específico para cada lámina cortical.

Cambios significativos en la expresión de la IR para PV en la corteza cerebral, han sido reportados en modelos experimentales de deafferentación o privación

sensorial (Barbado et al., 2002), y después de isquemia cerebral (Medina, Cairasco, & Escobar, 2008). Disminuciones en la cantidad de neuronas o de los procesos PV-positivos se han reportado en varias patologías tales como epilepsia del lóbulo temporal (DeFelipe, 1999; Marco et al., 1996), esquizofrenia y trastorno afectivo bipolar (Beasley & Reynolds, 1997; Pantazopoulos, Lange, Baldessarini, & Berretta, 2007; Sakai et al., 2008), y en la enfermedad de Alzheimer (Fonseca, Soriano, Ferrer, Martinez, & Tuñon, 1993). Las neuronas PV-positivas corresponde a las células en cesta y en candelabro (DeFelipe, 1989; Y Kawaguchi & Kubota, 1998; Zaitsev et al., 2005); estas en los primates predominan en las capas supragranulares o en las intermedias (láminas II, III y IV) (Hof et al., 1999). Respectivamente, los axones de las células en cesta y en candelabro hacen sinapsis sobre el soma y el segmento inicial del axón de las neuronas piramidales, exhiben el mayor poder inhibitorio en la corteza cerebral y sus axones en disposición tangencial les permiten sincronizar la actividad de grupos de piramidales y hacer selectiva la activación de minicolumnas o columnas corticales contiguas. Estas neuronas reciben aferencias GABAérgicas de otras interneuronas corticales y aferencias glutamatérgicas de neuronas piramidales vecinas y del tálamo (Defelipe, González-Albo, Del Río, & Elston, 1999).

Dadas las anteriores características de las neuronas PV-positivas, la pérdida de las mismas tal como es reportado en zonas de parche en el presente estudio, podría significar una disminución de las aferencias inhibitorias a los sectores de citoarquitectura preservada, generando un desbalance a favor de la excitabilidad del tejido. Hasta el momento, se desconoce el destino final de las células PV-positivas ubicadas en las zonas preservadas de la contusión *in situ* o *ex vivo*, cuyos axones no alcanzan sus respectivos blancos. Nosotros también describimos una pérdida de los procesos tangenciales que discurren en la lámina I y entre las láminas II y III, lo que refuerza nuestra idea de una posible alteración del control inhibitorio de columnas corticales adyacentes. Futuros estudios en este campo, deberían dirigirse a establecer el destino de estas células así como del efecto de su alteración en el mantenimiento de un balance entre excitación e inhibición.

Los incrementos en la expresión de neuronas CB-positivas ya han sido reportados en modelos experimentales de isquemia (Yenari et al., 2001) y deaferentación (Barbado et al., 2002); así como en tejido humano de esquizofrénicos (Daviss & Lewis, 1995). Las células CB-positivas corresponden morfológicamente a las células bipolares, las células doble buquet, las neurogliaformes y a las células de Martinotti, y aunque presentes en todas las láminas corticales, en la neocorteza de los primates, predomina en las láminas II y III (Hof et al., 1999; Yasuo Kawaguchi & Kubota, 1997; Río & DeFelipe, 1997a; Zaitsev et al., 2005). En los primates, algunas células piramidales expresan CB (Hof et al., 1999). Los axones de las interneuronas CB-positivas se orientan verticalmente, restringiéndose a realizar contactos sinápticos sobre dendritas de otras interneuronas o de células piramidales dentro de la misma minicolumna donde se ubica su soma, pero a través de varias láminas corticales (Hof et al., 1999; Yasuo Kawaguchi & Kubota, 1997; Markram et al., 2004). Sus aferencias excitatorias provienen del tálamo, de neuronas piramidales de minicolumnas adyacentes o distantes, y sus aferencias inhibitorias de otras interneuronas corticales, principalmente otras células doble buquet (Defelipe et al., 1999; DeFelipe, 1989; Y Kawaguchi & Kubota, 1998; Río & DeFelipe, 1997a).

Contrario a las neuronas PV-positivas, con axones que discurren horizontalmente que se dirigen a sectores con diferentes grados de compromiso por la lesión, las interneuronas CB-positivas posee procesos dendríticos y axonales cuya disposición se restringe a la misma minicolumna donde se ubica su soma, lo cual podría generar que resulten menos afectadas por las alteraciones que ocurren en sectores adyacentes. No obstante, los incrementos en el número de células CB-positivas en zonas de citoarquitectura preservadas que observamos en el presente estudio son difíciles de explicar. Lo más probable es que estas células adicionales no sean células *de novo*, producto de la proliferación de células madre, sino que otras interneuronas que en condiciones fisiológicas no expresaban la CB, ahora como parte de su respuesta a la condición nueva patológica, empiezan a

expresarla; quizá en un intento por compensar la pérdida de la actividad en el grupo de las PV-positivas.

Los incrementos en la cantidad de somas que expresan CR han sido documentados en modelos experimentales de enucleación de los colículos superiores con incrementos ipsilaterales pero decrementos contralaterales (Kang, Park, Lim, Kim, & Jeon, 2002); así como en la enfermedad de Huntington (Cicchetti, Prensa, Wu, & Parent, 2000), la enfermedad de Alzheimer (Hof, Nimchinsky, Celio, Bouras, & Morrison, 1993), en epilepsia del lóbulo temporal (Blumcke et al., 1996), en hipoxia neonatal (Z. Yang, You, & Levison, 2008), y en tejido post-mortem de individuos con trastorno afectivo bipolar (Sakai et al., 2008). Las neuronas CR-positivas son las más abundantes entre las tres subpoblaciones de interneuronas que expresan las CaBPs, distribuidos en todas las láminas corticales, pero de preferencia en las láminas II y III; sus somas son frecuentemente ovoides, con procesos en orientación vertical (distribuidos de forma similar al de las neuronas CB-positivas) cuya extensión les permite atravesar varias láminas corticales. La tendencia a incrementarse el número de estas neuronas en todas las láminas después del TCE, fuera de las zonas de parche, puede indicar un mayor nivel de tolerancia a la lesión y al microambiente adverso que le rodea. De hecho, hay mayor número de reportes y de tipo de eventos neuropatológicos en los cuales se incrementa su expresión, comparado con aquellos en los cuales se reporta una disminución, o comparado con lo que ocurre con las otras dos CaBPs. De acuerdo con otros autores (Rüttimann et al., 2004), los incrementos en el número de neuronas que expresan la CR pueden indicar un mecanismo protector contra la deaferentación; tipo de lesión ésta a la que estarían expuestas todas las neuronas corticales después de un TCE a través de varias modalidades: lesión en la sustancia blanca por aceleración/desaceleración durante el trauma, lesiones en la sustancia blanca por la formación de micro-hemorragias, y la deaferentación desde las neuronas afectadas en las zonas de parche.

Además de analizar la expresión de las CaBPs en el tejido contuso, durante este estudio también se observó el comportamiento de los astrocitos a través de la expresión de la GFAP. En el tejido control, la expresión de GFAP es más bien escasa; se observan muchos procesos de orientación vertical en la lámina I, y algunos somas pálidos en la sustancia blanca con procesos cortos y delgados, y entre las láminas II y VI prácticamente la marcación parece nula (ver Figura 6). Después del TCE, encontramos que la respuesta astrocítica era diferente en cada sector del tejido contuso dependiendo del grado de lesión del mismo, al igual que con los demás marcadores aquí analizados. Los procesos en la lámina I (aquellos asociados a la membrana pial) se hicieron más vigorosos y de inmunorreactividad intensa en todos los sectores, excepto en aquellos en que el parche se ubicaba sobre esa lámina. Esto ocurrido en la lámina I, también se observó en la sustancia blanca subcortical, donde la reactividad glial fue generalizada, tanto debajo de sectores de citoarquitectura conservada como de sectores con parches. Se observó una abundante reactividad glial alrededor de las zonas de parche, especialmente, cuando estas se ubicaban en las capas supragranulares. Dicha reactividad se expresaba en mayor cantidad en los somas de los astrocitos y en sus procesos hipertrofiados, con o sin asociación a vasos sanguíneos (ver Figura 6). En los sectores de parche propiamente, era común encontrar ausencia de somas y procesos o en ocasiones unos pocos somas pequeños sin proceso alguno (ver Figura 6). En los sectores con preservación de la citoarquitectura, “lejos” de las zonas de parche, los astrocitos mostraron muy poca reactividad, es decir, se encontraban muy pocos astrocitos hipertróficos de manera aislada.

El aumento de la IR para GFAP en los astrocitos de tejido contuso de humano, ya había sido reportado por otros estudios (Dressler et al., 2007; Hausmann et al., 2000; D.-R. Li et al., 2012; R. Li, Fujitani, Jia, & Kimura, 1998). El incremento de estos exclusivamente en las zonas focales (en nuestro caso, alrededor de los parches) también ha sido reportada por otros autores (Hausmann et al., 2000), en tejido post-mortem a diferentes tiempos entre el TCE y el deceso. En dicho estudio se estableció que el momento de mayor sobre-expresión de la GFAP ocurre entre

las 24 horas y los 9 días después de la lesión, aspecto que coincide con nuestras muestras cuyo tiempo post-lesión fue de 2 a 4 días. Lo otro interesante de éste estudio, es que teniendo acceso a tejido pericontuso (en términos macroscópicos), encontraron que la expresión en esos sectores era prácticamente igual a la del tejido sano; lo que no ocurrió en nuestro caso en los sectores de citoarquitectura conservada, en donde la reactividad glial se apreció generalizada en la lámina I y en la sustancia blanca subcortical.

La observación de ausencia de astrocitos GFAP-positivos dentro de los mismos parches refuerza nuestra interpretación sobre que en estos sectores ocurren procesos necróticos que afectan a todos los tipos celulares, incluyendo a los astrocitos; sin embargo, la cantidad de astrocitos que finalmente morirán será menor que la de neuronas, aún en sectores focales de la lesión, como se estableció recientemente (Dressler et al., 2007). Por otro lado, el incremento de la expresión de GFAP puede resultar de la disociación de los paquetes de filamentos intermedios a causa del edema o por un incremento en la síntesis de la proteína (Eng & Ghirnikar, 1994) sin división celular (Calvo, Carbonell, & Boya, 1991), aunque ya se ha demostrado que los astrocitos de la lámina I de la corteza cerebral pueden realizar división celular después del trauma (Takamiya, Kohsaka, Toya, Otani, & Tsukada, 1988).

Es difícil determinar las implicaciones fisiológicas del incremento de la expresión de GFAP en el tejido contuso de humano, ya que al presente no es claro si el efecto de la reactividad glial sea benéfico o perjudicial para este. Algunos autores han encontrado que la reactividad glial se requiere para la reparación de la barrera hematoencefálica, ayuda a restringir la inflamación, protege a los oligodendrocitos y a las neuronas de las lesiones secundarias, permite el mantenimiento de la mielinización, de la nutrición, del trofismo de las neuronas, promueve el remodelamiento sináptico y de la neurotransmisión, así como regula los niveles extracelulares de glutamato (Bush et al., 1999; Faulkner et al., 2004; L. Li et al., 2008; Liedtke et al., 1996; Otani et al., 2006; Vázquez-Chona et al., 2011); por otro

lado, existe una serie de hallazgos que apuntan al efecto deletéreo de la reactividad glial y la posterior gliosis, como que es uno de los mayores impedimentos de la regeneración axonal por la cicatrización alrededor del foco de la lesión, que los astrocitos pueden invertir la función de recaptura del glutamato cuando la excitotoxicidad sobrepasa su capacidad, lo cual exacerbaría el daño neuronal, que la inhibición de la sobre-expresión de GFAP mejora la plasticidad, entre otros (C. M. Anderson & Swanson, 2000; Eddleston & Mucke, 1993; Pekny & Nilsson, 2005; Pekny, Wilhelmsson, & Pekna, 2014; Ridet, Malhotra, Privat, & Gage, 1997). Por lo tanto, el debate está abierto y la respuesta requerirá de muchos estudios en los cuales se considere entre otros aspectos, la ubicación y la intensidad exacta de los astrocitos que sobre-expresan la GFAP, tal como fue propuesto hace más de una década y que constituyó uno de nuestros propósitos (Malhotra & Shnitka, 2002).

En conclusión, el presente estudio mostró cambios en la expresión de las CaBPs como consecuencia del TCE en humanos. Las CaBPs están involucradas en varios procesos celulares, tales como el amortiguamiento y transporte del calcio, y la regulación de múltiples sistemas de enzimas (Andressen et al., 1993). Los cambios en la expresión de las CaBPs pueden estar sujetas a alteraciones temporales y a los eventos dinámicos que ocurren después del TCE, los cuales pueden afectar el estado metabólico de las glías y de las neuronas. Adicionalmente, el presente trabajo nos permitió sugerir que los cambios en la expresión de las CaBPs pueden estar asociados con alteraciones en la conectividad neuronal después del trauma, las cuales se manifiestan en la variedad de secuelas que presentan los pacientes que le sobreviven. Además, nuestros resultados indican que la población de células GABAérgicas puede contribuir a los eventos secundarios generados después del TCE, tales como los cambios en la plasticidad o incrementos en la actividad excitatoria, y los efectos de estos en la actividad cortical general son actualmente desconocidos.

Capítulo 3

Diversidad neurodegenerativa en las contusiones corticales de humano: Un análisis histológico de tejido derivado de craniectomía decompresiva

3.1 Antecedentes

En los dos primeros capítulos de este documento, hemos mostrado varios hallazgos histológicos importantes en el estudio del tejido contuso extraído por cirugía decompresiva en humanos que han sufrido un TCE severo: 1. El compromiso tisular dentro del tejido contuso no es homogéneo entre poblaciones celulares ni entre subpoblaciones neuronales; 2. En el componente neuronal se aprecian grados de alteración de la citoarquitectura cortical que se intercalan; 3. Estos grados de alteración podrían sugerir porciones microscópicas de tejido con daño irreversible (zonas de parche) y otras con posibilidades de sobrevivencia y recuperación *in situ* (zonas con citoarquitectura conservada); 4. La pérdida total de la inmunorreactividad para NeuN en los sectores de parche (dentro de la contusión) podría significar pérdida neuronal; 5. Aún en los sectores de

citoarquitectura conservada, algunas neuronas se aprecian con alteraciones morfológicas.

A partir de estos hallazgos, surgieron nuevos interrogantes acerca de lo que podría ser el destino final del tejido contuso de continuar *in situ*, ya que el principal propósito del manejo médico en los pacientes que sobreviven al TCE severo es la prevención y la mitigación de la lesión secundaria, la cual puede perpetuarse por meses o incluso años, y ser la responsable de buena parte de las secuelas neurológicas, psiquiátricas y comportamentales. Las medidas básicas que los servicios de neurocirugía han implementado con estos pacientes son el monitoreo complejo y terapia médica avanzada y/o control de la presión intracraneana por evacuación de la lesión que genera el efecto de masa a través de la cirugía decompresiva (Chieriegato & Fainardi, 2008). La pregunta de fondo es: ¿Es viable el tejido contuso extraído quirúrgicamente? Hasta el momento hemos corroborado que definitivamente algunos sectores (identificados microscópicamente) no podrían serlo, pero ¿cuáles son las consecuencias para aquellos sectores con organización laminar “preservada”, de continuar en ese escenario adverso que propone el tejido que definitivamente no es viable? ¿Es realmente viable el tejido identificado como “con citoarquitectura conservada”?

Los estudios sobre los accidentes cerebrovasculares como la isquemia cerebral, han sido los que tradicionalmente procuran identificar el tejido lesionado viable. Es ampliamente reconocido que en la isquemia, es posible identificar una región de foco y otra de penumbra; esta última es considerada como una región morfológicamente preservada y susceptible de recuperación fisiológica (Astrup et al., 1981; Hakim, 1987; Hossmann, 1994). Infortunadamente, en el trauma craneoencefálico este reconocimiento no ha sido posible histológicamente, a pesar de los esfuerzos y de las implicaciones terapéuticas que tendría.

Aunque existe gran cantidad de estudios sobre los cambios histopatológicos en las muestras contusas de humanos (Bullock et al., 1991; Clark et al., 1999; Graham et

al., 2002; Løberg & Torvik, 1989; Oehmichen & Raff, 1980; Ribas & Jane, 1992; Seidberg et al., 2003; L. Zhang et al., 2006; Xiaopeng Zhang et al., 2003), estos son realizados en tejido post-mortem con varios años de sobrevida, con técnicas histológicas convencionales o de ultraestructura, sin contemplar el análisis de la organización estructural del tejido o haciéndolo en periodos crónicos del evento lesivo.

Por lo tanto, en este último capítulo se presenta un análisis del tejido contuso realizado en las mismas muestras empleadas en los dos primeros apartados del documento, haciendo énfasis en el componente neuronal y la valoración del estado de viabilidad o degeneración del mismo, específicamente en los sectores de citoarquitectura conservada identificados previamente.

Para tal propósito, nos hicimos las siguientes preguntas específicas:

- ¿Es la disminución de la IR para NeuN en el tejido contuso de humano, una pérdida de la antigenicidad o una disminución de la proteína propiamente?
- ¿Cuál es la proporción de neuronas, en los sectores de citoarquitectura conservada, que exhiben una apariencia de normalidad en su estructura celular?
- ¿Coinciden los sectores de parche de pérdida de la IR para NeuN con sectores de pérdida celular observados con la tinción de Nissl?
- ¿En qué sectores del tejido contuso se pueden identificar neuronas en proceso de degeneración? ¿Coinciden estos sectores con los de citoarquitectura conservada o con los de parche de pérdida de la IR para NeuN?

Para dar respuesta a las preguntas anteriores, inicialmente calificamos la calidad de la marcación (célula a célula) de las neuronas NeuN-positivas en los sectores de citoarquitectura conservada del tejido contuso y la comparamos con la del tejido post-mortem. También comparamos la ubicación de los parches de la

marcación de NeuN con cortes consecutivos procesados con la tinción de Nissl; cuantificamos la proteína NeuN a través de la técnica de Western Blot; y por último, procesamos tejido contuso con el marcador Fluoro-Jade C, que marca específicamente neuronas en degeneración (Schmued, Albertson, & Jr, 1997) para compararlo con los cortes ya procesados para NeuN. Este último marcador mencionado, ha sido ampliamente utilizado en modelos animales con diferentes tipos de lesión cerebral (K. Anderson et al., 2005; Castro et al., 2011; Collombet et al., 2006; Dennis et al., 2009; Hall et al., 2008; F. Liu et al., 2009; Sato et al., 2001; Singleton & Povlishock, 2004), pero hasta el momento no se ha empleado para valorar neurodegeneración celular en tejido cerebral de humano con TCE.

3.2 Materiales y Métodos

Este estudio también hizo parte del macroproyecto de investigación denominado **“Estudio cualitativo y cuantitativo del trauma craneoencefálico en humanos”**, financiado por Colciencias (Código No. 1106-04-16329). Por esta razón, las muestras de tejido con TCE y las de los controles post-mortem de este apartado corresponden a las del capítulo anterior, conservando los mismos criterios de inclusión y exclusión para ambos grupos de muestras. Los procedimientos para el procesamiento histológico de las muestras en el estudio actual, incluyen aquellos descritos en el primer capítulo 1. Adicionalmente, se describirán algunos hasta ahora no mencionados y en los cuales se hará énfasis.

3.2.1 Los pacientes con TCE y las muestras de tejido contuso

Para responder a las preguntas del presente capítulo, se analizaron muestras de tejido cerebral contuso, provenientes de 12 pacientes (ver Tabla 6) con diagnóstico de contusión cerebral focal y con hipertensión endocraneana severa.

En ningún caso se hizo remoción adicional de tejido cerebral para efectos del presente estudio. Todos los procedimientos para la recolección de las muestras y su posterior análisis, fueron aprobados por los Comités de Ética del Hospital Universitario del Valle y de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle (Acta No. 045, de 2004).

Tabla 6. Características de los pacientes con TCE para el estudio 3

Muestra	Sexo	Edad	GI	GOS	Lóbulo	Hem	TPT	HN
T07	M	22	12	5	Fron	Der	3	HSDA, HP, HSF
T08	M	28	13	5	Fron	Izq	3	BDP, II par
T09	M	30	14	5	Fron	Izq	2	HSF
T10	M	35	10	1	Fron	Izq	3	DAI, II par
T11	M	7	13	5	Temp	Izq	3	AF
T12	M	53	5	1	Temp	Der	1	HSDA, HSF, HU
T13	M	48	13	5	Fron	Izq	4	HSDA
T14	M	42	8	5	Temp	Izq	2	HSDA, HSF, HU, AF, HP, III par
T16	F	72	13	5	Fron	Izq	3	-
T17	M	22	14	5	Temp	Izq	4	HSDA
T18	F	4	11	3	P-O	Der	2	HSDA
T19	F	39	11	3	Temp	Izq	2	HSDA, AF, NH

GI: Glasgow de Ingreso al servicio de urgencias; GOS: Glasgow Outcome Score; Temp: Lóbulo Temporal; Fron: Lóbulo Frontal; P-O: Transición parieto-occipital; Hem: Hemisferio; Der: Derecho; Izq: Izquierdo; TPT: Tiempo entre el trauma y la cirugía (en días); HN: Otros hallazgos neurológicos adicionales a la contusión; HSDA: Hemorragia Subdural Aguda; HSA: Hemorragia Subaracnoidea; HP: Hemiparesia; HU: Herniación Uncal; AF: Afasia; HSF: Herniación Subfalcina; BDP: Bradipsiquia; II par: compromiso del II par craneal; III par: compromiso del III par craneal; NH: Nistagmos Horizontal; DAI: Lesión Axonal Difusa.

3.2.2 Los sujetos control y las muestras de tejido sin TCE

La expresión histológica y la cuantificación de los marcadores de interés en el tejido contuso fueron comparadas con la expresión y cuantificación de los mismos en tejido post-mortem sin TCE. Las muestras control de este apartado fueron las

mismas que se emplearon en capítulo 2 (ver Tabla 5, pág. 41) obtenidas en el Instituto de Medicina Legal y Ciencias Forenses de Cali.

3.2.3 Procesamiento de las muestras

Todos los procedimientos descritos a continuación, se realizaron en condiciones estándar de laboratorio, tanto para las muestras post-mortem como para las muestras contusas. Para mayor detalle del procesamiento, remitirse al apartado 1.2.3 del capítulo 1 de este documento.

En la Tabla 7 se especifica las técnicas a las que fueron sometidas cada una de las muestras con TCE del presente estudio, ya que las limitaciones de tejido en algunas de ellas impidieron someter todas las 12 muestras a todos los procedimientos.

Es de mencionar, que como parte del protocolo de procesamiento de cualquier muestra de tejido cerebral que llega a nuestro laboratorio dentro del macroproyecto, antes de iniciar la fijación en PLP, también se extraían pequeñas muestras (de 27 mm³) y se almacenan a -70° C para posibles análisis bioquímicos como la cuantificación de proteínas por Western Blot; y en el momento de realizar los cortes seriados que se procesarían para inmunohistoquímica, simultáneamente se cortaba una tajada que se incluía en parafina para realizar cortes más delgados y procesarlos con técnicas de histoquímica como la tinción clásica de Nissl y la histofluorescencia de Fluoro-Jade C (FJC). De aquí se obtendrían los cortes que posteriormente serían comparados con aquellos inmunomarcados para NeuN. El protocolo descrito para el registro fotográfico de NeuN en los capítulos anteriores, fue el mismo empleado en el presente estudio para el registro de los cortes con la tinción de Nissl.

Tabla 7. Técnicas aplicadas a cada muestra de tejido contuso

Muestra	NeuN-IHQ	NeuN-Nissl	FJC	WB
T07	X	X	X	
T08	X	X		
T09	X	X	X	X
T10	X	X	X	X
T11				X
T12	X			X
T13	X	X	X	
T14	X	X	X	X
T16	X	X	X	X
T17	X	X	X	X
T18	X	X	X	
T19				X

NeuN-IHQ: muestra sometida al análisis de la calidad de la expresión histológica de NeuN; NeuN-Nissl: muestra procesada por inmunohistoquímica para NeuN y también con la tinción de Nissl; FJC: muestra procesada por histofluorescencia con Fluoro-Jade C; WB: muestra procesada por Western Blot contra NeuN.

La calificación del nivel de expresión de NeuN en las células inmunomarcadas, se llevó a cabo en los cortes histológicos de 10 de las muestras procesadas (ver Tabla 7) para los estudios del primer y segundo capítulo, por lo cual se omitirá la descripción del proceso inmunohistoquímico en este apartado. Este análisis se hizo empleando las imágenes capturadas con los objetivos de 4x, 10x y 40x, mencionadas en los dos capítulos anteriores.

3.2.4 Análisis de la calidad de la expresión histológica de NeuN

Como se mencionó en los capítulos anteriores, en el tejido contuso se encontraron al menos dos tipos de sectores de acuerdo con el grado de compromiso frente a la lesión: las zonas de citoarquitectura conservada y las zonas de parche de pérdida

significativa de la IR para NeuN. No obstante, la medida precisa del área ocupada por cada tipo de sector no había sido determinada hasta ahora. La forma de realizar esta medición fue descrita en el capítulo 1, pero el análisis cuantitativo con las 12 muestras de tejido contuso será presentado en el presente estudio.

Si bien en los sectores de preservación laminar se había observado una aparente o leve diferencia en la densidad celular respecto del tejido control, la corroboración cuantitativa de esta diferencia también estaba pendiente de llevarse a cabo. La cuantificación de las neuronas NeuN-positivas se hizo en cajas de conteo (de 300 μm de ancho x 150 μm de profundidad), ubicadas en la transición entre las láminas II y III y entre las láminas V y VI. En los sectores de parche no se realizaron cuantificaciones celulares por la obvia disminución de la densidad.

La aparente “normalidad” en los sectores de citoarquitectura conservada del tejido contuso, dejaba de serlo al observarse en imágenes de alta magnificación, donde se apreciaron neuronas con patrones diversos en la calidad de la marcación para NeuN, respecto de lo reportado como normal en la literatura (Gittins & Harrison, 2004; Robertson et al., 2006). Con el fin de cuantificar la alteración del patrón de expresión de NeuN en los sectores de citoarquitectura conservada, fue necesario distinguir dos tipos de poblaciones de neuronas marcadas para NeuN: 1. Cualquier soma visto en el mejor plano focal del corte analizado sería denominado “neurona positiva para NeuN” (NeuN+); 2. Cualquier soma que cumpliera con las características del patrón de marcación normal de una neurona con NeuN, se denominaría una “neurona NeuN-positiva normal” (NeuN-N). Dicho patrón normal consistía en una marcación uniforme, fuerte y claramente compartimentalizada, siendo más intensa en el núcleo y un poco más leve en el citoplasma del soma y de las dendritas proximales (según (Robertson et al., 2006). La segunda población representa una subpoblación de la primera, por eso, la proporción de la segunda respecto de la primera, nos daría el porcentaje de células normalmente inmunorreactivas en el tejido. Estas poblaciones fueron contadas de manera

aislada por dos observadores independientes y debidamente entrenados. Los conteos de estas poblaciones se hicieron en las mismas cajas de conteo mencionadas en el párrafo anterior, ubicando una caja por lámina y por cada corte (3 cortes por muestra). Luego se combinaron los conteos de las seis láminas corticales para obtener un número total de neuronas por columna cortical completa. La proporción de neuronas normalmente marcadas se obtuvo de la razón NeuN-N/NeuN+.

Todo el análisis de la calidad de la expresión celular de NeuN, se hizo con la asistencia del programa Sigma ScanPro 5® (SPSS, Chicago, Illinois, USA).

3.2.5 Tinción de Nissl

Los cortes de 6 μm de espesor hechos en micrótomos, en el sentido tangencial del tejido, fueron puestos en láminas portaobjetos gelatinizadas. Una vez secos, se desparafinizaron por inmersión en xilol 3 veces (2 minutos cada vez) y se sometieron a una batería de soluciones en el orden y los tiempos especificados a continuación: alcohol de 100% (2 veces por 3 minutos cada vez), alcohol de 95% (2 veces por 10 y 2 minutos respectivamente), la solución de Cloroformo al 80% por 15 minutos, nuevamente alcoholes de 95% y 100%, 2 minutos cada uno; se sumergen en xilol por 5 minutos, alcohol de 100% por 2 minutos, alcohol de 95% (2 veces por 2 minutos cada una), agua destilada por 2 minutos, solución de Violeta de Cresyl al 5% por 15 minutos, inmersión rápida en alcohol de 70% con 10 gotas de ácido acético glacial; alcohol de 90% por 1 minuto, alcohol de 100% (3 veces por 3 minutos cada uno), y finalmente, xilol (2 veces por 3 minutos).

3.2.6 Western Blot de NeuN

Para llevar a cabo la cuantificación de la proteína NeuN, se utilizó el análisis bioquímico por electroforesis, electrotransferencia e inmunoblot. El procedimiento

descrito a continuación fue exactamente igual para 3 muestras control y 7 con TCE. Se emplearon aproximadamente 27 mm³ (30 mg) de tejido que fueron inicialmente inmersas en 700 µL de buffer RIPA (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 50 mM NaCl; 1 mM EDTA; Tritón X-100 al 0,5%; SDS al 0,5%; ácido deoxicólico al 0,5%) e inhibidor de proteasas (Aprotinina de pulmón bovino A6279®, Sigma, St. Louis, MO, USA). Luego, se sonificaron las muestras usando un dispositivo ultrasónico (Branson Ultrasonic Corporation 2510, Danbury, CT, USA) por 10 minutos, y subsiguientemente se homogenizaron. Ya homogenizadas, se centrifugaron a 14.000 rpm por 20 minutos a 4° C. Los sobrenadantes fueron congelados a -20° C hasta su uso. La concentración de proteínas en los sobrenadantes de estas muestras se determinó por el método de Bradford; preparándose para obtener una concentración final de 45 µg de proteína por pozo en geles de SDS-PAGE al 10%. Después de la separación de las proteínas por electroforesis, las electrotransferimos a membranas de PVDF. Estas membranas se sometieron luego al inmunoblot, así: inicialmente se sumergieron en una solución de bloqueo (Tris-Base al 0,08%; NaCl al 0,9%; Tween 20 al 0,3% y BSA al 0,3%) por una hora; luego fueron incubadas en el anticuerpo primario (Mouse Anti-Neuronal Nuclei Monoclonal Antibody, Chemicon International-MAB377®, Temecula, CA, USA) diluido 1:2500 en TBS. Después se lavaron las membranas 3 veces en TBS y se incubaron en suero del complejo Biotina/Avidina (Vectastain Elite ABC, PK-6102 Mouse IgG®, Vector Laboratories, Southfield, Michigan, USA) diluido 1:200 en TBS durante 1 hora cada uno. Finalmente se revelaron las membranas usando una solución que contenía Diaminobencidina al 4%, peróxido de hidrógeno al 2% y níquel al 2% diluidos en PBS (Peroxidase Substrate Kit, DAB SK-4100®, Vector Laboratories, Southfield, Michigan, USA). Como control negativo del procedimiento, una membrana fue procesada de la manera arriba descrita pero omitiendo agregar el anticuerpo primario. El anticuerpo contra β III-Tubulina (Anti- β III Tubulin monoclonal antibody, G7121®, Promega, Madison, WI, USA) diluido 1:5000, fue utilizado como un estándar interno. Todo este procedimiento fue llevado a cabo por duplicado.

El Western Blot para NeuN permitió reconocer las bandas características de NeuN: 2 bandas tenues de 46 y 48 kDa, una banda de 66 kDa y 2 bandas densas de 92 y 96 kDa. Estas últimas, corresponden a las formas diméricas de las bandas de 46 y 48 kDa, respectivamente. Las bandas de 92 y 96 kDa fueron las que siempre se marcaron en todos los procedimientos realizados de todas las muestras contusas y control; además, migraron una respecto de la otra con muy baja resolución o definición, por lo tanto, solo se analizaron estas y en forma conjunta, tal como ya lo habían hecho otros autores (Collombet et al., 2006). El anticuerpo Anti- β III-Tubulina marcó una única banda de ~50 kDa, en forma densa, intensa y aparentemente homogénea para todas las muestras. Con la asistencia del programa Gel Pro Analyzer 4.5 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA), cuantificamos la densidad óptica de las bandas de 92 y 96 kDa de NeuN y la banda de β III-Tubulina de ~50 kDa, para determinar si habían variaciones en la proporción NeuN/ β III-Tubulina entre las muestras control y con TCE.

3.2.7 Histofluorescencia para Fluoro-Jade C

Para identificar las neuronas en degeneración, utilizamos secciones de 6 μ m de espesor, cortadas con micrótopo, a partir del tejido embebido en parafina y puestas en láminas portaobjetos gelatinizadas. Estos cortes se desparafinizaron con xilol por 12 horas, se rehidrataron y sumergieron en etanol absoluto por 3 minutos seguido de etanol al 70% por 1 minuto y un lavado con agua destilada por 2 minutos. Luego se transfirieron los portaobjetos a una solución de Permanganato de Potasio (KMnO_4) al 0,06% durante 15 minutos y lavadas en agua destilada 3 veces por 1 minuto cada una. Después se sumergieron en la solución de Fluoro-Jade C (Fluor Jade C, Chemicon International-MAB377®, Temecula, CA, USA) al 0,0001% durante 30 minutos, y lavados 3 veces por 1 minuto con agua destilada. Una vez secas completamente las secciones, se

sumergen en xilol por 1 minuto, se les aplicó un medio de montaje y se les puso cubreobjetos.

Para realizar las capturas fotográficas de esta tinción, los cortes fueron analizados con el microscopio de confocal Leica TCS SP5 (Leica Micro-systems, Mannheim, Germany). Las imágenes de confocal de un plano óptico simple (con 1 μm de grosor) fueron obtenidas usando una longitud de onda de emisión de 525 nm. El laser de argón-criptón fue usado para excitar al fluorocromo a 488 nm. La atenuación del láser, el diámetro del *pinhole*, la sensibilidad del fotomultiplicador y la compensación fueron características constantes en la captura de las imágenes de todas las muestras.

La valoración cuantitativa de FJC se llevó a cabo en los cortes de corteza cerebral (en tres cortes por muestra) que se detectaron como consecutivos de aquellos procesados por inmunohistoquímica para NeuN. Las imágenes analizadas fueron tomadas usando una magnificación de 5x, en las cuales se identificó morfológicamente la sustancia gris usando un microscopio acoplado al programa *ImageJ* (National Institute Health, USA). Ubicadas las regiones de interés, por superposición de las imágenes de NeuN y FJC, se colocó una cuadrícula de 1 mm^2 de área, dentro de zonas con parche y dentro de zonas con citoarquitectura conservada, en las cuales se llevaron a cabo los conteos de las células FJC-positivas. Estas células debían tener marcado el núcleo y el citoplasma somático de forma intensa y homogénea. Así, se obtuvo el valor de la densidad de las neuronas FJC-positivas en el área indicada.

3.2.8 Presentación y análisis de los datos

Se mostrarán los porcentajes promedio de tejido con zonas de parche y con zonas de citoarquitectura preservada en las muestras contusas. Todos los conteos de células NeuN+ realizados por columna cortical en cada muestra control y contusa,

fueron promediados, por lo que se presenta la densidad de las mismas con la media y la desviación estándar por muestra. También se presentará el promedio de los porcentajes de células NeuN-N/NeuN+ obtenidos por cada muestra, con la media y la desviación estándar respectiva. Se determinó si la densidad neuronal de las muestras control y con TCE eran diferentes usando una prueba *t-student* no pareada, a dos colas, con una significancia estadística de al menos $p < 0,05$.

La densidad de neuronas FJC-positivas (FPN/mm²) se presenta como la media y la desviación estándar por muestra, y se comparó la densidad identificada en las zonas de parche con aquella de las zonas de citoarquitectura conservada para determinar si eran diferentes, usando una prueba *t-student* pareada, a dos colas, con una significancia estadística de al menos $p < 0,05$. Adicionalmente, se aplicó un análisis de regresión lineal entre los datos de la densidad de neuronas FJC-positivas y el porcentaje de área ocupada por los parches de NeuN, para determinar una posible relación entre las mismas. Este se hizo con un intervalo de confianza del 95%

En la cuantificación de la proteína NeuN por Western Blot, se presenta el promedio de la proporción NeuN/ β III-Tubulina de todas las muestras control y de todas las muestras post-TCE procesadas. Estos promedios fueron comparados para determinar posibles diferencias, mediante la prueba *t-student* no pareada, a dos colas, con una significancia estadística de al menos $p < 0,05$.

Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con la asistencia del programa GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, Ca, USA).

3.3 Resultados

3.3.1 Inmunorreactividad de NeuN en el tejido post-mortem

En el tejido post-mortem, la IR para NeuN permitió identificar todas las láminas corticales, con marcación de las neuronas piramidales grandes en las láminas III y V y otras más pequeñas en la lámina II. NeuN también se expresó en las neuronas no-piramidales ubicadas en las láminas II, IV y VI predominantemente. Cualitativamente, las variaciones en la densidad de neuronas NeuN-positivas se observó en todas las láminas, con las más altas densidades en las láminas II y IV. Basados en el tamaño de las neuronas piramidales, fue posible demarcar una sublamina en las láminas III y V, con células más pequeñas localizadas en la parte superficial de estas (ver Figura 10A). A mayor magnificación, todas las neuronas muestran una marcación fuerte en el núcleo, moderada en el citoplasma del soma y nula en el axón y en las porciones distales de las dendritas. En las células piramidales, la marcación de NeuN es positiva en todo el soma y en los segmentos iniciales de la dendrita apical y de las dendritas basales (ver Figura 10B).

En el tejido control, se contaron en promedio, por campo de una columna cortical, 233 células NeuN-positivas. El 64% aproximadamente de estas exhibían un patrón normal de la marcación (ver valores por muestra en la Tabla 8), y el 36% restante presentaban anormalidades del mismo tales como núcleo excéntrico y picnótico, citoplasma con leve vacuolización, bordes nucleares difusos y ocasionalmente fragmentación tanto del núcleo como del citoplasma (ver Figura 10C). Células con anormalidades como las descritas también fueron vistas en los cortes con la tinción de Nissl, y quizá podrían explicar las escasas células pálidamente marcadas con FJC en este tejido ($1,3 \pm 1,5$ FPN/mm²) (ver Figura 15A).

3.3.2 Inmunorreactividad de NeuN en las muestras con contusión cerebral

Todas las muestras contusas mostraron parches de pérdida sustancial de la IR para NeuN, en los cuales hay ausencia de muchos somas y procesos neuronales, con variadas formas y tamaños. En promedio, al menos el 25% de toda la superficie de sustancia gris cortical de cada corte histológico presentó esta anormalidad citoarquitectónica. Los parches fueron identificados ocupando el espacio de más de una lámina cortical en el 60% de los casos. De todos los parches encontrados, en el 39% de los casos se ubicaron en las capas supragranulares (ver Figura 11C), 21% en las capas infragranulares y aproximadamente el 40% restante, ocupaban la extensión total de las capas supra- e infragranulares (ver Figura 11D).

Los sectores de parche de NeuN, corresponden a zonas con pérdida severa de células marcadas con la tinción de Nissl. Ambos tipos de marcación coincidieron en mostrar células escasas y aisladas en los parches; y aunque las neuronas NeuN-positivas presentaban tamaños diferentes, aquellas marcadas con Nissl estaban homogéneamente encogidas (ver Figura 12A y 12B). La cuantificación de la proteína NeuN mediante Western Blot permitió corroborar que la pérdida de la expresión de NeuN en el tejido corresponde efectivamente a una pérdida de la proteína. La densidad óptica de las bandas de 92/96 kDa de NeuN en las muestras contusas indicó que estas contenían 67% menos de proteína ($22,00 \pm 7,96$) con respecto a las muestras control ($65,67 \pm 11,05$). Esta diferencia fue significativa ($p=0,0121$) (ver Figura 13).

En promedio, el 65% de la superficie cortical del tejido contuso presentaba citoarquitectura conservada (ver Figura 11B). Se encontraron aproximadamente 253 neuronas en promedio por cada campo de conteo en estos sectores preservados; es decir, que la densidad neuronal entre las muestras control y las contusas de citoarquitectura conservada no presenta diferencias significativas ($p=0,1765$). No obstante, el 61% de las neuronas en estos sectores exhibían

anormalidades como el núcleo excéntrico (ver Figura 14C), disminución de la intensidad de la IR en el núcleo y/o en el citoplasma (ver Figuras 14C-D), fragmentación de uno o los dos de estos compartimientos (ver Figuras 14B-D) y dendritas apicales entorchadas (ver Figura 14C).

La frecuencia de anormalidades en la marcación celular de NeuN en las muestras con contusión fue significativamente más alta que en las muestras control ($p=0,0076$), resultando en una disminución de neuronas con normalidad en la marcación del 33% (ver valores por muestra en la Tabla 8). Los cortes consecutivos de Nissl revelaron células de diverso tamaño y grado de afectación en la calidad de la marcación, así como alteraciones en los procesos similares a las halladas con NeuN (ver Figura 12C-D).

3.3.3 Marcación con Fluoro-Jade C en el tejido contuso

En el tejido control, la marcación de FJC fue prácticamente nula, ocasionalmente se observaron unas pocas células marcadas de forma aislada, muy tenue y sin procesos (ver Figura 15A). En el tejido contuso, FJC reveló varios patrones de marcación en aquellos sectores identificados con la marcación de NeuN. En los sectores de citoarquitectura conservada, FJC marcó somas de neuronas de manera tenue, similar a lo observado en el tejido post-mortem. Sin embargo, algunas de estas neuronas presentaban marcación entre moderada e intensa, siendo posible identificar segmentos iniciales de sus procesos, el citoplasma y en ocasiones hasta el núcleo (ver Figura 15B). La mayoría de las neuronas identificadas en los sectores de conservación laminar tenían morfología piramidal y estaban localizadas principalmente entre las láminas II y III, o entre V y VI (ver Figura 15G).

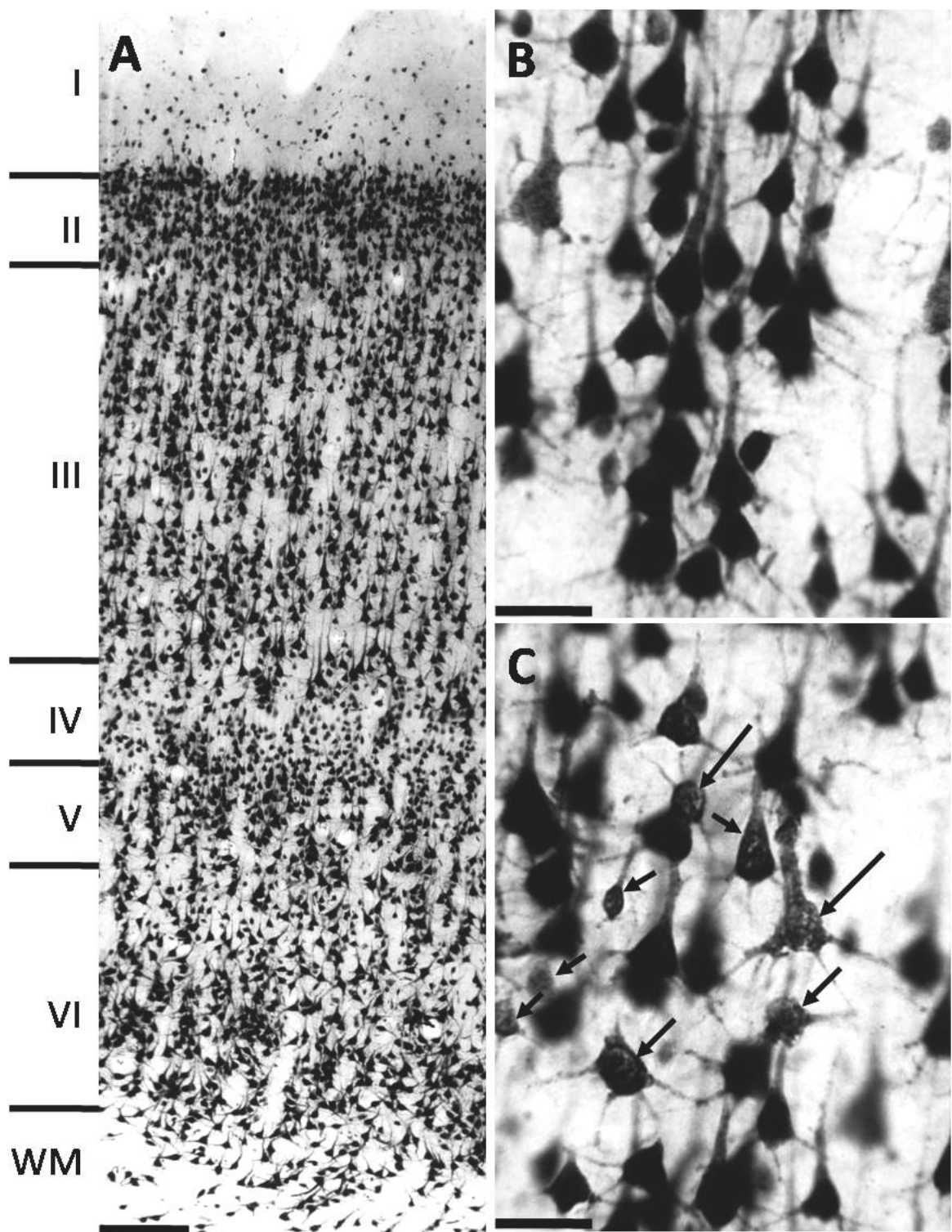


Figura 10. Inmunorreactividad de NeuN en el tejido control post-mortem.

Figura 10. Inmunorreactividad de NeuN en el tejido control post-mortem

A, es una imagen de un corte coronal de la corteza prefrontal de una muestra post-mortem, marcada con Anti-NeuN. Las seis láminas corticales son claramente identificadas. La barra = 100 μ m. B, es una imagen en alta magnificación, donde se observan las neuronas piramidales con su típica morfología triangular y algunas interneuronas de la lámina III. La IR es intensa, compacta y uniforme en cada célula, siendo más fuerte en el soma mientras que en el citoplasma y las dendritas proximales es más tenue. C, es una imagen en alta magnificación de un sector entre las láminas III y IV, donde se puede apreciar algunas células con anomalías en el patrón de marcación subcelular. Las flechas indican algunas neuronas con el núcleo ligeramente más pequeño y excéntrico, y con disminución de la IR, que las hace parecer granulosas y con pérdida de los límites celulares. La barra en B y C = 50 μ m.

Tabla 8. Análisis cuantitativo de la calidad de la IR para NeuN

Control post-mortem			Contusión por TCE		
Mue	NeuN+	%NeuN-N/NeuN+	Mue	NeuN+	%NeuN-N/NeuN+
C1	210,46 +/- 13,3	99,42 +/- 13,2	T07	298,00 +/- 15,0	52,67 +/- 17,7
C3	193,98 +/- 10,2	33,02 +/- 11,2	T08	301,67 +/- 42,8	51,12 +/- 16,3
C4	196,42 +/- 8,2	39,49 +/- 16,8	T09	285,33 +/- 31,0	36,02 +/- 15,6
C5	236,20 +/- 6,1	52,02 +/- 18,9	T10	378,99 +/- 40,28	60,33 +/- 12,5
C6	245,22 +/- 11,3	52,20 +/- 8,1	T12	63,85 +/- 52,5	20,67 +/- 13,6
C7	265,33 +/- 9,5	85,03 +/- 16,2	T13	231,00 +/- 10,4	25,33 +/- 11,3
C8	190,22 +/- 8,6	88,28 +/- 6,8	T14	202,42 +/- 11,7	11,02 +/- 17,3
C9	234,52 +/- 4,0	58,21 +/- 9,2	T16	273,21 +/- 27,6	54,82 +/- 22,8
C11	275,29 +/- 11,7	60,00 +/- 13,4	T17	234,83 +/- 24,8	43,00 +/- 26,5
C12	239,02 +/- 10,1	61,22 +/- 18,6	T18	261,88 +/- 8,6	30,67 +/- 17,9
C13	219,67 +/- 11,8	64,52 +/- 10,2			
C14	282,42 +/- 13,2	75,59 +/- 11,7			

NeuN+: Neuronas NeuN-positivas, valores expresados con media +/- desviación estándar.
 %NeuN-N/NeuN+: porcentaje de neuronas con marcación normal/todas las neuronas marcadas; valores expresados con media +/- desviación estándar.

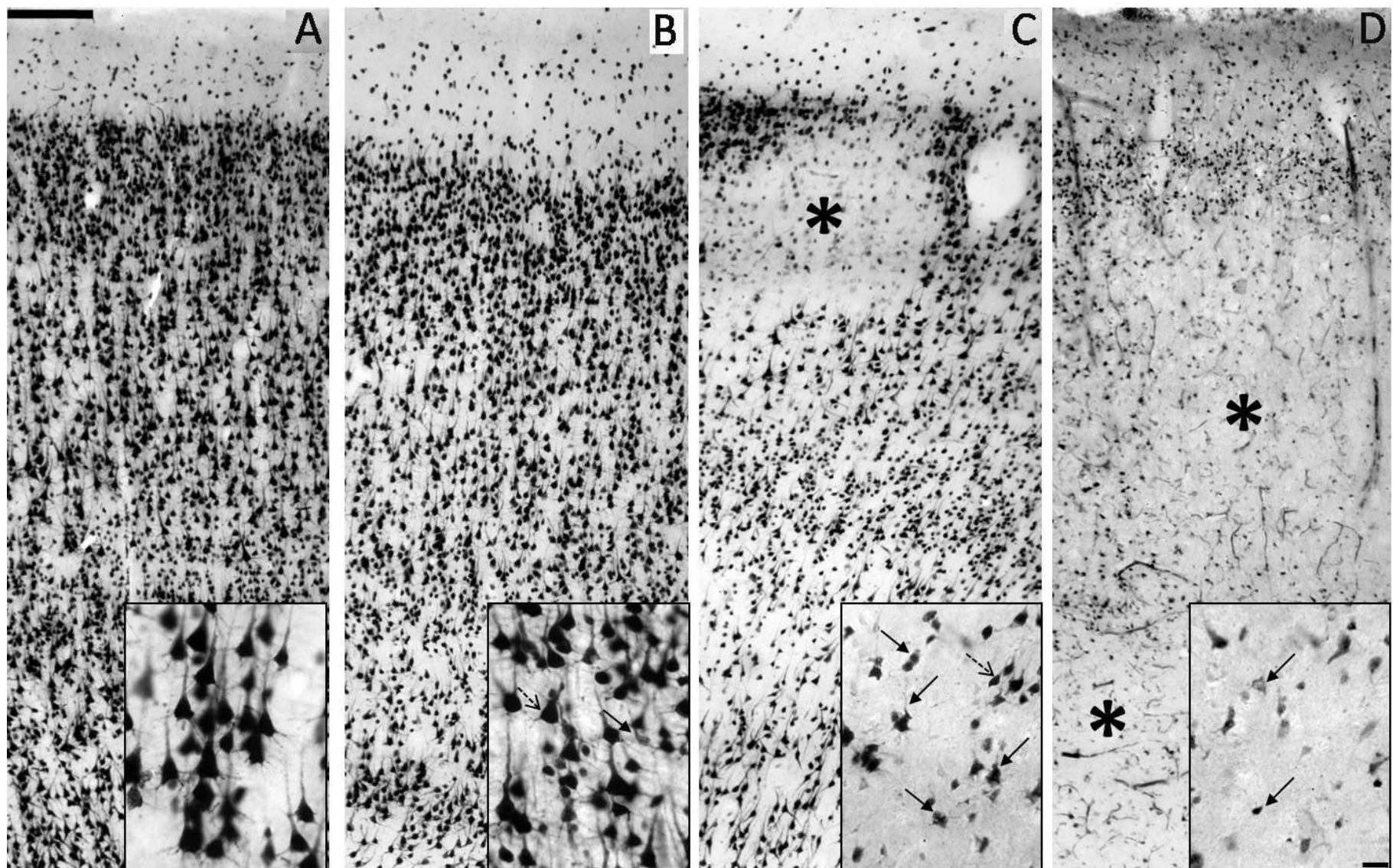


Figura 11. Expresión de NeuN en diferentes sectores de las muestras con contusión cerebral.

Figura 11. Expresión de NeuN en diferentes sectores de las muestras con contusión cerebral.

A, es una imagen de tejido control post-mortem. B, es una imagen de tejido contuso en la región de citoarquitectura conservada. En el recuadro de alta magnificación, la flecha discontinua señala una neurona con el patrón normal de marcación para NeuN, y la flecha continua señala una neurona con el patrón anormal. C, es una imagen de una muestra contusa con parche en las capas supragranulares, con pérdida significativa de somas y procesos neuronales (asterisco). El recuadro de alta magnificación muestra células con morfología aberrante, bordes irregulares (flechas continuas) y de tamaño reducido (flecha discontinua). D, es una imagen de tejido contuso con un parche que cubre desde la lámina II hasta la VI. En el recuadro de alta magnificación se aprecia la disminución de la densidad celular, la pérdida generalizada de elementos inmunorreactivos y las mismas anormalidades morfológicas descritas para el recuadro de la imagen C (flechas continuas). La barra en las imágenes de baja magnificación = 200 μm ; y la barra en las imágenes de alta magnificación = 20 μm .

De otro lado, algunas neuronas fuertemente marcadas fueron vistas en los sectores de parche (ver Figura 15E). Sin embargo, los bordes de estas células eran apenas distinguibles del intenso *background*, y tenían apariencia granulosa. El soma y los procesos de estas neuronas parecían inflamados y entorchados (ver Figura 15C).

La cuantificación de las neuronas Fluoro-Jade positivas (FPN) en columnas corticales de sectores con citoarquitectura conservada y con parche de pérdida de la IR para NeuN (ver valores por muestra en la Tabla 9), arrojó los siguientes valores. En los primeros, se determinó un promedio de $20,28 \pm 9,2$ FPN/ mm^2 , y en los segundos de $107,7 \pm 16,01$ FPN/ mm^2 . La comparación de los valores entre estos grupos, incluyendo la cuantificación de los tejidos post-mortem, permitió establecer que las muestras con contusión cerebral tienen mayor cantidad de células FPN que las de control post-mortem; y a su vez, que los sectores con parche tienen mayor cantidad de células FPN que los sectores con citoarquitectura conservada en el tejido con TCE ($p < 0,0001$).

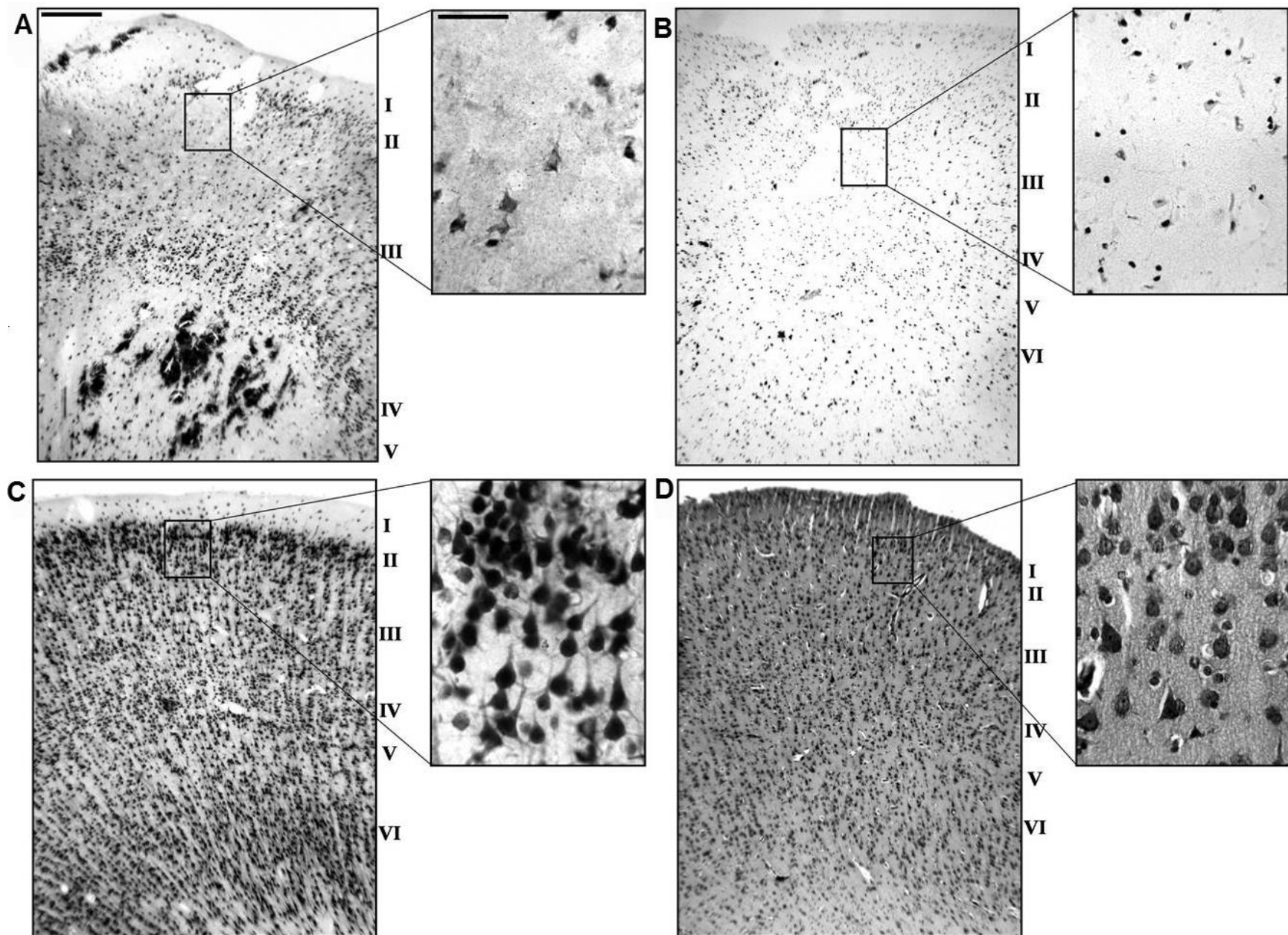


Figura 12. Comparación de cortes de tejido contuso marcados consecutivamente con NeuN y Nissl.

Figura 12. Comparación de cortes de tejido contuso marcados consecutivamente con NeuN y Nissl.

A y C, corresponden a imágenes de tejido marcado con NeuN; B y D, son imágenes de tejido marcado con Nissl. A y B son imágenes de sectores de parche de pérdida celular en las capas supragranulares. Se aprecia que los sectores de parche con NeuN, coinciden con sectores de pérdida severa de células en la tinción de Nissl. C y D, son imágenes de tejido contuso en sectores con citoarquitectura preservada. Las secciones consecutivas de NeuN y Nissl coinciden en mostrar células con diverso tamaño y calidad de la marcación, así como las deformidades en los somas y procesos visibles. La barra en A, B, C y D = 300 μ m; y la barra en los recuadros de alta magnificación = 50 μ m.

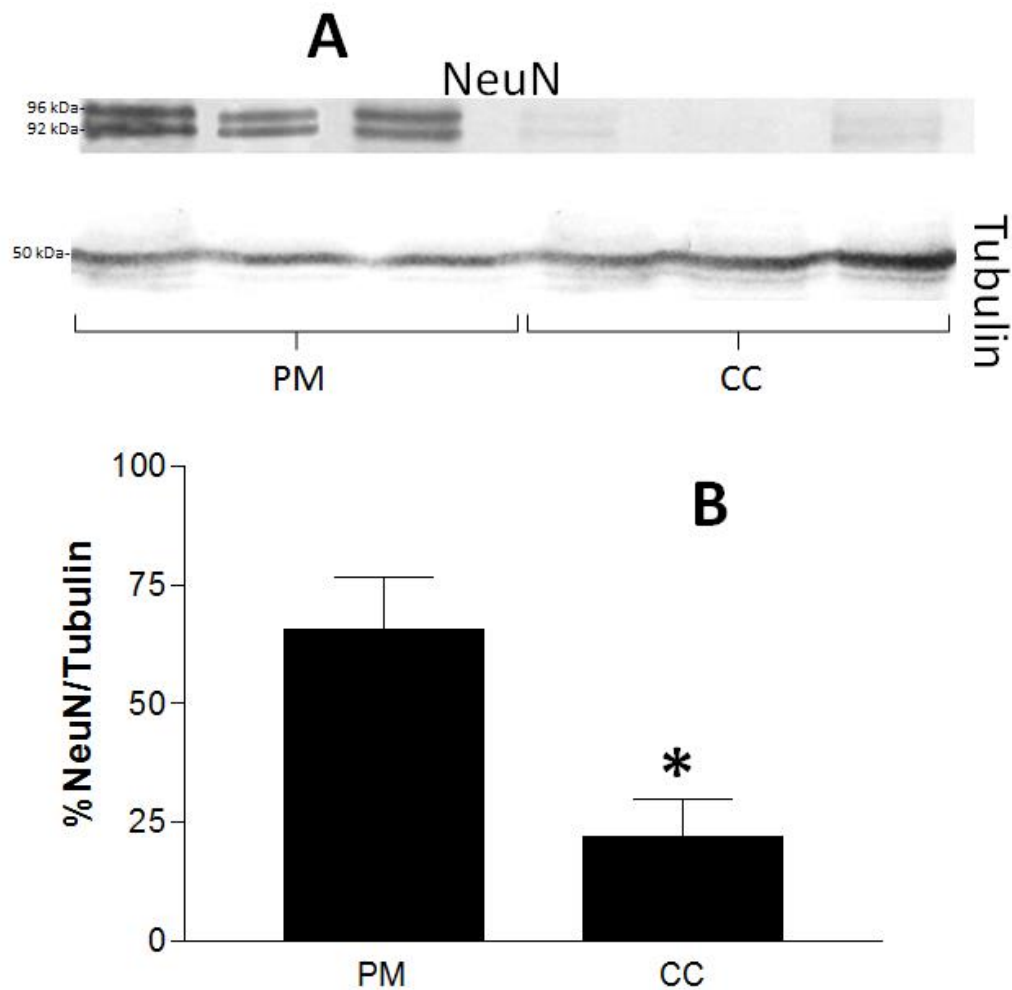


Figura 13. Pérdida de los niveles de la proteína NeuN en tejido contuso de humano

A, son imágenes de blots representativos de 3 muestras control y 3 de contusión cerebral, correspondientes a las bandas de 92 y 96 kDa de NeuN y de 50 kDa de β III-Tubulina. B, corresponde a la cuantificación de la densidad óptica de los blots de todas las muestras control (PM) y de contusión (CC) procesadas. Se expresa en la media de la proporción de la NeuN/ β III-Tubulina $\pm$ el error estándar. *: la diferencia entre los grupos de muestras es significativo con una $p < 0,005$.

Tabla 9. Cuantificación de las marcaciones de NeuN y Fluoro-Jade C en las muestras con contusión cerebral

Sector	Citoarquitectura conservada		Parche de pérdida de IR	
Muestra	%NeuN-N/NeuN+	FPN/mm ²	% parche	FPN/mm ²
T07	52,67 +/- 17,7	13,4 +/- 2,1	16	104,5 +/- 16,7
T09	36,02 +/- 15,6	11,4 +/- 0,6	31	118,4 +/- 16,4
T10	60,33 +/- 12,5	30,3 +/- 3,2	12	92,2 +/- 4,2
T13	25,33 +/- 11,3	17,3 +/- 1,4	46	126,1 +/- 10,1
T14	11,02 +/- 17,3	17,2 +/- 2,0	51	131,3 +/- 12,2
T16	54,82 +/- 22,8	20,2 +/- 3,1	10	89,0 +/- 11,0
T17	43,00 +/- 26,5	14,5 +/- 1,5	14	94,1 +/- 8,9
T18	30,67 +/- 17,9	38,0 +/- 5,9	20	105,9 +/- 18,9

%NeuN-N/NeuN+: porcentaje de neuronas con marcación normal/todas las neuronas marcadas; valores expresados con media +/- desviación estándar. FPN/mm²: densidad de neuronas Fluoro-Jade C positivas por mm². % parche: porcentaje del tejido contuso ocupado por sectores de parche de pérdida de la IR para NeuN.

3.4 Discusión

En el presente estudio realizamos una valoración cuantitativa de la expresión de NeuN y Fluoro-Jade C en el tejido contuso para determinar el grado de degeneración del compartimiento neuronal después de TCE severo en periodo agudo. También encontramos que el grado de neurodegeneración celular (cantidad y forma de células FJC-positivas) está relacionado con el nivel de compromiso de la citoarquitectura neuronal (grado de afectación de la IR para NeuN). La cuantificación de la calidad de la expresión tisular y de la proteína NeuN, nos permitieron corroborar tanto la alteración significativa de la primera en sectores de “citoarquitectura conservada” como la pérdida notable de la segunda en todo el tejido.

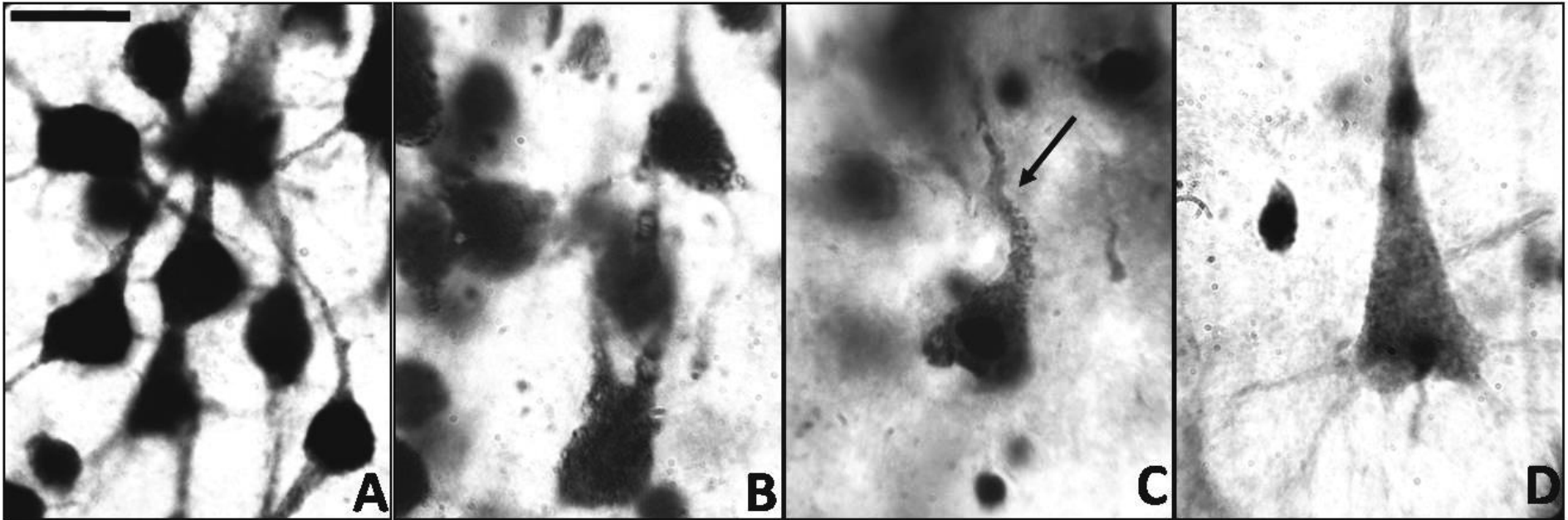


Figura 14. Anormalidades en la marcación celular de NeuN en el tejido con contusión cerebral

Las imágenes corresponden a microfotografías de alta magnificación (100x) de corteza cerebral de humano. A, es una imagen de tejido control, con células piramidales y no-piramidales intensamente marcadas en el núcleo y el citoplasma somático, y con marcación más leve en los procesos proximales. La IR es homogénea, delimitando claramente los límites de la célula. B, C y D corresponden a imágenes del tejido contuso. B, la imagen muestra algunas neuronas con disminución generalizada de la IR, bordes celulares difusos y una obvia disminución de la marcación en el núcleo y alrededor de este. La apariencia de la marcación en el núcleo y el citoplasma es granulosa. La flecha indica estos cambios citoplasmáticos en una de las células. C, es la imagen de una neurona piramidal con el núcleo encogido pero intensamente marcado, y la IR citoplasmática disminuida y fragmentada. La flecha señala un entorchamiento de la dendrita apical de la neurona. D, es la imagen de una neurona piramidal que muestra una pérdida severa de la IR para NeuN, sin núcleo distinguible. La flecha señala una neurona no-piramidal de la neurona piramidal recién mencionada, con mejor preservación de la intensidad en la IR, pero algo fragmentada. La barra = 20 μ m.

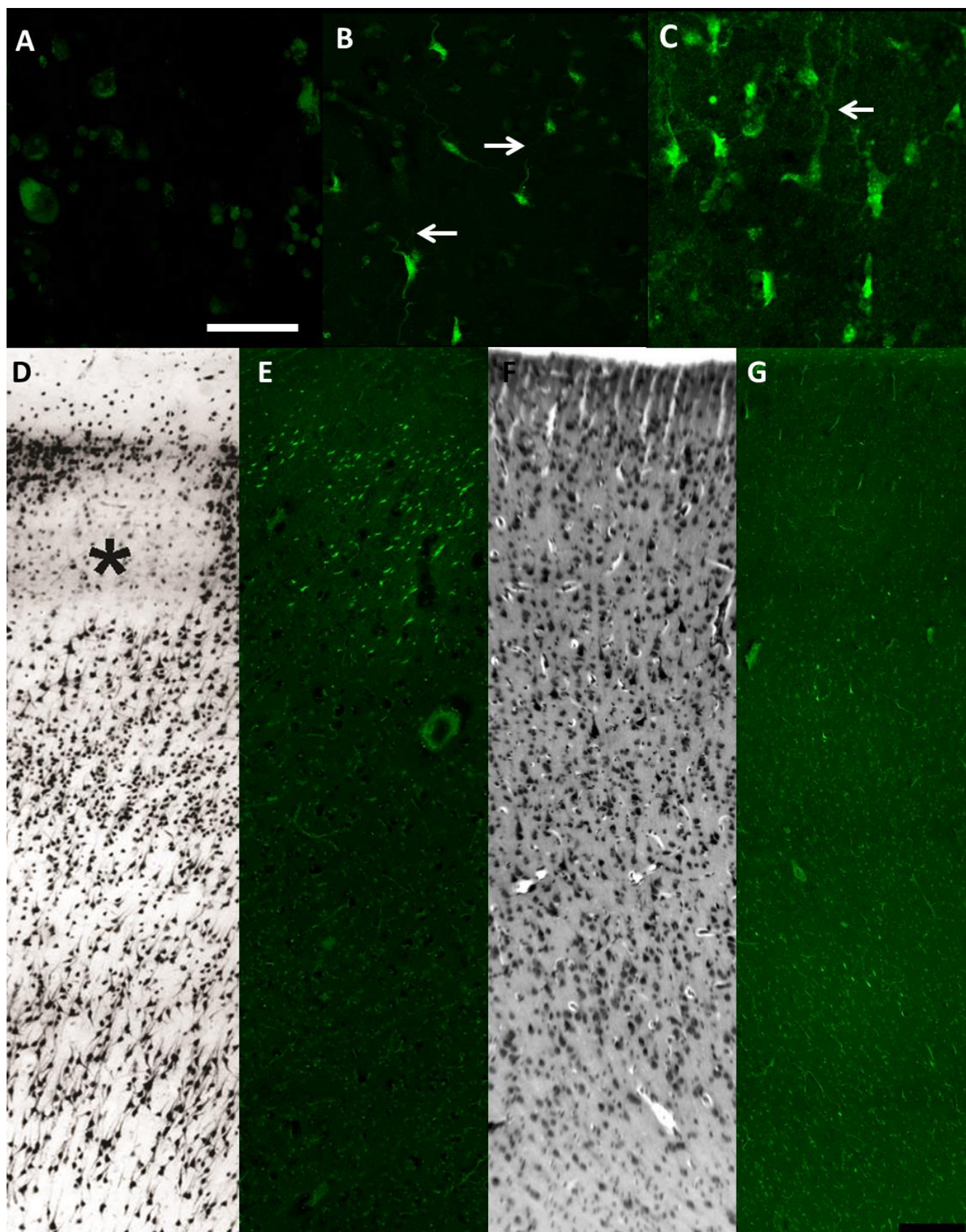


Figura 15. Expresión de Fluoro-Jade C en tejido con contusión cerebral

Figura 15. Expresión de Fluoro-Jade C en tejido con contusión cerebral

A, B, C, E y G: son imágenes de tejido marcado con Fluoro-Jade C. D y F: son imágenes de tejido marcado con NeuN. A: imagen de tejido control post-mortem. Nótese la marcación tenue, dispersa, algunas veces restringida al núcleo, sin procesos. B, F y G: imágenes de tejido contuso en sectores de citoarquitectura conservada. C, D y E: imágenes de tejido contuso en sectores de parche. D y E: imágenes de cortes consecutivos marcados con NeuN y FJC respectivamente, en sectores de con parche. F y G: imágenes de cortes consecutivos marcados con NeuN y FJC respectivamente, en sectores con citoarquitectura conservada. B: Nótese los diferentes niveles de intensidad de la marcación, desde tenue como en el tejido control hasta moderado e intenso como en los sectores de parche. Algunas células exhiben procesos marcados. C: hay mayor densidad de células FJC-positivas que en A y B, casi todas de alto nivel de intensidad en la marcación, y exhibiendo soma y procesos proximales claramente visibles. E: nótese que la concentración de células FJC-positivas tiene la ubicación del parche de pérdida de la IR para NeuN en D, ubicado en las láminas II y III. G: nótese que las células FJC-positivas están ubicadas en las láminas III y V principalmente, en una densidad baja, algo dispersas. Las flechas blancas están señalando procesos entorchados de neuronas FJC-positivas. La barra en A, B y C = 20 μm ; y en D, E, F y G = 200 μm .

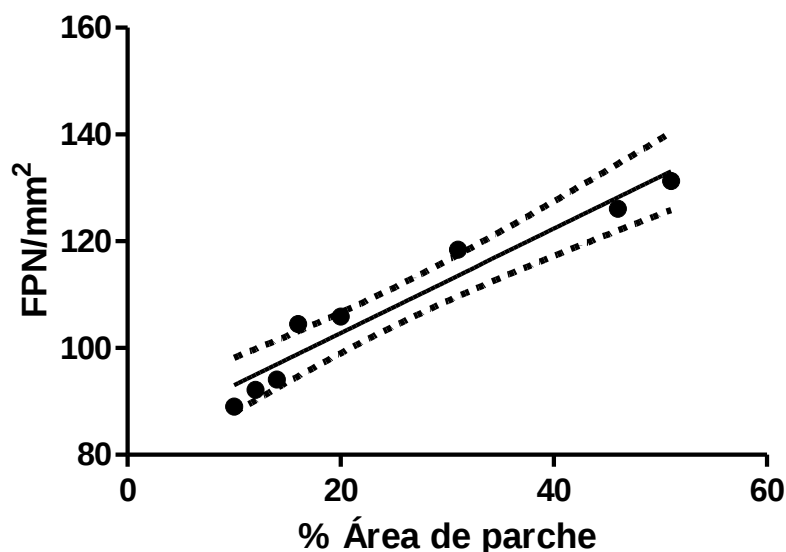


Figura 16. Relación directa entre el tamaño del parche y la densidad de neuronas en degeneración en el tejido contuso.

Representación gráfica de la regresión lineal entre los valores del área ocupada por los parches de pérdida de la IR para NeuN y la densidad de neuronas FJC-positivas en el tejido contuso. La línea continua indica la pendiente ideal de 1,0 grado de inclinación, y las líneas punteadas representan el intervalo de confianza del 95%. Los puntos negros presentan cada una de las 8 muestras contusas. La pendiente entre los valores de las variables analizadas fue de 0,98 ($p < 0,0001$). La conclusión del análisis es que hay una relación directa entre las variables consideradas, así: a mayor área de parche de NeuN, mayor la densidad de neuronas FJC-positivas.

3.4.1 Diversidad estructural en el compartimiento neuronal de la contusión cerebral del humano: distinguiendo el TCE de la isquemia

Cada vez hay más evidencia del concepto de “penumbra traumática” en la literatura científica, originada en investigaciones clínicas, fisiológicas y de imagenología que aplican los conceptos derivados del estudio de los accidentes cerebrovasculares (como la isquemia cerebral focal) para intentar determinar los umbrales de la lesión en el tejido contuso (Kawai, Nakamura, Tamiya, & Nagao, 2008; Menon, 2003; Newcombe et al., 2013; Wu, Huang, Vespa, Hovda, & Bergsneider, 2013). No obstante, nuestros hallazgos en el presente estudio parecieran cuestionar esta aproximación en varios aspectos. Primero, los mecanismos fisiopatológicos responsables de la muerte neuronal después de TCE pueden progresar independientemente de cómo ocurre en la isquemia. Al respecto, la patogénesis del evento isquémico agudo está bien definida: la oclusión macrovascular conduce a una lesión limitada del tejido por la perfusión, que usualmente resulta en un complejo topográfico previsible de foco y penumbra alrededor de éste (Baron, 1999). Además, en la isquemia, dicho complejo topográfico se conserva desde el momento agudo hasta la resolución crónica (Astrup et al., 1981; Heiss, 2010). Por lo tanto, la heterogeneidad micro-estructural que nosotros encontramos en el tejido contuso post-TCE, no cumple con las características del tejido isquémico.

Estas diferencias son esperables, dado el conocimiento de la evolución histopatológica que se tiene en la actualidad de las contusiones cerebrales. En la fase aguda después del TCE, en las primeras 24 horas, el foco de la contusión queda delimitado respecto de la zona perilesional; y luego de esta fase, se puede apreciar una gran variedad de manifestaciones morfológicas que van desde sectores con la estructura bastante preservada hasta otros con necrosis moderada. Estos hallazgos han sido descritos en estudios de contusiones de tipo hemorrágico, tanto en tejido post-mortem como en tejido extraído por

contusectomía (Bullock et al., 1991; Graham et al., 2002; Ribas & Jane, 1992; Schröder et al., 1995). De acuerdo con esta descripción, y teniendo en cuenta los hallazgos histopatológicos del presente estudio obtenidos en tejido extraído en su mayoría entre las 48 y las 96 horas después del TCE, podemos afirmar que nuestras muestras se encontraban en la fase subaguda del proceso contuso. Esta fase se corresponde con la apariencia macroscópica e intraquirúrgica del tejido de tipo hemorrágico, permitiéndonos identificar y estudiar una parte sólida y consistente del mismo, lo cual no es posible hacer en el foco isquémico. Además, la heterogeneidad estructural que observamos no concuerda con las características necróticas bien documentadas que ocurren en el tejido nervioso que ha sufrido una hipoxia/isquemia. La muerte celular en el foco isquémico es principalmente del tipo digestión enzimática y licuefacción subsiguiente (Farber, Chien, & Mitnacht, 1981; Garcia, Liu, & Ho, 1995; Golstein & Kroemer, 2007; Lipton, 1999; Trump et al., 1984), y nosotros encontramos no solo zonas de citoarquitectura conservada sino también algunos elementos neuronales en las zonas de parche o del foco de la contusión. Por lo tanto, quizá sea más probable que en el tejido contuso extraído por craniectomía (como el nuestro), se desarrolle una necrosis coagulativa (Farber, 1982).

De todas maneras, es difícil establecer un paralelo entre el TCE y la isquemia dado que los efectos del primer en la fisiología cerebral son heterogéneos en el tiempo, en un paciente y entre pacientes (Coles et al., 2004; Martin et al., 1997). Nosotros también encontramos una heterogeneidad en la evolución espacio-temporal del tejido contuso, apreciada en los diversos grados de compromiso de la citoarquitectura, no solo vistos entre muestras, sino también entre diferentes niveles de corte en una misma muestra. En conclusión, nosotros proponemos que los mecanismos fisiopatológicos responsables de la muerte neuronal en el tejido contuso después de TCE, pueden diferir notablemente de aquellos en la isquemia cerebral y deben ser completamente elucidados para lograr proponer umbrales morfológicos y fisiológicos apropiados. En efecto, un estudio reciente basándose en los umbrales fisiológicos isquémicos para valorar la zona pericontusional con

buena apariencia morfológica de pacientes con TCE, determinó que el deterioro metabólico progresivo de esta zona no era de naturaleza isquémica (Wu et al., 2013).

3.4.2 Relación entre los parches de pérdida de la IR para NeuN y el daño celular irreversible

En el presente estudio, utilizamos el término “parche” para designar una región microscópica del tejido contuso con pérdida casi total de la IR para NeuN. La pérdida de la IR para NeuN ha permitido la identificación del foco de la contusión en modelos animales (Härtig et al., 2009; Manley et al., 2006). A pesar de que el paradigma predominante ha sido considerar la pérdida de la IR como un indicador de pérdida celular en neurodegeneración y en respuesta a varios tipos de lesión del tejido nervioso (Dawodu & Thom, 2005; Tippet et al., 2007), algunos autores han cuestionado este punto de vista. Un estudio reportó la conservación de la integridad morfológica de las células (usando la tinción con Hoescht) y de sus niveles de NeuN (por Western Blot), a pesar de la pérdida total de la IR tisular de las neuronas, en un modelo de isquemia cerebral (Unal-Cevik et al., 2004); y en otro estudio se detectó la presencia de las células con la tinción de Nissl, no obstante de la completa pérdida de la IR para NeuN, en un modelo de axotomía de nervio periférico (McPhail et al., 2004).

Nuestros resultados revelan la relación entre los parches de pérdida de la IR para NeuN y la pérdida de las neuronas a través de varias aproximaciones, en el tejido con contusión cerebral en la fase subaguda del TCE. Primero, los sectores de pérdida de la IR para NeuN coincidieron con los sectores de pérdida sustancial de todos los tipos celulares en la tinción de Nissl (ver Figura 12A-B). Segundo, mostramos a través de Western Blot, una disminución significativa de los niveles de la proteína en las muestras contusas, comparados con los de las muestras control (ver Figura 13). Tercero, nosotros confirmamos la co-localización de los parches de NeuN (a través de cortes consecutivos de muestras contusas

marcados con otros anticuerpos específicos para neuronas) con parches de MAP2 (ver capítulo 1 del presente documento) y de las proteínas que ligan calcio PV, CB y CR (ver capítulo 2 del presente documento o (Buriticá et al., 2009). Entonces nuestros resultados están de acuerdo con otros investigadores que relacionan la pérdida total de la IR para NeuN con la pérdida del material de Nissl y signos de neurodegeneración celular detectados a través de la tinción de plata más allá del primer día de lesión, en un modelo de neurodegeneración por envenenamiento (Collombet et al., 2006). Por lo tanto, basados en nuestros hallazgos, podemos concluir que la pérdida de la IR para NeuN puede ser utilizada como un indicativo de la pérdida neuronal en las zonas de parche de las contusiones cerebrales de pacientes que padecieron TCE.

De otro lado, nosotros encontramos muy pocas neuronas NeuN-positivas en los parches. Esta observación sugiere un grado de preservación, aunque mínimo, que contrasta con la licuefacción asociada a la necrosis isquémica, como se discutió anteriormente. No obstante, estas neuronas eran morfológicamente anormales, y podrían corresponder a las “neuronas oscuras” que se han encontrado como parte de la respuesta histopatológica a varios tipos de lesión (Zsombok, Tóth, & Gallyas, 2005). Además, al observar una posible tendencia entre los valores del área del parche y de la densidad de neuronas FJC-positivas (ver Tabla 9), corroboramos esta tendencia mediante el análisis de regresión lineal (ver Figura 16), que nos permite afirmar que entre mayor es el área de parche, mayor es la densidad de neuronas en degeneración. En consecuencia, nuestros hallazgos sugieren que las neuronas observables dentro del área de parche, corresponden muy probablemente a células en proceso de muerte.

3.4.3 Estado de las zonas con citoarquitectura conservada en las contusiones cerebrales

En estudios previos, usando tomografía por emisión de positrones y umbrales fisiológicos, determinaron que una porción significativa del volumen del foco

contuso poseía valores por fuera del rango de la anormalidad. Esto fue considerado una falla de los umbrales para indicar la lesión irreversible (Cunningham et al., 2005). Sin embargo, este resultado puede representar evidencia de tejido viable en lo que imagenológicamente es el foco de la contusión, que para nuestro caso, es toda la muestra analizada de cada paciente intervenido quirúrgicamente. Entonces, si la preservación estructural en una zona de la contusión se cree está vinculada con la viabilidad de la misma (similar a lo que ocurre en la isquemia cerebral), nuestros hallazgos de sectores con citoarquitectura conservada identificados por la marcación de NeuN podrían ser entendidos como evidencia de tejido susceptible de ser reparable dentro del foco de la contusión. De hecho, algunos de nuestros datos podrían dar sustento a esta idea. Por ejemplo, la población neuronal total de los sectores con citoarquitectura conservada y de las muestras control post-mortem no presentaron diferencias, así como el espesor cortical total (utilizado para equiparar imágenes digitales durante las comparaciones). Estas observaciones proporcionan evidencia de que el edema, alteración propia del TCE, apenas parece ocurrir en las zonas con preservación estructural de la contusión; sin embargo, muchas otras características importantes asociadas a la neurodegeneración celular por trauma estarían siendo pasadas por alto en nuestros estudios. Otra sugerencia importante de estas observaciones es que el tejido post-mortem de sujetos “sanos” que empleamos, es un control confiable (estructuralmente hablando) para nuestras valoraciones histológicas.

En las regiones con citoarquitectura conservada, las neuronas NeuN-positivas mostraron patrones subcelulares diversos comparados con el denominado “patrón normal” observado en tejido cerebral sano perfundido. Por esta razón, nosotros decidimos cuantificar tanto la población NeuN-positiva total como la subpoblación que exhibía el llamado “patrón normal” basados en la apariencia de la marcación, lo cual nos permitió establecer una proporción de células normales en cada columna cortical evaluada. Esta divergencia del patrón normal de marcación de NeuN también ha sido observada en modelos animales de isquemia cerebral

(Domoráková, Burda, Mechírová, & Feriková, 2006), de citotoxicidad por trombina (Fujimoto et al., 2007), y de axotomía (Kwon et al., 2002). La cuantificación de las células con marcación normal de NeuN también ha sido utilizada por otros autores (Robertson et al., 2006), para valorar el efecto neuroprotector de la progesterona en un modelo de TCE. Los investigadores de este estudio sugirieron que el conteo de neuronas NeuN-positivas con patrón normal de marcación, era más efectivo que el conteo de la población total de neuronas para la valoración del estado del compartimiento neuronal. En nuestro estudio, el análisis de los sectores con citoarquitectura conservada mostró que sólo a través de la cuantificación de las neuronas con patrón normal de la marcación de NeuN fue posible encontrar diferencias importantes entre estos sectores en el tejido contuso y los homólogos en el tejido control.

La observación del tejido contuso con la tinción de Nissl, también nos permitió detectar anormalidades morfológicas en el compartimiento neuronal. Por lo tanto, la diversidad estructural hallada en la marcación de NeuN, es también característica del tejido marcado con Nissl; sin embargo, otros autores ya han demostrado que la marcación de NeuN es mejor que la de Nissl cuando se trata de conservar estabilidad en la marcación con tejido de varios intervalos post-mortem, o de valorar aspectos como el tipo, la forma y el tamaño de las neuronas (Gittins & Harrison, 2004). En conclusión, nosotros consideramos que nuestros resultados usando la marcación de NeuN son más confiables.

Aunque las células con marcación anormal de NeuN en las zonas de citoarquitectura conservada del tejido contuso, podría explicar la diferencia en la proporción de neuronas FJC-positivas (16 veces mayor) de estos sectores respecto del tejido control, este incremento solo representa el 3% del número de neuronas NeuN-positivas totales en un campo de conteo. Esta observación puede indicar que cuando se usa como criterio la cuantificación de las neuronas NeuN-positivas normales, quizá no todas las células en degeneración quedan incluidas en la valoración. Sin embargo, estudios previos ya han reportado que un volumen

significativo de tejido del foco contuso presenta daño irreversible (Cunningham et al., 2005; Wu et al., 2013), y quizá este volumen está más relacionado con el 61% de células NeuN-positivas anormalmente marcadas que nosotros reportamos en los sectores de citoarquitectura conservada. Por lo tanto, creemos que nuestro criterio para cuantificar las neuronas en degeneración apunta sólo a aquellas células en acidofilia total, el signo final de la muerte celular, excluyendo así a las células en estados intermedios de lesión.

Recientemente se identificó que NeuN es Fox-3, un factor de *splicing* alternativo (Kim et al., 2009), lo cual podría significar que los cambios en la IR de NeuN pueden estar relacionados con el rol de la proteína en la plasticidad neuronal y la respuesta celular a la lesión, además de su participación en el neurodesarrollo. Entonces, la pérdida de la marcación normal de NeuN puede dar cuenta de las diferentes fases de neurodegeneración celular mostradas por FJC en las regiones con citoarquitectura conservada y en el tejido post-mortem. Por lo tanto, los cambios en la IR normal de NeuN pueden representar poblaciones diversas de neuronas capturadas en tiempo real durante momentos metabólicos mixtos, los cuales concurren en la respuesta aguda y secundaria al TCE. Finalmente, el presente estudio al reportar grados mixtos de neurodegeneración celular en las regiones de la contusión cerebral con aparente preservación de la estructura cortical, destaca la necesidad de considerar otros criterios adicionales al de la preservación morfológica, para tratar de identificar la “penumbra traumática”.

Conclusiones

El presente documento recopila una serie de investigaciones que en conjunto estudiaron cualitativa y cuantitativamente las variaciones morfológicas, tanto histológicas en general como específicas al nivel celular (de poblaciones y subpoblaciones celulares, así como de cambios subcelulares en las mismas) del tejido cortical contuso proveniente de pacientes que sufrieron TCE severo y que debieron ser llevados a cirugía decompresiva.

Entre los estudios realizados, se hicieron varios hallazgos notables sobre el comportamiento celular y tisular en la contusión cerebral en el humano. La mayoría de estos hallazgos no tienen antecedente en tejido humano en general o en tejido humano extraído por craniectomía durante la fase aguda o subaguda del TCE severo. A continuación se enuncian dichos hallazgos:

- Dentro una misma región de la contusión, se encuentran sectores con diferentes grados de compromiso celular debido al TCE, manifestados en los cambios en la expresión de diversos biomarcadores neuronales (NeuN, MAP2, PV, CB y CR) y gliales (GFAP), así como de neurodegeneración celular (Fluoro Jade C). En la contusión cerebral se hallan desde sectores con aparente conservación de la citoarquitectura, tal cual se observa en el tejido control post-mortem, hasta sectores con parches de pérdida total de la IR para todos estos marcadores. Estos tipos de sectores, aparentemente extremos, se presentan simultáneamente en el nivel microscópico,

adyacentes uno del otro, incluso intercalados entre ellos. Este hallazgo (completamente novedoso) se constituye en uno de los más importantes de toda la investigación, ya que los sectores preservados son susceptibles de ser estudiados para buscar alternativas terapéuticas al TCE.

- Otro hallazgo importante fue la identificación del compromiso particular de las láminas corticales III y V, y principalmente de la lámina III. La mayoría de las neuronas ubicadas en estas láminas corticales (neuronas piramidales) poseen axones largos a través de los cuales el área cortical en la que se encuentran, realizan sus conexiones cortico-corticales y cortico-subcorticales a través de la sustancia blanca.
- Las alteraciones identificadas en la proteína del citoesqueleto neuronal MAP-2, se traducen para las neuronas piramidales en un encogimiento de la dendrita y sus ramificaciones, lo que conlleva a la desconexión de sus espinas dendríticas y a la consecuente pérdida de sus aferencias corticales y talámicas.
- Los cambios en la expresión de las CaBPs observados en el presente estudio, implican una alteración generalizada del componente inhibitorio de la corteza cerebral. No obstante, estos cambios son específicos entre subpoblaciones de interneuronas y entre las láminas corticales en las cuales se distribuyen, encontrándose disminución de las células PV-positivas y al mismo tiempo incrementos de las células CB- y CR-positivas, lo cual podría traducirse como un intento del componente por re-encontrar el balance excitación/inhibición perdido como consecuencia del TCE. Este hallazgo también es de gran importancia, dado que los cambios observados podrían dar sustento neurobiológico al posible desarrollo de trastornos epileptiformes en los pacientes que sobreviven al TCE. De hecho, la publicación lograda con estos datos ha tenido notable impacto entre la comunidad científica interesada en el estudio de la epilepsia post-

traumática (10 citaciones hasta el momento), ya que los resultados obtenidos por nosotros, en muchos casos remedan aquellos de los modelos animales durante la fase de la epileptogénesis.

- Se observó reactividad glial alrededor de los sectores de parche en la sustancia gris, y en la sustancia blanca subcortical en general, al mismo tiempo que su ausencia dentro de los sectores de parche. La observación de ausencia de astrocitos GFAP-positivos dentro de los parches refuerza nuestra interpretación sobre que en estos sectores de la contusión cerebral ocurren procesos de muerte celular de tipo necrótico que afectan todos los tipos celulares, incluyendo a los astrocitos. Sin embargo, las implicaciones fisiológicas del incremento de la expresión de GFAP en el tejido contuso de humano son difíciles de establecer, ya que al presente no es claro si el efecto de la reactividad glial sea benéfico o perjudicial para este.
- Encontramos neuronas en degeneración dentro de los sectores de parche, así como en los sectores con citoarquitectura conservada de la contusión cerebral. Y lo más importante, determinamos que el grado de neurodegeneración celular se corresponde con el nivel de compromiso de la citoarquitectura neuronal.
- Basados en nuestros hallazgos, nosotros proponemos que los mecanismos fisiopatológicos responsables de la muerte neuronal en el tejido contuso después de TCE, pueden diferir notablemente de aquellos en la isquemia cerebral y deben ser completamente elucidados para lograr proponer umbrales morfológicos y fisiológicos apropiados para determinar el foco y la penumbra de la contusión en el TCE humano.
- Proponemos que la pérdida histológica de la IR para NeuN puede ser utilizada en adelante, como un indicativo de la pérdida neuronal en las zonas de parche de las contusiones cerebrales de pacientes que

padecieron TCE. Nuestros hallazgos sugieren además, que las neuronas observables dentro del área de parche, corresponden muy probablemente a células moribundas.

- El presente estudio al reportar grados mixtos de neurodegeneración celular en las regiones de la contusión cerebral con aparente preservación de la estructura cortical, destaca la necesidad de considerar otros criterios adicionales al de la preservación morfológica, para tratar de identificar la “penumbra traumática”.

Perspectivas

En el presente estudio se llevó a cabo una amplia descripción del comportamiento histológico de la contusión cerebral cuando ésta se extrae tempranamente por craniectomía decompresiva. Después de analizar todos los hallazgos producto de este estudio, nos surgen las siguientes preguntas: ¿Qué sucede cuando ese tejido contuso continúa in situ? ¿Cuáles es el efecto a mediano y largo plazo para el tejido adyacente a la contusión? ¿Cuál es el destino final de los sectores con citoarquitectura conservada, terminan recuperándose o por morir? Porque no siempre es necesario llevar al paciente con TCE severo a cirugía decompresiva, y aún menos, que durante la cirugía se deba o pueda extraer la contusión.

Al respecto, ya tenemos dos avances importantes: 1. La implementación de un modelo de cultivo organotípico de tajadas agudas de cerebro, el cual inicialmente se estandarizó utilizando tejido contuso de humano, proveniente de algunas de las muestras aquí analizadas. Los hallazgos preliminares del uso de esta técnica ya están publicados (Riascos et al., 2008); y 2. La implementación de un modelo animal en ratas de TCE con lesión axonal difusa, el cual es el tipo más común de mecanismo de lesión traumática en los humanos. En los cerebros extraídos de estos animales con TCE también se está llevando a cabo el cultivo organotípico de tajadas agudas. En los estudios preliminares de éste modelo (2 tesis de maestría), además de corroborar la lesión axonal difusa, también se ha identificado el mismo fenómeno de pérdida de la IR para NeuN en parches, ubicados en la corteza dorsolateral de la rata; por lo tanto, en este tejido podremos intentar resolver las

preguntas ya planteadas sin depender de la difícil consecución de tejido cerebral de humano.

En el presente estudio, se analizó histológicamente la expresión de varias proteínas (NeuN, MAP2, CB, PV, CR y GFAP), y se valoró cuantitativamente una de estas (NeuN a través de Western Blot), pero nos surge la pregunta: ¿correlacionan los hallazgos histológicos de estas proteínas con la expresión de sus respectivos genes en el tejido contuso, o de genes que expresen proteínas asociadas a las ya estudiadas? Al respecto, se tiene un avance notable, y es el perfil de expresión génica a través de microarrays de ADN, en algunas de las muestras aquí analizadas. El resultado fueron más de 1.100 genes diferencialmente expresados después del TCE, pero el análisis y el estudio pormenorizado de estos genes es una tarea monumental que apenas comienza. A continuación se enlistan algunos resultados de este avance:

1. Becerra L., Buriticá E., Escobar M.I., Pimienta H.J., Overregulation of Alpha B Crystallin is a marker of reactive astrocytes in the acute response after cerebral contusion in humans. *Journal of Neurochemistry*, 2012 122(supl. 1): 12. Comunicación corta
2. Rodas Y., Becerra L.V., Buriticá E., Peña S., Pimienta H.J., Perfil de expresión génica en trauma craneoencefálico en humanos. *Acta Biológica Colombiana*, 2008 13(2): 245. Comunicación corta
3. Rodas Y, Becerra LV, Buriticá E, Guzmán F, Escobar MI, Pimienta HJ, Expresión de genes relacionados con procesos de cognición y enfermedad de Alzheimer en el lóbulo frontal humano posterior a trauma craneoencefálico. *Revista Ciencias de la Salud*, 2012 10(1): 127. Comunicación corta

Se espera en el futuro cercano, continuar explorando qué sucede con otros biomarcadores en las contusiones y en general, en el tejido con TCE, haciendo uso del modelo animal antes mencionado. Así mismo, se espera continuar

explorando la respuesta y evolución temporal del tejido como si continuara in situ en el modelo del cultivo organotípico de tajadas agudas de cerebro. También en el corto plazo, se pretende implementar ensayos con fármacos candidatos a ser neuroprotectores, tanto en el tejido in situ como en el tejido en cultivo.

Referencias bibliográficas

- Adamchik, Y., Frantseva, M., Weisspapir, M., Carlen, P., & Perez-Velazquez, J. (2000). Methods to induce primary and secondary traumatic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Research Protocols*, 5(2), 153–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10775835>
- Adams, J., Jennett, B., Murray, L., Teasdale, G., Gennarelli, T., & Graham, D. (2011). Neuropathological findings in disabled survivors of a head injury. *Journal of Neurotrauma*, 28(5), 701–9. doi:10.1089/neu.2010.1733
- Agha, A., Rogers, B., Mylotte, D., Taleb, F., Tormey, W., Phillips, J., & Thompson, C. (2004). Neuroendocrine dysfunction in the acute phase of traumatic brain injury. *Clinical Endocrinology*, 60(5), 584–91. doi:10.1111/j.1365-2265.2004.02023.x
- Agha, A., Rogers, B., Sherlock, M., O’Kelly, P., Tormey, W., Phillips, J., & Thompson, C. (2004). Anterior pituitary dysfunction in survivors of traumatic brain injury. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(10), 4929–36. doi:10.1210/jc.2004-0511
- Agha, A., & Thompson, C. (2006). Anterior pituitary dysfunction following traumatic brain injury (TBI). *Clinical Endocrinology*, 64(5), 481–8. doi:10.1111/j.1365-2265.2006.02517.x
- Aimaretti, G., & Ghigo, E. (2005). Traumatic brain injury and hypopituitarism. *The Scientific World Journal*, 5, 777–81. doi:10.1100/tsw.2005.100
- Akulinin, V. A., & Dahlstrom, A. (2003). Quantitative analysis of MAP2 immunoreactivity in human neocortex of three patients surviving after brain ischemia. *Neurochemical Research*, 28(2), 373–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12608711>

- Albert-Weissenberger, C., & Sirén, A.-L. (2010). Experimental traumatic brain injury. *Experimental & Translational Stroke Medicine*, 2(1), 16. doi:10.1186/2040-7378-2-16
- Anderson, C. M., & Swanson, R. A. (2000). Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, 32(1), 1–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10975906>
- Anderson, K., Miller, K., Fugaccia, I., & Scheff, S. (2005). Regional distribution of fluoro-jade B staining in the hippocampus following traumatic brain injury. *Experimental Neurology*, 193(1), 125–30. doi:10.1016/j.expneurol.2004.11.025
- Anderson, R., & Opeskin, K. (1998). Timing of early changes in brain trauma. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 19(1), 1–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9539384>
- Andressen, C., Blümcke, I., & Celio, M. R. (1993). Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell and Tissue Research*, 271(2), 181–208. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8453652>
- Annegers, J. F., & Coan, S. P. (2000). The risks of epilepsy after traumatic brain injury. *Seizure*, 9(7), 453–7. doi:10.1053/seiz.2000.0458
- Annegers, J. F., Hauser, W. A., Coan, S. P., & Rocca, W. A. (1998). A population-based study of seizures after traumatic brain injuries. *The New England Journal of Medicine*, 338(1), 20–4. doi:10.1056/NEJM199801013380104
- Arango-Dávila, C. a., Cardona-Gomez, G. P., Gallego-Gomez, J. C., Garcia-Segura, L. M., & Pimienta, H. J. (2004). Down-regulation of Bcl-2 in rat substantia nigra after focal cerebral ischemia. *NeuroReport*, 15(9), 1437–1441. doi:10.1097/01.wnr.0000131010.74494.75
- Ashman, T. A., Gordon, W. A., Cantor, J. B., & Hibbard, M. R. (2006). Neurobehavioral Consequences of Traumatic Brain Injury. *The Mont Sinai Journal of Medicine*, 73(7), 999–1005.
- Astrup, J., Siesjö, B. K., & Symon, L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 12(6), 723–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6272455>
- Avramescu, S., Nita, D., & Timofeev, I. (2009). Neocortical post-traumatic epileptogenesis is associated with loss of GABAergic neurons. *Journal of Neurotrauma*, 812(May), 799–812. Retrieved from <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/neu.2008.0739>

- Balan, I. S., Saladino, A. J., Aarabi, B., Castellani, R. J., Wade, C., Stein, D. M., ... Fiskum, G. (2013). Cellular alterations in human traumatic brain injury: changes in mitochondrial morphology reflect regional levels of injury severity. *Journal of Neurotrauma*, 30(5), 367–81. doi:10.1089/neu.2012.2339
- Bao, Y., Bramlett, H. M., Atkins, C. M., Truettner, J. S., Lotocki, G., Alonso, O. F., & Dietrich, W. D. (2011). Post-traumatic seizures exacerbate histopathological damage after fluid-percussion brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 28(1), 35–42. doi:10.1089/neu.2010.1383
- Barbado, M. V, Briñón, J. G., Weruaga, E., Porteros, A., Arévalo, R., Aijón, J., & Alonso, J. R. (2002). Changes in immunoreactivity to calcium-binding proteins in the anterior olfactory nucleus of the rat after neonatal olfactory deprivation. *Experimental Neurology*, 177(1), 133–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12429217>
- Barbas, H., & Pandya, D. N. (1989). Architecture and intrinsic connections of the prefrontal cortex in the rhesus monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, 286(3), 353–75. doi:10.1002/cne.902860306
- Barbas, H., & Rempel-Clower, N. (1997). Cortical structure predicts the pattern of corticocortical connections. *Cerebral Cortex*, 7(7), 635–646. doi:10.1093/cercor/7.7.635
- Baron, J. C. (1999). Mapping the ischaemic penumbra with PET: implications for acute stroke treatment. *Cerebrovascular Diseases (Basel, Switzerland)*, 9(4), 193–201. doi:15955
- Baugh, C. M., Stamm, J. M., Riley, D. O., Gavett, B. E., Shenton, M. E., Lin, A., ... Stern, R. A. (2012). Chronic traumatic encephalopathy: neurodegeneration following repetitive concussive and subconcussive brain trauma. *Brain Imaging and Behavior*, 6(2), 244–54. doi:10.1007/s11682-012-9164-5
- Baxter, D., Sharp, D. J., Feeney, C., Papadopoulou, D., Ham, T. E., Jilka, S., ... Goldstone, A. P. (2013). Pituitary dysfunction after blast traumatic brain injury: The UK BIOSAP study. *Annals of Neurology*, 74(4), 527–36. doi:10.1002/ana.23958
- Beasley, C., & Reynolds, G. (1997). Parvalbumin-immunoreactive neurons are reduced in the prefrontal cortex of schizophrenics. *Schizophrenia Research*, 24(3), 349–355. doi:10.1016/S0920-9964(96)00122-3
- Beasley, C., Zhang, Z., Patten, I., & Reynolds, G. (2002). Selective deficits in prefrontal cortical GABAergic neurons in schizophrenia defined by the

presence of calcium-binding proteins. *Biological Psychiatry*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006322302013604>

- Beer, R., Franz, G., Srinivasan, a., Hayes, R. L., Pike, B. R., Newcomb, J. K., ... Kampfl, a. (2002). Temporal Profile and Cell Subtype Distribution of Activated Caspase-3 Following Experimental Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurochemistry*, 75(3), 1264–1273. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0751264.x
- Bellander, B. M., Singhrao, S. K., Ohlsson, M., Mattsson, P., & Svensson, M. (2001). Complement activation in the human brain after traumatic head injury. *Journal of Neurotrauma*, 18(12), 1295–311. doi:10.1089/08977150152725605
- Beschorner, R., Nguyen, T. D., Gözalan, F., Pedal, I., Mattern, R., Schluesener, H. J., ... Schwab, J. M. (2002). CD14 expression by activated parenchymal microglia/macrophages and infiltrating monocytes following human traumatic brain injury. *Acta Neuropathologica*, 103(6), 541–9. doi:10.1007/s00401-001-0503-7
- Bigler, E. D., & Maxwell, W. L. (2012). Neuropathology of mild traumatic brain injury: relationship to neuroimaging findings. *Brain Imaging and Behavior*, 6(2), 108–36. doi:10.1007/s11682-011-9145-0
- Blumcke, I., Beck, H., Nitsch, R., Eickhoff, C., Scheffler, B., Celio, M. R., ... Wiestler, O. D. (1996). Preservation of calretinin-immunoreactive neurons in the hippocampus of epilepsy patients with Ammon's horn sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 55(3), 329–41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8786391>
- Bondanelli, M., Ambrosio, M. R., Zatelli, M. C., De Marinis, L., & degli Uberti, E. C. (2005). Hypopituitarism after traumatic brain injury. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, 152(5), 679–91. doi:10.1530/eje.1.01895
- Bouma, G. J., & Muizelaar, J. P. (1992). Cerebral blood flow, cerebral blood volume, and cerebrovascular reactivity after severe head injury. *Journal of Neurotrauma*, 9 Suppl 1, S333–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1588625>
- Bower, J. H., Maraganore, D. M., Peterson, B. J., McDonnell, S. K., Ahlskog, J. E., & Rocca, W. A. (2003). Head trauma preceding PD: a case-control study. *Neurology*, 60(10), 1610–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12771250>
- Bramlett, H. M., & Dietrich, W. D. (2004). Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. *Journal of Cerebral Blood Flow*

and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 24(2), 133–50.
doi:10.1097/01.WCB.0000111614.19196.04

- Bramlett, H. M., Dietrich, W. D., Green, E. J., & Busto, R. (1997). Chronic histopathological consequences of fluid-percussion brain injury in rats: effects of post-traumatic hypothermia. *Acta Neuropathologica*, 93(2), 190–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039468>
- Bruns, J., & Hauser, W. A. (2003). The epidemiology of traumatic brain injury: a review. *Epilepsia*, 44 Suppl 1, 2–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14511388>
- Bryant, R. A., O'Donnell, M. L., Creamer, M., McFarlane, A. C., Clark, C. R., & Silove, D. (2010). The psychiatric sequelae of traumatic injury. *The American Journal of Psychiatry*, 167(3), 312–20. doi:10.1176/appi.ajp.2009.09050617
- Budohoski, K. P., Czosnyka, M., de Riva, N., Smielewski, P., Pickard, J. D., Menon, D. K., ... Lavinio, A. (2012). The relationship between cerebral blood flow autoregulation and cerebrovascular pressure reactivity after traumatic brain injury. *Neurosurgery*, 71(3), 652–60; discussion 660–1. doi:10.1227/NEU.0b013e318260feb1
- Bullock, R., Maxwell, W. L., Graham, D. I., Teasdale, G. M., & Adams, J. H. (1991). Glial swelling following human cerebral contusion: an ultrastructural study. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 54(5), 427–34. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=488543&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Buriticá, E., & Pimienta, H. (2007). Corteza frontopolar humana: Área 10. *Revista Latinoamericana de Psicología*, 39(1), 127–142.
- Buriticá, E., Villamil, L., Guzmán, F., Escobar, M., García-Cairasco, N., & Pimienta, H. (2009). Changes in calcium-binding protein expression in human cortical contusion tissue. *Journal of Neurotrauma*, 26(12), 2145–2155.
- Bush, T. G., Puvanachandra, N., Horner, C. H., Polito, A., Ostensfeld, T., Svendsen, C. N., ... Sofroniew, M. V. (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*, 23(2), 297–308. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10399936>
- Calvo, J. L., Carbonell, A. L., & Boya, J. (1991). Co-expression of glial fibrillary acidic protein and vimentin in reactive astrocytes following brain injury in rats.

Brain Research, 566(1-2), 333–6. Retrieved from
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1814551>

- Carbonell, W. S., & Grady, M. S. (1999). Regional and temporal characterization of neuronal, glial, and axonal response after traumatic brain injury in the mouse. *Acta Neuropathologica*, 98(4), 396–406. doi:10.1007/s004010051100
- Castro, O. W., Furtado, M. a, Tilelli, C. Q., Fernandes, a, Pajolla, G. P., & Garcia-Cairasco, N. (2011). Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. *Brain Research*, 1374, 43–55. doi:10.1016/j.brainres.2010.12.012
- Cernak, I. (2005). Animal models of head trauma. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 2(3), 410–22. doi:10.1602/neurorx.2.3.410
- Chauhan, N. B. (2014). Chronic neurodegenerative consequences of traumatic brain injury. *Restorative Neurology and Neuroscience*, 32(2), 337–365.
- Chen, S., Pickard, J. D., & Harris, N. G. (2003). Time course of cellular pathology after controlled cortical impact injury. *Experimental Neurology*, 182(1), 87–102. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12821379>
- Chen, Y., & Swanson, R. (2003). Astrocytes and brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 137–149. doi:10.1097/01.WCB.0000044631.80210.3C
- Chen, Y., Vartiainen, N. E., Ying, W., Chan, P. H., Koistinaho, J., & Swanson, R. A. (2001). Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism. *Journal of Neurochemistry*, 77(6), 1601–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11413243>
- Chieriegato, A., & Fainardi, E. (2008). Potential role of surgery in traumatic focal brain lesions as revealed by functional imaging. *Intensive Care Medicine*, 34(11), 2125–6. doi:10.1007/s00134-008-1182-9
- Cicchetti, F., Prensa, L., Wu, Y., & Parent, A. (2000). Chemical anatomy of striatal interneurons in normal individuals and in patients with Huntington's disease. *Brain Research. Brain Research Reviews*, 34(1-2), 80–101. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11086188>
- Clark, R. S., Kochanek, P. M., Chen, M., Watkins, S. C., Marion, D. W., Chen, J., ... Graham, S. H. (1999). Increases in Bcl-2 and cleavage of caspase-1 and

caspase-3 in human brain after head injury. *FASEB Journal*, 13, 813–821.
Retrieved from <http://www.fasebj.org/content/13/8/813.short>

Clark, R. S., Kochanek, P. M., Watkins, S. C., Chen, M., Dixon, C. E., Seidberg, N. A., ... Graham, S. H. (2001). Caspase-3 Mediated Neuronal Death After Traumatic Brain Injury in Rats. *Journal of Neurochemistry*, 74(2), 740–753. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.740740.x

Clausen, F. (2004). *Delayed Cell Death after Traumatic Brain Injury*.

Coles, J. P., Fryer, T. D., Smielewski, P., Chatfield, D. A., Steiner, L. A., Johnston, A. J., ... Menon, D. K. (2004). Incidence and mechanisms of cerebral ischemia in early clinical head injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 24(2), 202–11. doi:10.1097/01.WCB.0000103022.98348.24

Colicos, M. A., Dixon, C. E., & Dash, P. K. (1996). Delayed, selective neuronal death following experimental cortical impact injury in rats: possible role in memory deficits. *Brain Research*, 739(1-2), 111–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8955931>

Collombet, J.-M., Masqueliez, C., Four, E., Burckhart, M.-F., Bernabé, D., Baubichon, D., & Lallement, G. (2006). Early reduction of NeuN antigenicity induced by soman poisoning in mice can be used to predict delayed neuronal degeneration in the hippocampus. *Neuroscience Letters*, 398(3), 337–42. doi:10.1016/j.neulet.2006.01.029

Condé, F., Lund, J. S., Jacobowitz, D. M., Baimbridge, K. G., & Lewis, D. A. (1994). Local circuit neurons immunoreactive for calretinin, calbindin D-28k or parvalbumin in monkey prefrontal cortex: distribution and morphology. *The Journal of Comparative Neurology*, 341(1), 95–116. doi:10.1002/cne.903410109

Conti, A., & Raghupathi, R. (1998). Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period. *The Journal of ...*, 18(15), 5663–5672. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/18/15/5663.short>

Cooper, D., & Rosenfeld, J. (2011). Decompressive craniectomy in diffuse traumatic brain injury. ... *England Journal of ...*, 1493–1502. Retrieved from <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1102077>

Coronado, V. G., Xu, L., Basavaraju, S. V., McGuire, L. C., Wald, M. M., Faul, M. D., ... Hemphill, J. D. (2011). Surveillance for Traumatic Brain Injury – Related Deaths — United States , 1997 – 2007. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 60(5), 1997–2007. doi:2011-723-011/21044

- Corrigan, J. D., Selassie, A. W., & Orman, J. A. L. (2010). The epidemiology of traumatic brain injury. *The Journal of Head Trauma Rehabilitation*, 25(2), 72–80. doi:10.1097/HTR.0b013e3181ccc8b4
- Cunningham, A., Salvador, R., Coles, J., Chatfield, D., Bradley, P., Johnston, A., ... Menon, D. (2005). Physiological thresholds for irreversible tissue damage in contusional regions following traumatic brain injury. *Brain*, 128(Pt 8), 1931–42. doi:10.1093/brain/awh536
- D'Ambrosio, R., & Perucca, E. (2004). Epilepsy after head injury. *Current Opinion in Neurology*, 17(6), 731–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2672045&tool=pmc&rendertype=abstract>
- Daviss, S., & Lewis, D. (1995). Local circuit neurons of the prefrontal cortex in schizophrenia: selective increase in the density of calbindin-immunoreactive neurons. *Psychiatry Research*, 59, 81–96. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0165178195027203>
- Dawodu, S., & Thom, M. (2005). Quantitative neuropathology of the entorhinal cortex region in patients with hippocampal sclerosis and temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*, 46(1), 23–30. doi:10.1111/j.0013-9580.2005.21804.x
- DeFelipe, J. (1989). Visualization of chandelier cell axons by parvalbumin immunoreactivity in monkey cerebral cortex. *Proceedings of the ...*, 86(March 1989), 2093–2097. Retrieved from <http://www.pnas.org/content/86/6/2093.short>
- DeFelipe, J. (1997). Types of neurons, synaptic connections and chemical characteristics of cells immunoreactive for calbindin-D28K, parvalbumin and calretinin in the neocortex. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891061897100138>
- DeFelipe, J. (1999). Chandelier cells and epilepsy. *Brain*, 122(10), 1807–1822. doi:10.1093/brain/122.10.1807
- Defelipe, J., González-Albo, M. C., Del Río, M. R., & Elston, G. N. (1999). Distribution and patterns of connectivity of interneurons containing calbindin, calretinin, and parvalbumin in visual areas of the occipital and temporal lobes of the macaque monkey. *The Journal of Comparative Neurology*, 412(3), 515–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10441237>
- Dennis, A. M., Haselkorn, M. L., Vagni, V. a, Garman, R. H., Janesko-Feldman, K., Bayir, H., ... Kochanek, P. M. (2009). Hemorrhagic shock after experimental

- traumatic brain injury in mice: effect on neuronal death. *Journal of Neurotrauma*, 26(6), 889–99. doi:10.1089/neu.2008.0512
- Dietrich, W. D., Alonso, O., & Halley, M. (1994). Early microvascular and neuronal consequences of traumatic brain injury: a light and electron microscopic study in rats. *Journal of Neurotrauma*, 11(3), 289–301. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7996583>
- Dixon, C. E., Clifton, G. L., Lighthall, J. W., Yaghmai, A. A., & Hayes, R. L. (1991). A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *Journal of Neuroscience Methods*, 39(3), 253–62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1787745>
- Dombrowski, S., Hilgetag, C., & Barbas, H. (2001). Quantitative architecture distinguishes prefrontal cortical systems in the rhesus monkey. *Cerebral Cortex*, 975–988. Retrieved from <http://cercor.oxfordjournals.org/content/11/10/975.short>
- Domoráková, I., Burda, J., Mechírová, E., & Feriková, M. (2006). Mapping of rat hippocampal neurons with NeuN after ischemia/reperfusion and Ginkgo biloba extract (EGb 761) pretreatment. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 26(7-8), 1193–204. doi:10.1007/s10571-006-9080-6
- Dressler, J., Hanisch, U., Kuhlisch, E., & Geiger, K. D. (2007). Neuronal and glial apoptosis in human traumatic brain injury. *International Journal of Legal Medicine*, 121(5), 365–75. doi:10.1007/s00414-006-0126-6
- Eddleston, M., & Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience*, 54(1), 15–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8515840>
- Eng, L. F., & Ghirnikar, R. S. (1994). GFAP and astrogliosis. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 4(3), 229–37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7952264>
- Escobar, M., Guzmán, F., Buriticá, E., Riascos, D., Villamil, L., & Pimienta, H. (2008). Alteración de la organización laminar y de la dendroarquitectura de la corteza cerebral del humano post-trauma craneoencefálico. *Colombia Médica*, 39(Supl 3), 51–59. Retrieved from <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/handle/10893/4205>
- Escobar, M., Pimienta, H., Jr, V. C., Jacobson, M., Crandall, J., & Kosik, K. (1986). Architecture of apical dendrites in the murine neocortex: dual apical dendritic systems. *Neuroscience*. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0306452286900746>

- Fajardo, C., Escobar, M. I., Buriticá, E., Arteaga, G., Umbarila, J., Casanova, M. F., & Pimienta, H. (2008). Von Economo neurons are present in the dorsolateral (dysgranular) prefrontal cortex of humans. *Neuroscience Letters*, 435(3), 215–218.
- Farber, J. L. (1982). Biology of disease: membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 47(2), 114–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7109537>
- Farber, J. L., Chien, K. R., & Mitnacht, S. (1981). Myocardial ischemia: the pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *The American Journal of Pathology*, 102(2), 271–81. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1903688&tool=pmc&rendertype=abstract>
- Faulkner, J. R., Herrmann, J. E., Woo, M. J., Tansey, K. E., Doan, N. B., & Sofroniew, M. V. (2004). Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(9), 2143–55. doi:10.1523/JNEUROSCI.3547-03.2004
- Ferguson, P. L., Smith, G. M., Wannamaker, B. B., Thurman, D. J., Pickelsimer, E. E., & Selassie, A. W. (2010). A population-based study of risk of epilepsy after hospitalization for traumatic brain injury. *Epilepsia*, 51(5), 891–8. doi:10.1111/j.1528-1167.2009.02384.x
- Ferrer, I., Tuñón, T., Serrano, M. T., Casas, R., Alcántara, S., Zújar, M. J., & Rivera, R. M. (1993). Calbindin D-28k and parvalbumin immunoreactivity in the frontal cortex in patients with frontal lobe dementia of non-Alzheimer type associated with amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 56(3), 257–61. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1014857&tool=pmc&rendertype=abstract>
- Finnie, J. (2001). Animal models of traumatic brain injury: a review. *Australian Veterinary Journal*, 79(9), 628–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11702936>
- Fleminger, S. (2008). Long-term psychiatric disorders after traumatic brain injury. *European Journal of Anaesthesiology*, 25 - Suppl, 123–30. doi:10.1017/S0265021507003250
- Fonseca, M., Soriano, E., Ferrer, I., Martinez, A., & Tuñón, T. (1993). Chandelier cell axons identified by parvalbumin-immunoreactivity in the normal human

- temporal cortex and in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 55(4), 1107–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8232900>
- Freund, T. F., Buzsáki, G., Leon, A., Baimbridge, K. G., & Somogyi, P. (1990). Relationship of neuronal vulnerability and calcium binding protein immunoreactivity in ischemia. *Experimental Brain Research*, 83(1), 55–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2073950>
- Frey, L. C. (2003). Epidemiology of posttraumatic epilepsy: a critical review. *Epilepsia*, 44 Suppl 1, 11–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14511389>
- Frugier, T., Morganti-Kossmann, M. C., O'Reilly, D., & McLean, C. A. (2010). In situ detection of inflammatory mediators in post mortem human brain tissue after traumatic injury. *Journal of Neurotrauma*, 27(3), 497–507. doi:10.1089/neu.2009.1120
- Fujimoto, S., Katsuki, H., Ohnishi, M., Takagi, M., Kume, T., & Akaike, A. (2007). Thrombin induces striatal neurotoxicity depending on mitogen-activated protein kinase pathways in vivo. *Neuroscience*, 144(2), 694–701. doi:10.1016/j.neuroscience.2006.09.049
- Furutani, R., & Kibayashi, K. (2012). Morphological alteration and reduction of MAP2-immunoreactivity in pyramidal neurons of cerebral cortex in a rat model of focal cortical compression. *Journal of Neurotrauma*, 29(6), 1266–76. doi:10.1089/neu.2010.1630
- Gahm, C., Holmin, S., & Mathiesen, T. (2002). Nitric oxide synthase expression after human brain contusion. *Neurosurgery*, 50(6), 1319–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12015851>
- Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2007). Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation*, 14(7), 1237–43. doi:10.1038/sj.cdd.4402148
- Garcia, J. H., Liu, K. F., & Ho, K. L. (1995). Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in Wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. *Stroke*, 26(4), 636–42; discussion 643. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7709411>
- Gardner, A., Iverson, G. L., & McCrory, P. (2014). Chronic traumatic encephalopathy in sport: a systematic review. *British Journal of Sports Medicine*, 48(2), 84–90. doi:10.1136/bjsports-2013-092646

- Gemmell, E. (2013). *NEURONAL CHANGES IN THE HIPPOCAMPUS OF POST-STROKE SURVIVORS*. Newcastle University.
- Gennarelli, T. A. (1994). Animate models of human head injury. *Journal of Neurotrauma*, 11(4), 357–68. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7837277>
- Ginsberg, M. D., Belayev, L., Zhao, W., Huh, P. W., & Busto, R. (1999). The acute ischemic penumbra: topography, life span, and therapeutic response. *Acta Neurochirurgica. Supplement*, 73, 45–50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10494340>
- Gittins, R., & Harrison, P. (2004). Neuronal density, size and shape in the human anterior cingulate cortex: a comparison of Nissl and NeuN staining. *Brain Research Bulletin*, 63(2), 155–60. doi:10.1016/j.brainresbull.2004.02.005
- Goldman, S. M., Kamel, F., Ross, G. W., Jewell, S. A., Bhudhikanok, G. S., Umbach, D., ... Tanner, C. M. (2012). Head injury, α -synuclein Rep1, and Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 71(1), 40–8. doi:10.1002/ana.22499
- Golstein, P., & Kroemer, G. (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(1), 37–43. doi:10.1016/j.tibs.2006.11.001
- González-Albo, M., Elston, G., & DeFelipe, J. (2001). The human temporal cortex: characterization of neurons expressing nitric oxide synthase, neuropeptides and calcium-binding proteins, and their glutamate receptor. *Cerebral Cortex*, 1170–1181. Retrieved from <http://cercor.oxfordjournals.org/content/11/12/1170.short>
- Graef, J. D., & Godwin, D. W. (2010). Intrinsic plasticity in acquired epilepsy: too much of a good thing? *The Neuroscientist: A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 16(5), 487–95. doi:10.1177/1073858409358776
- Graham, D. I., Gennarelli, T. A., & McIntosh, T. K. (2002). Trauma. In D. I. Graham & P. L. Lantos (Eds.), *Greenfield's Neuropathology* (Seventh ed., pp. 823–898). London: Hodder Arnold Publication. Retrieved from <http://www.amazon.com/Greenfields-Neuropathology-Volume-CD-ROM-Publication/dp/0340806613>
- Guzmán, F., Moreno, M. C., & Montoya, A. (2008). Evolución de los pacientes con trauma craneoencefalico en el Hospital Universitario del Valle: Seguimiento a 12 meses. *Colomb. Méd*, 39(3,supl), 25–28. Retrieved from

<http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=573397&indexSearch=ID>

- Hakim, A. M. (1987). The cerebral ischemic penumbra. *The Canadian Journal of Neurological Sciences. Le Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 14(4), 557–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2446732>
- Hall, E., Bryant, Y., Cho, W., & Sullivan, P. (2008). Evolution of post-traumatic neurodegeneration after controlled cortical impact traumatic brain injury in mice and rats as assessed by the de Olmos silver and fluorojade staining methods. *Journal of Neurotrauma*, 25(3), 235–47. doi:10.1089/neu.2007.0383
- Hall, E., & Sullivan, P. (2005). Spatial and temporal characteristics of neurodegeneration after controlled cortical impact in mice: more than a focal brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 22(2), 252–265. Retrieved from <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/neu.2005.22.252>
- Hamberger, A., Viano, D. C., Säljö, A., & Bolouri, H. (2009). Concussion in professional football: morphology of brain injuries in the NFL concussion model--part 16. *Neurosurgery*, 64(6), 1174–82; discussion 1182. doi:10.1227/01.NEU.0000316855.40986.2A
- Hang, C.-H., Chen, G., Shi, J.-X., Zhang, X., & Li, J.-S. (2006). Cortical expression of nuclear factor kappaB after human brain contusion. *Brain Research*, 1109(1), 14–21. doi:10.1016/j.brainres.2006.06.045
- Haranishi, Y., Kawata, R., Fukuda, S., Kiyoshima, T., Morimoto, Y., Matsumoto, M., & Sakabe, T. (2005). Moderate hypothermia, but not calpain inhibitor 2, attenuates the proteolysis of microtubule-associated protein 2 in the hippocampus following traumatic brain injury in rats. *European Journal of Anaesthesiology*, 22(2), 140–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15816594>
- Harris, M. A., Shen, H., Marion, S. A., Tsui, J. K. C., & Teschke, K. (2013). Head injuries and Parkinson's disease in a case-control study. *Occupational and Environmental Medicine*, 70(12), 839–44. doi:10.1136/oemed-2013-101444
- Hart, T., Brenner, L., Clark, A. N., Bogner, J. A., Novack, T. A., Chervoneva, I., ... Arango-Lasprilla, J. C. (2011). Major and minor depression after traumatic brain injury. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 92(8), 1211–9. doi:10.1016/j.apmr.2011.03.005
- Härtig, W., Reichenbach, A., Voigt, C., Boltze, J., Bulavina, L., Schuhmann, M. U., ... Grosche, J. (2009). Triple fluorescence labelling of neuronal, glial and

vascular markers revealing pathological alterations in various animal models. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 37(2), 128–38. doi:10.1016/j.jchemneu.2008.10.003

Hausmann, R., Riess, R., Fieguth, A., & Betz, P. (2000). Immunohistochemical investigations on the course of astroglial GFAP expression following human brain injury. *International Journal of Legal Medicine*, 113(2), 70–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10741479>

Heiss, W.-D. (2010). The concept of the penumbra: can it be translated to stroke management? *International Journal of Stroke*, 5(4), 290–5. doi:10.1111/j.1747-4949.2010.00444.x

Hergenroeder, G. W., Moore, A. N., McCoy, J. P., Samsel, L., Ward, N. H., Clifton, G. L., & Dash, P. K. (2010). Serum IL-6: a candidate biomarker for intracranial pressure elevation following isolated traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation*, 7, 19. doi:10.1186/1742-2094-7-19

Herrmann, B. L., Rehder, J., Kahlke, S., Wiedemayer, H., Doerfler, A., Ischebeck, W., ... Mann, K. (2006). Hypopituitarism following severe traumatic brain injury. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes : Official Journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*, 114(6), 316–21. doi:10.1055/s-2006-924254

Hicks, R., Soares, H., Smith, D., & McIntosh, T. (1996). Temporal and spatial characterization of neuronal injury following lateral fluid-percussion brain injury in the rat. *Acta Neuropathologica*, 91(3), 236–46. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8834535>

Hilgetag, C., Dombrowski, S., & Barbas, H. (2002). Classes and gradients of prefrontal cortical organization in the primate. *Neurocomputing*, 44-46, 823–829. doi:10.1016/S0925-2312(02)00479-4

Hof, P., Glezer, I., Condé, F., Flagg, R., Rubin, M., Nimchinsky, E., & Vogt Weisenhorn, D. (1999). Cellular distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin, calbindin, and calretinin in the neocortex of mammals: phylogenetic and developmental patterns. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 16(2), 77–116. doi:10.1016/S0891-0618(98)00065-9

Hof, P., Mufson, E., & Morrison, J. (1995). Human orbitofrontal cortex: cytoarchitecture and quantitative immunohistochemical parcellation. *Journal of Comparative ...* Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.903590105/abstract>

- Hof, P., Nimchinsky, E., Celio, M., Bouras, C., & Morrison, J. (1993). Calretinin-immunoreactive neocortical interneurons are unaffected in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, 152(1-2), 145–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8515868>
- Holmin, S., & Höjeberg, B. (2004). In situ detection of intracerebral cytokine expression after human brain contusion. *Neuroscience Letters*, 369(2), 108–14. doi:10.1016/j.neulet.2004.07.044
- Holmin, S., Söderlund, J., Biberfeld, P., & Mathiesen, T. (1998). Intracerebral inflammation after human brain contusion. *Neurosurgery*, 42(2), 291–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9482179>
- Hossmann, K. A. (1994). Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Annals of Neurology*, 36(4), 557–65. doi:10.1002/ana.410360404
- Huang, A. P.-H., Tu, Y.-K., Tsai, Y.-H., Chen, Y.-S., Hong, W.-C., Yang, C.-C., ... Huang, S.-J. (2008). Decompressive craniectomy as the primary surgical intervention for hemorrhagic contusion. *Journal of Neurotrauma*, 25(11), 1347–54. doi:10.1089/neu.2008.0625
- Huh, J. W., Raghupathi, R., Laurer, H. L., Helfaer, M. A., & Saatman, K. E. (2003). Transient loss of microtubule-associated protein 2 immunoreactivity after moderate brain injury in mice. *Journal of Neurotrauma*, 20(10), 975–84. doi:10.1089/089771503770195821
- Hunt, R. F., Scheff, S. W., & Smith, B. N. (2009). Posttraumatic epilepsy after controlled cortical impact injury in mice. *Experimental Neurology*, 215(2), 243–52. doi:10.1016/j.expneurol.2008.10.005
- Igarashi, T., Huang, T. T., & Noble, L. J. (2001). Regional vulnerability after traumatic brain injury: gender differences in mice that overexpress human copper, zinc superoxide dismutase. *Experimental Neurology*, 172(2), 332–41. doi:10.1006/exnr.2001.7820
- Ikonomovic, M. D., Uryu, K., Abrahamson, E. E., Ciallella, J. R., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M.-Y., ... DeKosky, S. T. (2004). Alzheimer's pathology in human temporal cortex surgically excised after severe brain injury. *Experimental Neurology*, 190(1), 192–203. doi:10.1016/j.expneurol.2004.06.011
- Instituto Nacional de Salud, & Observatorio Nacional de Salud. (2013). Primer Informe ONS, aspectos relacionados con la frecuencia de uso de los servicios de salud, mortalidad y discapacidad en Colombia, 2011. *Imprenta Nacional de Colombia*.

- Iwata-Ichikawa, E., Kondo, Y., Miyazaki, I., Asanuma, M., & Ogawa, N. (1999). Glial cells protect neurons against oxidative stress via transcriptional up-regulation of the glutathione synthesis. *Journal of Neurochemistry*, 72(6), 2334–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10349842>
- Jafari, S., Etminan, M., Aminzadeh, F., & Samii, A. (2013). Head injury and risk of Parkinson disease: a systematic review and meta-analysis. *Movement Disorders*, 28(9), 1222–9. doi:10.1002/mds.25458
- Jellinger, K. A., Paulus, W., Wrocklage, C., & Litvan, I. (2001a). Effects of closed traumatic brain injury and genetic factors on the development of Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology: The Official Journal of the European Federation of Neurological Societies*, 8(6), 707–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11784357>
- Jellinger, K. A., Paulus, W., Wrocklage, C., & Litvan, I. (2001b). Traumatic brain injury as a risk factor for Alzheimer disease. Comparison of two retrospective autopsy cohorts with evaluation of ApoE genotype. *BMC Neurology*, 1, 3. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=37390&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Jennett, B. (1996). Epidemiology of head injury. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 60(4), 362–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1073884&tool=pmc.entrez&rendertype=abstract>
- Jin, X., Prince, D. A., & Huguenard, J. R. (2006). Enhanced excitatory synaptic connectivity in layer v pyramidal neurons of chronically injured epileptogenic neocortex in rats. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 26(18), 4891–900. doi:10.1523/JNEUROSCI.4361-05.2006
- Johnson, G. V., & Foley, V. G. (1993). Calpain-mediated proteolysis of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) is inhibited by phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase, but not by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Journal of Neuroscience Research*, 34(6), 642–7. doi:10.1002/jnr.490340607
- Johnson, G. V., Litersky, J. M., & Jope, R. S. (1991). Degradation of microtubule-associated protein 2 and brain spectrin by calpain: a comparative study. *Journal of Neurochemistry*, 56(5), 1630–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2013758>

- Johnson, V. E., Stewart, W., Trojanowski, J. Q., & Smith, D. H. (2011). Acute and chronically increased immunoreactivity to phosphorylation-independent but not pathological TDP-43 after a single traumatic brain injury in humans. *Acta Neuropathologica*, 122(6), 715–26. doi:10.1007/s00401-011-0909-9
- Jones, L. B., Johnson, N., & Byne, W. (2002). Alterations in MAP2 immunocytochemistry in areas 9 and 32 of schizophrenic prefrontal cortex. *Psychiatry Research: Neuroimaging*, 114(3), 137–148. doi:10.1016/S0925-4927(02)00022-7
- Jorge, R. E., Robinson, R. G., Moser, D., Tateno, A., Crespo-Facorro, B., & Arndt, S. (2004). Major depression following traumatic brain injury. *Archives of General Psychiatry*, 61(1), 42–50. doi:10.1001/archpsyc.61.1.42
- Kampf, A., Posmantur, R. M., Zhao, X., Schmutzhard, E., Clifton, G. L., & Hayes, R. L. (1997). Mechanisms of calpain proteolysis following traumatic brain injury: implications for pathology and therapy: a review and update. *Journal of Neurotrauma*, 14(3), 121–34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9104930>
- Kampf, A., Posmantur, R., Nixon, R., Grynspan, F., Zhao, X., Liu, S. J., ... Hayes, R. L. (1996). mu-calpain activation and calpain-mediated cytoskeletal proteolysis following traumatic brain injury. *Journal of Neurochemistry*, 67(4), 1575–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8858942>
- Kane, M. J., Angoa-Pérez, M., Briggs, D. I., Viano, D. C., Kreipke, C. W., & Kuhn, D. M. (2012). A mouse model of human repetitive mild traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience Methods*, 203(1), 41–9. doi:10.1016/j.jneumeth.2011.09.003
- Kang, Y.-S., Park, W.-M., Lim, J.-K., Kim, S.-Y., & Jeon, C.-J. (2002). Changes of calretinin, calbindin D28K and parvalbumin-immunoreactive neurons in the superficial layers of the hamster superior colliculus following monocular enucleation. *Neuroscience Letters*, 330(1), 104–108. doi:10.1016/S0304-3940(02)00723-1
- Kawaguchi, Y., & Kubota, Y. (1997). GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cerebral Cortex*, 476–486. Retrieved from <http://cercor.oxfordjournals.org/content/7/6/476.short>
- Kawaguchi, Y., & Kubota, Y. (1998). Neurochemical features and synaptic connections of large physiologically-identified GABAergic cells in the rat frontal cortex. *Neuroscience*, 85(3), 677–701. doi:10.1016/S0306-4522(97)00685-4

- Kawai, N., Nakamura, T., Tamiya, T., & Nagao, S. (2008). Metabolic disturbance without brain ischemia in traumatic brain injury: a positron emission tomography study. In G. Manley, C. Hemphill, & S. Stiver (Eds.), *Acta neurochirurgica. Supplement. Vol 102. Intracranial pressure and brain monitoring XIII* (Vol. 102, pp. 241–5). New York: Springer New York. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19388323>
- Kawamata, T., Mori, T., Sato, S., & Katayama, Y. (2007). Tissue hyperosmolality and brain edema in cerebral contusion. *Neurosurgical Focus*, 22(5), E5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17613236>
- Kaya, S. S., Mahmood, A., Li, Y., Yavuz, E., Göksel, M., & Chopp, M. (1999). Apoptosis and expression of p53 response proteins and cyclin D1 after cortical impact in rat brain. *Brain Research*, 818(1), 23–33. doi:10.1016/S0006-8993(98)01204-9
- Kharatishvili, I., & Pitkänen, A. (2010). Posttraumatic epilepsy. *Current Opinion in Neurology*, 23(2), 183–8. doi:10.1097/WCO.0b013e32833749e4
- Kim, K. K., Adelstein, R. S., & Kawamoto, S. (2009). Identification of neuronal nuclei (NeuN) as Fox-3, a new member of the Fox-1 gene family of splicing factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 284(45), 31052–61. doi:10.1074/jbc.M109.052969
- Kinnunen, K. M., Greenwood, R., Powell, J. H., Leech, R., Hawkins, P. C., Bonnelle, V., ... Sharp, D. J. (2011). White matter damage and cognitive impairment after traumatic brain injury. *Brain : A Journal of Neurology*, 134(Pt 2), 449–63. doi:10.1093/brain/awq347
- Kochanek, P. M., Marion, D. W., Zhang, W., Schiding, J. K., White, M., Palmer, A. M., ... Ho, C. (1995). Severe controlled cortical impact in rats: assessment of cerebral edema, blood flow, and contusion volume. *Journal of Neurotrauma*, 12(6), 1015–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8742130>
- Kolakowsky-Hayner, S. A., Gourley, E. V, Kreutzer, J. S., Marwitz, J. H., Meade, M. A., & Cifu, D. X. (2002). Post-injury substance abuse among persons with brain injury and persons with spinal cord injury. *Brain Injury*, 16(7), 583–92. doi:10.1080/02699050110119475
- Kühn, J., Meissner, C., & Oehmichen, M. (2005). Microtubule-associated protein 2 (MAP2)--a promising approach to diagnosis of forensic types of hypoxia-ischemia. *Acta Neuropathologica*, 110(6), 579–86. doi:10.1007/s00401-005-1090-9

- Kuzniecky, R., & Barkovich, A. (2001). Malformations of cortical development and epilepsy. *Brain and Development*, 23, 2–11. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0387760400001959>
- Kwon, B. K., Liu, J., Messerer, C., Kobayashi, N. R., McGraw, J., Oschipok, L., & Tetzlaff, W. (2002). Survival and regeneration of rubrospinal neurons 1 year after spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 3246–51. doi:10.1073/pnas.052308899
- Langlois, J. A., Rutland-Brown, W., & Wald, M. M. (2006). The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *The Journal of Head Trauma Rehabilitation*, 21(5), 375–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16983222>
- Lauret, C. (2006). An overview of in vivo, in vitro, and finite element models developed to study traumatic brain injury. *BMTE*, 6(1), 1–13. Retrieved from <http://www.mate.tue.nl/mate/pdfs/6176.pdf>
- Li, D.-R., Ishikawa, T., Zhao, D., Michiue, T., Quan, L., Zhu, B.-L., & Maeda, H. (2009). Histopathological changes of the hippocampus neurons in brain injury. *Histology and Histopathology*, 24(9), 1113–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19609858>
- Li, D.-R., Zhang, F., Wang, Y., Tan, X.-H., Qiao, D.-F., Wang, H.-J., ... Maeda, H. (2012). Quantitative analysis of GFAP- and S100 protein-immunopositive astrocytes to investigate the severity of traumatic brain injury. *Legal Medicine (Tokyo, Japan)*, 14(2), 84–92. doi:10.1016/j.legalmed.2011.12.007
- Li, L., Lundkvist, A., Andersson, D., Wilhelmsson, U., Nagai, N., Pardo, A. C., ... Pekny, M. (2008). Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 28(3), 468–81. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600546
- Li, R., Fujitani, N., Jia, J. T., & Kimura, H. (1998). Immunohistochemical indicators of early brain injury: an experimental study using the fluid-percussion model in cats. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology*, 19(2), 129–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9662107>
- Liedtke, W., Edelmann, W., Bieri, P. L., Chiu, F. C., Cowan, N. J., Kucherlapati, R., & Raine, C. S. (1996). GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron*, 17(4), 607–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8893019>

- Lighthall, J. W. (1988). Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *Journal of Neurotrauma*, 5(1), 1–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3193461>
- Lind, D., Franken, S., Kappler, J., Jankowski, J., & Schilling, K. (2005). Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *Journal of Neuroscience Research*, 79(3), 295–302. doi:10.1002/jnr.20354
- Lipton, P. (1999). Ischemic cell death in brain neurons. *Physiological Reviews*, 79(4), 1431–1568. Retrieved from <http://physrev.physiology.org/content/79/4/1431.short>
- Liu, F., Schafer, D., & McCullough, L. (2009). TTC, fluoro-Jade B and NeuN staining confirm evolving phases of infarction induced by middle cerebral artery occlusion. *Journal of Neuroscience Methods*, 179(1), 1–8. doi:10.1016/j.jneumeth.2008.12.028
- Liu, H., Yang, M., Qiu, G., Zhuo, F., & Yu, W. (2012). Aquaporin 9 in rat brain after severe traumatic brain injury. *Arquivos de Neuro- ...*, (30470608), 214–220. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0004-282X2012000300012&script=sci_arttext
- Løberg, E. M., & Torvik, A. (1989). Brain contusions: the time sequence of the histological changes. *Medicine, Science, and the Law*, 29(2), 109–15. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2747472>
- Lowenstein, D. H. (2009). Epilepsy after head injury: an overview. *Epilepsia*, 50 Suppl 2, 4–9. doi:10.1111/j.1528-1167.2008.02004.x
- Lowenstein, D., Thomas, M., Smith, D., & McIntosh, T. (1992). Selective Vulnerability of Dentate Hilar Neurons following Traumatic Brain Injury: A Potential Mechanistic Link between Head Trauma and Disorders of the Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 12(December), 4848–4853.
- Lu, J., Marmarou, A., Choi, S., Maas, A., Murray, G., & Steyerberg, E. W. (2005). Mortality from traumatic brain injury. *Acta Neurochirurgica*, 95, 281–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16463866>
- Lyck, L., Dalmau, I., Chemnitz, J., Finsen, B., & Schrøder, H. D. (2008). Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 56(3), 201–21. doi:10.1369/jhc.7A7187.2007

- Lye, T. C., & Shores, E. A. (2000). Traumatic brain injury as a risk factor for Alzheimer's disease: a review. *Neuropsychology Review*, 10(2), 115–29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10937919>
- Maas, A. I. R., Stocchetti, N., & Bullock, R. (2008). Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *The Lancet. Neurology*, 7(8), 728–41. doi:10.1016/S1474-4422(08)70164-9
- Magnoni, S., Esparza, T. J., Conte, V., Carbonara, M., Carrabba, G., Holtzman, D. M., ... Brody, D. L. (2012). Tau elevations in the brain extracellular space correlate with reduced amyloid- β levels and predict adverse clinical outcomes after severe traumatic brain injury. *Brain : A Journal of Neurology*, 135(Pt 4), 1268–80. doi:10.1093/brain/awr286
- Malhotra, S. K., & Shnitka, T. K. (2002). Diversity in reactive astrocytes. In *Neuroglia in the aging brain* (pp. 17–33). Human Press.
- Manley, G. T., Rosenthal, G., Lam, M., Morabito, D., Yan, D., Derugin, N., ... Panter, S. S. (2006). Controlled cortical impact in swine: pathophysiology and biomechanics. *Journal of Neurotrauma*, 23(2), 128–39. doi:10.1089/neu.2006.23.128
- Marciano, P. G., Brettschneider, J., Manduchi, E., Davis, J. E., Eastman, S., Raghupathi, R., ... McIntosh, T. K. (2004). Neuron-specific mRNA complexity responses during hippocampal apoptosis after traumatic brain injury. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(12), 2866–76. doi:10.1523/JNEUROSCI.5051-03.2004
- Marco, P., Sola, R. G., Pulido, P., Alijarde, M. T., Sánchez, A., Ramón y Cajal, S., & DeFelipe, J. (1996). Inhibitory neurons in the human epileptogenic temporal neocortex. An immunocytochemical study. *Brain : A Journal of Neurology*, 119 (Pt 4, 1327–47. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8813295>
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G., & Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nature Reviews. Neuroscience*, 5(10), 793–807. doi:10.1038/nrn1519
- Marras, C., Hincapié, C. A., Kristman, V. L., Cancelliere, C., Soklaridis, S., Li, A., ... Cassidy, J. D. (2014). Systematic review of the risk of Parkinson's disease after mild traumatic brain injury: results of the International Collaboration on Mild Traumatic Brain Injury Prognosis. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 95(3 Suppl), S238–44. doi:10.1016/j.apmr.2013.08.298
- Martin, N. A., Patwardhan, R. V., Alexander, M. J., Africk, C. Z., Lee, J. H., Shalmon, E., ... Becker, D. P. (1997). Characterization of cerebral

- hemodynamic phases following severe head trauma: hypoperfusion, hyperemia, and vasospasm. *Journal of Neurosurgery*, 87(1), 9–19. doi:10.3171/jns.1997.87.1.0009
- Masel, B. E., & DeWitt, D. S. (2010). Traumatic brain injury: a disease process, not an event. *Journal of Neurotrauma*, 27(8), 1529–40. doi:10.1089/neu.2010.1358
- Mattson, M. P. (1988). Neurotransmitters in the regulation of neuronal cytoarchitecture. *Brain Research*, 472(2), 179–212. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2898278>
- Mazher, S., Ahmed, S., & Ali, A. (2014). Current Consideration Regarding Operative Versus Non-Operative Outcome of Brain Contusion Patients. *Pakistan Journal of Medicine and Dentistry*, 3(01), 23–30.
- McAllister, T. W. (2011). Neurobiological consequences of traumatic brain injury. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 13(3), 287–300.
- McGarry, L. J., Thompson, D., Millham, F. H., Cowell, L., Snyder, P. J., Lenderking, W. R., & Weinstein, M. C. (2002). Outcomes and costs of acute treatment of traumatic brain injury. *The Journal of Trauma - Injury Infection & Critical Care*, 53(6), 1152–9. doi:10.1097/01.TA.0000025801.33552.71
- McKee, A. C., Stern, R. A., Nowinski, C. J., Stein, T. D., Alvarez, V. E., Daneshvar, D. H., ... Cantu, R. C. (2013). The spectrum of disease in chronic traumatic encephalopathy. *Brain : A Journal of Neurology*, 136(Pt 1), 43–64. doi:10.1093/brain/aws307
- McPhail, L. T., McBride, C. B., McGraw, J., Steeves, J. D., & Tetzlaff, W. (2004). Axotomy abolishes NeuN expression in facial but not rubrospinal neurons. *Experimental Neurology*, 185(1), 182–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14697329>
- Medina, A., Cairasco, N. G., & Escobar, M. (2008). Respuesta de una subpoblación de interneuronas y del transportador glial de glutamato GLT1 en la corteza contralateral a un foco isquémico. *Colombia Médica*, 39(Supl 3), 14–24. Retrieved from <http://bibliotecadigital.univalle.edu.co/handle/10893/4200>
- Menon, D. K. (2003). Procrustes, the traumatic penumbra, and perfusion pressure targets in closed head injury. *Anesthesiology*, 98(4), 805–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12657837>

- Milders, M., Fuchs, S., & Crawford, J. R. (2003). Neuropsychological impairments and changes in emotional and social behaviour following severe traumatic brain injury. *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology*, 25(2), 157–72. doi:10.1076/jcen.25.2.157.13642
- Miñambres, E., Ballesteros, M. A., Mayorga, M., Marin, M. J., Muñoz, P., Figols, J., & López-Hoyos, M. (2008). Cerebral apoptosis in severe traumatic brain injury patients: an in vitro, in vivo, and postmortem study. *Journal of Neurotrauma*, 25(6), 581–91. doi:10.1089/neu.2007.0398
- Molloy, C., Conroy, R. M., Cotter, D. R., & Cannon, M. (2011). Is traumatic brain injury a risk factor for schizophrenia? A meta-analysis of case-controlled population-based studies. *Schizophrenia Bulletin*, 37(6), 1104–10. doi:10.1093/schbul/sbr091
- Morales, D. M., Marklund, N., Lebold, D., Thompson, H. J., Pitkanen, A., Maxwell, W. L., ... McIntosh, T. K. (2005). Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? *Neuroscience*, 136(4), 971–89. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.08.030
- Moreno, S. L., & Carreño, P. A. (2012). Lesiones de causa externa. Colombia, 2011. *Forensis*, 13(1), 11–64.
- Moretti, L., Cristofori, I., Weaver, S. M., Chau, A., Portelli, J. N., & Grafman, J. (2012). Cognitive decline in older adults with a history of traumatic brain injury. *The Lancet. Neurology*, 11(12), 1103–12. doi:10.1016/S1474-4422(12)70226-0
- Mukaetova-Ladinska, E. B., Arnold, H., Jaros, E., Perry, R., & Perry, E. (2004). Depletion of MAP2 expression and laminar cytoarchitectonic changes in dorsolateral prefrontal cortex in adult autistic individuals. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 30(6), 615–23. doi:10.1111/j.1365-2990.2004.00574.x
- Mullen, R., Buck, C., & Smith, A. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 211, 201–211. Retrieved from <http://dev.biologists.org/content/116/1/201.short>
- Napieralski, J. a, Raghupathi, R., & McIntosh, T. K. (1999). The tumor-suppressor gene, p53, is induced in injured brain regions following experimental traumatic brain injury. *Molecular Brain Research*, 71(1), 78–86. doi:10.1016/S0169-328X(99)00155-2
- Nathoo, N., Narotam, P. K., Agrawal, D. K., Connolly, C. A., van Dellen, J. R., Barnett, G. H., & Chetty, R. (2004). Influence of apoptosis on neurological

- outcome following traumatic cerebral contusion. *Journal of Neurosurgery*, 101(2), 233–40. doi:10.3171/jns.2004.101.2.0233
- Nemetz, P. N., Leibson, C., Naessens, J. M., Beard, M., Kokmen, E., Annegers, J. F., & Kurland, L. T. (1999). Traumatic brain injury and time to onset of Alzheimer's disease: a population-based study. *American Journal of Epidemiology*, 149(1), 32–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9883791>
- Newcomb, J. K., Zhao, X., Pike, B. R., & Hayes, R. L. (1999). Temporal Profile of Apoptotic-like Changes in Neurons and Astrocytes Following Controlled Cortical Impact Injury in the Rat. *Experimental Neurology*, 88, 76–88.
- Newcombe, V. F. J., Williams, G. B., Outtrim, J. G., Chatfield, D., Gulia Abate, M., Geeraerts, T., ... Menon, D. K. (2013). Microstructural basis of contusion expansion in traumatic brain injury: insights from diffusion tensor imaging. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33(6), 855–62. doi:10.1038/jcbfm.2013.11
- Ng, I., Yeo, T. T., Tang, W. Y., Soong, R., Ng, P. Y., & Smith, D. R. (2000). Apoptosis occurs after cerebral contusions in humans. *Neurosurgery*, 46(4), 949–56. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10764270>
- Nilsson, P., Laursen, H., Hillered, L., & Hansen, A. J. (1996). Calcium movements in traumatic brain injury: the role of glutamate receptor-operated ion channels. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism : Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 16(2), 262–70. doi:10.1097/00004647-199603000-00011
- Nordström, P., Michaëlsson, K., Gustafson, Y., & Nordström, A. (2014). Traumatic brain injury and young onset dementia: a nationwide cohort study. *Annals of Neurology*, 75(3), 374–81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24812697>
- O'Connor, W. T., Smyth, A., & Gilchrist, M. D. (2011). Animal models of traumatic brain injury: a critical evaluation. *Pharmacology & Therapeutics*, 130(2), 106–13. doi:10.1016/j.pharmthera.2011.01.001
- Oehmichen, M., Eisenmenger, W., Raff, G., & Berghaus, G. (1986). Brain macrophages in human cortical contusions as indicator of survival period. *Forensic Science International*, 30(4), 281–301. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3710334>

- Oehmichen, M., & Raff, G. (1980). Timing of cortical contusion. Correlation between histomorphologic alterations and post-traumatic interval. *Zeitschrift Für Rechtsmedizin. Journal of Legal Medicine*, 84(2), 79–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7376745>
- Omalu, B. I., DeKosky, S. T., Hamilton, R. L., Minster, R. L., Kamboh, M. I., Shakir, A. M., & Wecht, C. H. (2006). Chronic traumatic encephalopathy in a national football league player: part II. *Neurosurgery*, 59(5), 1086–92; discussion 1092–3. doi:10.1227/01.NEU.0000245601.69451.27
- Onaya, M. (2002). Neuropathological investigation of cerebral white matter lesions caused by closed head injury. *Neuropathology : Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 22(4), 243–51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12564763>
- Ongür, D., Ferry, A. T., & Price, J. L. (2003). Architectonic subdivision of the human orbital and medial prefrontal cortex. *The Journal of Comparative Neurology*, 460(3), 425–49. doi:10.1002/cne.10609
- Onyszchuk, G., He, Y.-Y., Berman, N. E. J., & Brooks, W. M. (2008). Detrimental effects of aging on outcome from traumatic brain injury: a behavioral, magnetic resonance imaging, and histological study in mice. *Journal of Neurotrauma*, 25(2), 153–71. doi:10.1089/neu.2007.0430
- Orff, H. J., Ayalon, L., & Drummond, S. P. A. (2009). Traumatic brain injury and sleep disturbance: a review of current research. *The Journal of Head Trauma Rehabilitation*, 24(3), 155–65. doi:10.1097/HTR.0b013e3181a0b281
- Otani, N., Nawashiro, H., Fukui, S., Ooigawa, H., Ohsumi, A., Toyooka, T., ... Brenner, M. (2006). Enhanced hippocampal neurodegeneration after traumatic or kainate excitotoxicity in GFAP-null mice. *Journal of Clinical Neuroscience : Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 13(9), 934–8. doi:10.1016/j.jocn.2005.10.018
- Palacios, M. (2014). *Comportamiento de la proteína precursora amiloide durante la fase aguda del trauma cráneo encefálico en humanos*. Universidad del Valle.
- Palacios, M., Buriticá, E., Becerra, L., González, D. M., Escobar, M. I., & Pimienta, H. (2011). Amyloid Pathway in Human Cortex Surgically Excised After Traumatic Brain Injury. *Journal of Head Trauma Rehabilitation*, 26(5), 434. doi:10.1097/HTR.0b013e31822f073a
- Palmer, A. M., Marion, D. W., Botscheller, M. L., Swedlow, P. E., Styren, S. D., & DeKosky, S. T. (1993). Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed

- in a controlled cortical impact model. *Journal of Neurochemistry*, 61(6), 2015–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7504079>
- Pantazopoulos, H., Lange, N., Baldessarini, R. J., & Berretta, S. (2007). Parvalbumin neurons in the entorhinal cortex of subjects diagnosed with bipolar disorder or schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 61(5), 640–52. doi:10.1016/j.biopsych.2006.04.026
- Parpura, V., Scemes, E., & Spray, D. (2004). Mechanisms of glutamate release from astrocytes: gap junction “hemichannels”, purinergic receptors and exocytotic release. *Neurochemistry International*, 45(2-3), 259–64. doi:10.1016/j.neuint.2003.12.011
- Pavlov, I., Huusko, N., Drexel, M., Kirchmair, E., Sperk, G., Pitkänen, a., & Walker, M. C. (2011). Progressive loss of phasic, but not tonic, GABAA receptor-mediated inhibition in dentate granule cells in a model of post-traumatic epilepsy in rats. *Neuroscience*, 194, 208–19. doi:10.1016/j.neuroscience.2011.07.074
- Pekny, M., & Nilsson, M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, 50(4), 427–34. doi:10.1002/glia.20207
- Pekny, M., Wilhelmsson, U., & Pekna, M. (2014). The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neuroscience Letters*, 565, 30–8. doi:10.1016/j.neulet.2013.12.071
- Petzold, A., Tisdall, M. M., Girbes, A. R., Martinian, L., Thom, M., Kitchen, N., & Smith, M. (2011). In vivo monitoring of neuronal loss in traumatic brain injury: a microdialysis study. *Brain : A Journal of Neurology*, 134(Pt 2), 464–83. doi:10.1093/brain/awq360
- Pitkänen, A., Immonen, R. J., Gröhn, O. H. J., & Kharatishvili, I. (2009). From traumatic brain injury to posttraumatic epilepsy: what animal models tell us about the process and treatment options. *Epilepsia*, 50 Suppl 2(Table 1), 21–9. doi:10.1111/j.1528-1167.2008.02007.x
- Pitkänen, A., Kharatishvili, I., Karhunen, H., Lukasiuk, K., Immonen, R., Nairismägi, J., ... Nissinen, J. (2007). Epileptogenesis in experimental models. *Epilepsia*, 48 Suppl 2, 13–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17571349>
- Pitkänen, A., & McIntosh, T. K. (2006). Animal models of post-traumatic epilepsy. *Journal of Neurotrauma*, 23(2), 241–61. doi:10.1089/neu.2006.23.241

- Ponsford, J., Whelan-Goodinson, R., & Bahar-Fuchs, A. (2007). Alcohol and drug use following traumatic brain injury: a prospective study. *Brain Injury*, 21(13-14), 1385–92. doi:10.1080/02699050701796960
- Posmantur, R. M., Kampfl, A., Taft, W. C., Bhattacharjee, M., Dixon, C. E., Bao, J., & Hayes, R. L. (1996). Diminished microtubule-associated protein 2 (MAP2) immunoreactivity following cortical impact brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 13(3), 125–37. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8965322>
- Povlishock, J. T. (1992). Traumatically induced axonal injury: pathogenesis and pathobiological implications. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 2(1), 1–12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1341941>
- Povlishock, J. T., & Katz, D. I. (2005). Update of neuropathology and neurological recovery after traumatic brain injury. *The Journal of Head Trauma Rehabilitation*, 20(1), 76–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15668572>
- Pradilla, G., Vesga, B. E., & León-Sarmiento, F. E. (2003). Estudio neuroepidemiológico nacional (EPINEURO) colombiano. *Rev. Panam. Salud Pública*, 14(2), 104–111. Retrieved from http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49892003000700005&lng=pt&nrm=iso&tlng=es
- Qiu, J., Whalen, M. J., Lowenstein, P., Fiskum, G., Fahy, B., Darwish, R., ... Moskowitz, M. A. (2002). Upregulation of the Fas Receptor Death-Inducing Signaling Complex after Traumatic Brain Injury in Mice and Humans. *The Journal of Neuroscience*, 22(9), 3504–3511.
- Ragaisis, V. (2002). Brain contusion: morphology, pathogenesis and treatment. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 38(3), 243–9; quiz 354. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12474694>
- Raghupathi, R. (2004). Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 14(2), 215–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15193035>
- Rao, V., & Lyketsos, C. (2000). Neuropsychiatric sequelae of traumatic brain injury. *Psychosomatics*, 41(2), 95–103. doi:10.1176/appi.psy.41.2.95
- Rapoport, M. J. (2012). Depression following traumatic brain injury: epidemiology, risk factors and management. *CNS Drugs*, 26(2), 111–21. doi:10.2165/11599560-000000000-00000

- Reeves, R. R., & Laizer, J. T. (2012). Traumatic brain injury and suicide. *Journal of Psychosocial Nursing and Mental Health Services*, 50(3), 32–8. doi:10.3928/02793695-20120207-02
- Reynolds, G., Zhang, Z., & Beasley, C. (2001). Neurochemical correlates of cortical GABAergic deficits in schizophrenia: selective losses of calcium binding protein immunoreactivity. *Brain Research Bulletin*, 55(5), 579–584. doi:10.1016/S0361-9230(01)00526-3
- Riascos, D., Guzmán, F., Buriticá, E., Palacios, M., Escobar, M. I., & Pimienta, H. (2008). Caracterización de un modelo organotípico de cultivos de neuronas corticales de humano derivadas de trauma craneoencefálico. *Colombia Medica*, 39(3 SUPPL.), 29–37.
- Ribas, G. C., & Jane, J. A. (1992). Traumatic contusions and intracerebral hematomas. *Journal of Neurotrauma*, 9 Suppl 1, S265–78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1588615>
- Ridet, J. L., Malhotra, S. K., Privat, A., & Gage, F. H. (1997). Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends in Neurosciences*, 20(12), 570–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9416670>
- Riggio, S., & Wong, M. (2009). Neurobehavioral sequelae of traumatic brain injury. *The Mount Sinai Journal of Medicine, New York*, 76(2), 163–72. doi:10.1002/msj.20097
- Río, M. del, & DeFelipe, J. (1997a). Double bouquet cell axons in the human temporal neocortex: relationship to bundles of myelinated axons and colocalization of calretinin and calbindin D-28k immunoreactivities. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 13(4), 243–251. doi:10.1016/S0891-0618(97)00050-1
- Río, M. del, & DeFelipe, J. (1997b). Synaptic connections of calretinin-immunoreactive neurons in the human neocortex. *The Journal of Neuroscience*, 17(13), 5143–5154. Retrieved from <http://www.jneurosci.org/content/17/13/5143.short>
- Robertson, C. L., Puskar, A., Hoffman, G. E., Murphy, A. Z., Saraswati, M., & Fiskum, G. (2006). Physiologic progesterone reduces mitochondrial dysfunction and hippocampal cell loss after traumatic brain injury in female rats. *Experimental Neurology*, 197(1), 235–43. doi:10.1016/j.expneurol.2005.09.014
- Rola, R., Mizumatsu, S., Otsuka, S., Morhardt, D. R., Noble-Haeusslein, L. J., Fishman, K., ... Fike, J. R. (2006). Alterations in hippocampal neurogenesis

- following traumatic brain injury in mice. *Experimental Neurology*, 202(1), 189–99. doi:10.1016/j.expneurol.2006.05.034
- Rugbjerg, K., Ritz, B., Korbo, L., Martinussen, N., & Olsen, J. H. (2008). Risk of Parkinson's disease after hospital contact for head injury: population based case-control study. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 337, a2494. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2603581&tool=pmc&rendertype=abstract>
- Rüttimann, E., Vacher, C.-M., Gassmann, M., Kaupmann, K., Van der Putten, H., & Bettler, B. (2004). Altered hippocampal expression of calbindin-D-28k and calretinin in GABA(B(1))-deficient mice. *Biochemical Pharmacology*, 68(8), 1613–20. doi:10.1016/j.bcp.2004.07.019
- Saatman, K. E., Bareyre, F. M., Grady, M. S., & McIntosh, T. K. (2001). Acute cytoskeletal alterations and cell death induced by experimental brain injury are attenuated by magnesium treatment and exacerbated by magnesium deficiency. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 60(2), 183–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11273006>
- Saatman, K. E., Bozyczko-Coyne, D., Marcy, V., Siman, R., & McIntosh, T. K. (1996). Prolonged calpain-mediated spectrin breakdown occurs regionally following experimental brain injury in the rat. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 55(7), 850–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8965100>
- Sadoughi, A., Rybinnik, I., & Cohen, R. (2013). Measurement and Management of Increased Intracranial Pressure. *The Open Critical Care Medicine Journal*, 6, Suppl 1, 56–65.
- Sakai, T., Oshima, A., Nozaki, Y., Ida, I., Haga, C., Akiyama, H., ... Mikuni, M. (2008). Changes in density of calcium-binding-protein-immunoreactive GABAergic neurons in prefrontal cortex in schizophrenia and bipolar disorder. *Neuropathology : Official Journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 28(2), 143–50. doi:10.1111/j.1440-1789.2007.00867.x
- Salin, P., Tseng, G. F., Hoffman, S., Parada, I., & Prince, D. A. (1995). Axonal sprouting in layer V pyramidal neurons of chronically injured cerebral cortex. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 15(12), 8234–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8613757>
- Sanchez, C., Diaz-Nido, J., & Avila, J. (2000). Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the

- neuronal cytoskeleton function. *Progress in Neurobiology*, 61. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301008299000465>
- Sato, M., Chang, E., Igarashi, T., & Noble, L. . (2001). Neuronal injury and loss after traumatic brain injury: time course and regional variability. *Brain Research*, 917(1), 45–54. doi:10.1016/S0006-8993(01)02905-5
- Schmued, L., Albertson, C., & Jr, W. S. (1997). Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Research*, 1(1 997), 37–46. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000689939601387X>
- Schretlen, D. J., & Shapiro, A. M. (2003). A quantitative review of the effects of traumatic brain injury on cognitive functioning. *International Review of Psychiatry (Abingdon, England)*, 15(4), 341–9. doi:10.1080/09540260310001606728
- Schröder, M. L., Muizelaar, J. P., Bullock, M. R., Salvant, J. B., & Povlishock, J. T. (1995). Focal ischemia due to traumatic contusions documented by stable xenon-CT and ultrastructural studies. *Journal of Neurosurgery*, 82(6), 966–71. doi:10.3171/jns.1995.82.6.0966
- Schwarzbold, M., Diaz, A., Martins, E. T., Rufino, A., Amante, L. N., Thais, M. E., ... Walz, R. (2008). Psychiatric disorders and traumatic brain injury. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 4(4), 797–816. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2536546&tool=pmc&rendertype=abstract>
- Seidberg, N. A., Clark, R. S. B., Zhang, X., Lai, Y., Chen, M., Graham, S. H., ... Marion, D. W. (2003). Alterations in inducible 72-kDa heat shock protein and the chaperone cofactor BAG-1 in human brain after head injury. *Journal of Neurochemistry*, 84(3), 514–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12558971>
- Shapira, Y., Shohami, E., Sidi, A., Soffer, D., Freeman, S., & Cotev, S. (1988). Experimental closed head injury in rats: mechanical, pathophysiologic, and neurologic properties. *Critical Care Medicine*, 16(3), 258–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3277783>
- Shreiber, D. I., Bain, A. C., Ross, D. T., Smith, D. H., Gennarelli, T. A., McIntosh, T. K., & Meaney, D. F. (1999). Experimental investigation of cerebral contusion: histopathological and immunohistochemical evaluation of dynamic cortical deformation. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58(2), 153–64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10029098>

- Simpson, G., & Tate, R. (2002). Suicidality after traumatic brain injury: demographic, injury and clinical correlates. *Psychological Medicine*, 32(4), 687–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12102383>
- Singleton, R. H., & Povlishock, J. T. (2004). Identification and characterization of heterogeneous neuronal injury and death in regions of diffuse brain injury: evidence for multiple independent injury phenotypes. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(14), 3543–53. doi:10.1523/JNEUROSCI.5048-03.2004
- Smith, C., Gentleman, S. M., Leclercq, P. D., Murray, L. S., Griffin, W. S. T., Graham, D. I., & Nicoll, J. A. R. (2013). The neuroinflammatory response in humans after traumatic brain injury. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 39(6), 654–66. doi:10.1111/nan.12008
- Smith, D. H., Chen, X. H., Pierce, J. E., Wolf, J. A., Trojanowski, J. Q., Graham, D. I., & McIntosh, T. K. (1997). Progressive atrophy and neuron death for one year following brain trauma in the rat. *Journal of Neurotrauma*, 14(10), 715–27. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9383090>
- Smith, F. M., Raghupathi, R., MacKinnon, M.-A., McIntosh, T. K., Saatman, K. E., Meaney, D. F., & Graham, D. I. (2000). TUNEL-positive staining of surface contusions after fatal head injury in man. *Acta Neuropathologica*, 100(5), 537–45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11045676>
- Spikman, J. M., Timmerman, M. E., Milders, M. V, Veenstra, W. S., & van der Naalt, J. (2012). Social cognition impairments in relation to general cognitive deficits, injury severity, and prefrontal lesions in traumatic brain injury patients. *Journal of Neurotrauma*, 29(1), 101–11. doi:10.1089/neu.2011.2084
- Stefini, R., Catenacci, E., Piva, S., Sozzani, S., Valerio, A., Bergomi, R., ... Latronico, N. (2008). Chemokine detection in the cerebral tissue of patients with posttraumatic brain contusions. *Journal of Neurosurgery*, 108(5), 958–62. doi:10.3171/JNS/2008/108/5/0958
- Sundaram, N. K., Geer, E. B., & Greenwald, B. D. (2013). The impact of traumatic brain injury on pituitary function. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 42(3), 565–83. doi:10.1016/j.ecl.2013.05.003
- Sundman, M. H., Hall, E. E., & Chen, N.-K. (2014). Examining the relationship between head trauma and neurodegenerative disease: A review of epidemiology, pathology and neuroimaging techniques. *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism*, 4(137), 2161–0460. doi:10.4172/2161-0460.1000137

- Sutton, R. L., Lescaudron, L., & Stein, D. G. (1993). Unilateral cortical contusion injury in the rat: vascular disruption and temporal development of cortical necrosis. *Journal of Neurotrauma*, 10(2), 135–49. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8411217>
- Swartz, B. E., Houser, C. R., Tomiyasu, U., Walsh, G. O., DeSalles, A., Rich, J. R., & Delgado-Escueta, A. (2006). Hippocampal cell loss in posttraumatic human epilepsy. *Epilepsia*, 47(8), 1373–82. doi:10.1111/j.1528-1167.2006.00602.x
- Szaflarski, J. P., Nazzari, Y., & Dreier, L. E. (2014). Post-traumatic epilepsy: current and emerging treatment options. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 10, 1469–77. doi:10.2147/NDT.S50421
- Taiushev, K. G., Zotov, I. V., Kaganovskaia, E. A., Kasumov, R. D., & Shustova, T. I. (1990). Changes in human cerebral cortex in various areas of concussion in severe cranio-cerebral injury. *Arkhiv Anatomii, Gistologii i Émbriologii*, 99(8), 26–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2268187>
- Takahashi, M., Billups, B., Rossi, D., Sarantis, M., Hamann, M., & Attwell, D. (1997). The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *The Journal of Experimental Biology*, 200(Pt 2), 401–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9050249>
- Takamiya, Y., Kohsaka, S., Toya, S., Otani, M., & Tsukada, Y. (1988). Immunohistochemical studies on the proliferation of reactive astrocytes and the expression of cytoskeletal proteins following brain injury in rats. *Brain Research*, 466(2), 201–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3359311>
- Tashiro, Y., Chakraborty, S., Drake, J. M., & Hattori, T. (1997). Progressive loss of glutamic acid decarboxylase, parvalbumin, and calbindin D28K immunoreactive neurons in the cerebral cortex and hippocampus of adult rat with experimental hydrocephalus. *Journal of Neurosurgery*, 86(2), 263–71. doi:10.3171/jns.1997.86.2.0263
- Taylor, L. A., Kreutzer, J. S., Demm, S. R., & Meade, M. A. (2003). Traumatic brain injury and substance abuse: A review and analysis of the literature. *Neuropsychological Rehabilitation*, 13(1-2), 165–88. doi:10.1080/09602010244000336
- Teasdale, T. W., & Engberg, A. W. (2001). Suicide after traumatic brain injury: a population study. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, 71(4), 436–40. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1763534&tool=pmc&rendertype=abstract>

- Timofeev, I., Bazhenov, M., Avramescu, S., & Nita, D. a. (2010). Posttraumatic epilepsy: the roles of synaptic plasticity. *The Neuroscientist : A Review Journal Bringing Neurobiology, Neurology and Psychiatry*, 16(1), 19–27. doi:10.1177/1073858409333545
- Tippett, L. J., Waldvogel, H. J., Thomas, S. J., Hogg, V. M., van Roon-Mom, W., Synek, B. J., ... Faull, R. L. M. (2007). Striosomes and mood dysfunction in Huntington's disease. *Brain : A Journal of Neurology*, 130(Pt 1), 206–21. doi:10.1093/brain/awl243
- Tooney, P. a, & Chahl, L. a. (2004). Neurons expressing calcium-binding proteins in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 28(2), 273–8. doi:10.1016/j.pnpbp.2003.10.004
- Trump, B. F., Berezesky, I. K., Sato, T., Laiho, K. U., Phelps, P. C., & DeClaris, N. (1984). Cell calcium, cell injury and cell death. *Environmental Health Perspectives*, 57, 281–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1568285&tool=pmc&rendertype=abstract>
- Tsaousides, T., Cantor, J. B., & Gordon, W. A. (2011). Suicidal ideation following traumatic brain injury: prevalence rates and correlates in adults living in the community. *The Journal of Head Trauma Rehabilitation*, 26(4), 265–75. doi:10.1097/HTR.0b013e3182225271
- Unal-Cevik, I., Kilingç, M., Gürsoy-Ozdemir, Y., Gurer, G., & Dalkara, T. (2004). Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain Research*, 1015(1-2), 169–74. doi:10.1016/j.brainres.2004.04.032
- Uryu, K., Chen, X.-H., Martinez, D., Browne, K. D., Johnson, V. E., Graham, D. I., ... Smith, D. H. (2007). Multiple proteins implicated in neurodegenerative diseases accumulate in axons after brain trauma in humans. *Experimental Neurology*, 208(2), 185–92. doi:10.1016/j.expneurol.2007.06.018
- Valbuena, S. J. (2012). Muertes y lesiones no fatales por accidentes de transporte. Colombia, 2011. *Forensis*, 13(1), 267–310.
- Valencia, I., Legido, A., Yelin, K., Khurana, D., Kothare, S. V., & Katsetos, C. D. (2006). Anomalous inhibitory circuits in cortical tubers of human tuberous sclerosis complex associated with refractory epilepsy: aberrant expression of parvalbumin and calbindin-D28k in dysplastic cortex. *Journal of Child Neurology*, 21(12), 1058–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17156698>

- Vaz, R., Sarmiento, A., Borges, N., Cruz, C., & Azevedo, I. (1997). Ultrastructural study of brain microvessels in patients with traumatic cerebral contusions. *Acta Neurochirurgica*, 139(3), 215–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9143587>
- Vázquez-Chona, F. R., Swan, A., Ferrell, W. D., Jiang, L., Baehr, W., Chien, W.-M., ... Levine, E. M. (2011). Proliferative reactive gliosis is compatible with glial metabolic support and neuronal function. *BMC Neuroscience*, 12, 98. doi:10.1186/1471-2202-12-98
- Verellen, R. M., & Cavazos, J. E. (2010). Post-traumatic epilepsy: an overview. *Therapy*, 7(5), 527–531. doi:10.2217/THY.10.57
- Verma, A., Anand, V., & Verma, N. P. (2007). Sleep disorders in chronic traumatic brain injury. *Journal of Clinical Sleep Medicine : JCSM : Official Publication of the American Academy of Sleep Medicine*, 3(4), 357–62. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1978305&tool=pmc&entrez&rendertype=abstract>
- Verwer, R. W. H., Hermens, W. T. J. M. C., Dijkhuizen, P., ter Brake, O., Baker, R. E., Salehi, A., ... Swaab, D. F. (2002). Cells in human postmortem brain tissue slices remain alive for several weeks in culture. *FASEB Journal*, 16(1), 54–60. doi:10.1096/fj.01-0504com
- Viola-Saltzman, M., & Watson, N. F. (2012). Traumatic brain injury and sleep disorders. *Neurologic Clinics*, 30(4), 1299–312. doi:10.1016/j.ncl.2012.08.008
- Wagner, A. K., McCullough, E. H., Niyonkuru, C., Ozawa, H., Loucks, T. L., Dobos, J. a, ... Fabio, A. (2011). Acute serum hormone levels: characterization and prognosis after severe traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 28(6), 871–88. doi:10.1089/neu.2010.1586
- Wasserman, L., Shaw, T., Vu, M., Ko, C., Bollegala, D., & Bhalerao, S. (2008). An overview of traumatic brain injury and suicide. *Brain Injury*, 22(11), 811–9. doi:10.1080/02699050802372166
- Williams, S., Raghupathi, R., MacKinnon, M. A., McIntosh, T. K., Saatman, K. E., & Graham, D. I. (2001). In situ DNA fragmentation occurs in white matter up to 12 months after head injury in man. *Acta Neuropathologica*, 102(6), 581–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11761718>
- Wolf, H., & Buslei, R. (1996). NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. ... *of Histochemistry & ...*, 44(10), 1167–1171. Retrieved from <http://jhc.sagepub.com/content/44/10/1167.short>

- Wu, H.-M., Huang, S.-C., Vespa, P., Hovda, D. A., & Bergsneider, M. (2013). Redefining the pericontusional penumbra following traumatic brain injury: evidence of deteriorating metabolic derangements based on positron emission tomography. *Journal of Neurotrauma*, 30(5), 352–60. doi:10.1089/neu.2012.2610
- Xiong, Y., Mahmood, A., & Chopp, M. (2013). Animal models of traumatic brain injury. *Nature Reviews. Neuroscience*, 14(2), 128–42. doi:10.1038/nrn3407
- Yang, L., & Benardo, L. (1997). Epileptogenesis following neocortical trauma from two sources of disinhibition. *Journal of Neurophysiology*, 78(5), 2804–10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9356429>
- Yang, L., & Benardo, L. (1998). Removal of superficial inhibition releases hyperexcitability in middle and deep horizontal slices from rat somatosensory neocortex. *Neuroscience Letters*, 257(1), 33–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9857959>
- Yang, L., Benardo, L., Valsamis, H., & Ling, D. (2007). Acute injury to superficial cortex leads to a decrease in synaptic inhibition and increase in excitation in neocortical layer V pyramidal cells. *Journal of Neurophysiology*, 97(1), 178–87. doi:10.1152/jn.01374.2005
- Yang, Z., You, Y., & Levison, S. (2008). Neonatal hypoxic/ischemic brain injury induces production of calretinin-expressing interneurons in the striatum. *Journal of Comparative ...*, 511(1), 19–33. doi:10.1002/cne.21819. Neonatal
- Yenari, M. A., Minami, M., Sun, G. H., Meier, T. J., Kunis, D. M., McLaughlin, J. R., ... Steinberg, G. K. (2001). Calbindin d28k overexpression protects striatal neurons from transient focal cerebral ischemia. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 32(4), 1028–35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11283407>
- Zaitsev, a V, Gonzalez-Burgos, G., Povysheva, N. V, Kröner, S., Lewis, D. a, & Krimer, L. S. (2005). Localization of calcium-binding proteins in physiologically and morphologically characterized interneurons of monkey dorsolateral prefrontal cortex. *Cerebral Cortex (New York, N.Y. : 1991)*, 15(8), 1178–86. doi:10.1093/cercor/bhh218
- Zhang, L., Zhang, W.-P., Hu, H., Wang, M.-L., Sheng, W.-W., Yao, H.-T., ... Wei, E.-Q. (2006). Expression patterns of 5-lipoxygenase in human brain with traumatic injury and astrocytoma. *Neuropathology*, 26(2), 99–106. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16708542>

- Zhang, Q., & Sachdev, P. S. (2003). Psychotic disorder and traumatic brain injury. *Current Psychiatry Reports*, 5(3), 197–201. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12773272>
- Zhang, X., Graham, S. H., Kochanek, P. M., Marion, D. W., Nathaniel, P. D., Watkins, S. C., & Clark, R. S. (2003). Caspase-8 expression and proteolysis in human brain after severe head injury. *FASEB Journal*, 17(10), 1367–9. doi:10.1096/fj.02-1067fje
- Zhang, X., Liu, E., Liu, X., & Dai, Q. (2001). Changes in and effective factors of microtubule-associated protein 2 in traumatic neurons. *Chinese Medical Journal*, 114(10), 1035–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11677761>
- Zsombok, A., Tóth, Z., & Gallyas, F. (2005). Basophilia, acidophilia and argyrophilia of “dark” (compacted) neurons during their formation, recovery or death in an otherwise undamaged environment. *Journal of Neuroscience Methods*, 142(1), 145–52. doi:10.1016/j.jneumeth.2004.08.005

Anexos

Anexo A

Publicaciones asociadas al trabajo de doctorado

1. Escobar M.I., Guzmán F., **Buriticá E.**, Riascos D., Villamil L., Pimienta H.J., *Alteración de la organización laminar y de la dendroarquitectura de la corteza cerebral del humano post-trauma craneoencefálico*. Colombia Médica, 2008 39(3, supl. 3): 51-59. Artículo original. Número de citas: 4

Alteración de la organización laminar y de la dendroarquitectura de la corteza cerebral del humano post-trauma craneoencefálico

**MARTHA ISABEL ESCOBAR, MSc¹, FRANCISCO GUZMÁN, MD², EFRAÍN BURITICÁ, MSc³,
DAVID RIASCOS, MD⁴, LILIANA VILLAMIL, MD⁴, HERNÁN PIMIENTA, MSc⁵**

RESUMEN

Introducción: El trauma craneoencefálico (TCE) es un fenómeno heterogéneo desde el punto de vista molecular, celular y en la respuesta clínica. Se considera que esta diversidad se debe a la intensidad de la injuria primaria, eventos secundarios asociados (hipoxia, isquemia, edema, inflamación), al estado metabólico del paciente, su base genética, edad, género, etc. Para determinar la integridad anatómico-funcional de las células nerviosas es importante verificar el estado de la cito, dendroarquitectura y preservación laminar como un requisito para garantizar conectividad.

Objetivo: Valorar la respuesta de las neuronas al trauma con dos marcadores neuronales selectivos sensibles a la lesión NeuN y MAP2.

Materiales y métodos: Se utilizaron muestras (4 de lóbulo temporal y 2 de lóbulo frontal) de 6 pacientes que habían sufrido TCE. Las muestras se fijaron en PLP, cortadas en vibrátomo a 50 µm, incubadas con los anticuerpos NeuN y MAP2 y procesadas con el sistema avidina-biotina. Como control se utilizó tejido humano *post-mortem*.

Resultados: La inmunorreactividad (IR) para NeuN fue anormal en todas las muestras, con sectores que mostraron IR ligeramente alterada, otros con pérdida parcial de las capas supragranulares, sobre todo la lámina III y otros con pérdida drástica de todas las láminas. La IR para MAP2 se alteró en todas las muestras con diferentes grados de compromiso. Los procesos dendríticos fueron difíciles de seguir, especialmente los procedentes de la lámina V, los cuales se observaron tortuosos, fragmentados y con orientación aberrante.

Conclusiones: Con el propósito de conocer el estado de las neuronas después de un evento lesivo se recomienda el uso de los marcadores NeuN y MAP2 complementarios a los métodos clásicos. El presente trabajo muestra la diversidad de respuestas histopatológicas en sectores adyacentes de una misma muestra con ambos marcadores, como un indicador de los diferentes estados de neurodegeneración.

Palabras clave: Trauma craneoencefálico; MAP2; NeuN; Corteza cerebral humana.

2. **Buriticá E.**, Villamil L., Guzmán F., Escobar M.I., García-Cairasco N., Pimienta H.J., *Changes in calcium-binding proteins expression in human cortical contusion tissue*. Journal of Neurotrauma, 2009 26(12): 2145-55.
Artículo original. Número de citaciones: 10

JOURNAL OF NEUROTRAUMA 26:2145–2155 (December 2009)
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/neu.2009.0894

Original Articles

Changes in Calcium-Binding Protein Expression in Human Cortical Contusion Tissue

Efraín Buriticá,¹ Liliana Villamil,¹ Francisco Guzmán,¹ Martha I. Escobar,¹
Norberto García-Cairasco,² and Hernán J. Pimienta¹

Abstract

Traumatic brain injury (TBI) produces several cellular changes, such as gliosis, axonal and dendritic plasticity, and inhibition-excitation imbalance, as well as cell death, which can initiate epileptogenesis. It has been demonstrated that dysfunction of the inhibitory components of the cerebral cortex after injury may cause status epilepticus in experimental models; we proposed to analyze the response of cortical interneurons and astrocytes after TBI in humans. Twelve contusion samples were evaluated, identifying the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) and calcium-binding proteins (CaBPs). The study was made in sectors with and without preserved cytoarchitecture evaluated with NeuN immunoreactivity (IR). In sectors with total loss of NeuN-IR the results showed a remarkable loss of CaBP-IR both in neuropil and somata. In sectors with conserved cytoarchitecture less drastic changes in CaBP-IR were detected. These changes include a decrease in the amount of parvalbumin (PV-IR) neurons in layer II, an increase of calbindin (CB-IR) neurons in layers III and V, and an increase in calretinin (CR-IR) neurons in layer II. We also observed glial fibrillary acidic protein immunoreactivity (GFAP-IR) in the white matter, in the gray-white matter transition, and around the sectors with NeuN-IR total loss. These findings may reflect dynamic activity as a consequence of the lesion that is associated with changes in the excitatory circuits of neighboring hyperactivated glutamatergic neurons, possibly due to the primary impact, or secondary events such as hypoxia-ischemia. Temporal evolution of these changes may be the substrate linking severe cortical contusion and the resulting epileptogenic activity observed in some patients.

Key words: calcium-binding proteins; epileptogenesis; GABA interneurons; human traumatic brain injury

3. Riascos D., **Buriticá E.**, Jiménez E., Castro O., Guzmán F., Palacios M., García-Cairasco N., Geula Ch., Escobar M.I., Pimienta H.J., *Neurodegenerative diversity in human cortical contusion: Histological analysis of tissue derived from decompressive craniectomy*. Brain Research, 2013 1537: 86-99. Artículo original. Número de citas: 1

BRAIN RESEARCH 1537 (2013) 86–99

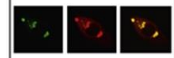


Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/brainres

Brain Research



Research Report

Neurodegenerative Diversity in human cortical contusion: Histological analysis of tissue derived from decompressive craniectomy



David Riascos^{a,b,*}, Efraín Buriticá^b, Eliecer Jiménez^b, Olagide Castro^c,
Francisco Guzmán^b, Mauricio Palacios^b, Norberto Garcia-Cairasco^c,
Changiz Geula^a, Martha Escobar^b, Hernán Pimienta^b

^aCognitive and Neurology Alzheimer's Disease Center, Feinberg Medical School, Northwestern University, 320 East Superior St, Chicago, IL 60610, USA

^bCentro de Estudios Cerebrales, Facultad de Salud, Universidad del Valle, Sede San Fernando, Calle 4 B # 36-00, Cali, Colombia

^cNeurophysiology and Experimental Neuroetology Laboratory, Ribeirão Preto School of Medicine, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, Sao Paulo, Brazil

Anexo B

Ponencias asociadas al trabajo de doctorado

1. **TÍTULO:** *Expresión de la proteína Cristalina Alfa B y de la proteína Acídica Fibrilar Glial en trauma craneoencefálico en humanos*

MODALIDAD: Presentación oral

EVENTO: XIII Simposio de Investigaciones en Salud

INSTITUCIÓN: Facultad de Salud – Universidad del Valle

FECHA Y LUGAR: Octubre – 2011 / Cali – Colombia

2. **TÍTULO:** *Expresión de CRYAB en contusión cerebral de humano*

MODALIDAD: Presentación oral

EVENTO: XII Simposio de Investigaciones en Salud

INSTITUCIÓN: Facultad de Salud – Universidad del Valle

FECHA Y LUGAR: Octubre – 2010 / Cali – Colombia

3. **TÍTULO:** *Valoración cuantitativa de la lesión y muerte neuronal en corteza cerebral de rata con citometría de flujo*

MODALIDAD: Presentación oral

EVENTO: XII Simposio de Investigaciones en Salud

INSTITUCIÓN: Facultad de Salud – Universidad del Valle

FECHA Y LUGAR: Octubre – 2010 / Cali – Colombia

4. **TÍTULO:** *Variantes en la expresión de interneuronas en trauma craneoencefálico*

MODALIDAD: Presentación oral

EVENTO: XI Simposio de Investigaciones en Salud

INSTITUCIÓN: Facultad de Salud – Universidad del Valle

FECHA Y LUGAR: Octubre – 2009 / Cali - Colombia

5. **TÍTULO:** *Cambios en la expresión de las proteínas que ligan calcio en muestras de corteza cerebral de humano después de trauma craneoencefálico*

MODALIDAD: Presentación oral

EVENTO: X Simposio de Investigaciones en Salud

INSTITUCIÓN: Facultad de Salud – Universidad del Valle

FECHA Y LUGAR: Octubre – 2008 / Cali - Colombia

6. **TÍTULO:** *Response of GABAergic interneurons to human TBI*

MODALIDAD: Poster

EVENTO: International Symposium NEWroscience 2008 – Contemporary Neurosciences, Epilepsies and Arts

INSTITUCIÓN: Neurophysiology and Experimental Neuroethology Laboratory – Ribeirão Preto School of Medicine – University of São Paulo

FECHA Y LUGAR: Septiembre – 2008 / Ribeirao Preto - Brasil

7. **TÍTULO:** *Respuesta de las interneuronas GABAérgicas al TCE en humano*

MODALIDAD: Presentación oral

EVENTO: VI Encuentro Nacional de Neurociencias / VII Seminario Internacional de Neurociencias

INSTITUCIÓN: Colegio Colombiano de Neurociencias COLNE

FECHA Y LUGAR: Abril – 2008 / Bogotá - Colombia

8. **TÍTULO:** *Cyclin D1 expression after TBI in human cortex*

MODALIDAD: Poster

EVENTO: Annual Meeting of Society for Neuroscience

INSTITUCIÓN: Society for Neuroscience

FECHA Y LUGAR: Octubre – 2006 / Atlanta – Estados Unidos de América

9. **TÍTULO:** APP expression *in human traumatic brain injury*

MODALIDAD: Poster

EVENTO: Annual Meeting of Society for Neuroscience

INSTITUCIÓN: Society for Neuroscience

FECHA Y LUGAR: Octubre – 2006 / Atlanta – Estados Unidos de América

10. **TÍTULO:** *Expresión de la Ciclina D1 en la corteza cerebral de humano después de trauma craneoencefálico*

MODALIDAD: Presentación oral

EVENTO: VI Seminario Internacional / V Encuentro Nacional de Neurociencias

INSTITUCIÓN: Centro de Estudios Cerebrales - Universidad del Valle

FECHA Y LUGAR: Octubre – 2006 / Cali - Colombia

11. **TÍTULO:** *Corteza cerebral del humano: Citoarquitectura normal y respuesta a la lesión traumática*

MODALIDAD: Presentación oral

EVENTO: Primera Jornada de Neurociencias para el Eje Cafetero

INSTITUCIÓN: Centro de Biología Molecular y Biotecnología –Universidad Tecnológica de Pereira

FECHA Y LUGAR: Mayo – 2006 / Pereira – Risaralda