

Modelo de Cultivo Órganotípico Agudo de Cerebro de Rata Para la Evaluación de Fármacos Neuroprotectores en Trauma Cráneo Encefálico

Daniel Romero Urrea



**Universidad del Valle
Facultad de Salud**

**Escuela de Ciencias Básicas
Maestría en Ciencias Biomédicas**

**Cali
2016**

Daniel Romero Urrea

**Proyecto de Investigación presentado como requisito para optar al
título de Magíster en Ciencias Biomédicas**

MAURICIO PALACIOS GÓMEZ, M.D. M.Sc. Ph.D.

Director

Facultad de Salud

**Escuela de Ciencias Básicas
Maestría en Ciencias Biomédicas**

Dedicado a la Zarigüeya y la Musaraña

Contenido

1	Resumen ejecutivo	6
2	Abstract	7
3	Planteamiento del problema	8
4	Marco Teórico	11
4.1	Fisiopatología del TCE	11
4.2	Estado actual de la investigación de fármacos en TCE	12
4.3	Lesión axonal difusa	14
4.4	Modelos de TCE	15
4.5	Cultivos organotípicos agudos	16
4.6	Viabilidad y recuento celular	17
4.7	Proteína nuclear específica de neuronas	18
4.8	Proteína precursora del amiloide	19
4.9	Progesterona como modelo de neuroprotección	20
5	Materiales y métodos	23
5.1	Diseño experimental	23
5.2	Modelo de lesión	24
5.3	Preparación de las tajadas	27
5.4	Cultivo celular organotípico	28
5.5	Procesamiento de las Muestras	32
5.6	Inmunohistoquímica	32
5.7	Registro y Procesamiento De Imágenes	33
5.8	Análisis de datos y estadística	34

6	Consideraciones éticas.....	35
7	Resultados	36
7.1	Observaciones clínicas	36
7.2	Observaciones histopatológicas macroscópicas	36
7.3	Datos descriptivos de la expresión de NeuN	36
7.4	Datos descriptivos de la expresión APP N-Terminal	40
7.5	Datos cuantitativos de la los conteos de neuronas marcadas con NeuN en la corteza motora	41
7.6	Datos cuantitativos de los conteos de neuronas marcadas con NeuN en la corteza sensitiva.....	45
7.7	Datos cuantitativos de la los conteos de neuronas marcadas con APP N-Terminal en la corteza motora.....	49
7.8	Datos cuantitativos de la los conteos de neuronas marcadas con APP N-Terminal en la corteza sensitiva.....	53
8	Discusión.....	59
8.1	Modelo de lesión y cultivos organotípicos.....	59
8.2	Efecto neuroprotector de la progesterona.....	63
9	Conclusiones	67
10	Anexos.....	68
10.1	Protocolo de anestesia.....	68
10.2	Protocolo de modelo de lesión.....	68
10.3	Protocolo de viabilidad celular	69
10.4	Protocolo de inmunohistoquímica	69
11	Referencias	71

1 Resumen ejecutivo

El trauma craneoencefálico (TCE) es una de las lesiones que tiene mayor impacto sobre una comunidad, debido a las consecuencias directas e inmediatas de éste, así como por las secuelas que genera a largo plazo, las cuales pueden ser progresivas y presentarse en los días iniciales o incluso años después. Las condiciones relacionadas con el TCE, ya son en si mismas un problema mayor; los estudios realizados han encontrado que tras el impacto primario, aumenta el riesgo de presentar síndromes epilépticos (11 veces), enfermedad de Alzheimer (4,5 veces), depresión (1,5 veces), entre otros trastornos psicoafectivos significativamente importantes. Además, el riesgo de morir es 7,5 veces mayor.

Durante los últimos treinta años, la investigación de fármacos para esta entidad ha sido infructuosa; debido a esto, dentro de los grupos de investigación en neurociencias, se han trazado diferentes estrategias, para abordar desde diferentes ángulos la búsqueda de terapias que disminuyan el impacto y las secuelas que se presentan en los pacientes que han sufrido un TCE. Una de estas directrices apunta a la generación de modelos in vitro, que tengan una mayor posibilidad de predecir las respuestas neuroprotectoras de los fármacos candidatos. Partiendo de esta base, se ha considerado la posibilidad de desarrollar cultivos agudos de tajadas corticales organotípicas, provenientes de cerebros de rata que recibieron un impacto que produjo una lesión cerebral difusa según la metodología descrita por Marmarou. El modelo tiene la ventaja de que permite mantener las relaciones glía/neurona y las conexiones propias de la zona. Además de conservar el contexto tisular del área a estudiar.¹

En el Centro de Estudios Cerebrales, se han cultivado con éxito tajadas agudas de corteza cerebral, provenientes de cirugía descompresiva realizada en pacientes atendidos por trauma craneoencefálico, y con estas se ha descrito la evolución temporal del tejido hasta por 12 horas después de la intervención; posteriormente, el grupo se centró en el estudio del modelo de cultivo organotípico como una herramienta para describir los sucesos tempranos del TCE, para esto se desarrolló en conjunto un modelo de TCE difuso por aceleración y se estandarizó la técnica. En el presente proyecto se plantea avanzar en el desarrollo del modelo, orientándolo hacia la evaluación de fármacos; motivo por el cual, se van a investigar marcadores funcionales sensibles a los procesos de lesión, neurodegeneración y supervivencia, con el fin de implementarlos como indicadores en la evaluación de fármacos candidatos a convertirse en neuroprotectores.

Lograr cultivar neuronas postmitóticas, ha sido una de las principales dificultades en la generación de modelos in vitro para TCE; alcanzar el objetivo de esta propuesta, abrirá una puerta para el estudio en condiciones controladas y accesibles a la fisiopatología del TCE, con la posibilidad de evaluar fármacos, con el objetivo de desarrollar nuevos medicamentos que permitan mejorar el pronóstico de los pacientes víctimas de TCE.

2 Abstract

Traumatic brain injury (TBI) is the beginning of a chronic inability because the patients can develop motor impairment, cognitive and affective disorders among those who survive.

The neurological and psychiatric disorders may or may not be progressive, and can occur days, months or years after primary impact. The prevalence in Colombia of the sequels of TBI is 6.4 x1000 inhabitants which means a public health concern of great magnitude.

TBI is a factor associated with other medical conditions: Alcoholism is more frequent (1.8 times) between 1 and 3 years post-TBI and the risk of epileptic syndromes (11 times), depression (1.5 times), Alzheimer's disease (4.5 times) and other psychoaffective disorders are significantly important. Furthermore, the risk of death is 7,5 fold higher in patients with TBI.

The investigation of drugs for this condition has been unsuccessful during the last thirty years, and because of this, strategies have been drawn from different angles to address the search for therapies that reduce the impact and the sequels for patients. One of those guidelines is aimed at the generation of in vitro models most likely to predict responses of neuroprotective drug candidates, and based on this, we considered the possibility of developing cultures of organotypic cortical acute slices.

In the Centro de Estudios Cerebrales (Brain Research Center) o the Universidad del Valle, we have successfully cultivated acute slices from decompressive surgery, in patients treated for TBI, and we have described the temporal evolution of tissue in this system for up to next 12 hours postoperative.

This project seeks to advance the development of the model, with focus on drug evaluation, therefore, we aim to investigate markers of injury, neurodegeneration and survival in acute organotypic model of rat brain to implement as a method for evaluating drugs TBI.

Achieving postmitotic neurons in a culture, has been one of the main difficulties in the generation of in vitro models for TBI; and achieve the objective of this proposal, will open a door for the study of TBI in accessible and controlled conditions to the pathophysiology, with the possibility of intervening promising neuroprotective drug.

3 Planteamiento del problema

La lesión cerebral traumática (TCE) es el inicio de lo que a futuro se convertirá en una enfermedad crónica, puesto que cumple con los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para esta definición: es permanente, está causada por alteraciones patológicas irreversibles, requiere terapia especializada para su rehabilitación, tanto física como cognitiva y/o puede requerir largos periodos de observación, supervisión y/o cuidado.^{2,3}

El TCE puede desencadenar una gran variedad de complicaciones, siendo ésta la principal causa de epilepsia,^{4,5} a su vez, se asocia con un mayor riesgo de padecer algunas condiciones médicas como son: la enfermedad de Alzheimer,⁶ la enfermedad de Parkinson,⁷ el alcoholismo,⁸ la depresión,^{9,10} la psicosis,^{11,12} el suicidio,¹³ diversos trastornos neuroendocrinos,^{14,15} la disfunción sexual y la incontinencia,¹⁶ además incrementa la mortalidad a largo plazo y reduce de manera significativa la expectativa de vida.^{17,18} La prevalencia en Colombia de la aparición de secuelas por TCE es de 6,4 por cada 1.000 habitantes,¹⁹ lo cual significa un problema de salud pública de mayor magnitud que el que se presenta en los Estados Unidos de Norteamérica, donde es del orden de 2,7 por cada 1.000 habitantes.²⁰

Aunque en la actualidad existen numerosos esfuerzos para disminuir la incidencia del TCE, todos están basados en estrategias para disminuir la violencia y prevenir los accidentes de tránsito, lamentablemente los resultados han sido desalentadores. Esto se traduce para la sociedad en un aumento significativo de los costos de la atención médica y en la pérdida de la productividad de los individuos, los cuales en su gran mayoría son jóvenes que se encuentran en las etapas más productivas de su vida; estas pérdidas han sido estimadas en otros países en una cifra anual, cercana a la tercera parte del producto interno bruto (PIB) de Colombia (60 billones de dólares),²¹ sin valorar los costos indirectos que se generan debido al impacto que tiene sobre la familia, los cuidadores y la comunidad en general.

La necesidad de contar con recursos terapéuticos que disminuyan las secuelas y las condiciones médicas asociadas al TCE es un planteamiento claro entre los objetivos de las neurociencias; sin embargo los fármacos candidatos como neuroprotectores, más prometedores en la investigación preclínica, al pasar a las pruebas en sujetos humanos, usualmente fallan en los estudios clínicos de fase I y II.²² Las explicaciones de estos resultados son diversas, incluyendo las diferencias en las respuestas celulares y tisulares a la lesión, además de la heterogeneidad del trauma en los humanos.

Esto refleja la importancia de profundizar en los mecanismos fisiopatológicos con diferentes niveles de complejidad, yendo desde lo molecular, pasando por lo celular hasta llegar a las estructuras complejas del sistema como la corteza cerebral la cual puede modelarse mediante técnicas *in vivo* e *in vitro*. Para el caso del TCE, la

investigación básica de neurociencias, ha utilizado en menor proporción a los modelos *in vitro* a partir de cultivos disociados que los modelos *in vivo*, debido a las dificultades que se presentan para mantener las neuronas postmitóticas y las células gliales en cultivo. Otro de los factores que han desalentado el uso de estas metodologías, ha sido la falta de predictibilidad de los modelos originados a partir de células embrionarias o líneas tumorales, los cuales no han sido muy útiles para recrear la organización, conectividad y el microambiente de la matriz extracelular, propios de la corteza cerebral,²³ así como los diferentes aspectos fisiopatológicos propios del TCE.

A partir de esta necesidad, se empezaron a desarrollar modelos *in vitro*, basados en los cultivos celulares organotípicos, los cuales ofrecen todas las ventajas de la conservación de las conexiones celulares tejido-específicas. Es decir, esta metodología permite preservar los circuitos neuronales locales con los patrones de innervación apropiada, pero excluyendo parámetros complejos de los modelos animales, como son la irrigación sanguínea, la barrera hematoencefálica, etc. Estos modelos han tenido dos líneas de desarrollo: la primera línea es el cultivo organotípico clásico, en el que mediante sistemas de preservación, nutrición y condiciones especiales se pueden mantener los tejidos por periodos de tiempo superiores a una semana; la segunda línea corresponde a las tajadas agudas, los cuales son sistemas mucho más simples, sin medios de preservación, en los cuales la vida útil se mide en horas.

En el Centro de Estudios Cerebrales se tiene interés en este último sistema, utilizando muestras de corteza cerebral e hipocampo de rata, el cual es un biomodelo clásico en la investigación básica en neurociencia y en farmacología, debido a que posee una neuroanatomía y una neuroquímica muy similar a la del ser humano, convirtiéndose por lo tanto en el candidato ideal para el estudio de fármacos promisorios en TCE, además el biomodelo se encuentra sustentado en el planteamiento de Walker y cols,²⁴ de sistemas basados en células con un buen rendimiento y que alberguen la complejidad biológica. Cuanto más cerca se encuentre el modelo *in vitro* del modelo *in vivo* y pueda reflejar los mecanismos fisiopatológicos relacionados con las condiciones de la enfermedad humana, es más alto su valor como una interface entre el descubrimiento y el desarrollo de nuevas terapias.²⁵

Adicionalmente, el grupo de investigación se ha enfocado en la investigación de la lesión secundaria post trauma en humanos y en estudios previos ha reportado alteraciones en la expresión de marcadores de integridad neuronal y glial con respuesta heterogénea; coexistiendo en un mismo escenario la pérdida celular, alteraciones del citoesqueleto, activación glial, microhemorragias y activación de la respuesta inflamatoria, entre otros fenómenos.^{26,27} También se describieron la vulnerabilidad selectiva que se presenta ante el TCE (particularmente en las capas supragranulares de la corteza cerebral) y una respuesta menos severa de algunos subtipos de interneuronas.²⁸ Basándose en esta línea de investigación se implementó como metodología la técnica de las tajadas agudas de corteza cerebral humana post TCE y

mediante esta, se realizaron varias descripciones de la evolución en el tiempo de la lesión.¹

En el presente proyecto se pretende avanzar en el desarrollo del modelo de tajadas agudas de corteza cerebral. Para lograr este objetivo se escogió a la rata como biomodelo de la lesión secundaria a TCE, usando la metodología de lesión cerebral difusa por trauma cerrado descrita por Marmarou²⁹ para obtener los tejidos y llevarlos al cultivo celular. De esta forma se obtiene un sistema de para evaluación de fármacos candidatos a convertirse en neuroprotectores.

4 Marco Teórico

4.1 Fisiopatología del TCE

El TCE es un trastorno heterogéneo con diferentes formas de presentación, donde el factor unificador es el daño cerebral causado por fuerzas externas, como consecuencia de un impacto directo, una rápida aceleración o desaceleración, un objeto penetrante o una onda expansiva, entre otros. La naturaleza, intensidad, dirección y duración de estas fuerzas determinan la evolución y magnitud de los daños.³⁰

La muerte neuronal en el TCE es causada por las fuerzas mecánicas directas hacia el cerebro, donde sus consiguientes alteraciones vasculares, celulares y moleculares dan lugar a la lesión primaria y secundaria. También hay evidencia de que los antecedentes genéticos, género, edad, tipo y gravedad de la lesión, el estado metabólico del cerebro, y otras condiciones (por ejemplo, otras enfermedades, medicamentos, etc.) asociadas con el traumatismo cerebral, puede afectar la gravedad y/o mecanismos de neurodegeneración.³¹

Los procesos fisiopatológicos del TCE se caracterizan por dos fases, las cuales pueden coexistir en el mismo paciente de manera frecuente: la lesión primaria y la secundaria. La lesión primaria es el resultado de fuerzas mecánicas que producen deformidad en el tejido en el momento del trauma, generando un daño inevitable e inmediato del parénquima con un patrón focal, multifocal o de lesión difusa, con procesos que difieren para cada uno de los componentes celulares, de matriz y vasculares. En términos de tratamiento, este tipo de contusión es exclusivamente sensible a acciones preventivas, pero no terapéuticas³² y las secuelas anatomopatológicas más frecuentes son los hematomas (incluyendo el epidural, subdural y la hemorragia intraparenquimatosa), la lesión axonal difusa, la hemorragia subaracnoidea y las contusiones.³³

La lesión secundaria se refiere al daño, potencialmente evitable, que ocurre en tiempos variables posterior a la lesión inicial, caracterizada por degeneración neuronal, axonal y glial, causada por interacciones dinámicas entre procesos de isquemia, edema, inflamación, citotoxicidad y/o reparación.³⁴ Para los pacientes que sobreviven al impacto inicial, la morbilidad y mortalidad, son determinadas por los procesos mencionados de lesión secundaria; estos pueden continuar durante meses después del TCE tanto en humanos como en modelos experimentales, constituyéndose en un modelo neurodegenerativo.³⁵

Basados en modelos de TCE en roedores, se ha dividido en tres periodos la etapa aguda de la lesión secundaria, comenzando por los eventos que se presentan minutos después de la lesión secundaria, los que se presentan durante las primeras 24 horas y

los de inicio tardío, entre las 24 – 72 horas post-lesión. Cada uno de estos períodos sólo refleja una estimación del comienzo de los eventos patogénicos; no obstante, la mayoría se extienden por días después del trauma, donde los detalles del perfil temporal y de las interacciones no se conocen en su totalidad.³⁶

Desde el punto de vista fisiopatológico, el proceso de la muerte neuronal se produce por dos mecanismos principales: Necrosis y apoptosis. La necrosis puede ser iniciada por el daño mecánico sobre el tejido, que conduce a la disminución de energía, la alteración de la membrana celular, el aumento del flujo de calcio y la alteración subsiguiente de la homeostasis iónica que provoca la liberación del glutamato.³⁷ Las alteraciones del potencial de membrana resultan en la despolarización de ésta, la liberación de glutamato y la sobre estimulación postsináptica de los receptores NMDA y AMPA, y un aumento en la conducción de calcio hacia el interior de las células que ocasiona un aumento en el estrés oxidativo, lesión mitocondrial y la activación de proteasas dependientes de calcio que causan la destrucción del citoesqueleto de las neuronas postsinápticas.³⁸ Las respuestas inflamatorias causadas por la liberación extracelular de los componentes del citoplasma y/o la ruptura de la barrera hematoencefálica, son otros factores que exponen a las neuronas adyacentes a las señales de muerte celular y daños secundarios.

La neurodegeneración apoptótica puede ocurrir a través de vías caspasa-dependiente o caspasa-independiente. La evidencia en seres humanos y modelos experimentales, muestra que las neuronas y las células gliales con morfología apoptótica se pueden encontrar varios meses después del TCE. Un gran número de estudios^{39,40,41,42} se han centrado en las vías mediadas por las mitocondrias que se desencadenan por la liberación del citocromo C y la formación de un apoptosoma, que surge de la unión de la procaspasa 9 al citocromo C y la proteasa del factor de activación de la apoptosis-1, que activa la caspasa 9 y posteriormente, activa la caspasa 3, en una forma de proteasa dependiente de ATP.^{43,44} Los sustratos de la caspasa 3 incluyen las proteínas del citoesqueleto, las enzimas de reparación del ADN como la poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP), las proteínas del ciclo celular y las enzimas implicadas en la transducción de señales.⁴⁵ Los datos existentes sugieren que la vía mediada por las mitocondrias, se activa tanto en los modelos de TCE experimental, como en el TCE en humanos. La expresión y activación de los distintos componentes de la vía, son más prominentes durante los primeros 3 días después de que ocurre el TCE.⁴⁶

4.2 Estado actual de la investigación de fármacos en TCE

Aunque las cifras de muerte y discapacidad a consecuencia del TCE son significativas, no se ha aprobado ningún tratamiento en los últimos treinta años y las acciones terapéuticas, incluidos los fármacos, han fracasado cuando se retan en ensayos clínicos con humanos.⁴⁷ La heterogeneidad del trauma se considera la mayor barrera

para alcanzar intervenciones terapéuticas efectivas y partiendo de este punto, se han generado iniciativas para afrontar la heterogeneidad en cada uno de los aspectos de la investigación en TCE con el fin de lograr una opción de tratamiento en los próximos 10 años.

La iniciativa *International Mission for Prognosis and Analysis of Clinical Trials in Traumatic Brain Injury* (IMPACT), pretende estandarizar, mejorar y organizar los ensayos clínicos que se realizan en TCE teniendo en cuenta que afrontar la variabilidad de la presentación de las lesiones y los múltiples mecanismos que las producen, requiere de unas metodologías de reclutamiento y evaluación más complejas que las disponibles para otras áreas de investigación clínica.⁴⁸ Por el momento, un primer logro ha sido el aumento de registro de ensayos clínicos con medicamentos para el tratamiento del TCE y la inclusión de la población pediátrica en estas investigaciones, encontrándose en junio de 2015, 890 estudios registrados en la base de datos *ClinicalTrials.gov*.⁴⁹

En el área preclínica, los modelos de TCE en animales han provisto a los investigadores de elementos para la investigación de la contusión, la isquemia, las lesiones asociadas a la reperusión, la lesión axonal difusa y recientemente, algunos modelos de trauma por onda explosiva;⁵⁰ sin embargo, las diferencias de tamaño, organización, desarrollo y maduración pueden afectar la respuesta a un efecto biomecánico, donde un cambio significativo en el cerebro lisencefálico de los roedores, puede trasladarse como una pequeña variación al cerebro girencefálico del humano, o viceversa.⁵¹

Por otro lado los modelos *in vitro* permiten explorar variables, de lesión secundaria en condiciones homogéneas de lesión, con algunas limitantes que requieren un mayor desarrollo de las técnicas. De estos, los cultivos de células disociados tienen ventajas en la reproductibilidad de los experimentos, el control sobre el ensayo y la posibilidad de manipulación es muy superior a los modelos *in vivo*. Sin embargo, las desventajas de la utilización de cultivos primarios incluyen la dificultad y la necesidad de experiencia muy calificada en la recolección de las muestras de tejido requeridas; las neuronas obtenidas de animal o humano adulto tienen bajas posibilidades de ser cultivadas con respecto a las cultivadas a partir del tejido embrionario y en el caso de utilizar estas últimas, la plasticidad y la adaptación de las células en desarrollo es mayor y por lo tanto afecta la modelación del trauma en el modelo con células adultas.⁵² Desde el punto de vista histológico, la desventaja de los cultivos disociados, es la distribución al azar de los diferentes tipos neuronales y que se desconocen o no se tienen en cuenta las redes neuronales tal como se encuentran *in situ*.

Los cultivos de tajada cerebrales en la investigación del TCE, son una opción intermedia entre los modelos animales y los cultivos primarios, porque permiten

mantener en parte la interconexión celular y la heterogeneidad,⁵³ con algunas características del control experimental de los cultivos de tejidos disociados.¹

Por último, los modelos computacionales tridimensionales de elementos finitos, han tenido un gran avance en la comprensión de la lesión primaria, en las predicciones y en el desarrollo de medidas preventivas del TCE. Sin embargo, requieren un aporte de resultados experimentales descriptivos de todos los componentes, con los cuales se construyen las variables de estos modelos.^{54, 55} En este contexto, los aportes de investigaciones anteriores, beneficiarán la construcción de modelos del TCE *in vitro*, *in vivo* y computacionales al generar nuevas variables que puedan ser consideradas como predictores de lesión o indicadores de eficacia de las medidas terapéuticas. El presente trabajo considera las recomendaciones del *Classification of Traumatic Brain Injury Workshop* 2008, organizado por el *National Institute of Neurological Disorders and Stroke*.⁵⁶

4.3 Lesión axonal difusa

El TCE, es una de las lesiones más complejas que se presentan en el ser humano, por esto, ha sido difícil obtener un modelo global del fenómeno; ante esta dificultad, se han creado una gran cantidad de diseños experimentales que reproducen aspectos concretos de las lesiones que son observadas en la atención clínica de los pacientes.⁵⁷ La mayoría de los modelos, reproducen las lesiones cerebrales focales,^{58,59,60} mientras que unos pocos se concentran en las lesiones cerebrales difusas.^{61,62} En la última década a la par del desarrollo de los modelos de TCE, se han desarrollado una serie de modelos *in vitro* que han permitido conocer más de cerca todos los procesos que ocurren a nivel celular en la lesión cerebral mediada por el TCE. Éstos permiten analizar patrones fisiológicos, neuroquímicos y patológicos; además permiten modelar diferentes intervenciones durante el progreso de la lesión, para evaluar la utilidad de nuevas herramientas diagnósticas y fármacos que puedan convertirse en agentes terapéuticos.

En este proyecto de investigación, se focalizó la atención en la lesión cerebral difusa, la forma más frecuente de presentación de daño neurológico en los pacientes que sufren un TCE. Para lograr este objetivo, se utilizó un modelo de lesión axonal difusa en roedores por impacto-aceleración diseñado por Marmorou,²⁹ con el fin de replicar la mecánica del trauma cerrado; en éste se deja caer un pistón con un peso establecido a un altura estándar, sobre un placa de acero fijada en el cráneo del animal de experimentación que se encuentra fijado sobre una base de espuma para amortiguar el impacto. Este modelo presenta muchas ventajas, pues es capaz de reproducir el edema cerebral que se produce en la lesión, así como la lesión axonal difusa, sin asociarse a contusiones focales, ni a la ruptura permanente de la barrera hematoencefálica.^{63,64} Con este modelo también es posible variar la intensidad de la lesión, en función de la masa y la altura desde que cae libremente la pesa que ejerce el trauma.

Un impacto producido desde una altura de 2 metros, con un peso de 450 g, produce un TCE grave, asociado a una incidencia de fracturas craneales del 12,5% y a una mortalidad del 44% en animales con ventilación espontánea.⁵² Si a los biomodelos se les suministra ventilación mecánica, se puede reducir la mortalidad a un 10%, debido a que la muerte generalmente se produce por el fallo transitorio de las funciones del tallo cerebral. Otra forma de reducir la mortalidad asociada al impacto, puede ser disminuir la altura del impacto, pues al dejar caer el peso desde 1 metro de altura, casi no se generan desenlaces fatales del procedimiento, dado que el TCE que se produce sería leve.

En este modelo de TCE, la lesión axonal difusa se produce porque el trauma produce un fallo en los mecanismos de transporte axonal.⁶⁵ Cuando la intensidad del TCE es leve, se observa un edema axonal que solo produce una disfunción en la conducción nerviosa, mientras que cuando ésta es moderada o severa, se presenta una tensión lineal que produce un daño estructural de los axones, con desconexión axonal total, producida por el movimiento de aceleración/desaceleración que generan la cabeza con respecto al cuello;^{66,67} en la práctica clínica, este es el mecanismo del trauma que se presenta con mayor frecuencia en los accidentes de tráfico. Uno de los aspectos principales de este tipo de lesión, consiste en el cambio de velocidad en el tiempo; la aceleración-desaceleración súbita que produce el TCE, es un parámetro muy importante en la respuesta tisular secundaria.

Las fuerzas que se generan al interior del cerebro difieren en función de la diferente masa de las estructuras que lo componen y esta desigualdad, es la que causa una distorsión y un exceso de tensión lineal sobre el tejido cerebral.^{68,69} El cambio de velocidad que se presenta la masa encefálica (por las fuerzas de aceleración/desaceleración súbita) es un parámetro muy importante en la respuesta tisular al trauma. La inercia produce un movimiento sagital rápido de la cabeza que determina una distribución desigual de las tensiones dentro del cerebro, debidas a las diferentes densidades del tejido, que tiene como efecto una distorsión y estiramiento del tejido cerebral.

4.4 Modelos de TCE

En este trabajo de investigación con el fin de modelar el TCE, se utilizó la metodología descrita por Marmorou, un modelo de impacto-aceleración por caída libre de un peso determinado; este mecanismo produce una lesión cerebral difusa que no se asocia a contusiones focales ni a la ruptura de la barrera hematoencefálica. El dispositivo de impacto consiste en una pesa de 450 gramos que se deja caer libremente por gravedad a través de un tubo de polimetilmetacrilato (Plexiglás) sobre un disco metálico fijado al cráneo de una rata con metacrilato; para prevenir fracturas del cráneo y permitir el

movimiento sagital, la cabeza de la rata debe fijarse sobre un colchón de goma-espuma con una densidad determinada.

El objetivo del tubo es permitir un ángulo controlado de la caída del objeto con un recorrido preestablecido, el disco tiene como función distribuir el la fuerza mecánica del impacto por todo el cráneo, para así disminuir el riesgo de fracturas y lesiones focales. La cabeza del animal de experimentación, se fija sobre un colchón de goma espuma para permitir un determinado movimiento de la cabeza sobre el impacto, que producirá una aceleración angular rápida en el plano sagital, que simula las fuerzas de aceleración y desaceleración, que sufre el cerebro dentro del cráneo y las cuales son finalmente las responsables de la lesión producida. En este modelo las ratas han de ser anestesiadas antes del procedimiento, no se recomienda el uso de analgésicos posteriormente debido a que pueden ser factores tanto neuroprotectores como neurolesivos, y en consecuencia pueden alterar los resultados del modelo.

4.5 Cultivos organotípicos agudos

El cultivo celular es una técnica que permite mantener una población de células vivas de manera controlada para poder realizar observaciones y estudiar diferentes aspectos de las mismas; en las técnicas tradicionales, se obtiene una sola línea de células para mantenerlas aisladas de elementos que puedan alterar su comportamiento. Sin embargo, para el estudio de ciertos fenómenos como el TCE se hace necesario la observación del panorama completo del ambiente celular dentro del encéfalo.⁷⁰

Teniendo en cuenta esto, se seleccionaron a un tipo especial de cultivos celulares, los cultivos organotípicos, en los cuales no se realiza una disociación de las células individuales, sino que se toman tajadas completas, con una población heterogénea de células que mantienen toda la citoarquitectura, con su organización tridimensional intacta y todas las interacciones que se presentan entre los diversos tipos que conforman el tejido cerebral.⁷¹ De esta manera, se pueden reproducir las condiciones *in vitro* de una manera más fiel a lo que está ocurriendo *in vivo*, para lograr unas descripciones más precisas de los fenómenos agudos que están ocurriendo.^{72,73,74}

Con esta técnica de cultivo celular, es posible observar los fenómenos aislados del tejido completo y permite un preciso control del ambiente extracelular, la temperatura, la nutrición y la oxigenación, pues la muestra de tejido se mantiene en un líquido cefalorraquídeo artificial que le permite un adecuado flujo metabólico y mantiene la temperatura constante, además se suministra oxigenación continuo mediante un suplemento gaseoso (dióxido de Carbono al 5% y Oxígeno al 95%) que mantiene vivos a los tejidos y valorar diferentes variantes metabólicas.^{75,76}

Al revisar las publicaciones realizadas en la última década, se nota un interés cada vez mayor en los cultivos organotípicos, para evaluar aspectos de la neurodegeneración; el biomodelo más utilizado por la facilidad y el conocimiento que se tiene de la especie es la rata, esto se debe a que son fáciles de mantener y obtener las tajadas de cerebro de una manera rápida para garantizar que lleguen vivas al medio de cultivo celular. Estos modelos de cultivo celular, han sido de gran utilidad para el estudio de las lesiones que se presentan hipoxia o en hipoglucemia, pues han permitido describir los tipos de muerte celular que se han asociado a esta, la secuencia de eventos relacionados y lo más importante para este proyecto, han demostrado ser de utilidad para la evaluación de nuevos fármacos, siendo posible la observación directa de sus efectos sobre los tejidos, sin las dificultades que supone la administración sistémica de los mismos, como las alteraciones que produce el metabolismo, los problemas de la distribución corporal y las tasas de eliminación de xenobióticos entre otros.

En el caso puntual del TCE, se han hecho trabajos para valorar las lesiones producidas por el trauma primario y el secundario. Generalmente se han utilizado ratas de hasta dos semanas de edad, obteniendo cortes hipocampales que han sido útiles para la comprensión de la fisiopatología y la evaluación de los fármacos candidatos a convertirse en medicamentos, siendo la respuesta de los tejidos completos, la que más se acerca a la situación real que se está modelando con el cultivo.

4.6 Viabilidad y recuento celular

Una de las claves para el éxito de cualquier modelo de cultivo celular organotípico, consiste en poder determinar de manera efectiva y precisa la viabilidad celular. Esta puede definirse como el total de células vivas y saludables en un muestra.

Para lograr esto, una de los métodos más utilizados es el ensayo de exclusión mediante el uso de Azul de Triptán, una técnica que permite visualizar la viabilidad de los tejidos y conocer de forma directa si dentro del cultivo celular existen células viables.^{77,78} Esta técnica está basada en un principio físico muy simple, la membrana plasmática tiene la propiedad de mantener fuera de las células a las moléculas hidrofóbicas como el Azul de Triptán, una propiedad que no tienen las células muertas, pues esta difunde libremente hacia el citoplasma. Entonces al aplicar la tinción sobre una muestra de tejido, las células viables van a visualizarse libres de la tinción en el interior, mientras que las células muertas van a tener colorante en su interior.

Para lograr que el ensayo sea efectivo, es necesario que las células que se van evaluar, se encuentren en una suspensión, para poder visualizarlas y cuantificarlas mediante un hematocitometro, que pueda manejar volúmenes definidos. Una vez se hayan realizado estos conteos, es posible calcular el numero total de células y cuál porcentaje de estas es viable.

Este ensayo es determinante para poder evaluar la respuesta de los tejidos a un medio específico, como es un modelo de cultivo organotípico, pues al permitir cuantificar la viabilidad de las células, permite saber que las condiciones del cultivo celular fueron apropiadas para mantener la viabilidad de los tejidos y poder modelar las condiciones que se quieran observar sin que existan sesgos producidos por la muerte de las células no relacionadas con el fenómeno a estudiar sino con las condiciones del medio de cultivo.

4.7 Proteína nuclear específica de neuronas

La proteína nuclear específica de neuronas (NeuN) es una proteína soluble que se encuentra en el núcleo y la región citoplasmática perinuclear de las poblaciones de neuronas vitales, esto hace del marcador NeuN, una excelente herramienta para determinar la viabilidad de las mismas en el sistema nervioso central de los mamíferos; al parecer, esta proteína corresponde a un factor de transcripción que se expresa de manera exclusiva en el núcleo y el citoplasma de neuronas postmitóticas, pero su función fisiológica no se entiende muy bien hasta la fecha.⁷⁹ Basándose en estas propiedades de la proteína, Mullen y su equipo desarrollaron un anticuerpo monoclonal que reconoce NeuN, que es específico para neuronas, marcando de manera precisa el núcleo y en menor medida el soma y los procesos proximales. En el sistema nervioso central, no presentan inmunorreactividad a este marcador las células fotorreceptoras de la retina, las células de Purkinje en cerebelo, las células mitrales de los bulbos olfatorios y la cadena simpática ganglionar así como ninguno de los tipos de células gliales; esto hace de el marcador NeuN, una excelente herramienta para determinar poblaciones neuronales.^{80,81}

Cuando las neuronas son fijadas en buenas condiciones, en ausencia de lesiones y factores deletéreos, expresan una intensa inmunorreactividad ante NeuN; por otra parte, condiciones patológicas como la hipoxia, la isquemia cerebral y especialmente el trauma, producen una disminución de la intensidad de la marcación por toda la neurona.⁸² Aunque la reducción de la marcación con el anticuerpo anti-NeuN puede, según algunos autores, indicar cambio en la antigenicidad de la proteína NeuN en lugar de la muerte celular y algunas neuronas pueden recuperar su patrón de tinción después de la reparación; se acepta que este fenómeno corresponde a la lesión neuronal.^{26,83}

En la actualidad, la marcación mediante anticuerpos dirigidos a NeuN, se considera como una de las mejores herramientas para realizar estudios estereológicos en corteza cerebral, esto se debe a que en la corteza cerebral, tiene la capacidad para marcar toda la población neuronal, mientras que otros marcadores específicos como el la proteína del neurofilamento⁸⁴ los marcadores de β -tubulina III, y la Enolasa específica para neuronas, que se encuentran presentes en procesos neuronales e incluso la histórica

tinción con Nissl, tienen una menor sensibilidad cuando se trata de ubicar y marcar grupos de neuronas piramidales, además, son mucho más lábiles a los cambios de pH que se puedan presentar en las muestras.⁸⁵

4.8 Proteína precursora del amiloide

La proteína precursora del Amiloide (APP), hace parte de una familia de proteínas de la membrana celular; en este grupo, también se incluye al grupo de proteínas APL-1 en *Caenorhabditis elegans*, APPL en *Drosophila melanogaster* y APLP1 y APLP2 en mamíferos. En humanos, se encuentra codificado en la región 19q13.1 en el cromosoma 19 y en 11q24 del cromosoma 11⁸⁶. Estas proteínas presentan una estructura característica que consiste en un segmento extracelular largo que corresponde a la porción amino-terminal y una porción intracelular corta de la porción carboxilo-terminal.⁸⁷ Las APP, derivan de un proteoglicano de gran tamaño que ha sido denominado *Platelet-Derived Macrophage-Binding Proteoglycan* (PDMBP), el cual es secretado por las plaquetas y tiene la propiedad de inhibir la endocitosis de las lipoproteínas de baja densidad acetiladas (LDL-Ac) en los macrófagos.⁸⁸

De las APP, se reconocen tres isoformas, las de 751 y 770 aminoácidos, presentes en las neuronas y otras células y la isoforma de 659 aminoácidos, que se expresa principalmente en neuronas. Se reconoce a las APP como las precursoras del péptido β -Amiloide, una de las principales proteínas implicadas en la formación de las placas amiloides que se encuentran en los cerebros de pacientes con la enfermedad de Alzheimer.⁸⁹ La APP tiene dos formas alternativas de *splicing*, que produce dos segmentos casi idénticos, que tienen tres proteasas diferentes denominadas como α , β y γ secretasas. A su vez éstas tienen dos vías para su procesamiento: la vía amiloidogénica y la no amiloidogénica.

El TCE es un factor de riesgo epidemiológico para la enfermedad de Alzheimer^{90,91,92} junto con un otros predisponentes aceleradores genéticos que incluyen el genotipo ApoE. Esta afirmación se refuerza en los hallazgos neuropatológicos en los cuales se ha reportado la presencia de placas amiloides en la corteza cerebral de 30-38% de los pacientes que han sufrido un TCE severo.⁹³ Los mecanismos moleculares de la formación de la placa amiloide en trauma no están completamente esclarecidos, pero parecen incluir alteraciones en la producción y/o metabolismo de la proteína precursora amiloide (APP), la cual se encuentra sobre expresada en axones y somas de neuronas lesionadas después de un TCE.

El aumento en la producción de APP es un evento temprano durante la lesión secundaria del TCE; su acumulación axónal se ha reportado a partir de los 35 minutos después de la lesión,⁹⁴ y se ha reportado como hallazgo de autopsias de pacientes con antecedentes de TCE y en modelos animales en donde las APP permanecen en

concentraciones altas a través del tiempo. Esta sobre-regulación positiva se ha asociado con un aumento en la expresión de la enzima β -secretasa en modelos animales que podrían facilitar la producción de β -Amiloide que como se mencionó anteriormente, se ha relacionado con un mayor riesgo para el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.⁹⁵

En contraste con los posibles efectos perjudiciales de la APP, el aumento agudo de APP post TCE ha generado la hipótesis de que la APP puede realmente tener una función neuroprotectora.⁹⁶ Durante el desarrollo, la APP tiene una función neurogénica y sinaptogénica, es sintetizada por una vía ribosomal de baja energía, un fenómeno poco habitual en la síntesis de proteínas, la cual es más propia de proteínas de respuesta al estrés metabólico; de ésta, se ha descrito su capacidad de bloquear el efecto de la caspasa 3 activada y del P-53. En resumen, la APP puede resultar beneficiosa o perjudicial dependiendo de la forma en que sea procesada dentro de las células.

El metabolismo de la APP por una α -secretasa y una γ -secretasa produce el sAPP α , y ha sido reportado que muchas de las funciones neuroprotectoras y neurotróficas en el sistema nervioso central dependen de éste, mientras que el β -APP y el β -Amiloide son generados a partir de la escisión por la β -secretasa y la γ -secretasa, ambas vías son mutuamente excluyentes.⁹⁷

En este trabajo de investigación, se evaluó la presencia de esta proteína a través de la utilización de un anticuerpo contra ella como marcador de lesión neuronal, pues aunque existen numerosos reportes en la literatura publicada que demuestran la existencia de un importante depósito de β -Amiloide y la formación de placas amiloides; hasta el momento no se ha podido demostrar una relación directa entre el aumento de depósito de β -Amiloide y su toxicidad en TCE. La cuantificación de la APP en el modelo experimental, podría aportar información muy útil sobre la expresión de esta proteína y su valor como marcador de neurodegeneración y la lesión neuronal secundaria en la evaluación de fármacos candidatos a medicamentos neuroprotectores.

4.9 Progesterona como modelo de neuroprotección

La progesterona (Prog.) es una hormona que tiene múltiples funciones no reproductivas, en el sistema nervioso central⁹⁸ a través de tres mecanismos principales: la regulación de la expresión génica, la modulación de los sistemas de neurotransmisores, y la activación de cascadas de señalización. Se han descrito dos receptores nucleares (PRA y PRB) y un receptor 7TMPr γ ubicado en la membrana celular, estos se distribuyen ampliamente en todas las estructuras del sistema nervioso sin distinción de tipos celulares, se encuentran principalmente localizados en la corteza cerebral, el cerebelo, el núcleo caudado, el tálamo, la pituitaria y la médula espinal.^{99,100}

En el TCE, parece que el efecto más prominente consiste en reducir el edema cerebral vasogénico y citotóxico y con ello frenar la pérdida secundaria de las células nerviosas vulnerables;¹⁰¹ pero, la hormona también ejerce otros efectos beneficiosos por otros mecanismos. La progesterona es un potente agente anti-inflamatorio y anti-apotótico con algunas propiedades antioxidantes que lo capaciten para proteger las células contra la ruptura de las membranas celulares que conduce a la muerte de las neuronas y la glia.^{102,103}

Una revisión sistemática de la progesterona en modelos animales de isquemia o TCE, demostró que la progesterona es neuroprotectora, en términos de reducción de volumen de la lesión, ya sea después de la isquemia cerebral o lesión cerebral, y esto se correlacionaba con la recuperación funcional.¹⁰⁴

De los primeros datos publicados, se realizó una revisión sistemática que evidencia una mejoría neurológica con el uso de la progesterona sin considerar el resultado concluyente por el tamaño de la muestra.¹⁰⁵ Por otra parte en la base de datos *ClinicalTrials.gov* están registrados 4 ensayos clínicos de intervención con progesterona en TCE.^{106,107,108}

En la actualidad, los datos obtenidos de los ensayos clínicos han sido decepcionantes, pues en ninguno de estos se encontró mejoría en los parámetros neurológicos evaluados. En el estudio *Neuroprotective Agent, Progesterone, in Severe Traumatic Brain Injury* (SYNAPSE) que fue un estudio clínico multicéntrico aleatorizado controlado con placebo, realizado en 21 países, para evaluar la efectividad de la progesterona para mejorar el pronóstico de los pacientes con TCE severo, los datos del estudio mostraron que la progesterona no tuvo ningún impacto sobre el desenlace.¹⁰⁹ El siguiente estudio clínico de tercera fase diseñado para evaluar los efectos de la progesterona (Progesterone for the Treatment of Traumatic Brain Injury ProTECT III),¹¹⁰ tampoco encontró ningún beneficio en el pronóstico de los pacientes y fue terminado antes de tiempo por no encontrar ningún beneficio que justificara la intervención.

En una revisión posterior a la publicación de estos resultados,¹¹¹ Howard sostiene que existieron tres factores críticos en el diseño de estos estudios que pudieron alterar los resultados presentados: un esquema de dosis y duración de la terapia inadecuado en los estudios de fase II, La decisión estratégica de no realizar estudios clínicos de fase 2B, que pudieron haber sido útiles para determinar las variables farmacocinéticas y de esquemas terapéuticos para la fase III y finalmente no tener en cuenta los datos preclínicos y los resultados de los estudios clínicos de fase II al diseño experimental realizados por los grupos de investigación de China. Al final de la discusión, el autor hace un llamado para tener en cuenta los efectos pleiotrópicos de la progesterona como un agente terapéutico para el TCE y el accidente cardiovascular y volver a diseñar estudios de fase IIB que tomen en cuenta los datos obtenidos en las experiencias preclínicas.

En otro análisis,¹¹² Stein revisa las circunstancias en que fueron planificados estos estudios, la evidencia con que contaban al momento y los datos preclínicos en que se basaron para emprender la tarea; al final concluye que no solo se trata de una discordancia entre los resultados obtenidos en los modelos animales, sino en tener definiciones precisas acerca de cómo debe ser caracterizada la condición que se está tratando de evaluar. Además es muy enfático al declarar que los nuevos diseños de las intervenciones clínicas de fármacos candidatos a convertirse en medicamentos neuroprotectores, deben ser desarrolladas en conjunto con los investigadores de ciencias básicas biomédicas y preclínicas, de manera que puedan determinarse que clase de intervenciones son las más efectivas para llevarlas a los pacientes reales,

Tomando en cuenta lo anterior, la progesterona es en la actualidad el mejor fármaco disponible como control positivo pues ha pasado toda una serie de experimentos de ciencias básicas y modelos animales, pero no existe claridad en su utilidad como agente neuroprotector, Por esta razón el modelo de cultivo organotípico puede ayudar a aislar una serie de variables farmacocinéticas específicas (como son las alteraciones en los patrones de distribución del fármaco, transportadores específicos de la molécula, metabolismo *in situ*, entre otras) que pueden alterar los resultados clínicos y pueden ser tener una solución mediante técnicas de la farmacéutica. Además existe una evidencia apoyada en numerosos estudios preclínicos y de ciencias básicas que apoyan la efectividad de la progesterona como un agente neuroprotector.¹¹³

En un estudio reciente, se evaluó a la progesterona como un fármaco neuroprotector en un modelo de TCE moderado y repetitivo por percusión con líquido en ratas; los resultados de este estudio mostraron que el grupo que fue tratado con progesterona, presentaba menos déficit motor y sensitivo en la valoración clínica, así como en los marcadores de estrés oxidativo y neuroinflamación.¹¹⁴ En otro estudio, evaluaron el efecto de la progesterona en la expresión de los mediadores de la inflamación prostaglandina E₂ (PGE₂), Ciclooxigenasa 2 (COX₂), factor nuclear κB (NF-κB) y el factor de necrosis tumoral α (TNF-α), en un modelo de TCE en ratas; los resultados mostraron que la progesterona reduce de manera significativa la respuesta inflamatoria, el edema cerebral, además de mejorar los puntajes en las evaluaciones neurológicas, concluyendo que la inhibición de la inflamación puede ser un mecanismo importante de la neuroprotección de la progesterona.¹¹⁵

5 Materiales y métodos

5.1 Diseño experimental

Este proyecto se desarrolló en muestras de cerebro de roedores como un planteamiento descriptivo comparativo, de manera que permitió trazar diferencias en la características definidas como variables partiendo del concepto de heterogeneidad y de acuerdo a las guías ARRIVE para el reporte de la investigación utilizando modelos animales de experimentación.¹¹⁶

Para la validación del cultivo organotípico, se utilizaron un total de 9 biomodelos de ratas macho de la cepa Wistar (*Rattus norvegicus*), estos se seleccionaron de aproximadamente 12 semanas de edad y con un peso promedio entre 350 y 450 gramos aproximadamente; los biomodelos fueron almacenados en el bioterio de la Universidad del Valle, en condiciones controladas de iluminación, temperatura, sin alteraciones del ritmo circadiano propio de los roedores; el bioterio cuenta con sistema cerrado de ventilación independiente para cada cubículo y se contuvieron en jaulas específicas para roedores con un sustrato de aserrín, al seleccionar los grupos de acomodación por jaula, se realizó una asignación aleatoria a cada uno de los 3 grupos experimentales (n=3 ratas por cada grupo):

Tabla 1 Distribución de los grupos para cada uno de los tratamientos

Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
SHAM N=3, logrando un mínimo de 4 tajadas cerebrales	TCE. N=3, logrando un mínimo de 4 tajadas cerebrales	SHAM + Prog. N=3, logrando un mínimo de 4 tajadas cerebrales	TCE + Prog. N=3, logrando un mínimo de 4 tajadas cerebrales

Antes de cada procedimiento, se trasladaron a las ratas en sus respectivas jaulas de contención, hacia el laboratorio de técnicas histológicas donde se realizaron los experimentos cubriéndolos de la luz directa del sol. Antes de cada procedimiento, se realizó una sedación profunda utilizando una maquina de anestesia con Isoflurano mediante el uso de una cámara especial para roedores con un flujo 0,3 L/min de oxígeno y una presión positiva de 10 – 15 cm de H₂O durante un periodo de 5 a 7 minutos.

Después de realizar la inducción de la anestesia, los animales de los grupos A y B se sometieron a un modelo de trauma craneoencefálico según la metodología descrita por Marmorou y cols. en 1994,⁶² mientras que los animales del grupo C fueron utilizados como control (SHAM) de los efectos metodológicos no específicos, en este caso la anestesia y cirugía para fijar el disco de acero. Después pasaron un periodo de 48 horas donde se les permitió la alimentación y el agua *ad libitum*.

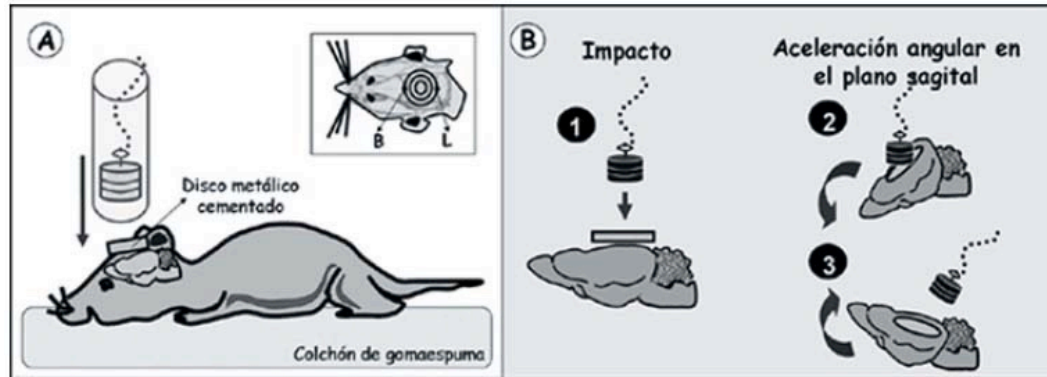
Después de este periodo, todos los animales fueron sacrificados por decapitación bajo anestesia general y las muestras de tajadas cerebrales obtenidas fueron llevadas al cultivo organotípico agudo durante 6 horas, durante las cuales al grupo A se le añadió la progesterona (*Syigma Aldrich*, P8783) al líquido cefalorraquídeo, mientras que el grupo B y C, recibieron el líquido cefalorraquídeo artificial descrito previamente (ver tabla 1).

5.2 Modelo de lesión

Se utilizó el modelo de caída libre de peso diseñado por Marmorou y cols. en 1994,²⁹ con una serie de modificaciones realizadas por el grupo según los resultados obtenidos de la estandarización de la técnica, quedando la altura desde la cual cae el peso en 155 cm, una distancia que se encuentra dentro del rango descrito por el artículo original (entre 1 y 2 metros). Esta altura logra un TCE moderado, con unas excelentes tasas de sobrevida de las ratas, sin tener necesidad de administrar ventilación mecánica y/o asistida, para biomodelos de más de 350 gramos (Ratas Wistar).

Ilustración 1 Modelo de TCE por impacto aceleración

Diagrama del modelo descrito por Marmarou y cols. de TCE por impacto-aceleración. A) Primero se debe fijar un disco metálico sobre el cráneo de la rata utilizando un adhesivo de cianocrilato, éste debe ir centrado sobre la línea media entre las cisuras bregma y lambda. A continuación se coloca el animal sobre una espuma y con la cabeza centrada bajo un tubo de aluminio por el que se deja caer una pesa para que golpee el disco metálico. B) La cabeza de la rata sufre un impacto seguido de una aceleración angular en el plano sagital. (Tomado de Prieto et al., 2009).



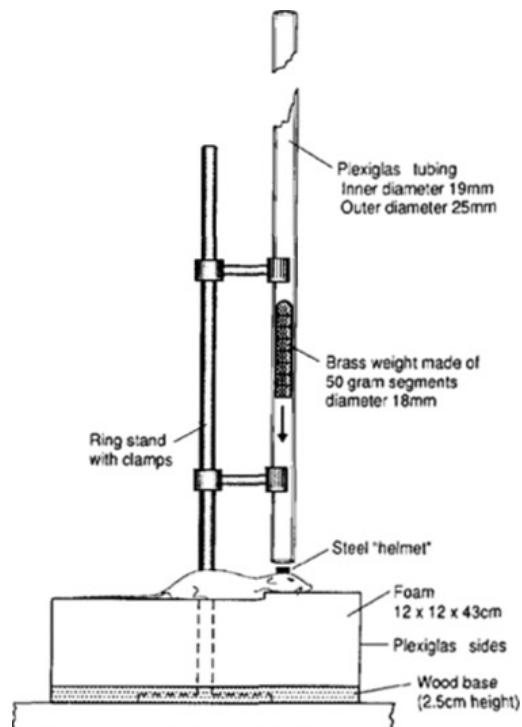
Para obtener el peso deseado, se utilizó un pistón de acero torneado a medida con una masa de 45 gr; este se dejó caer libremente desde una altura de 155 cm a través de un tubo de Plexiglás que se ubica con el fin de permitir un ángulo controlado de la caída del peso, además, garantiza un recorrido preestablecido que impacte únicamente en el cráneo de la rata. El impacto se produce sobre un disco de acero de 2,5 cm de diámetro y 2 mm de grosor fijado con adhesivo de cianoacrilato al cráneo de una rata (sobre la línea media del cráneo entre bregma y lambda), este tiene como finalidad la distribución homogénea del impacto sobre la superficie del cráneo, evitando las fracturas del mismo y las lesiones focales producidas por el impacto localizado. La cabeza de la rata, se encuentra fijada de manera laxa sobre un colchón de goma-espuma el cual tiene una densidad 20 kg/m³ (Figura 1). La cabeza de la rata al apoyarse sobre un colchón de goma espuma permite un determinado movimiento de la cabeza sobre el impacto, que produce una aceleración angular rápida en el plano sagital, determinando las fuerzas de aceleración y desaceleración, que sufre el cerebro dentro del cráneo y son responsables de la lesión producida.

Antes del procedimiento quirúrgico de fijación del disco ó de recibir cualquier impacto, las ratas fueron anestesiadas mediante el uso de Isoflurano, suministrado mediante una máquina de anestesia específica para uso veterinario (Ver Protocolo, Anexo 1). Después del impacto, no se les suministró analgesia o anti inflamatorios no esteroideos a éste, debido a que podían alterar los resultados del modelo (pueden tener efectos neuroprotectores o neurolesivos). Los biomodelos del grupo C, fueron sometidos al

mismo procedimiento quirúrgico, se fijaron en el colchón de goma espuma, pero no recibieron el impacto en su cráneo.

Figura 1 Diagrama de la configuración del dispositivo de impacto

Diagrama de la configuración del dispositivo de impacto. Se fija el tubo de Plexiglás de manera que se encuentre a 90° con la horizontal, a la salida inferior del tubo, se ubica la rata con el disco de metal justamente debajo del tubo y con una fijación laxa sobre el colchón de goma espuma (Densidad de 20 kg/m³) Una vez que el dispositivo se encuentra ubicado, se deja caer el pistón de 450 gr, desde una altura de 155 cm, verificando el impacto y evitando un efecto de doble impacto por rebote.

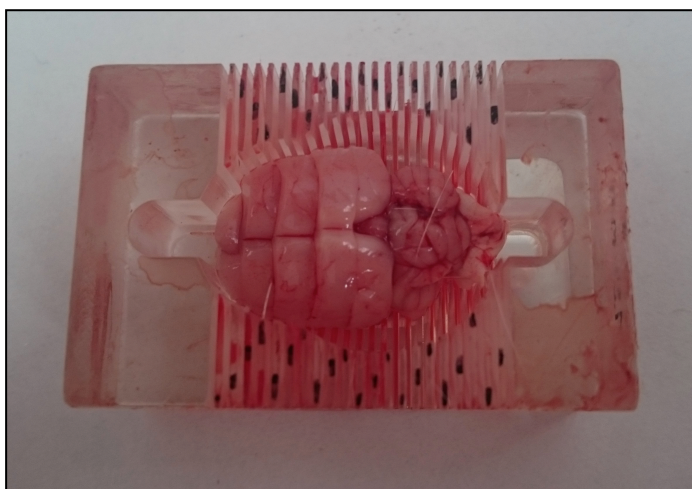


5.3 Preparación de las tajadas

Reactivos: Isoflurano; Líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa).

Todos las ratas tuvieron un periodo de observación de 48 horas, con alimentación y agua *ad libitum*, posterior a esto, se sacrificaron para el cultivo. El procedimiento efectuado fue la decapitación bajo anestesia general (Ver Protocolo, Anexo 1). Una vez se separó la cabeza de la rata, se procedió rápidamente a la extracción del cerebro completo, teniendo mucho cuidado de no tocarlo en el procedimiento para evitar lesiones no relacionadas con el diseño experimental; el tiempo límite establecido para el procedimiento fue de cinco minutos. Al cerebro se le retiraron las meninges y se ubicó en una matriz especialmente diseñada para el corte de tajadas de cerebro de roedores (RBM), con el fin de ayudar a la disección y obtener láminas de exactamente 1,5 mm de espesor, que fueran reproducibles y estandarizadas (ver fig. 4). Los cortes se realizaron en sentido coronal con dirección rostro – caudal; de la muestra se descartaron el bulbo olfatorio y el cerebelo.

Ilustración 2 Matriz de corte de cerebro de roedor



Matriz utilizada como marco de referencia para obtener las tajadas para el cultivo organotípico. En esta se ubicaba el cerebro rescatado y se procedía a realizar los cortes utilizando como las guías marcadas de manera que cada tajada quedara de 1,5 mm de espesor.

Después de la extracción, las muestras fueron manejadas bajo condiciones de esterilidad, se les retiraron los coágulos y se llevaron al dispositivo de cultivo temperatura ambiente como lo describe Riascos y cols¹ irrigado con LCRa, a pH controlado de 7,4;⁷² en todos los casos, se evitó el exceso de manipulación con el fin de no lesionar el tejido. Estas tajadas fueron llevadas de inmediato a cultivo, manteniendo unas muestras de tejido para los controles de tiempo cero de cultivo y control histopatológico inmediato.

Tabla 2 Fórmula para la preparación del LCRa

Para 1 litro de LCRa 1X	
NaCl 124 mM	7,24 gr
KCl 5 mM	0,37 gr
NaH ₂ PO ₄ 1 mM	0,14 gr
MgSO ₄ 2,65 mM	0,32 gr
NaHCO ₃ 26 mM	2,18 gr
Glucosa 10 mM	1,80 gr
CaCl ₂ 2 mM	0,22 gr
Agua destilada y desionizada	1.000 mL
pH 7,4 – Temperatura Ambiente	

5.4 Cultivo celular organotípico

Una vez obtenidas las tajadas, se les realizó el corte y procesamiento inicial, después fueron introducidas a la cámara de conservación de cortes cerebrales vivos, diseñada por el grupo de investigación según una adaptación de la metodología descrita por Krimer y Goldman-Rakic en 1997,¹¹⁷ en ésta, se acomodaron sobre una camilla compartimentada de rejilla de acero inoxidable y se procedió a la ubicación dentro del contenedor con el LCRa. Las tajadas se sostuvieron en contacto directo en la interface dispuesta por un flujo continuo de LCRa a 2 cc/min y una mezcla de gases de O₂ al 95% y CO₂ al 5% con burbujeo permanente, (según ha sido descrito en la bibliografía revisada) a la temperatura de laboratorio (26 °C) y pH fisiológico.^{118,119,120}

La camilla consistió en un aro de etil vinil acetato (Foamy) de 6 cm de diámetro y 1,5 cm de espesor, cuyo fondo era una malla de acero con tabiques de alambre para dividir el

espacio en 4 compartimentos radiales. La malla de acero permitió el contacto con el LCRa y el paso de la mezcla de gases de manera constante. La compartimentación permitió a cada tajada la misma disponibilidad de nutrientes y de gas evitando su superposición (ilustración 3). El aro de Foamy le dio a la estructura la flotabilidad necesaria para mantener las tajadas por encima de la superficie del LCRa, pero manteniendo un estrecho contacto con este sin alterar tensión superficial en la interface líquido gas, un elemento necesario para mantener la adecuada perfusión de los tejidos cultivados durante toda la duración del cultivo celular (ilustración 4).

La cámara de cultivo celular fue elaborada en vidrio, según el diseño del grupo de investigación, que se ha venido utilizando. El diámetro de apertura superior de la cámara es de 10 cm de diámetro, finalizando en una base circular donde se conectan dos conductos de vidrio. El conducto lateral, funciona como una trampa de nivel del LCRa, de manera que cuando el nivel máximo de líquido alcanzado al interior del contenedor llegara 5 cm de altura, todo el exceso de líquido se elimina por una manguera que drena el contenido.

Ilustración 3 Montaje de las tajadas de cerebro

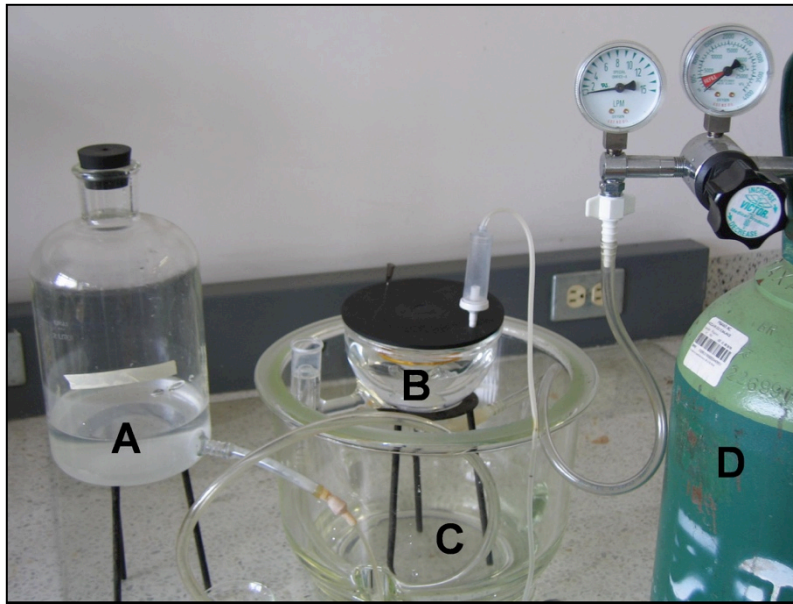


El siguiente conducto, sirve para el ingreso de la mezcla de gases, está ubicado directamente la parte inferior de la base del contenedor, y se proyecta 2 cm dentro del mismo. En su interior se encuentra fijado un filtro realizado con un cristal de cuarzo fino, para actuar como un difusor que permita el ingreso de la mezcla de gases en el LCRA, en este conducto se conecta una manguera que proviene del regulador de flujo de la bala de oxígeno (ilustración 4).

Localización de las tajadas de cerebro de rata en la camilla de la cámara de cultivo celular, el dispositivo se encuentra ubicado en la incubadora que mantiene la temperatura constante y se encuentra conecta al difusor para la mezcla de gases

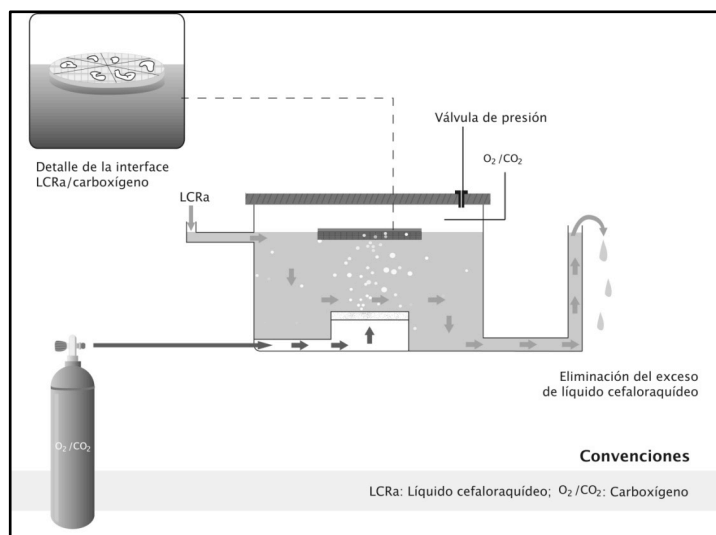
Ilustración 4 Montaje de la cámara de cultivo

A) Reservorio de LCRA. B. Cámara de conservación de tejidos. C. Contenedor de baño maría para regular la temperatura. D. Bala con manómetro y regulador de flujo de la mezcla de gases (CO_2 5%, O_2 95%) (Tomado de Riascos y cols 2008).



Para sellar la cámara de cultivo, se utilizó un disco de caucho de 5 mm de espesor que lograba una oclusión hermética del dispositivo. Para fijar un dispositivo de venoclisis, que regulaba el goteo del LCRA; en la otra perforación, se fijo un angiocat de calibre 14, de manera que no se generara un efecto de vacío que impidiera la evacuación del remanente de solución y generara una presión positiva para lograr una mayor oxigenación de las tajadas

Ilustración 5 Esquema del funcionamiento del cultivo



Esquema del principio del funcionamiento de la cámara de cultivo de organotípico. En esta se puede apreciar la dirección del flujo de carboxígeno proveniente de la bala, así como el suministro de LCR y la salida del sobrante por la trampa de flujo.

5.5 Procesamiento de las Muestras

De cada uno de los grupos empleados, TCE, SHAM, TCE + Prog. o SHAM + Prog. de 48 horas que fueron cultivados por seis horas en total, de cada uno, se obtuvieron cuatro muestras, de las cuales una tajada con corteza motora se destinó para ensayos de Viabilidad Celular. Tres tajadas con corteza motora, sensorial e hipocampo se destinaron para la fijación e inmunohistoquímica.

5.6 Inmunohistoquímica

Reactivos: Paraformaldehído lisina periodato (PLP); Sacarosa; *Buffer* fosfato salino (PBS por sus siglas en inglés); Isopentano; Solución anticongelante (glicerol al 20% y etilenglicol al 30% en PBS 10X); Anticuerpos primarios: *Anty-amyloid precursor protein* (APP) C-Terminal. *Rabbit Polyclonal* – IgG (Sigma®), *Anty-amyloid precursor protein* (APP) N-Terminal. *Rabbit Polyclonal* – IgG (Sigma®) y Anti NeuN MAB377. *Mouse Monoclonal* - IgG₁ (Chemicon Internacional®); Complejo avidina/biotina (Kit ABC Vectastain – Elite PK *mouse* y *rabbit* IgG, Vector Laboratories®); Diaminobencidina (Peroxidase Substrate Kit; DAB SK-4100).

Las muestras fueron fijadas mediante inmersión en pH 7,4 a 4 grados Celsius en paraformaldehído lisina periodato (PLP); durante 3 días. Seguido a esto, la crioprotección se realizó con gradientes de sacarosa al 10%, 20% y 30% en *Buffer* fosfato salino (PBS) 1X por 3 días consecutivos y se congelaron por inmersión en isopentano, el cual estaba enfriado previamente mediante convección por dióxido de carbono (CO₂) en estado sólido (hielo seco) y fueron almacenadas a un congelador a una temperatura de -70 °C.

Utilizando un criostato Leica CM3050-S, se realizaron cortes coronales de 30 µm de espesor de cada una de las tajadas congeladas. De cada muestra de tejido se descartaron los cortes pertenecientes a los primeros y últimos 200 µm, para de esta manera evitar las áreas afectadas por la disección y por el contacto con la malla de soporte al interior de las cámaras de cultivo. Los cortes fueron almacenados en una solución anticongelante a -20 °C hasta ser procesados histológicamente.

Las muestras fueron procesadas de manera seriada para Inmunohistoquímica en tejido flotante contra los anticuerpos primarios, mediante la técnica de avidina/biotina anti-ratón y anti-conejo; y fueron reveladas con diaminobencidina contrastada con níquel, bajo las condiciones estándar del laboratorio. (Ver Protocolo, Anexo 4).

Para valorar la especificidad obtenida en la inmunotinción, se realizó un ensayo de control negativo, en el que se omitió el anticuerpo primario. Este control mostró la ausencia de inmunorreactividad en los tejidos.

5.7 Registro y Procesamiento De Imágenes

Con el fin de proceder al análisis de los resultados, se tomaron una serie de microfotografías mediante una cámara digital DFC 295 (Leica), la cuál estaba acoplada a un microscopio iluminado por LED modelo Leica DM750. Las capturas de las imágenes obtenidas se procesaron con el programa Leica Application Suite (LAS) 3.8.0 en formato Tiff de 8 bits, de tipo entero sin signo, con una resolución de 2.048 x 1.536 pixeles. En todas estas fotografías se fijó un tiempo de exposición de 22,5 ms, manteniendo constante la intensidad de la iluminación y sin utilizar la corrección gamma.

Para determinar la organización laminar de la corteza de las muestras, tanto en todas las muestras de tejido, se observaron las placas histológicas con el microscopio de luz y se tomaron microfotografías con un aumento de 10X en al menos 3 cortes de la corteza somato sensorial y al menos 3 cortes en la corteza motora. En cada una de las secciones que fueron fotografiadas se debía poder apreciar el borde pial, además de una pequeña porción de sustancia blanca subcortical. Con las imágenes adquiridas, se realizó un procedimiento de reconstrucción fotográfica con el fin de incluir el espesor

total de la corteza cerebral; para lograr esto, se utilizó la herramienta de fusión de fotografías consecutivas del programa PhotoStitch de Cannon (versión 3.1.21.45, 1996-2007®).

Para el conteo celular, y descripciones celulares, se tomaron una serie de microfotografías utilizando los aumentos de 20X y 40X, de la corteza motora, la sensorial y el hipocampo de cada hemisferio. Las microfotografías utilizadas para el conteo celular correspondieron a las láminas supragranulares e infragranulares, justo en las zonas de transición de las láminas II-III y V-VI respectivamente. Todas estas microfotografías fueron calibradas antes de realizar cualquier análisis. Los conteos realizados en la corteza fueron manuales, delimitando un cuadrante específico con un área de 500 x 500 μm^2

5.8 Análisis de datos y estadística

Para efectos del análisis de los datos obtenidos, se realizó una descripción cualitativa y cuantitativa de los resultados de la marcación por Inmunohistoquímica para APP N-terminal y NeuN en las diferentes regiones del cerebro que fueron analizadas. Para APP C-terminal sólo se realizaron descripciones cualitativas.

Para el análisis cuantitativo se tuvieron en cuenta los 4 grupos experimentales establecidos, de estos se tomaron a sus vez cuatro tajadas de cada uno y en todos se midió la expresión de las proteínas NeuN y APP N-terminal para cada grupo de cultivo para lo cual se construyeron dos curvas (Control Vs. Tratado) y se analizaron por ANOVA de una vía, considerando a priori, una $p < 0,05$ como indicador de significancia del resultado.

Para la verificación de los datos, se utilizó la prueba *post hoc* de Tukey con el fin de obtener datos de la comparación múltiple de medias entre cada uno de los grupos y para cada uno de los niveles del cultivo.¹²¹ Los análisis se llevaron a cabo en el programa GraphPad Prism 6.

6 Consideraciones éticas

El proyecto de investigación fue sometido a la evaluación del Comité De Ética En Investigación Con Animales de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, recibiendo aprobación y certificación institucional según el acta No. 001 de 2011. En el documento entregado, se autorizaba no utilizar analgesia para los biomodelos, pues tanto los opioides como los antiinflamatorios no esteroideos, pueden ser factores distractores que alteren los resultados, pues ambos grupos farmacológicos tienen efectos en la viabilidad de las poblaciones neuronales.

El manejo de los animales de experimentación se manejó acorde con lo establecido en la ley 84, sancionada por el congreso de Colombia el 27 de diciembre de 1989, *“Por la cual se adopta el estatuto Nacional de Protección de los Animales”*, la cual en su capítulo sexto hace referencia a los animales de experimentación y en la Resolución 8430 de 1993 emitida por el Ministerio de Salud *“Por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”*.

Durante todo el desarrollo de este proyecto se siguieron las regulaciones vigentes sobre el trato de los animales de experimentación, además de las guías locales de manejo de animales de experimentación.

7 Resultados

7.1 Observaciones clínicas

Durante el ensayo del modelo de lesión, en ninguna de las ratas se presentaron fracturas craneales y todos sobrevivieron al procedimiento. Después de recibir el impacto, las ratas se trasladaron a la cámara de anestesia para ser monitorizados, sin encontrar ninguna evidencia de que presentaran episodios de apnea. Sin embargo, en la fase de mantenimiento, se encontraron patrones respiratorios anormales, con una duración entre los 5 y los 15 minutos, pero estos pueden estar ocasionados por el Isoflurano utilizado en la anestesia. En esta fase, de mantenimiento y observación, no se presentaron signos clínicos de lesiones neurológicas graves, como movimientos sugerentes de decorticación o convulsiones. En promedio, todos los biomodelos se recuperaron completamente de la anestesia en un periodo de 10 minutos en promedio; es interesante resaltar que los biomodelos que recibieron el impacto (grupos TCE y TCE + Prog.), tomaban un poco más de tiempo para estar completamente activos. En ninguno de los grupos del ensayo se encontraron alteraciones motoras o comportamentales, tal vez la única observación fue un poco de hipoactividad en el grupo que recibió el impacto (grupos TCE y TCE + Prog.). Con estos hallazgos, se pudo establecer que el TCE producido por el modelo de lesión por aceleración/desaceleración según como fue estandarizado por el grupo de investigación, producía un TCE moderado, con un 100% de sobrevivencia de los ratas durante la duración de los experimentos (48 horas).

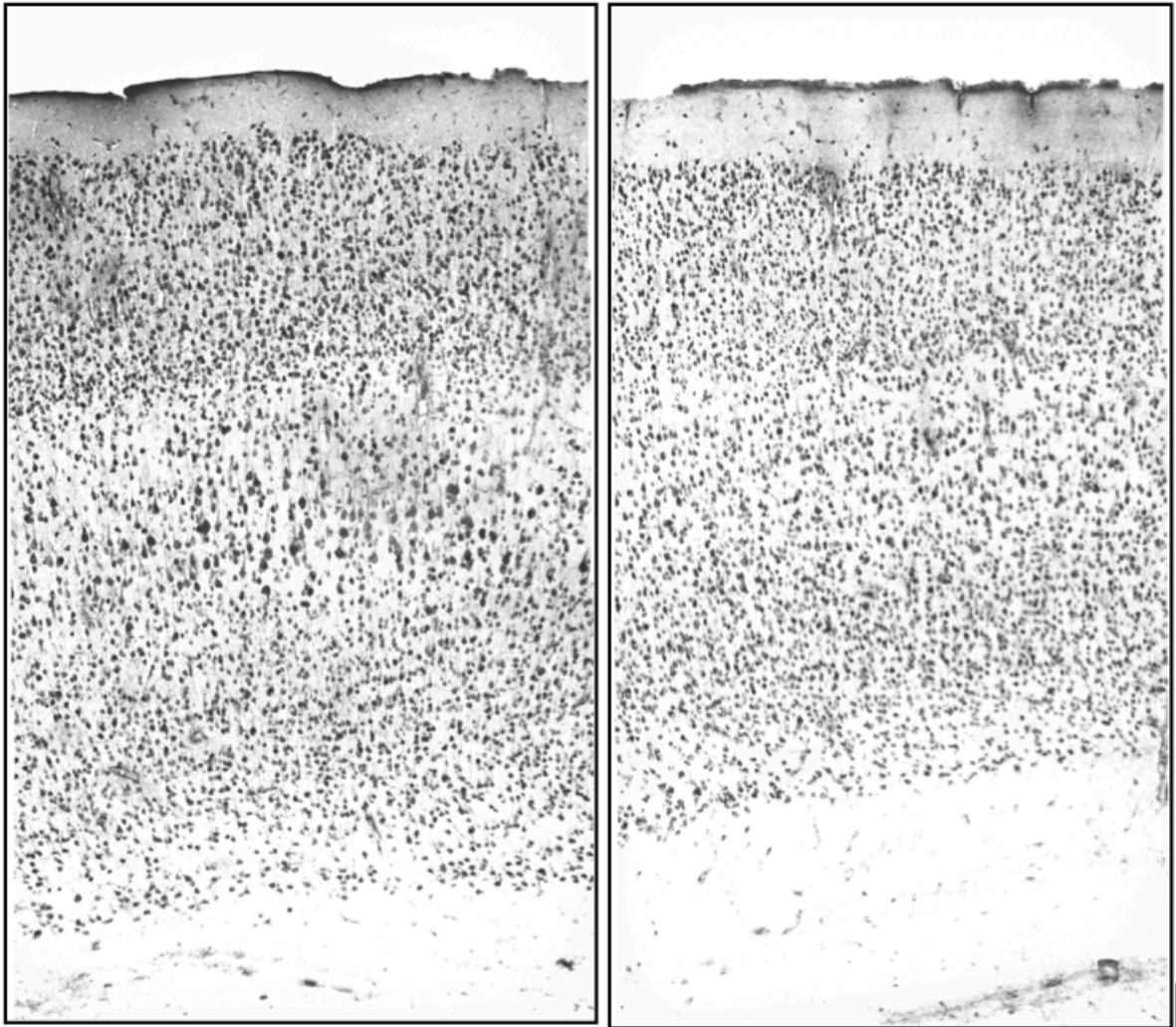
7.2 Observaciones histopatológicas macroscópicas

Pasadas las 48 horas de la lesión, tras la decapitación y extracción del cerebro, se examinaron los aspectos macroscópicos de la lesión, sin encontrar signos evidentes de contusiones o lesiones focales o de fracturas que pudieran haber pasado desapercibidas en el examen clínico previo al sacrificio.

7.3 Datos descriptivos de la expresión de NeuN

En todos los grupos (SHAM, SHAM + Prog, TCE, TCE + Prog), las muestras de tejido con la marcación inmunohistoquímica para la proteína NeuN, presentaron una intensa Inmunorreactividad, ésta se concentró en el núcleo de las células y la región perinuclear, encontrándose en una menor medida en las regiones proximales de las dendritas basales y apicales.

Ilustración 6 Tinción de NeuN de la corteza motora y sensitiva



Corteza Motora

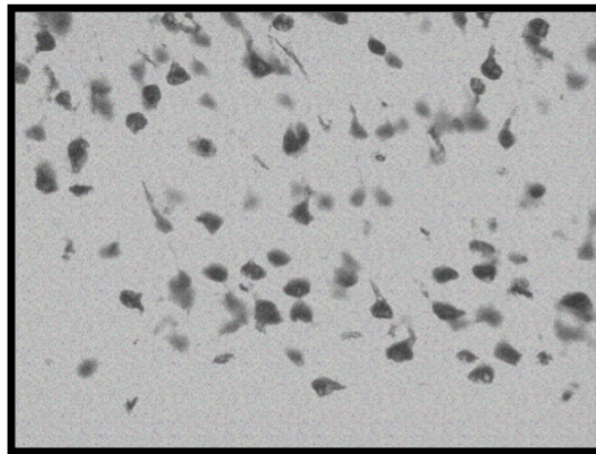
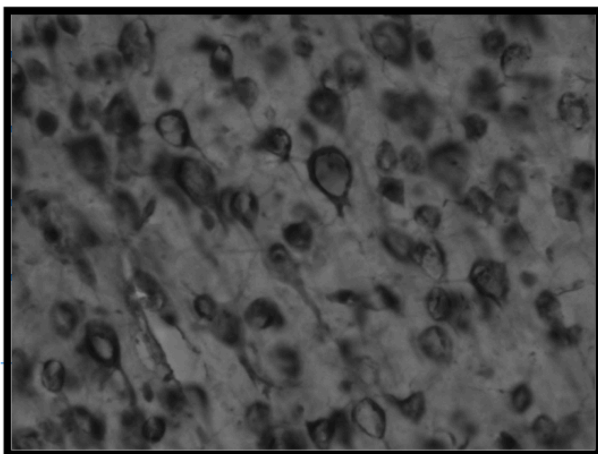
Corteza Sensitiva

En las dos imágenes se puede apreciar la laminaridad de la corteza de la rata. En la corteza motora, se pueden apreciar grupos de neuronas piramidales más grandes en las zonas de transición entre las láminas IV y V, mientras que en la corteza sensitiva si bien se aprecian también las neuronas de gran tamaño, no se encuentran tantas diferencias entre ellas.

En las muestras correspondientes a los grupos SHAM al tiempo de cero horas de En las muestras correspondientes a los grupos SHAM al tiempo de cero horas de cultivo y marcadas contra NeuN, se identificaron la totalidad de las 6 láminas corticales y a partir de ellas se estableció un patrón de comparación para evaluar la evolución en todos los grupos experimentales.

El procedimiento de la marcación para NeuN, permitió que se pudieran identificar grupos de células pequeñas piramidales en la capa II de las corteza motora y sensitiva, además de un número importante de pequeñas formas piramidales en las capas III y V. También expresaron una intensa marcación los grupos de células medianas y grandes en las capas III y V y formas piramidales modificadas en la capa VI. También se encontró un aumento de la expresión en formas de células no piramidales; si bien éstas se encontraron a lo largo de todas las capas, la densidad de las mismas fue mucho mayor en las capas II y IV. En los grupos de trauma y trauma más progesterona, se encontró un aumento de la marcación con NeuN en las dendritas y el axón de la neurona y un patrón más difuso de la marcación en todo el soma de la célula. Es de resaltar que en todas las capas se encontraron variaciones en la densidad de la marcación

Ilustración 7 Marcaciones de NeuN grupos Trauma y control



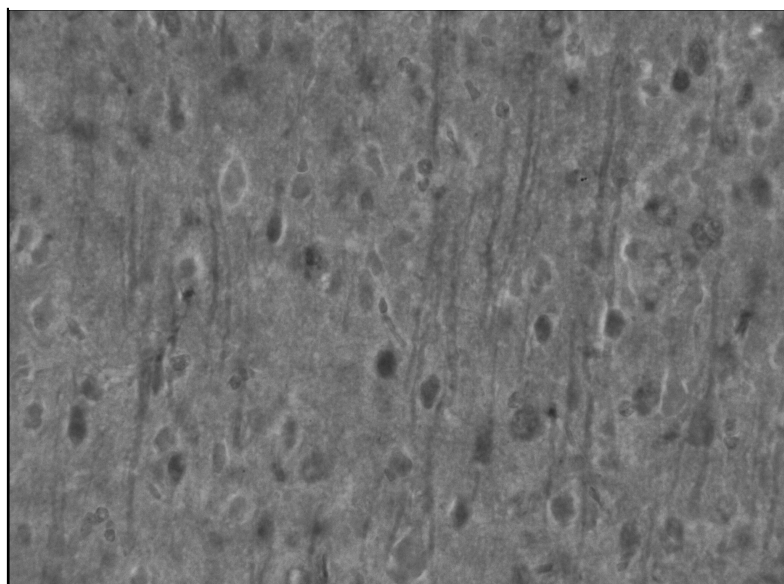
En el grupo de trauma se pudo apreciar una marcación más difusa en el soma de las neuronas, pero se evidenció una marcación más intensa en las dendritas y en los axones. Por el contrario, en el grupo que recibió el tratamiento con progesterona, se evidenció una marcación más fuerte, con una demarcación de los núcleos de las neuronas y una buena definición de las dendritas proximales.

7.4 Datos descriptivos de la expresión APP N-Terminal

Al revisar la totalidad del tejido en el microscopio bajo 10 aumentos, se evidenció una marcación positiva de APP N-terminal en todos los grupos que fueron llevados al cultivo celular organotípico (SHAM, TCE, SHAM + Prog. y TCE + Prog.) siendo posible identificarla en los axones de las neuronas y en la zona limítrofe con la sustancia blanca subcortical, presentándose como acúmulos de la proteína en forma de haz que salen de la corteza y se dispersan en la sustancia blanca.

Esta marcación fue generalizada a lo largo de todas las muestras evaluadas de la corteza, sin embargo, el hallazgo fue más notorio en los axones de las células ubicadas en las láminas IV y V para todos los grupos. Por otra parte, los grupos que recibieron el TCE, presentaron una mayor intensidad en la marcación para APP, siendo mucho más notoria los axones de las células, siendo menos intensa en el grupo que recibió el tratamiento con progesterona.

Ilustración 8 Marcación APP N-Terminal



En la imagen se aprecia una porción de la corteza motora que muestra la marcación de los axones que se encontró en los grupos que fueron expuestos al trauma.

7.5 Datos cuantitativos de la los conteos de neuronas marcadas con NeuN en la corteza motora

Al realizar el análisis de varianza (ANOVA) de una vía de la corteza motora en la región supragranular, los resultados obtenidos, mostraron que existía una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos a los que se sometieron a los grupos del experimento (valor de $p < 0,0001$), resaltando el efecto que tiene la progesterona sobre el conteo celular, al compararlo contra todos los grupos evaluados.

Al analizar los datos cuantitativos de los resultados de los conteos celulares de la marcación de inmunohistoquímica para NeuN, utilizando la prueba *Post Hoc* de Tukey,¹²¹ (ver Fig. 11) se encontró que en las capas supragranulares de la corteza motora, existía una diferencia significativa (valor de p de 0,0031) entre el grupo que recibió el TCE y el que recibió el TCE más Progesterona (*Mean diff* -35,77; intervalo de confianza -59,89 a -11,65). Para la comparación entre el grupo de TCE y Control más Progesterona también se encontró una diferencia significativa (valor de p de $< 0,0001$; *Mean diff* -70,13 intervalo de confianza -94,25 a -46,00). Por último, se encontró una diferencia significativa entre el grupo de Control más Progesterona y TCE más progesterona (valor de p de $< 0,0001$; *Mean diff* 34,35; intervalo de confianza 19,10 a 49,61).

Por otra parte, en el análisis entre el grupo de Control y el grupo TCE más Progesterona, no se encontró ninguna diferencia significativa (valor de p de 0,3915; *Mean diff* 13,73; intervalo de confianza -10,39 a 37,85). También se encontró que no había diferencia significativa en el grupo Control y el grupo control más Progesterona (valor de p de 0,108; *Mean diff* -20,63; intervalo de confianza -44,75 a 3,496).

En la corteza motora de la región infragranular de la corteza motora, los resultados de la ANOVA de una vía mostraron que también existía una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos de los grupos del experimento, (valor de $p < 0,0001$), siendo aún más notoria la diferencia entre el los grupos Control y TCE al compararlos con el grupo TCE más progesterona.

Ilustración 9 Análisis *post hoc* NeuN corteza motora Supragranular

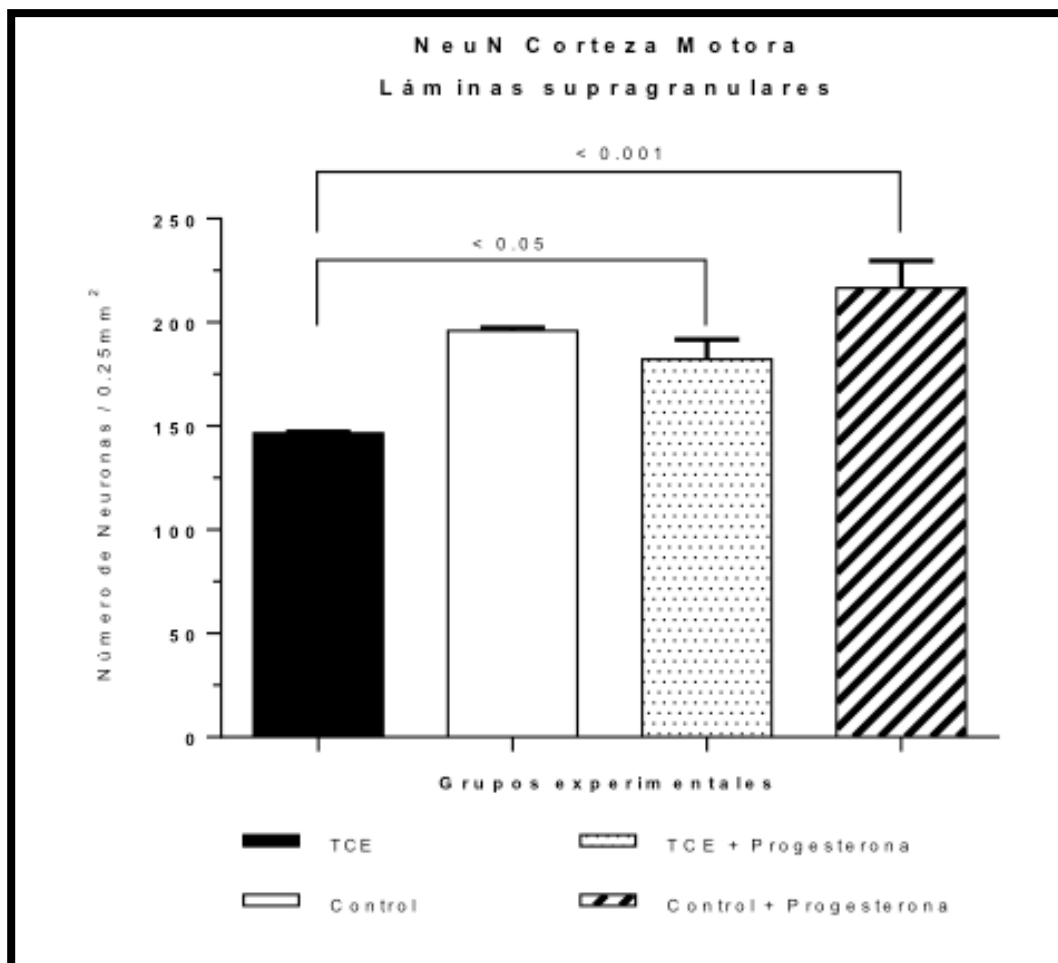


Tabla 3 Análisis de varianza NeuN corteza motora supragranular

Fuente de Variación	SS	DF	MS	F(DF, DFd)
Intergrupar	9715	3	3238	F (3, 16) = 28,47
Intragrupo	1820	16	113,7	
Total	11535	19		

Valor de $p < 0,0001$.

Tabla 4 Estadística descriptiva NeuN corteza motora supragranular

	Control	TCE	Control + Prog.	TCE + Prog.
Media	182,3	216,6	146,5	196
Desviación Estándar	9,468	13,04	0,7071	1,414
IC Inferior 95%	174,4	205,7	140,1	183,3
IC Superior 95%	190,2	227,5	152,9	208,7

Para la región infragranular de la corteza motora, la prueba *Post Hoc* utilizada, (ver Fig. 12) los resultados mostraron, que existía una diferencia significativa (valor de p de $< 0,0001$) entre el grupo que recibió de Control más progesterona y el que recibió el TCE más Progesterona (*Mean diff* 34,67; intervalo de confianza 20,49 to 48,84). Al revisar los datos obtenidos entre el grupo de TCE y Control más Progesterona también se encontró una diferencia significativa (valor de p de $< 0,0012$; *Mean diff* -36,9 intervalo de confianza -59,31 a -14,49). Por último, se encontró una diferencia significativa entre el grupo de Control y Control más Progesterona (valor de p de $< 0,0209$; *Mean diff* -25,9; intervalo de confianza -48,31 a -3,485).

En el análisis entre el grupo de TCE y el grupo TCE más Progesterona, no se encontró ninguna diferencia significativa (valor de p de 0,9916; *Mean diff* -2,229; intervalo de confianza -24,64 a 20,18). Tampoco se encontró que existiera diferencia significativa en el grupo Control y el grupo TCE más Progesterona (valor de p de 0,6831; *Mean diff* 8,771; intervalo de confianza -13,64 a 31,18). Finalmente, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo Control y el grupo TCE (valor de p 0,6886; *Mean diff* 11; intervalo de confianza -17,35 a 39,35).

Ilustración 10 Análisis *post hoc* NeuN corteza motora infragranular

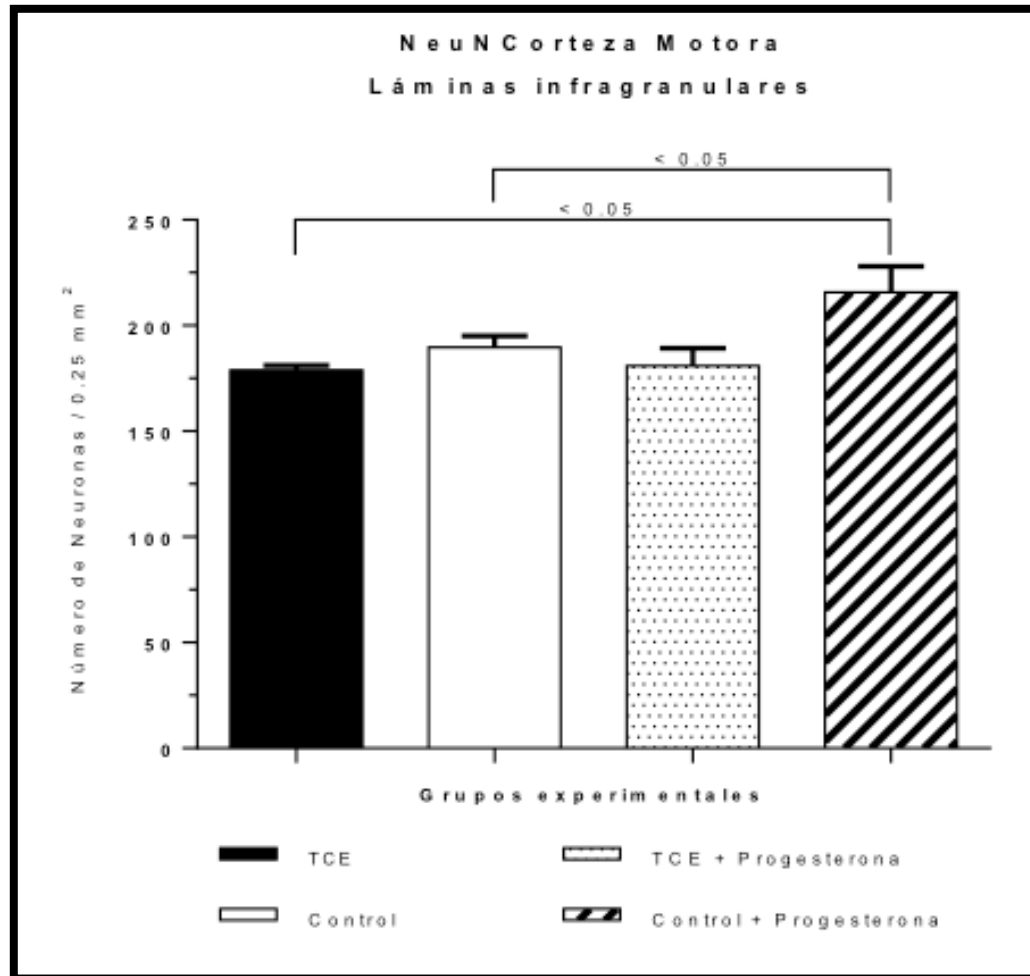


Tabla 5 Análisis de varianza NeuN corteza motora infragranular

Fuente de Variación	de	SS	DF	MS	F(DF, DFd)
Intergrupar		5561	3	1854	F (3, 16) = 18
Intragrupo		1571	16	98,17	
Total		7132	19		

*Valor de $p < 0,0001$

Tabla 6 Estadística descriptiva NeuN corteza motora infragranular

	Control	TCE	Control + Prog.	TCE + Prog.
Media	181	215,6	178,8	189,8
Desviación Estándar	8,271	12,29	2,475	5,303
IC Inferior 95%	174,1	205,4	156,5	142,1
IC Superior 95%	187,9	225,9	201	237,4

7.6 Datos cuantitativos de los conteos de neuronas marcadas con NeuN en la corteza sensitiva

Para el caso de la corteza sensitiva en la región supragranular el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, los resultados obtenidos, evidenciaron que no existía una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos a los que se sometieron a los grupos del experimento (valor de $p < 0,012$).

Utilizando la prueba *Post Hoc* establecida (ver Fig. 13) se encontró que en las capas supragranulares de la corteza sensitiva, existe una diferencia significativa (valor de p de 0,0172) entre el grupo que recibió el TCE y el de Control más Progesterona (*Mean diff* - 21,08; intervalo de confianza -38,81 a -3,353). Para la comparación entre el grupo de Control y el de TCE también se encontró una diferencia significativa (valor de p de < 0,0299; *Mean diff* 24,5 intervalo de confianza -2,072 a -46,93).

Por el contrario, al analizar la comparación entre el grupo de Control más Progesterona y el grupo TCE más Progesterona, no se encontró ninguna diferencia significativa (valor de p de 0,2181; *Mean diff* 7,958; intervalo de confianza -3,255 a 19,17). También se encontró que no había diferencia significativa en el grupo TCE y el grupo TCE más Progesterona (valor de p de 0,1895; *Mean diff* -13,13; intervalo de confianza -30,86 a 4,606). En el caso de la comparación del grupo Control y el grupo TCE más Progesterona, no se encontraron diferencias significativas (valor de p de 0,2936; *Mean diff* 11,38; intervalo de confianza -6,356 a 29,11). Finalmente, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de Control y el grupo de Control más Progesterona (valor de p de 0,9448; *Mean diff* 3,417; intervalo de confianza -14,31 a 21,15).

Ilustración 11 Análisis *post hoc* NeuN corteza sensitiva supragranular

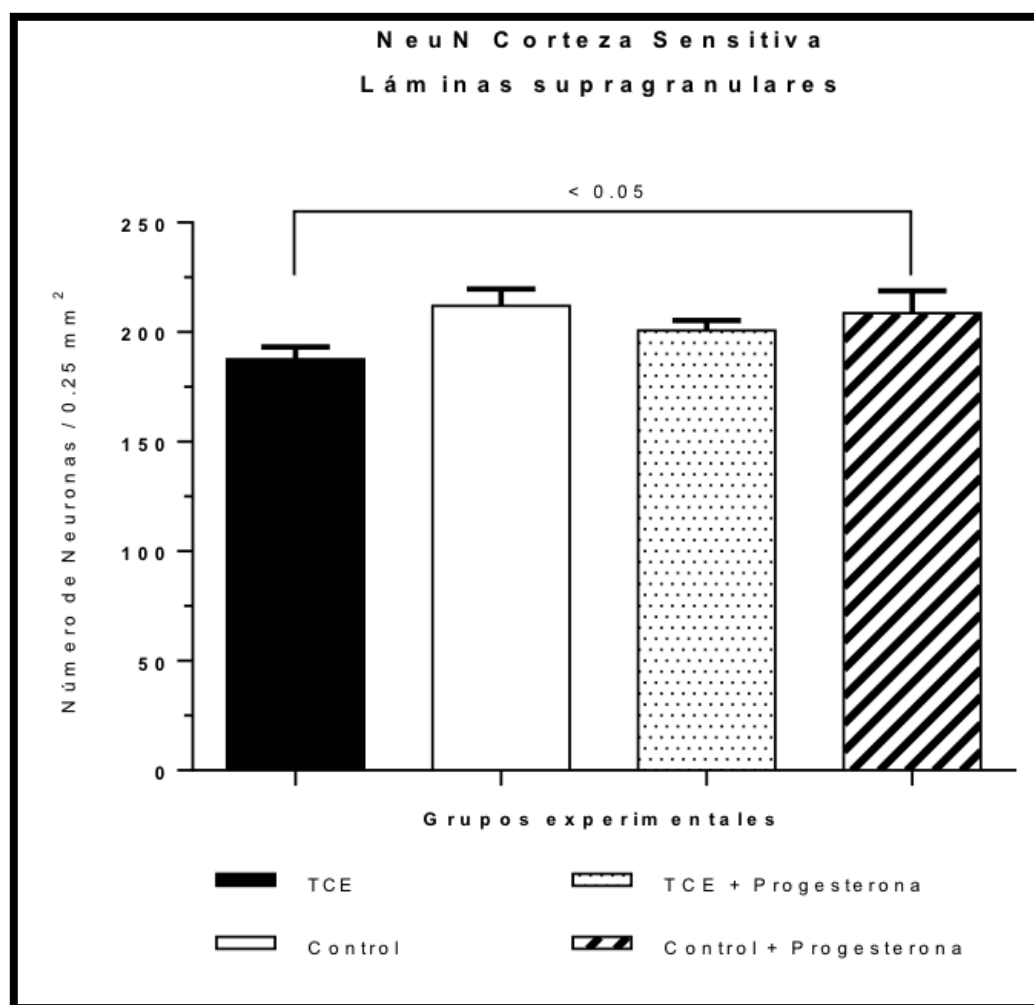


Tabla 7 Análisis de varianza NeuN corteza sensitiva supragranular

Fuente de Variación	SS	DF	MS	F(DF, DFd)
Intergrupar	929	3	309,7	F (3, 16) = 5,039
Intragrupa	983,2	16	61,45	
Total	1912	19		

*Valor de $p < 0,012$

Tabla 8 Estadística descriptiva NeuN corteza sensitiva supragranular

	Control	TCE	Control + Prog.	TCE + Prog.
Media	200,6	208,6	187,5	212
Desviación Estándar	4,682	10,26	5,657	7,778
IC Inferior 95%	196,7	200	136,7	142,1
IC Superior 95%	204,5	217,2	238,3	281,9

En la corteza sensitiva de la región infragranular, los resultados de la ANOVA de una vía los datos demostraron que existía una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos de los grupos del experimento, (valor de $p < 0,0031$), siendo aún más notoria la diferencia entre el los grupos Control más Progesterona y al compararlos con los grupos TCE y TCE más progesterona.

Al correr la prueba *Post Hoc* se encontró que en las capas infragranulares de la corteza sensitiva existe una diferencia significativa entre el grupo que recibió el Control más Progesterona y el TCE más Progesterona (*Mean diff* -19,83; intervalo de confianza 7,285 a 32,38).

Para la comparación entre el grupo de TCE y el de TCE más Progesterona, no se encontró una diferencia significativa (valor de p de $< 0,8944$; *Mean diff* 4,875 intervalo de confianza -14,97 a 24,72). Al analizar la comparación entre el grupo de Control y el grupo TCE más Progesterona, no se encontró ninguna diferencia significativa (valor de p de 0,404; *Mean diff* 11,13; intervalo de confianza -8,716 a 30,97).

Ilustración 12 Análisis *post hoc* NeuN corteza sensitiva infragranular

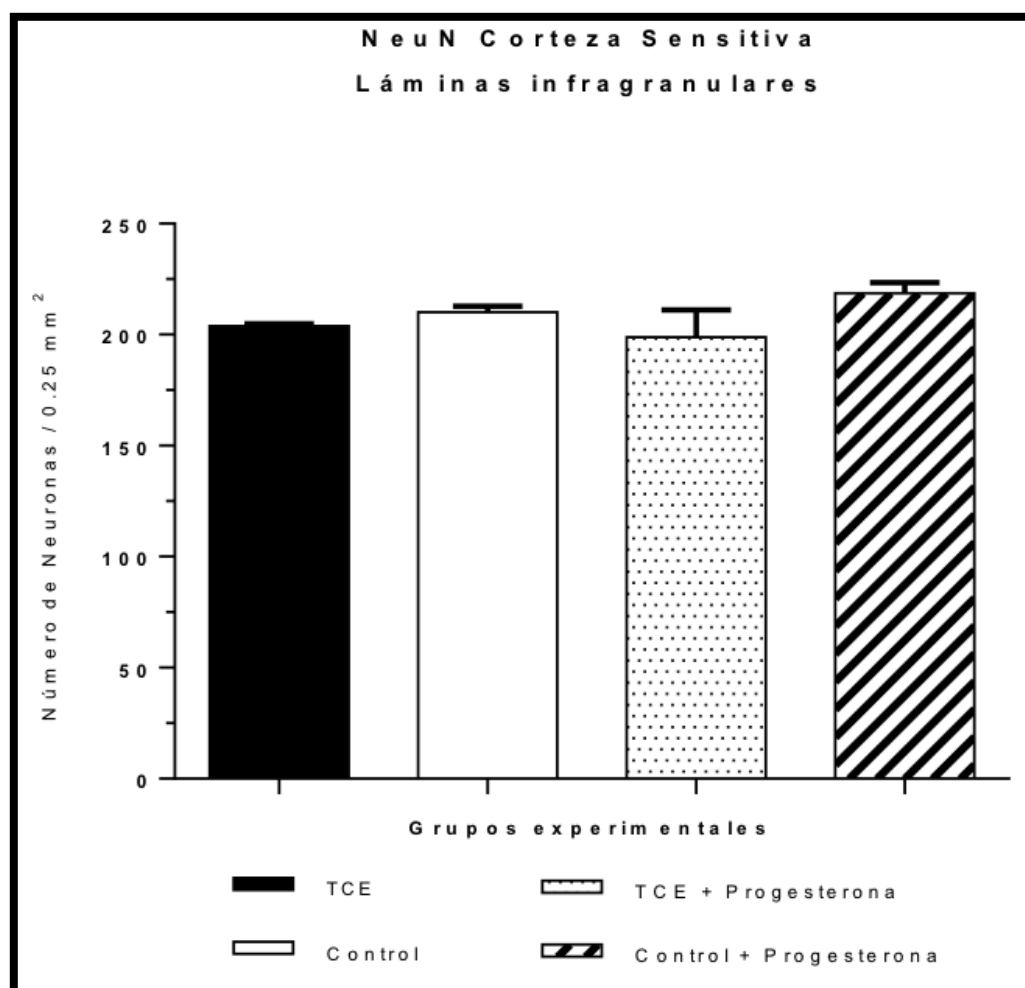


Tabla 9 Análisis de varianza NeuN corteza sensitiva infragranular

Fuente de Variación	SS	DF	MS	F(DF, DFd)
Intergrupar	1624	3	541,4	F (3, 16) = 7,036
Intragrupa	1231	16	76,95	
Total	2855	19		

*Valor de $p < 0,0001$

Tabla 10 Estadística descriptiva NeuN corteza motora infragranular

	Control	TCE	Control + Prog.	TCE + Prog.
Media	198,9	218,7	203,8	210
Desviación Estándar	12,37	4,637	1,061	2,828
IC Inferior 95%	188,5	214,8	194,2	184,6
IC Superior 95%	209,2	222,6	213,3	235,4

7.7 Datos cuantitativos de la los conteos de neuronas marcadas con APP N-Terminal en la corteza motora

Al realizar el análisis de varianza (ANOVA) de una vía de la corteza motora en la región supragranular, los resultados obtenidos, mostraron que existía una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos a los que se sometieron a los grupos del experimento (valor de $p < 0,0001$), siendo muy notorio la disminución en el número de células marcadas para APP en los grupos que recibieron progesterona.

Al analizar los datos cuantitativos de los resultados de los conteos celulares de la marcación inmunohistoquímica para NeuN, utilizando la prueba *Post Hoc* de Tukey,¹²¹ (ver Fig. 15) se encontró que en las capas supragranulares de la corteza motora la marcación con APP N-Terminal, existía una diferencia significativa (valor de p de 0,0006) entre el grupo de Control más Progesterona y el que recibió el TCE más Progesterona (*Mean diff* -15; intervalo de confianza -23,45 a -6,553). Para la comparación entre el grupo de TCE y TCE más Progesterona también se encontró una diferencia significativa (valor de p de $< 0,0023$; *Mean diff* 20,54 intervalo de confianza 7,187 a -33,9). También, se encontró una diferencia significativa entre el grupo de Control y TCE más progesterona (valor de p de $< 0,0016$; *Mean diff* 21,29; intervalo de confianza 7,937 a 34,65). Se encontraron diferencias significativas entre los grupos TCE y Control más Progesterona (valor de p de $< 0,0001$; *Mean diff* 35,54 intervalo de confianza 22,19 a 48,9). Para finalizar, existe una diferencia significativa entre el grupo Control y el grupo Control más Progesterona (valor de p de $< 0,0001$; *Mean diff* 36,29 intervalo de confianza 22,94 a 49,65). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas al revisar la comparación entre el grupos de Control y el grupo de TCE (valor de p de $< 0,9992$; *Mean diff* 0,75 intervalo de confianza 16,14 a 17,64).

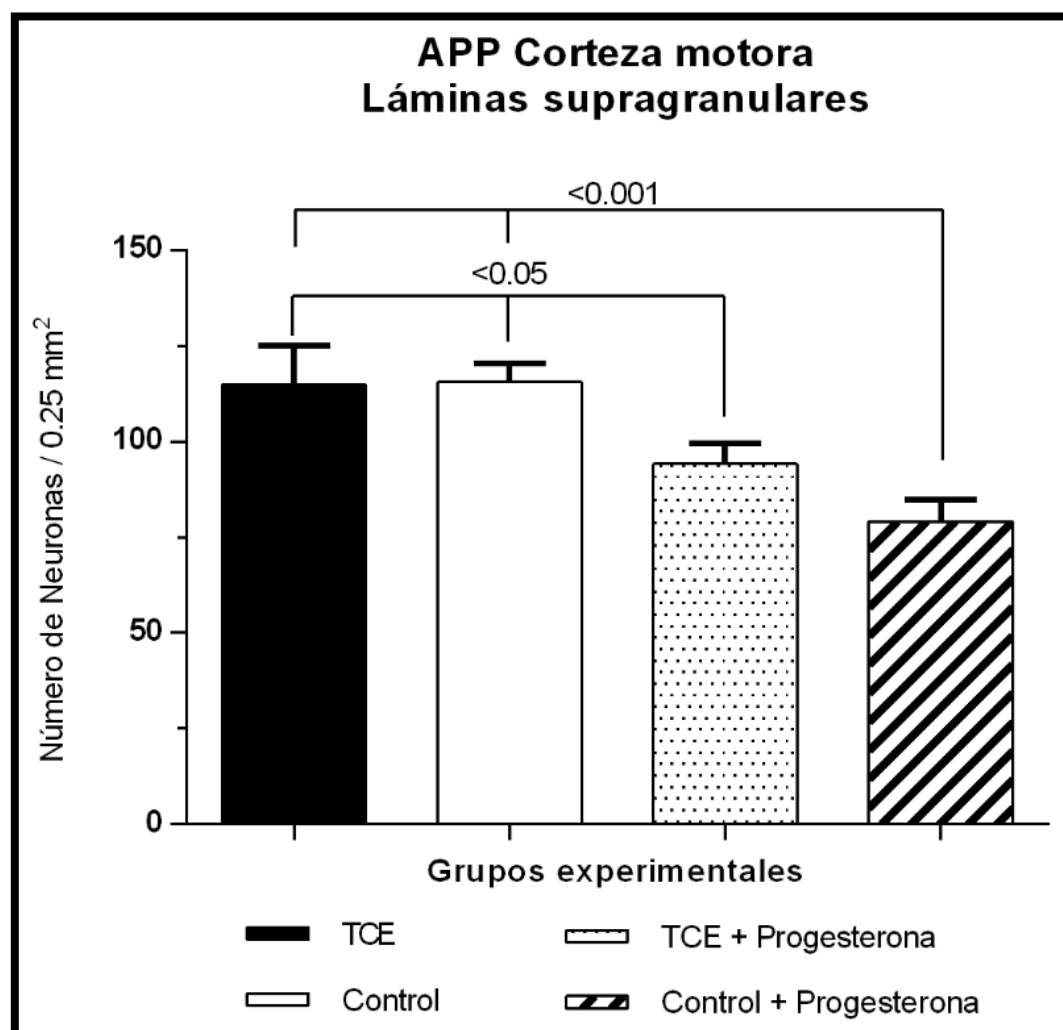


Ilustración 13 Análisis *post hoc* APP N-Terminal corteza motora supragranular

Tabla 11 Análisis de varianza APP N-Terminal corteza motora supragranular

Fuente de Variación	de	SS	DF	MS	F(DF, DFd)
Intergrupar		1158	3	386,1	F (3, 16) = 2,981
Intragrupo		2073	16	129,5	
Total		3231	19		

*Valor de $P = 0,00626$

Tabla 12 Estadística descriptiva APP N-Terminal corteza motora supragranular

	Control	TCE	Control + Prog.	TCE + Prog.
Media	94,21	79,21	114,8	115,5
Desviación Estándar	5,381	5,676	10,25	4,95
IC Inferior 95%	89,71	74,46	22,63	71,03
IC Superior 95%	98,71	83,95	206,9	160

En la región infragranular, de la corteza motora los resultados para la marcación con APP N-Terminal de la ANOVA de una vía mostraron que también existía una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos de los grupos del experimento, (valor de $p < 0,00626$), siendo aún más notoria la diferencia para el grupo de Control más Progesterona al compararse con los otros grupos.

Al analizar los datos cuantitativos de los resultados de los conteos celulares de la marcación inmunohistoquímica para NeuN, utilizando la prueba *Post Hoc* definida (ver Fig. 14) no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos que fueron evaluados. Control más Progesterona *versus* TCE más Progesterona (valor de p de = 0,1312; *Mean diff* -13,29 intervalo de confianza -29,57 a 2,98). TCE *versus* TCE más Progesterona (valor de p de = 0,3789; *Mean diff* -14,88 intervalo de confianza -40,62 a 10,8). Control *versus* TCE más Progesterona (valor de p de = 0,1285; *Mean diff* -21,13 intervalo de confianza -46,87 a 4,61). TCE *versus* Control más Progesterona (valor de p de = 0,998; *Mean diff* -1,583 intervalo de confianza -27,33 a 24,1). Control *versus* Control más Progesterona (valor de p de = 0,8198; *Mean diff* -7,833 intervalo de confianza -33,58 a 17,9). Control *versus* TCE (valor de p de = 0,9454; *Mean diff* -6,25 intervalo de confianza -38,58 a 17,9).

Ilustración 14 Análisis *post hoc* APP N-Terminal corteza motora láminas infragranulares

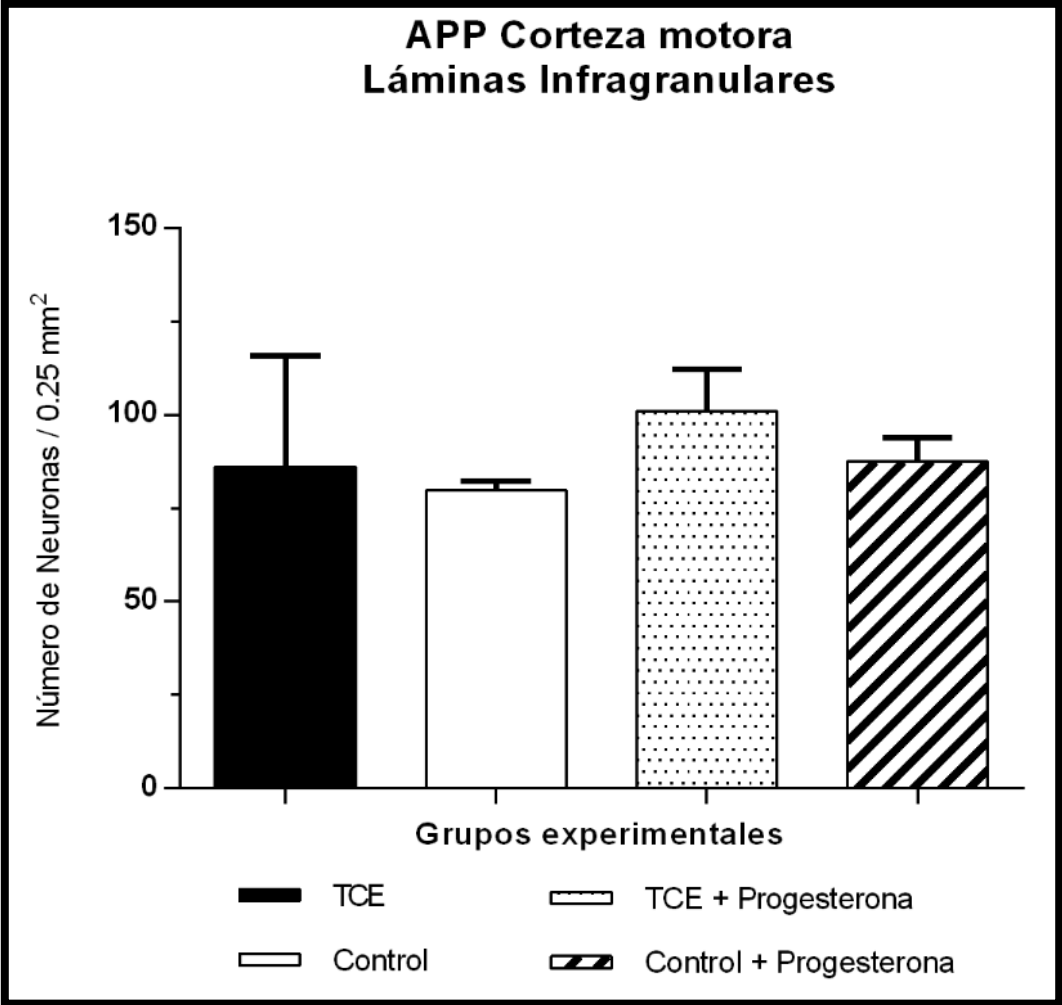


Tabla 13 Análisis de varianza APP N-Terminal corteza motora infragranular

Fuente de Variación	SS	DF	MS	F(DF, DFd)
Intergrupar	163,7	3	54,56	F (3, 16) = 1,582
Intragrupo	551,8	16	34,49	
Total	715,5	19		

Valor de $p < 0,2328$

Tabla 14 Estadística descriptiva NeuN corteza motora región infragranular

	Control	TCE	Control + Prog.	TCE + Prog.
Media	82,17	87,42	88,75	89
Desviación Estándar	6,782	5,531	1,768	3,536
IC Inferior 95%	76,5	82,79	72,87	57,23
IC Superior 95%	87,84	92,04	104,6	120,8

7.8 Datos cuantitativos de la los conteos de neuronas marcadas con APP N-Terminal en la corteza sensitiva

Para el caso de la corteza sensitiva en las láminas supragranulares, el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, los resultados obtenidos, evidenciaron que no existía una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos a los que se sometieron a los grupos del experimento (valor de $p < 0,2328$).

Al analizar los datos cuantitativos de los resultados de los conteos celulares de la marcación inmunohistoquímica para APP N-Terminal, utilizando la prueba *Post Hoc* definida (ver Fig. 17) no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los grupos que fueron evaluados. Control más Progesterona *versus* TCE más Progesterona (valor de p de $< 0,3145$; *Mean diff* 5,25 intervalo de confianza -3,151 a 13,6). TCE *versus* TCE más Progesterona (valor de p de $= 0,5068$; *Mean diff* -6,583 intervalo de

confianza -6,699 a 19,8). Control *versus* TCE más Progesterona (valor de p de = 0,476; *Mean diff* 6,833 intervalo de confianza -6,449 a 20,1). TCE *versus* Control más Progesterona (valor de p de = 0,9914; *Mean diff* -1,333 intervalo de confianza -11,95 a 14,6). Control *versus* Control más Progesterona (valor de p de = 0,9858; *Mean diff* -1,583 intervalo de confianza -11,7 a 14,8). Control *versus* TCE (valor de p de > 0,9999; *Mean diff* -6,25 intervalo de confianza -38,58 a 17,9).

Ilustración 15 Análisis *post hoc* APP N-Terminal corteza sensitiva infragranular

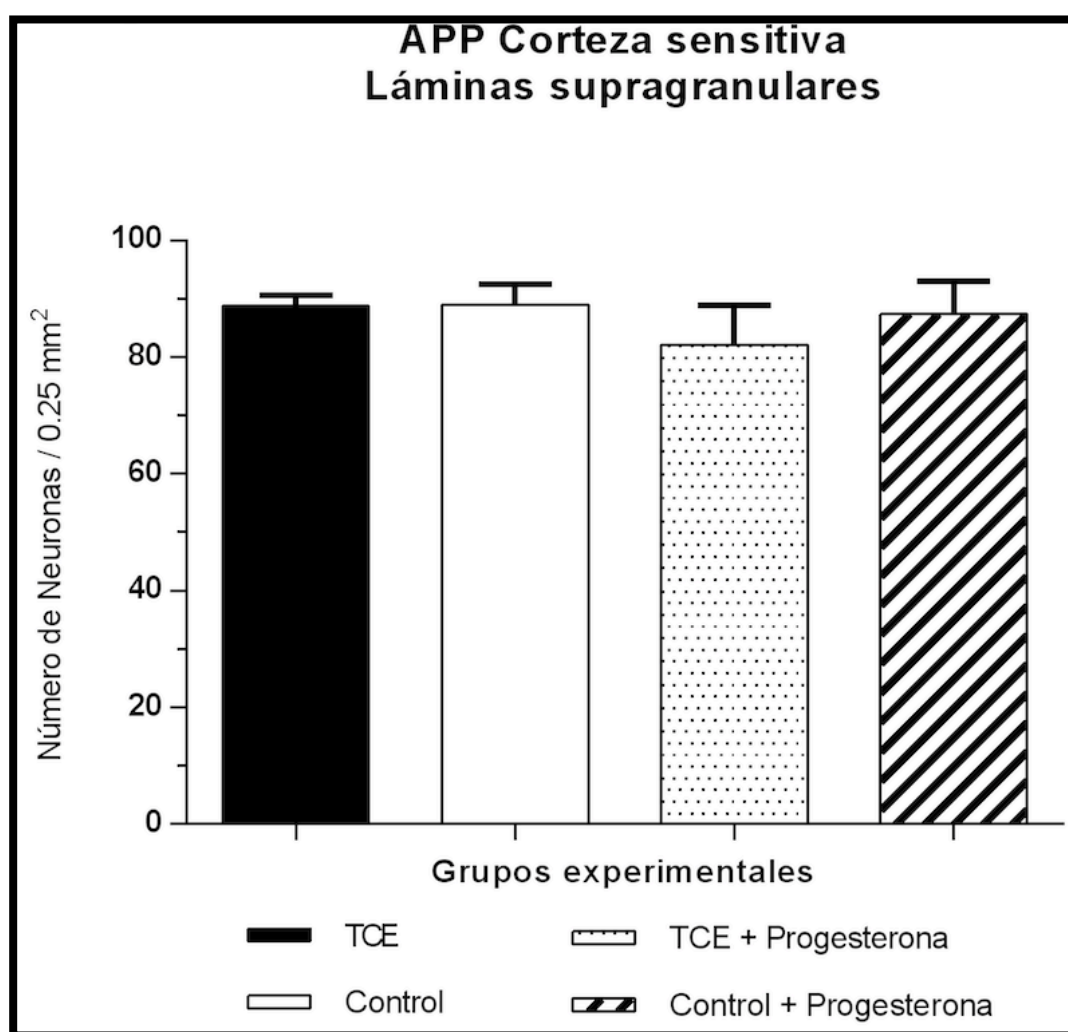


Tabla 15 Análisis de varianza APP N-Terminal corteza sensitiva supragranular

Fuente de Variación	SS	DF	MS	F(DF, DFd)
Intergrupar	163,7	3	54,56	F (3, 16) = 1,582
Intragrupo	551,8	16	34,49	
Total	715,5	19		

Valor de $p < 0,2328$

Tabla 16 Estadística descriptiva APP corteza sensitiva región supragranular

	Control	TCE	Control + Prog.	TCE + Prog.
Media	82,17	87,42	88,75	89
Desviación Estándar	6,782	5,531	1,768	3,536
IC Inferior 95%	76,5	82,79	72,87	57,23
IC Superior 95%	87,84	92,04	104,6	120,8

En la corteza sensitiva de la región infragranular, los resultados de la ANOVA de una vía los datos demostraron que existía una diferencia significativa entre los diferentes tratamientos de los grupos del experimento, (valor de $p < 0,0014$), siendo aún más notoria la diferencia entre el los grupos de Control y TCE, al ser comparados con los grupos TCE más Progesterona y Control más Progesterona.

Al correr la prueba *Post Hoc* (ver Fig. 18) se encontró que en las capas infragranulares de la corteza sensitiva existe una diferencia significativa entre el grupo que de TCE más Progesterona y TCE (valor de p de = 0,0073; *Mean diff* 17,44 intervalo de confianza 4,92 a 30,78). También se encontraron diferencias significativas entre el grupo Control más Progesterona y el grupo TCE (valor de p de = 0,0239; *Mean diff* 14,94 intervalo de confianza 1,592 a 28,28). En la comparación entre el grupo Control más Progesterona y TCE (valor de p de = 0,0114; *Mean diff* 16,5 intervalo de confianza 3,155 a 28,85). Se evidenció además diferencias significativas entre el el grupo Control y el grupo Control más Progesterona (valor de p de = 0,037; *Mean diff* 14 intervalo de confianza 0,6547 a 27,35).

Al realizar el análisis de la comparación entre el grupo TCE más Progesterona y el grupo Control más Progesterona, no se evidenció que existiera diferencia significativa (valor de p de = 0,9997; *Mean diff* 0,9375 intervalo de confianza 7,503 a 9,378). Tampoco se encontró que existiera diferencia significativa entre el grupo TCE y el grupo Control (valor de p de = 0,9985; *Mean diff* 0,9375 intervalo de confianza -19,38 a 14,38).

Tabla 17 Análisis *post hoc* APP N-Terminal corteza sensitiva infragranular

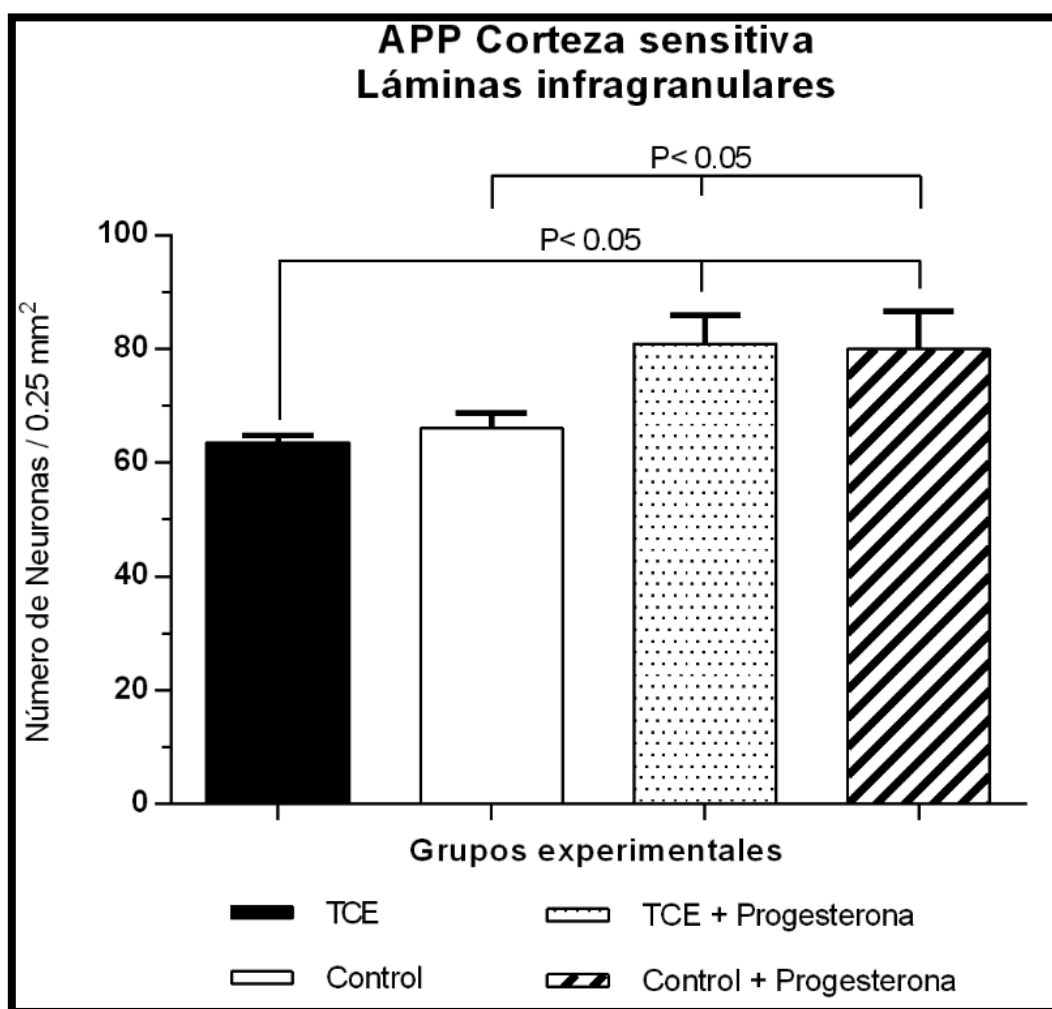


Tabla 18 Análisis de varianza APP N-Terminal corteza sensitiva infragranular

Fuente de Variación	SS	DF	MS	F(DF, DFd)
Intergrupar	800,4	3	266,8	F (3, 16) = 8,416
Intragrupa	507,2	16	31,7	
Total	1308	19		

*Valor de p 0,0014

Tabla 19 Estadística descriptiva APP N-Terminal corteza sensitiva infragranular

	Control	TCE	Control + Prog.	TCE + Prog.
Media	80,94	80	63,5	66
Desviación Estándar	5,05	6,747	1,414	2,828
IC Inferior 95%	76,72	74,36	50,79	40,59
IC Superior 95%	85,16	85,64	76,21	91,41

8 Discusión

8.1 Modelo de lesión y cultivos organotípicos

El TCE es una de las entidades más elusivas a la hora de tratar de entender su fisiopatología, esto puede deberse a la diversidad de factores implicados en la génesis de las lesiones, la enorme complejidad de las múltiples vías de señalización celular implicadas y aspectos mas complejos previos al trauma, tales como la reserva cerebral y la reserva cognitiva, dos factores que se relacionan directamente con el desenlace final de un TCE.¹²² En la actualidad incluso se están planteando nuevos acercamientos a los pacientes que permitan por lo menos predecir el comportamiento de las lesiones, según una serie de marcadores séricos, con el fin de tratar de dilucidar los fenómenos que ocurren y poder tener un pronóstico de la evolución de la lesión.¹²³

Desde el 2008 el grupo de estudio de trauma del centro de estudios cerebrales, ha venido trabajando en el reconocimiento de las alteraciones morfológicas, patrones de respuesta neuronal, evaluación de marcadores celulares relacionados con el trauma craneoencefálico y en el análisis temporal del comportamiento celular utilizando modelos de cultivos celulares organotípicos. Hasta la fecha se ha logrado la estandarización de las técnicas, la valoración del modelo y se fijaron los parámetros básicos a a partir de los cuales se pueden desarrollar medidas neuroprotectoras que es el propósito del presente trabajo.

Con todos los datos obtenidos por el grupo, se consideró que era el momento de realizar la validación del modelo de cultivo organotípico como una estrategia para validar nuevos fármacos candidatos a convertirse en medicamentos neuroprotectores.

La búsqueda actual de estrategias de tratamientos encaminados a disminuir la magnitud de las lesiones derivadas del TCE, no ha dado buenos resultados hasta la fecha. Casi todos los enfoques que se han probado en los modelos experimentales, han arrojado resultados ambiguos y que no son concluyentes.¹²⁴

El desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la lesión primaria y secundaria del TCE, presenta graves problemas en el diseño de los experimentos necesarios para probar las moléculas candidatas a medicamentos neuroprotectores, pues no se han logrado obtener un modelo que reproduzca de manera adecuada los fenómenos que ocurren en el tejido cerebral durante la lesión y en las etapas posteriores a ésta, pues carecen del entorno celular adecuado y las interacciones entre los diferentes tipos celulares del tejido cerebral y la citoarquitectura propia de la zona.

Tabla 20 Trabajos realizados con la técnica de cultivos celulares organotípicos en TCE por el CEC

Año	Título	Trabajo realizado
2008	Progresión temporal de los cambios agudos de la cito y dendroarquitectura en tajadas de neocorteza derivada de contusión cerebral de humano ¹	En este trabajo se implementó la cámara de cultivo celular y se pudo evidenciar la vitalidad de las neuronas obtenidas de tejido humano proveniente de craniectomía descompresiva, encontrando la posibilidad de intentar manipulaciones sobre el tejido y generar un modelo in vitro para el estudio de la biología molecular del TCE y el ensayo de terapias de neuroprotección
2013	Viabilidad de modelo organotípico agudo de corteza cerebral de rata con trauma craneoencefálico por función mitocondrial	Se realizó la validación del modelo al comprobar la vitalidad de las neuronas de las tajadas de cerebro de rata que fueron utilizadas en el cultivo organotípico y se pudo determinar que el porcentaje de supervivencia de las células disociadas de la corteza frontal de rata para las cuatro horas de cultivo mediante un ensayo de función mitocondrial
2014	Evaluación de las alteraciones generadas en el tejido nervioso posterior a un trauma craneoencefálico difuso de severidad moderada moderado ¹²⁵	En este trabajo, se utilizó la metodología del cultivo organotípico como una estrategia para determinar la fisiología de la lesión secundaria que se produce tras el TCE generado en un modelo animal utilizando la metodología descrita por Marmarou para lesión axonal difusa por TCE, además de las alteraciones morfológicas que se presentan en las neuronas, la citoarquitectura y demás variables que se presentaron en diferentes tiempos de cultivo celular
2014	Evaluación de los niveles de caspasa 3 activa en cultivo organotípico agudo de tajadas cerebrales de rata derivadas de un modelo de trauma craneoencefálico difuso moderado ¹²⁶	Una vez fueron establecidos los parámetros del modelo de cultivo organotípico y fue validada la vitalidad de las neuronas, este trabajo de investigación se centró en la verificación de marcadores celulares específicos de apoptosis, obteniendo datos útiles de la fisiología de la lesión secundaria que se produce tras el trauma craneoencefálico que permitieron comparar los datos obtenidos con los que fueron obtenidos mediante otras técnicas y se encuentran descritos en la literatura
2015	Cultivo organotípico agudo de cerebro de rata para la evaluación temporal y cuantitativa de la proteína precursora amiloide en trauma craneoencefálico ¹²⁷	En este trabajo de terminaron de establecer los marcadores celulares más específicos de la lesión, encontrando cuál es el mejor momento tras el TCE (realizado según la metodología descrita por Marmarou), para realizar los cultivos celulares y encontrar un equilibrio entre la vitalidad del tejido y la expresión de los marcadores de lesión neuronal.

Por otra parte, los biomodelos usados habitualmente, presentan una serie de variables farmacocinéticas específicas de cada especie animal seleccionada, que pueden alterar drásticamente los resultados obtenidos de los experimentos, de manera que es muy difícil determinar el efecto real que va a tener esta sustancia en los ensayos clínicos futuros.

Uno de los problemas más grandes a los cuales se enfrenta la investigación y desarrollo de fármacos neuroprotectores que tengan la capacidad de mejorar el pronóstico de los pacientes que sufran un trauma craneoencefálico, consiste en que en la mayoría de los casos los hallazgos preclínicos y de los modelos animales no se correlacionan con los datos de los estudios clínicos de tercera fase que se realizan para validar los resultados. Recientemente se publicaron los resultados del *Neuroprotective Agent, Progesterone, in Severe Traumatic Brain Injury* (SYNAPSE) un estudio clínico multicéntrico aleatorizado controlado con placebo, realizado en 21 países, en donde se evaluó la efectividad de la progesterona como un agente neuroprotector para el TCE severo. Las conclusiones del estudio muestran que la progesterona no tuvo ningún impacto sobre el pronóstico de los pacientes con TCE. Estos datos contrastan con toda una serie de evidencias preclínicas acumuladas hasta la fecha. Otro estudio clínico de tercera fase que también evaluó el efecto de la progesterona, el Progesterone for the Treatment of Traumatic Brain Injury ProTECT III, tampoco encontró ningún beneficio en el pronóstico de los pacientes y concluye que es necesario tener diferentes acercamientos en la investigación como son nuevos diseños experimentales de modelos de lesión, más y mejores estudios preclínicos, estudios farmacocinéticos de fase II y unos mejores criterios de inclusión y de exclusión en la fase clínica, con el fin de poder reducir la heterogeneidad del evento. Además los autores manifiestan que el éxito de pasar de la fase preclínica al diseño de nuevos fármacos efectivos, puede requerir la creación de nuevos paradigmas en el estudio del trauma craneoencefálico, incluidos nuevos métodos de ensayos clínicos, ensayos clínicos de fase temprana para identificar las dosis efectivas de los fármacos, buscar resultados más específicos basados en el mecanismo de la lesión y rigurosos ensayos multicéntricos preclínicos que permitan hacer predicciones más precisas sobre los resultados.¹⁰²

En el presente trabajo, la evaluación directa de los tejidos con las diferentes marcaciones mostró diferencias en la forma de expresión de la lesión celular entre las diferentes láminas de la corteza observadas, evidenciando que el TCE es un proceso que no afecta de manera homogénea a todo el encéfalo. Hace poco tiempo se publicó un artículo en el que se reportaba el uso de un modelo de impacto cortical mediante el uso de un percutor neumático.¹²⁸ Lo llamativo de este trabajo fue que cuando modificaron el momento angular del impacto sobre la corteza frontal y el vector de la fuerza aplicada, de manera que la trayectoria siguiera diferentes ángulos, encontraron diferencias significativas, en la cuantificación de los marcadores de muerte celular, siendo mayores en la región M1 de la corteza y en la región CA3 del hipocampo, con activación de microglías y procesos relacionados con la neurogénesis, demostrando así

que la magnitud de las lesiones relacionadas con el TCE tienen una variación importante en las diferentes zonas del encéfalo en relación directa con los vectores en los cuales se ejercen las fuerzas que generan la lesión.

Otro estudio realizado con el mismo sistema de TCE focalizado por un percutor neumático, analizó la respuesta de la microglía utilizando PCR en tiempo real y un análisis de imagenología con resonancia magnética, se encontró que el estrés rotacional que se genera con el TCE sobre el encéfalo, era suficiente para producir activación de la glía en respuesta a las lesiones del tejido.¹²⁹

Es por esto que el modelo de trauma craneoencefálico y la valoración del cultivo celular organotípico, cobran importancia, pues se consolidan como una estrategia efectiva para lograr una homogenización de las características de la lesión, en un ambiente donde se están tomando en cuenta las diferentes poblaciones celulares y la citoarquitectura, a diferencia de lo que ocurre en los modelos de cultivos celulares donde únicamente se puede apreciar el efecto sobre una población neuronal específica sin las interacciones intercelulares ni la conectividad de las mismas; además, permite la evaluación en un ambiente controlado y conocido en el cual se puede observar de manera directa el efecto de múltiples intervenciones y pueden ser verificadas mediante el uso de los marcadores celulares específicos que se conocen en la actualidad, tal como se pudo comprobar en este trabajo de investigación.

El cultivo celular organotípico, permitió un acercamiento a los fenómenos que se están presentando en el TCE. Pero el valor de esta clase de estudios, consiste en la capacidad de aislar el fenómeno de otras variables propias de los biomodelos, como son las variaciones en la absorción, el metabolismo específico de cada especie para cada una de los fármacos candidatos y los problemas de distribución que se presentan para que las sustancias puedan atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al sistema nervioso central.

Este trabajo de investigación presenta algunas diferencias con los resultados obtenidos en el trabajo de Riascos y cols. en 2008, porque las muestras de tejidos humanos cultivadas, eran obtenidas a partir de pacientes que presentaban un trauma craneoencefálico severo, con una alta probabilidad de lesiones focales y/o contusiones. Estas muestras según lo descrito en la publicación.¹ ya mostraban signos de un alto deterioro relacionado con la mecánica del trauma y el procedimiento quirúrgico al cual fueron sometidos los pacientes; de manera que el modelo de TCE y el cultivo celular organotípico de corteza cerebral de roedor, se posiciona como una herramienta muy útil dentro de los elementos de evaluación de los fármacos candidatos a medicamentos neuroprotectores, pues logra estandarizar todas estas variables, permitiendo identificar el efecto farmacológico directo sobre las diferentes dianas terapéuticas de manera independiente a otros factores distractores.

8.2 Efecto neuroprotector de la progesterona

La progesterona es una hormona que normalmente es sintetizada por las gónadas, la placenta y las glándulas adrenales, pero también puede ser generada dentro del encéfalo, con acciones precisas como neuroesteroide; allí puede ser metabolizada a sus metabolitos más activos 5 α DH-progesterona y alopregnanolona de hecho, la gran mayoría de los efectos neuroprotectores que se le reconocen a la progesterona, se deben realmente a estas dos moléculas.⁹⁸

Desde hace tiempo, es conocido que la administración exógena de la progesterona, tiene un efecto neuroprotector importante en varios modelos animales de neurodegeneración, lesiones medulares, TCE bien sea focalizado o difuso e isquemia global y focalizada. Los estudios experimentales realizados en modelos de TCE, han mostrado diferentes mecanismos por lo cuales la progesterona, puede ejercer su efecto neuroprotector. Por ejemplo, la administración de Progesterona después del TCE, ha demostrado que reduce el edema vasogénico citotóxico,¹³⁰ un fenómeno que puede ser explicado por que la progesterona tiene la capacidad de modular la expresión del canal de Acuaporina 4.¹³¹ Evidencia proveniente de otros estudios ha establecido que la progesterona tiene influencia positiva en la transcripción de genes antiapoptóticos, como Bcl-2, mientras que puede disminuir la expresión de genes que codifican para diversos factores proapoptóticos como BAX, BAD y Caspasa 3 activada.^{132,133} También se ha implicado como un mecanismo de neuroprotección a la inhibición del receptor sigma 1 por parte de la progesterona,¹³⁴ así como a una serie de efectos antioxidantes que se manifiestan en la reducción de la peroxidación lipídica que se presenta después de un TCE.¹³⁵

Es por esto que se seleccionó a la progesterona como el fármaco para probar en el modelo de cultivo organotípico, pues la efectividad de la misma, no se limitaría a una solo mecanismo de acción, sino que presenta la oportunidad de cubrir varios frentes de manera simultanea, obviando las limitaciones farmacocinéticas que se presentan en la administración a los diferentes biomodelos, tal como se ha discutido previamente.

En el presente trabajo, se pudo evidenciar el efecto neuroprotector de la progesterona, en la corteza cerebral de la rata, al ser llevada al cultivo cerebral organotípico, un fenómeno que fue particularmente notorio en la marcación para NeuN en la corteza motora, tanto en las láminas supragranulares, como en las infragranulares. Es de resaltar que este fenómeno no se presentó en la corteza sensorial, donde si bien en las láminas supragranulares fue claro el efecto de la progesterona al comparar al grupo de TCE más Progesterona contra el grupo Control, no se pudo constatar este efecto para las otras comparaciones o en las láminas infragranulares.

Al revisar los datos obtenidos del análisis estadístico, se pudo encontrar una constante en todas las áreas de la corteza que fueron comparadas y consistió en que para todos

los grupos evaluados (láminas supragranulares de la corteza motora, láminas infragranulares de la corteza motora (láminas supragranulares de la corteza sensitiva, láminas infragranulares de la corteza sensitiva), los conteos del número de células con una marcación más próxima a lo normal para NeuN, fue mayor en el grupo que recibió el tratamiento con progesterona, siendo más marcado este efecto, en el grupo que no recibió el TCE, encontrando que se percibía una mayor definición de los somas de las neuronas y una mayor intensidad en la imagen, mostrando el citoplasma más claro, y una mayor definición de la dendrita apical con un núcleo bien definido.

En el análisis realizado de los grupos de experimentación utilizando el marcador para APP N-Terminal, se encontró una marcada diferencia entre los grupos para las láminas supragranulares de la corteza motora, notando una reducción importante en los niveles de este marcador para los grupos que recibieron el tratamiento con progesterona. Este dato fue estadísticamente significativo al comparar el grupo TCE y el grupo TCE más Progesterona (valor de $p < 0,05$) y con mejores resultados para la comparación entre el grupo TCE y Control más Progesterona (valor de $p < 0,001$).

Dentro del análisis cualitativo, resalta la presencia de la marcación más intensa en las láminas infragranulares en la zona de transición entre IV y V. Hay que recordar que a pesar de que no fue estudiado en el presente trabajo, algunas de las funciones que han sido descritas para la APP, se podrían relacionar con la formación de nuevas sinápsis¹³⁶ y más importante para esta discusión, con los procesos de reparación axonal en casos de lesión axonal.¹³⁷ De hecho, se han publicado modelos de análisis de la expresión de la APP como marcadores de lesión axonal, en la valoración de las lesiones que se presentan en el TCE,¹³⁸ algo de gran utilidad en el análisis forense.¹³⁹

Es probable que lo observado en la intensidad de la marcación axonal entre las láminas supragranulares e infragranulares, se deba a que estas últimas son las que proyectan sus axones fuera de la corteza y por tanto son más susceptibles de presentar lesiones por cizallamiento asociadas a los diferentes vectores de aceleración que se presentan en el TCE difuso en función de las diferentes masas y densidades que tienen las diferentes estructuras del encéfalo, tal como se ha mencionado antes.^{54,66,68}

De los hallazgos previos de nuestro grupo de investigación,^{127,125} se conoce que el procedimiento del cultivo celular organotípico es en sí mismo un factor que afecta la viabilidad de las neuronas que se encuentran en las tajadas agudas del cerebro de rata en la medida que va pasando el tiempo de cultivo. De manera que encontrar que entre todos los grupos evaluados, aquellos que tuvieron el tratamiento con progesterona presentaran cifras más altas en el conteo celular (una observación que fue positiva en todas las cortezas que fueron evaluadas), en cierta medida valida la efectividad del modelo de cultivo organotípico como una estrategia para evaluar a nuevos fármacos candidatos de convertirse en medicamentos neuroprotectores.

En el modelo de TCE difuso de Marmarou, trabajado por el grupo de investigación, la lesión cerebral se produce por una aceleración angular que produce un vector de fuerzas centrípetas que alteran de manera diferencial al encéfalo de acuerdo a la masa y la densidad de cada zona, alterando de manera diferente la citoarquitectura y produciendo un patrón de lesiones heterogéneo. Teniendo esto en cuenta, el modelo de cultivo celular organotípico, se constituye como una nueva herramienta que permite estudiar las diferencias en las respuestas del tejido cerebral ante el TCE y la relación de estas con diversos factores externos, como el ángulo del vector de la fuerza que determina el trauma, el efecto que tiene el momento angular y la aceleración sobre las diferentes densidades de los tejidos.

Los hallazgos del presente estudio permiten determinar que el modelo del cultivo celular organotípico de tajadas agudas de cerebro de roedor, es una herramienta útil para el análisis de fármacos candidatos a medicamentos neuroprotectores. El modelo permite aislar las variables farmacocinéticas que pueden alterar los resultados obtenidos de los ensayos animales, optimizando los recursos y reduciendo el número de los biomodelos utilizados. Permite estudiar las diferencias regionales que se presentan en las diferentes áreas del cerebro ante el trauma, pudiendo determinar diferentes tipos y magnitudes de las lesiones cerebrales, así como la presencia de efectos selectivos de los fármacos sobre áreas específicas del encéfalo, algo que no es posible de realizar con los cultivos celulares tradicionales.

Las limitaciones de este trabajo, se presentan en los ajustes de los tiempos de cultivo, pues las lesiones neuronales son procesos que no culminan en el momento del TCE, sino que son dinámicos en el tiempo. De manera que por una parte se debe calcular muy bien el tiempo de exposición de la sustancia que se está analizando, sin olvidar que en la medida que transcurre el cultivo, se están perdiendo células del tejido cerebral.

En esta ocasión, solamente se analizaron neuronas utilizando dos marcadores que permitieran verificar dos fenómenos relativamente conocidos como son la muerte neuronal por la lesión secundaria y la lesión axonal difusa. A futuro, se podrían analizar otros tipos celulares, con diferentes marcadores que permitan identificar, otros aspectos relacionados con el TCE y las diferentes respuestas de cada una de las estructuras dentro del encéfalo.

Debido a la alta prevalencia del TCE y el impacto que tiene sobre la sociedad, se hace necesario continuar con el desarrollo de nuevas metodologías, pues en la actualidad el desarrollo de nuevos medicamentos que puedan mitigar las lesiones secundarias, es casi nulo. Fue muy desalentador observar el fracaso de los estudios clínicos realizados con la progesterona que fueron publicados durante el desarrollo de este trabajo de investigación, pero puso en evidencia la necesidad de la creación de nuevos acercamientos al estudio del TCE como el del presente trabajo, que permitan un

entendimiento mejor de los fenómenos que se están presentando en el tejido nervioso y se puedan entender mejor los fenómenos en unas condiciones bien controladas, sin que estas se alejen de la realidad del fenómeno que se presenta en el mundo real, para de esta manera lograr una mejor articulación con los investigadores clínicos que se evalúen los nuevos medicamentos en el futuro, pudiendo determinar variables importantes en el diseño del ensayo clínico como son los tiempos de exposición a los fármacos candidatos, el mejor momento para la administración después del evento, las mejores concentraciones de los principios activos *in situ* y de esta manera ser más eficientes en la investigación de nuevos medicamentos y ofrecer más seguridad a los pacientes participantes del estudio.

9 Conclusiones

- El modelo de lesión por TCE y el cultivo organotípico de corteza cerebral de roedor, en conjunto constituyen una herramienta efectiva para la investigación y el desarrollo de nuevas terapias efectivas para la neuroprotección.
- El análisis de los datos obtenidos mediante la técnica de exclusión celular con azul de tripán, permite validar el cultivo celular organotípico, pues muestra que las células de la muestra se encuentran vivas en un 60% para el control y un 50% para las ratas que reciben el trauma, que además mantienen su citoarquitectura, conectividad y función para permitir las diferentes intervenciones farmacológicas requeridas durante la investigación.
- Mediante el análisis estadístico se confirmó la consistencia del modelo utilizado en esta investigación (modelo de TCE sumado a cultivo organotípico) y su superioridad frente otras técnicas de cultivo celular, pues tiene la capacidad de aislar múltiples variables distractoras de los efectos farmacológicos que se quieren observar.
- Se confirmó que el efecto protector descrito de la progesterona se conserva en el modelo de cultivo celular organotípico y esta molécula puede ser utilizada como un patrón de referencia y control para nuevas iniciativas de desarrollo de nuevas terapias, encontrando que el grupo que recibió el tratamiento con progesterona preserva mejor las características morfológicas típicas de las neuronas viables para ambas marcaciones.
- El modelo de cultivo celular organotípico, permitió además confirmar que el TCE es un fenómeno que no se comporta de manera homogénea en el cerebro y se constituye como una herramienta útil en el análisis de las diferentes respuestas de los tejidos a las lesiones.

10 Anexos

10.1 Protocolo de anestesia

Las ratas fueron anestesiadas mediante inhalación de Isoflurano al 4% en una cámara de anestesia, a 0,3 L/min O₂ y una presión positiva de 10 – 15 cm de H₂O durante un periodo de 5 – 7 minutos. (Figura 26) Posterior a esto, el animal fue retirado de la cámara de anestesia y con el suministro constante de Isoflurano a través de una máscara tubular en el hocico bajo respiración espontánea, se realizó la incisión en escalo a nivel de la línea media entre bregma y lambda, exponiendo el cráneo para la adhesión del disco metálico.

Posterior a la lesión experimental, los animales permanecieron en la caja de anestesia, con iguales condiciones iniciales pero con un suministro de Isoflurano al 2%, durante un periodo de 15 minutos aproximadamente. Durante los 5 minutos siguientes, y con administración de Isoflurano vía máscara, se suturó la incisión.

10.2 Protocolo de modelo de lesión

Posterior al periodo de anestesia, se practicó una incisión en la línea media del escalo seguido de una elevación periostal para exponer el área central de la bóveda craneal entre las suturas coronal y lambdoidea. En ésta área se fijó con adhesivo de cianoacrilato el disco metálico. Luego y de manera muy rápida, se retiró la máscara de gases y se colocó la rata boca abajo en la espuma de tal manera que el disco metálico quedara centrado con el borde inferior del tubo por el que se dejó caer la pesa y una vez impactado el disco metálico, se procedió a retirar rápida y cuidadosamente la rata para evitar un segundo golpe.

Este procedimiento de impacto con suspensión de anestesia no tuvo una duración mayor a 15 segundos. Subsecuente a esto, se trasladó la rata de nuevo a la cámara de anestesia para brindarle mantenimiento anestésico. Finalizado este periodo, se sacó la rata de la cámara de anestesia y, administrándole los gases vía máscara, le fue retirado el disco metálico y se suturó la incisión con 3-4 puntos separados de seda 3/000, después de lo cual se le trasladó a su jaula para permitirle la recuperación de la anestesia.

El periodo de recuperación duró en promedio 10 minutos, tiempo después del cual las ratas despertaron completamente. El tiempo total de monitoreo post-lesión fue de aproximadamente 40 minutos: 20 minutos en la etapa de mantenimiento anestésico, 10

minutos en el periodo de recuperación de la anestesia, y 10 minutos de valoración cualitativa motora una vez las ratas despertaron completamente.

Finalmente las ratas fueron trasladadas al Bioterio de la Universidad del Valle donde se mantuvieron por 48 y 72 horas hasta la extracción de los cerebros.

10.3 Protocolo de viabilidad celular

Transcurrido el tiempo de cultivo, y teniendo en cuenta la identificación de las muestras entre cultivado y no cultivado, se procedió a la disociación de las células cerebrales, cada bloque de tejido cerebral (aproximadamente 100 mg) se trasladó a una caja de Petri y cuidadosamente se extrajo la corteza cerebral del corte coronal del tejido mediante el uso de un escarpelo, luego se picó en trozos pequeños de menos de 1 mm de diámetro, con hojas de afeitar. Inmediatamente, las piezas de tejido se soplaron con cuidado dentro y fuera de una pipeta de 1 mL de 5 – 7 veces, con el fin de desprender las células del tejido, se incubó en 1 mL de Hank's Balanced Salt Solution 1X (GIBCO® HBSS) a pH 7,4 con tripsina al 0,025% (p/v) a 37°C durante 30 min. Al finalizar el tiempo de incubación, se adicionó 10 mL de HBSS para detener la reacción de la tripsina. Para el conteo, se tomaron 100 µl de la suspensión obtenida y se mezcló con 900 µl de Azul de Tripán al 0,4% en solución de NaCl al 0,85% (Lonza Biowhitaker), se mezcló bien y se incubó por 3 minutos (tiempos muy largos de exposición al colorante pueden hacer que las células vivas acaben por captar también éste).

Se adicionó al hematocitómetro, 10 µl de la solución celular con azul de tripan y se cubrió la muestra con un cubreobjetos. El recuento se realizó teniendo en cuenta las células que estaban en los recuadros divididos en 16 cuadrículas (A, B, C y D) del hematocitómetro y se tuvo en cuenta tanto las células blancas (vivas) como las azules (muertas); descartando aquellas que no estuviesen dentro de la cuadrícula de conteo. Todos los conteos para cada una de las muestras se realizaron por duplicado.

10.4 Protocolo de inmunohistoquímica

Los cortes se procesaron de manera seriada para Inmunohistoquímica en tejido flotante contra los anticuerpos descritos, usando la técnica de avidina/biotina anti-ratón y anti-conejo (Kit ABC Vectastain – Elite PK mouse y rabbit IgG, Vector Laboratories®) y revelado con diaminobencidina contrastado con níquel (Peroxidase Substrate Kit; DAB SK-4100), bajo condiciones estándar de laboratorio; el protocolo se describe a continuación: Los tejidos se lavaron 3 veces por 10 minutos cada vez en PBS 1X; luego se incubaron por 15 minutos a Temperatura ambiente en solución para bloqueo de peroxidasas endógenas (metanol al 30% y peróxido de hidrógeno al 0,3% en agua

destilada) seguido de 3 lavados por 5 minutos cada vez en PBS 1X. Por 40 minutos se incubaron a Temperatura ambiente en suero de bloqueo (con suero normal de caballo o de cabra) al 1.5% y Triton X-100 al 0,5% en PBS 1X. Posteriormente, las secciones se incubaron durante 18-24 horas con el anticuerpo primario en una solución de suero de bloqueo al 1,5% y tritón al 0,5% a 4 grados Celsius. Finalizado este paso se hicieron de 3 lavados por 5 minutos cada vez en PBS 1X. Los tejidos se expusieron por 40 minutos a incubación en Biotina y, posteriormente, lavados con PBS 1X 3 veces por cinco minutos cada uno, a lo cual siguió incubación en Avidina, también durante 40 minutos. Terminado este proceso, los tejidos se lavaron nuevamente con PBS 1X y se les adicionó una solución que contenía Diaminobencidina al 4%, peróxido de hidrógeno al 2% y níquel al 2% en PBS 1X durante diferentes tiempos de reacción según el anticuerpo primario utilizado. El tejido se lavó nuevamente con PBS 1X durante 3 veces para bloquear la reacción de la diaminobencidina y se montó en placas revestidas con gelatina. Las placas se dejaron secando hasta el día siguiente y los tejidos se cubrieron con un medio de montaje (Fisher Permount Mounting Media) y se pusieron laminillas.

11 Referencias

- ¹ Riascos DA, Pimienta HJ, Escobar MI, Buriticá E, Guzmán F, Palacios M. Organotypic human neuronal culture derived from traumatic brain injury. Colombia Médica 2008; 39(3 Supl 3): 29-37.
- ² World Health Organization. Innovative care for chronic conditions: Building blocks for action: WHO global report 2002. Geneva: WHO; 2002. WHO/MNC/CCH/02.01
- ³ Masei BE, DeWitt DS Traumatic brain injury: a disease process, not an event. J Neurotrauma, 2010; 27(8): 1529-40.
- ⁴ Englander J, Bushnik T, Duong TT, Cifu DX, Zafonte R, Wright J. Analyzing risk factors for late posttraumatic seizures: a prospective, multicenter investigation. Arch Phys Med Rehabil, 2003; 84(3): 365-73.
- ⁵ Angeleri F, Majkowski J, Cacchiò G, Sobieszek A, D'Acunto S, Gesuita R, et al. Posttraumatic epilepsy risk factors: one-year prospective study after head injury. Epilepsia. 1999; 40(9): 1222-30.
- ⁶ Jellinger KA, Paulus W, Wrocklage C, Litvan I. Traumatic brain injury as a risk factor for Alzheimer disease. Comparison of two retrospective autopsy cohorts with evaluation of ApoE genotype. BMC Neurol. 2001 Dec 18;1:3.
- ⁷ Bower JH, Maraganore DM, Peterson BJ, McDonnell SK, Ahlskog JE, Rocca WA. Head trauma preceding PD: a case-control study. Neurology. 2003; 60(10): 1610-5.
- ⁸ Horner MD, Ferguson PL, Selassie AW, Labbate LA, Kniele K, Corrigan JD. Patterns of alcohol use 1 year after traumatic brain injury: a population-based, epidemiological study. J Int Neuropsychol Soc. 2005; 11(3): 322-30.
- ⁹ Seel RT, Kreutzer JS, Rosenthal M, Hammond FM, Corrigan JD, Black K. Depression after traumatic brain injury: a National Institute on Disability and Rehabilitation Research Model Systems multicenter investigation. Arch Phys Med Rehabil. 2003 Feb;84(2):177-84.

-
- ¹⁰ Holsinger T, Steffens DC, Phillips C, Helms MJ, Havlik RJ, Breitner JC, et al., Head injury in early adulthood and the lifetime risk of depression. *Arch Gen Psychiatry*. 2002; 59(1): 17-22.
- ¹¹ Koponen S , Taiminen T, Kurki T, Portin R, Isoniemi H, Himanen L, et al., MRI findings and Axis I and II psychiatric disorders after traumatic brain injury: a 30-year retrospective follow-up study. *Psychiatry Res*. 2006; 146(3): 263-70
- ¹² Ach   K, Jarho L, Kyykk   T, Vesterinen E. Paranoid disorders following war brain damage. Preliminary report. *Psychopathology* 1991; 24(5): 309-15.
- ¹³ Teasdale TW, Engberg AW. Suicide after traumatic brain injury: a population study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2001; 71(4): 436-40.
- ¹⁴ Schneider HJ, Kreitschmann-Andermahr I, Ghigo E, Stalla GK, Agha A. Hypothalamopituitary dysfunction following traumatic brain injury and aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *JAMA* 2007; 298(12): 1429-38
- ¹⁵ Agha, A. and C.J. Thompson, Anterior pituitary dysfunction following traumatic brain injury (TBI). *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2006. 64(5): p. 481-8.
- ¹⁶ Foxx-Orenstein A, Kolakowsky-Hayner S, Marwitz JH, Cifu DX, Dunbar A, Englander J. Incidence, risk factors, and outcomes of fecal incontinence after acute brain injury: findings from the Traumatic Brain Injury Model Systems national database. *Arch Phys Med Rehabil*. 2003; 84(2): 231-7.
- ¹⁷ Harrison-Felix CL, Whiteneck GG, Jha A, DeVivo MJ, Hammond FM, Hart DM. Mortality over four decades after traumatic brain injury rehabilitation: a retrospective cohort study. *Arch Phys Med Rehabil*. 2009 Sep;90(9):1506-13.
- ¹⁸ Brown AW, Leibson CL, Malec JF, Perkins PK, Diehl NN, Larson DR. Long-term survival after traumatic brain injury: a population-based analysis. *NeuroRehabilitation*. 2004;19(1):37-43.
- ¹⁹ Pradilla A G, Vesga A BE, León-Sarmiento FE; GENECO. Estudio neuroepidemiol  gico nacional (EPINEURO) colombiano. *Rev Panam Salud Publica*. 2003; 14(2): 104-11.

-
- ²⁰ Thurman DJ, Alverson C, Dunn KA, Guerrero J, Snizek JE. Traumatic brain injury in the United States: A public health perspective. *J Head Trauma Rehabil.* 1999;14(6):602-15.
- ²¹ Langlois JA, Rutland-Brown W, Wald MM. The epidemiology and impact of traumatic brain injury: a brief overview. *J Head Trauma Rehabil.* 2006 Sep-Oct;21(5):375-8.
- ²² Maas AI, Roozenbeek B, Manley GT. Clinical trials in traumatic brain injury: past experience and current developments. *Neurotherapeutics.* 2010; 7(1): 115-26.
- ²³ Strasser U, Fischer G. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *J Neurosci Methods.* 1995 Apr;57(2):177-86.
- ²⁴ Walker MJ, Barrett T, Guppy LJ. Functional pharmacology: the drug discovery bottleneck? *Drug Discov Today Targets* 3: 208–215
- ²⁵ Sundstrom L, Morrison B 3rd, Bradley M, Pringle A. Organotypic cultures as tools for functional screening in the CNS. *Drug Discov Today.* 2005; 10(14): 993-1000.
- ²⁶ Escobar M, Guzman F, Buriticá E, Riascos D, Villamil L, Pimienta HJ. Changes in laminar and dendritic organization of the cerebral cortex after traumatic brain injury. *Colomb. Med.* 2008; 393: 51-59.
- ²⁷ Buritica, E., et al., Response of GABAergic interneurons to human traumatic brain injury. *Epilepsy Behav.* 2009. 14(1): 1.
- ²⁸ Buriticá E, Villamil L, Guzmán F, Escobar MI, García-Cairasco N, Pimienta HJ. Changes in calcium-binding protein expression in human cortical contusion tissue. *J Neurotrauma.* 2009; 26(12): 2145-55.
- ²⁹ Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I : Pathophysiology and biomechanics. *J. Neurosurg.* 1994; 80: 291-300.
- ³⁰ Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol.* 2008; 7(8): 728-41.

-
- ³¹ Thompson HJ, Lifshitz J, Marklund N, Grady MS, Graham DI, Hovda DA. Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. *J Neurotrauma*. 2005 Jan;22(1):42-75.
- ³² Finnie, J. Blumbergs P. Traumatic brain injury. *Vet Pathol* 2002 39: 679-89
- ³³ Graham DI, Adams JH, Murray LS, Jennett B. Neuropathology of the vegetative state after head injury. *Neuropsychol Rehabil*. 2005; 15(3-4): 198-213.
- ³⁴ Veenith T, Goon SSh, Burnstein RM. Molecular mechanisms of traumatic brain injury: the missing link in management. *World J Emerg Surg*. 2009 Feb 2;4:7
- ³⁵ Royo NC, Schouten JW, Fulp CT, Shimizu S, Marklund N, Graham DI, et al. From cell death to neuronal regeneration: building a new brain after traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003 Aug;62(8):801-11..
- ³⁶ Margulies S, Hicks R; Combination Therapies for Traumatic Brain Injury Workshop Leaders. Combination therapies for traumatic brain injury: prospective considerations. *J Neurotrauma*. 2009 Jun;26(6):925-39.
- ³⁷ Povlishock JT, Katz DI. Update of neuropathology and neurological recovery after traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil*. 2005 Jan-Feb;20(1):76-94.
- ³⁸ Saatman KE, Zhang C, Bartus RT, McIntosh TK. Behavioral efficacy of posttraumatic calpain inhibition is not accompanied by reduced spectrin proteolysis, cortical lesion, or apoptosis. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000. 20(1): 66-73.
- ³⁹ Kirkland RA, Franklin JL. Bax, reactive oxygen, and cytochrome c release in neuronal apoptosis. *ntioxid Redox Signal*. 2003 Oct;5(5):589-96.
- ⁴⁰ Cheng G, Kong RH, Zhang LM, Zhang JN. Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. *Br J Pharmacol*. 2012 Oct;167(4):699-719.
- ⁴¹ Du L1, Zhang X, Han YY, Burke NA, Kochanek PM, Watkins SC, et al. Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosylation) contributes to NAD⁺ depletion and cell death induced by oxidative stress. *J Biol Chem*. 2003 May 16;278(20):18426-33.

-
- ⁴² Yang QH, Church-Hajduk R, Ren J, Newton ML, Du C. Omi/HtrA2 catalytic cleavage of inhibitor of apoptosis (IAP) irreversibly inactivates IAPs and facilitates caspase activity in apoptosis. *Genes Dev.* 2003 Jun 15;17(12):1487-96.
- ⁴³ McManus MJ, Murphy MP, Franklin JL. Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate caspase-dependent and -independent neuronal deaths. *Mol Cell Neurosci.* 2014 Nov;63:13-23.
- ⁴⁴ Zuo H, Lin T, Wang D, Peng R, Wang S, Gao Y, Xu X, et al. Neural cell apoptosis induced by microwave exposure through mitochondria-dependent caspase-3 pathway. *Int J Med Sci.* 2014 Mar 9;11(5):426-35.
- ⁴⁵ [Franklin JL](#). Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Apr 15;14(8):1437-48.
- ⁴⁶ Raghupathi, R., Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathol.* 2004. 14(2): p. 215-22.
- ⁴⁷ Traumatic brain injury: time to end the silence. *Lancet Neurol.* 2010; 9(4): 331.
- ⁴⁸ Maas AI, Steyerberg EW, Marmarou A, McHugh GS, Lingsma HF, Butcher I. IMPACT recommendations for improving the design and analysis of clinical trials in moderate to severe traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 2010; 7(1): 127-34.
- ⁴⁹ U.S. National Institutes of Health. Craniocerebral Trauma. *ClinicalTrials.gov* [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 [Acceso 22 de Junio, 2015]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=%22Craniocerebral+Trauma%22>
- ⁵⁰ Albert-Weissenberger C, Sirén AL. Experimental traumatic brain injury. *Exp Transl Stroke Med.* 2010 Aug 13;2(1):16.
- ⁵¹ Morales DM, Marklund N, Lebold D, Thompson HJ, Pitkanen A, Maxwell WL, et al. Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? *Neuroscience* 2005; 136(4): 971-89.

-
- ⁵² Kumaria A, Tolias CM. In vitro models of neurotrauma. *Br J Neurosurg.* 2008 A; 22(2): 200-6.
- ⁵³ Elkin BS, Morrison B 3rd. Region-specific tolerance criteria for the living brain. *Stapp Car Crash J.* 2007 Oct;51:127-38.
- ⁵⁴ Cloots RJ, Gervaise HM, van Dommelen JA, Geers MG. Biomechanics of traumatic brain injury: influences of the morphologic heterogeneities of the cerebral cortex. *Ann Biomed Eng* 2008; 36(7): 1203-15.
- ⁵⁵ El Sayed, T, Mota, A, Fraternali, F, Ortiz, M. Biomechanics of Traumatic Brain Injury. *Comput Methods Appl Mech Eng.* 2008; 197 (51–52), 4692–701.
- ⁵⁶ Saatman KE, Duhaime AC, Bullock R, Maas AI, Valadka A, Manley GT; Workshop Scientific Team and Advisory Panel Members. Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *J Neurotrauma.* 2008 Jul;25(7):719-38.
- ⁵⁷ Leker RR, Shohami E, Constantini S. Experimental models of head trauma. *Acta Neurochir Suppl.* 2002; 83: 49-54.
- ⁵⁸ Denny-Brown D, Adams RD, et al. The pathology of injury to nerve induced by cold. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1945;4:305-23
- ⁵⁹ Dixon CE, Lighthall JW, Anderson TE. Physiologic, histopathologic, and cineradiographic characterization of a new fluid-percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurotrauma.* 1988; 5(2): 91-104.
- ⁶⁰ McIntosh TK, Vink R, Noble L, Yamakami I, Fernyak S, Soares H, et al. Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience.* 1989; 28(1): 233-44.
- ⁶¹ Cernak I, Vink R, Zapple DN, Cruz MI, Ahmed F, Chang T, et al. The pathobiology of moderate diffuse traumatic brain injury as identified using a new experimental model of injury in rats. *Neurobiol Dis.* 2004;17(1): 29-43.
- ⁶² Marmarou A, Hochwald G, Nakamura T, Tanaka K, Weaver J, Dunbar J. Brain edema resolution by CSF pathways and brain vasculature in cats. *Am J Physiol.* 1994 Aug; 267(2 Pt 2): H514-20.

⁶³ Buffo A, Rolando C, Ceruti S. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol.* 2010; 79(2): 77-89.

⁶⁴ Clements JM, Cossins JA, Wells GM, Corkill DJ, Helfrich K, Wood LM, et al. Matrix metalloproteinase expression during experimental autoimmune encephalomyelitis and effects of a combined matrix metalloproteinase and tumour necrosis factor-alpha inhibitor. *J Neuroimmunol.* 1997; 74(1-2): 85-94.

⁶⁵ Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci.* 2005; 6(12): 931-44.

⁶⁶ Cloots RJ, van Dommelen JA, Kleiven S, Geers MG. Multi-scale mechanics of traumatic brain injury: predicting axonal strains from head loads. *Biomech Model Mechanobiol.* 2013; 12(1): 137-50.

⁶⁷ Giordano C, Cloots RJ, van Dommelen JA, Kleiven S. The influence of anisotropy on brain injury prediction. *J Biomech.* 2014; 47(5): 1052-9.

⁶⁸ Cloots RJ, van Dommelen JA, Nyberg T. Micromechanics of diffuse axonal injury: influence of axonal orientation and anisotropy. *Biomech Model Mechanobiol.* 2011; 10(3): 413-22.

⁶⁹ Irimia A, Chambers MC, Alger JR, et al. Comparison of acute and chronic traumatic brain injury using semi-automatic multimodal segmentation of MR volumes. *J Neurotrauma.* 2011; 28(11): 2287-306.

⁷⁰ Morrison B, Saatman KE, Meaney DF, McIntosh TK. In vitro central nervous system models of mechanically induced trauma: a review. *J Neurotrauma.* 1998; 15(11): 911-28.

⁷¹ Ilenz D, Kitai ST. Organotypic cortex-striatum-mesencephalon cultures: the nigrostriatal pathway. *Neurosci Lett.* 1996; 209(3): 177-80.

⁷² Gähwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM. Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci.* 1997; 20(10): 471-7.

-
- ⁷³ Noraberg J, Kristensen BW, Zimmer J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. *Brain Res Brain Res Protoc*. 1999; 3(3): 278-90.
- ⁷⁴ Noraberg J, Poulsen FR, Blaabjerg M, Kristensen BW, Bonde C, Montero M, et al. Organotypic hippocampal slice cultures for studies of brain damage, neuroprotection and neurorepair. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2005; 4(4): 435-52.
- ⁷⁵ Lossi L, Alasia S, Salio C, Merighi A. Cell death and proliferation in acute slices and organotypic cultures of mammalian CNS. *Prog Neurobiol*. 2009; 88(4): 221-45.
- ⁷⁶ Strasser U, Fischer G. Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *J Neurosci Methods*. 1995; 57(2): 177-86.
- ⁷⁷ Tennant JR. Evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. *Transplantation* 1964; 2: 685-694,
- ⁷⁸ Avelar-Freitas BA, Almeida VG, Pinto MC, Mourão FA, Massensini AR, Martins-Filho OA, et al. Trypan blue exclusion assay by flow cytometry. *Braz J Med Biol Res*. 2014; 47(4): 307-15.
- ⁷⁹ Gusel'nikova VV, Korzhevskiy DE. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*. 2015; 7(2): 42-7.
- ⁸⁰ Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 1992; 116(1): 201-11.
- ⁸¹ Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, et al., NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *J Histochem Cytochem*. 1996; 44(10): 1167-71.
- ⁸² Sugawara T, Lewén A, Noshita N, Gasche Y, Chan PH. Effects of global ischemia duration on neuronal, astroglial, oligodendroglial, and microglial reactions in the vulnerable hippocampal CA1 subregion in rats. *J Neurotrauma* 2002; 19(1): 85-98.
- ⁸³ Lyck L, Dalmau I, Chemnitz J, Finsen B, Schrøder HD. Immunohistochemical markers for quantitative studies of neurons and glia in human neocortex. *J Histochem Cytochem* 2008; 56(3): 201-21.

-
- ⁸⁴ Immunohistochemical studies with antibodies to neurofilament proteins on axonal damage in experimental focal lesions in rat. *J Neurol Sci.* 1993 Jul;117(1-2):164-74.
- ⁸⁵ Gittins R, Harrison PJ. Neuronal density, size and shape in the human anterior cingulate cortex: a comparison of Nissl and NeuN staining. *Brain Res Bull* 2004; 63(2): 155-60.
- ⁸⁶ Baumkötter F, Wagner K, Eggert S, Wild K, Kins S. Structural aspects and physiological consequences of APP/APLP trans-dimerization. *Experimental Brain Research Experimentelle Hirnforschung Experimentation Cerebrale.* 2012; 217(3-4): 389-395.
- ⁸⁷ Selkoe DJ. The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron.* 1991; 6(4): 487-98.
- ⁸⁸ Mas-Oliva J, Arnold KS, Wagner WD, Phillips DR, Pitas RE, Innerarity TL. Isolation and characterization of a platelet-derived macrophage-binding proteoglycan. *J Biol Chem.* 1994; 269(13): 10177-83.
- ⁸⁹ Zhang YW, Thompson R, Zhang H, Xu H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol Brain.* 2011; 4: 3.
- ⁹⁰ Mortimer JA, van Duijn CM, Chandra V, Fratiglioni L, Graves AB, Heyman A, et al. Head trauma as a risk factor for Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *Int J Epidemiol.* 1991; 20 Suppl 2: S28-35..
- ⁹¹ Magnoni S, Brody DL. New perspectives on amyloid-beta dynamics after acute brain injury: moving between experimental approaches and studies in the human brain. *Arch Neurol.* 2010 Sep;67(9):1068-73.
- ⁹² Nicoll JA, Roberts GW, Graham DI. Apolipoprotein E epsilon 4 allele is associated with deposition of amyloid beta-protein following head injury. *Nat Med.* 1995. 1(2): 135-7.
- ⁹³ Roberts GW, Gentleman SM, Lynch A, Murray L, Landon M, Graham DI. Beta amyloid protein deposition in the brain after severe head injury: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1994; 57(4): 419-25.

-
- ⁹⁴ Hortobágyi T, Wise S, Hunt N, Cary N, Djurovic V, Fegan-Earl A, et al. Traumatic axonal damage in the brain can be detected using beta-APP immunohistochemistry within 35 min after head injury to human adults. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007 Apr;33(2):226-37.
- ⁹⁵ Blasko I, Beer R, Bigl M, Apelt J, Franz G, Rudzki D, et al. Experimental traumatic brain injury in rats stimulates the expression, production and activity of Alzheimer's disease beta-secretase (BACE-1). *J Neural Transm*, 2004. 111(4): p. 523-36.
- ⁹⁶ Van Den Heuvel C, Donkin JJ, Finnie JW, Blumbergs PC, Kuchel T, Koszyca B, et al. Downregulation of amyloid precursor protein (APP) expression following post-traumatic cyclosporin-A administration. *J Neurotrauma*. 2004 Nov;21(11):1562-72.
- ⁹⁷ Suh YH¹, Checler F. Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev* 2002; 54(3): 469-525.
- ⁹⁸ Herson PS, Koerner IP, Hurn PD. Sex, sex steroids, and brain injury. *Semin Reprod Med*, 2009; 27(3): 229-39.
- ⁹⁹ Brinton RD¹, Thompson RF, Foy MR, Baudry M, Wang J, Finch CE, et al. Progesterone receptors: form and function in brain. *Front Neuroendocrinol* 2008; 29(2): 313-39.
- ¹⁰⁰ Guennoun R, Meffre D, Labombarda F, Gonzalez SL, Gonzalez Deniselle MC, Stein DG, et al. The membrane-associated progesterone-binding protein 25-Dx: expression, cellular localization and up-regulation after brain and spinal cord injuries. *Brain research reviews*, 2008; 57(2): 493-505.
- ¹⁰¹ Wright DW, Bauer ME, Hoffman SW, Stein DG. Serum progesterone levels correlate with decreased cerebral edema after traumatic brain injury in male rats. *J Neurotrauma*, 2001. 18(9): 901-9.
- ¹⁰² Stein, D.G. Progesterone exerts neuroprotective effects after brain injury. *Brain Res Rev*. 2008; 57(2): 386-97.
- ¹⁰³ Liu M, Kelley MH, Herson PS, Hurn PD. Neuroprotection of sex steroids. *Minerva Endocrinol* 2010; 35(2): 127-43.

-
- ¹⁰⁴ Gibson CL, Gray LJ, Bath PM, Murphy SP. Progesterone for the treatment of experimental brain injury; a systematic review. *Brain* 2008; 131(Pt 2): 318-28.
- ¹⁰⁵ Xiao G, Wei J, Yan W, Wang W, Lu Z. Improved outcomes from the administration of progesterone for patients with acute severe traumatic brain injury: a randomized controlled trial. *Crit Care*. 2008; 12(2): R61.
- ¹⁰⁶ U.S. National Institutes of Health. Progesterone | "Trauma, Nervous System" ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 2000 [Acceso 29 de Enero, 2016]. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=Progesterone&cond=%22Trauma%2C+Nervous+System%22>
- ¹⁰⁷ Wright DW, Kellermann AL, Hertzberg VS, Clark PL, Frankel M, Goldstein FC, et al., ProTECT: a randomized clinical trial of progesterone for acute traumatic brain injury. *Ann Emerg Med*. 2007; 49(4): 391-402
- ¹⁰⁸ Xiao GM, Wei J, Wu ZH, Wang WM, Jiang QZ, Cheng J, et al., [Clinical study on the therapeutic effects and mechanism of progesterone in the treatment for acute severe head injury]. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2007; 45(2): 106-8.
- ¹⁰⁹ Skolnick BE, Maas AI, Narayan RK, van der Hoop RG, MacAllister T, Ward JD et al. A clinical trial of progesterone for severe traumatic brain injury. *N Engl J Med*. 2014 Dec 25;371(26):2467-76.
- ¹¹⁰ Wright DW, Yeatts SD, Silbergleit R, Palesch YY, Hertzberg VS, Frankel M, et al. Very early administration of progesterone for acute traumatic brain injury. *N Engl J Med*. 2014 Dec 25;371(26): 2457-66.
- ¹¹¹ Howard RB, Sayeed I, Stein D. Suboptimal dosing parameters as possible factors in the negative Phase III clinical trials of progesterone in TBI. *J Neurotrauma*. 2015 Sep 15. [Epub ahead of print]
- ¹¹² Stein DG. Embracing failure: What the Phase III progesterone studies can teach about TBI clinical trials. *Brain Inj*. 2015;29(11):1259-72.
- ¹¹³ Junpeng M, Huang S, Qin S. Progesterone for acute traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011; (1): CD008409.

-
- ¹¹⁴ Webster KM, Wright DK, Sun M, Semple BD, Ozturk E, Stein DG, et al. Progesterone treatment reduces neuroinflammation, oxidative stress and brain damage and improves long-term outcomes in a rat model of repeated mild traumatic brain injury. *J Neuroinflammation*. 2015; 12: 238.
- ¹¹⁵ Si D, Li J, Liu J, Wang X, Wei Z, Tian Q, et al. Progesterone protects blood-brain barrier function and improves neurological outcome following traumatic brain injury in rats. *Exp Ther Med*. 2014; 8(3): 1010-1014.
- ¹¹⁶ Kilkenney C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother*. 2010 Jul;1(2):94-9.
- ¹¹⁷ Krimer LS, Goldman-Rakic PS. An interface holding chamber for anatomical and physiological studies of living brain slices. *J Neurosci Methods*. 1997; 75(1): 55-8.
- ¹¹⁸ Köhling R, Schmidinger A, Hülsmann S, Vanhatalo S, Lücke A, Straub H, et al. Anoxic terminal negative DC-shift in human neocortical slices in vitro. *Neuroscience*. 1996; 75(4): 999-1002.
- ¹¹⁹ Uruno K, O'Connor MJ, Masukawa LM. Effects of bicuculline and baclofen on paired-pulse depression in the dentate gyrus of epileptic patients. *Brain Res*. 1995; 695(2): 163-72.
- ¹²⁰ Masukawa LM, Wang H, O'Connor MJ, Uruno K. Prolonged field potentials evoked by 1 Hz stimulation in the dentate gyrus of temporal lobe epileptic human brain slices. *Brain Res*. 1996; 721(1-2): 132-9.
- ¹²¹ Tukey JW. Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics*. 1949; 5(2): 99-114.
- ¹²² Mathias JL, Wheaton P. Contribution of brain or biological reserve and cognitive or neural reserve to outcome after TBI: A meta-analysis (prior to 2015). *Neurosci Biobehav Rev*. 2015; pii: S0149-7634(15)00155-4
- ¹²³ Di Battista AP, Buonora JE, Rhind SG, Hutchison MG, Baker AJ, Rizoli SB, et al. Blood Biomarkers in Moderate-To-Severe Traumatic Brain Injury: Potential Utility of a Multi-Marker Approach in Characterizing Outcome. *Front Neurol*. 2015 May 26; 6: 110.

-
- ¹²⁴ Reis C, Wang Y, Akyol O, Ho WM, Li RA, Stier G. What's New in Traumatic Brain Injury: Update on Tracking, Monitoring and Treatment. *Int J Mol Sci.* 2015 May 26; 16(6): 11903-65.
- ¹²⁵ González DM. Evaluación de las alteraciones generadas en el tejido nervioso posterior a un trauma craneoencefálico difuso de severidad moderada moderado [tesis de Maestría]. Cali: Centro de Estudios Cerebrales, Postgrado de Ciencias Biomédicas Universidad del Valle; 2014.
- ¹²⁶ Muñoz E. Evaluación de los niveles de caspasa 3 activa en cultivo organotípico agudo de tajadas cerebrales de rata derivadas de un modelo de trauma craneoencefálico difuso moderado [tesis de Maestría]. Cali: Centro de Estudios Cerebrales, Postgrado de Ciencias Biomédicas Universidad del Valle; 2014.
- ¹²⁷ Aldana GE. Cultivo organotípico agudo de cerebro de rata para la evaluación temporal y cuantitativa de la proteína precursora amiloide en trauma craneoencefálico. [tesis de Maestría]. Cali: Centro de Estudios Cerebrales, Postgrado de Ciencias Biomédicas Universidad del Valle; 2015.
- ¹²⁸ Pabón MM, Acosta S, Guedes VA, Tajiri N, Kaneko Y, Borlongan CV. Brain Region-Specific Histopathological Effects of Varying Trajectories of Controlled Cortical Impact Injury Model of Traumatic Brain Injury. *CNS Neurosci Ther.* 2016 Jan 18. doi: 10.1111/cns.12485. [Epub ahead of print]
- ¹²⁹ Hernandez A, Donovan V, Grinberg YY, Obenaus A, Carson MJ. Differential detection of impact site versus rotational site injury by magnetic resonance imaging and microglial morphology in an unrestrained mild closed head injury model. *J Neurochem.* 2016 Jan;136 Suppl 1:18-28.
- ¹³⁰ Roof RL, Duvdevani R, Heyburn JW, Stein DG. Progesterone rapidly decreases brain edema: treatment delayed up to 24 hours is still effective. *Exp Neurol.* 1996 Apr;138(2):246-51.
- ¹³¹ Guo Q, Sayeed I, Baronne LM, Hoffman SW, Guennoun R, Stein DG. Progesterone administration modulates AQP4 expression and edema after traumatic brain injury in male rats. *Exp Neurol.* 2006 Apr;198(2):469-78.

-
- ¹³² Yao XL, Liu J, Lee E, Ling GS, McCabe JT. Progesterone differentially regulates pro- and anti-apoptotic gene expression in cerebral cortex following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*. 2005; 22(6): 656-68.
- ¹³³ Djebaili M, Guo Q, Pettus EH, Hoffman SW, Stein DG. The neurosteroids progesterone and allopregnanolone reduce cell death, gliosis, and functional deficits after traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma*. 2005; 22(1): 106-18.
- ¹³⁴ Cai W, Zhu Y, Furuya K, Li Z, Sokabe M, Chen L. Two different molecular mechanisms underlying progesterone neuroprotection against ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. 2008; 55(2): 127-38.
- ¹³⁵ Roof RL, Hoffman SW, Stein DG. Progesterone protects against lipid peroxidation following traumatic brain injury in rats. *Mol Chem Neuropathol*. 1997; 31(1): 1-11.
- ¹³⁶ Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretzschmar HA, Herms J. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci*. 2006 Jul 5;26(27):7212-21.
- ¹³⁷ Xu DE, Zhang WM, Yang ZZ, Zhu HM, Yan K, Li S, et al. Amyloid precursor protein at node of Ranvier modulates nodal formation. *Cell Adh Migr*. 2014;8(4):396-403.
- ¹³⁸ Davceva N, Basheska N, Balazic J. Diffuse Axonal Injury-A Distinct Clinicopathological Entity in Closed Head Injuries. *Am J Forensic Med Pathol*. 2015; 36(3): 127-33.
- ¹³⁹ Hayashi T, Ago K, Nakamae T, Higo E, Ogata M. Two different immunostaining patterns of beta-amyloid precursor protein (APP) may distinguish traumatic from nontraumatic axonal injury. *Int J Legal Med*. 2015; 129(5): 1085-90.