



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Efectos neuroprotectores del resveratrol en trauma craneoencefálico inducido por el modelo de impacto aceleración por caída libre de peso

Johanna Andrea Folleco E.

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Bogotá, Colombia

2015

Efectos neuroprotectores del resveratrol en trauma craneoencefálico inducido por el modelo de impacto aceleración por caída libre de peso

Johanna Andrea Folleco E.

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Neurociencias

Director:

MD. Msc. Ph.D. Alejandro Múnera G.

Línea de Investigación:

Fisiología del control motor facial

Grupo de Investigación:

Neurofisiología comportamental

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina

Bogotá, Colombia

2015

A mi familia, a mis amigos y a mis maestros

Agradecimientos

Mis agradecimientos, admiración, cariño y respeto al profesor Alejandro Múnera por su asesoría y paciencia.

A los profesores Manuel Rojas, Marisol Lamprea, Julieta Troncoso y Lucía Botero por su disposición y guía en los distintos momentos en que hicieron parte del desarrollo de este proyecto.

Al Centro de Estudios Cerebrales de la Universidad del Valle, en especial a la Dra. Martha Escobar por acogerme y permitirme aprender de su trabajo.

A la (e)PhD Viviana Vargas por compartir su tiempo, sus conocimientos y su experiencia. Por sus buenos y acertados consejos.

A Jeimmy Cerón, Duvan González, Melissa Cárdenas, Irene Riveros, Diana Cárdenas y a mis compañeros de maestría por facilitar con sus conocimientos y apoyo constante este proceso de aprendizaje.

A la Facultad de Psicología de la Fundación Universitaria Los Libertadores por la financiación.

A todos los profesores que durante mi proceso de formación tuve la oportunidad de conocer y de aprender.

A Magda y a Rodrigo Martínez por todo su apoyo y colaboración.

A la Universidad Nacional de Colombia, mi espacio preferido de aprendizaje.

Resumen

El traumatismo craneoencefálico (TCE) es el problema de salud pública con mayor índice de morbimortalidad en el mundo que afecta principalmente a personas jóvenes (1). El resveratrol es un polifenol presente en las uvas, asociado con el incremento de la tasa de supervivencia en condición de daño cerebral. En este proyecto se examinó el efecto de la administración aguda y en baja dosis del resveratrol sobre la expresión de la proteína MAP2 y la activación de la microglía en las cortezas motora primaria y de las vibrisas (vM1), y en las regiones hipocámpicas CA1 y CA3, ocho horas después de inducida la lesión traumática mediante el modelo aceleración por caída libre de peso de Marmarou. Se trabajó con 15 ratas Wistar divididas en tres grupos: control, vehículo y experimental. Se concluyó que la dosis de 20mg/kg de resveratrol atenúa de forma significativa el descenso en la inmunoreactividad de MAP2 en CA3 y vM1, y la activación de la microglía en CA3 y, principalmente en la corteza motora de las vibrisas.

Palabras clave: TCE, Resveratrol, Neuroprotección

Abstract

Traumatic brain injury (TBI) is the public health problem of world order with the highest rate of mortality in the world that predominantly affects young adults (1). This project examined the effect of acute and in low doses trauma after administration of resveratrol (RSV), polyphenol present in grapes, associated with the increase in the rate of neuronal survival in brain damage condition. The Marmarou model acceleration free fall weight were used. Were used 15 Wistar rats randomly divided into three groups: control vehicle and experimental experimental. The immunoreactive MAP2 and microglia activation eight hours post injury were tested in the CA1 and CA3 hippocampus and motor cortex: primary and the vibrissae. It is concluded that RSV dose tested (20mg/kg) administered acutely attenuates the response activation of microglia in motor cortex and the hippocampal CA3. The RSV attenuates decrease the MAP2 in CA3 and cortex motors the vibrissae.

Keywords: Resveratrol, TCE, Neuroprotection

Contenido

	Pág.
Resumen.....	VI
Lista de figuras	X
Lista de tablas	XII
Lista de abreviaturas	XIII
Introducción	1
1 Aspectos fisiopatológicos de los TCE	3
1.1 Estrés oxidativo	5
1.2 Excitotoxicidad	6
1.3 Respuesta inflamatoria.....	6
2 Modelos experimentales para estudiar la fisiopatología del TCE	11
2.1 Modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	11
2.1.1 Modelo de percusión lateral por fluido -PLF-.....	13
2.1.2 Modelo de impacto cortical controlado -ICC-	13
2.1.3 Modelo de impacto aceleración por caída libre de peso.....	14
3 Neuroprotección	17
3.1 Neuroprotección mediada por fármacos	19
3.1.1 Acción neuroprotectora del resveratrol	22
4 Objetivos	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos específicos.....	27
5 Metodología.....	28
5.1 Diseño experimental.....	28
5.1.1 Animales de experimentación	28
5.2 Procedimiento para inducir la lesión traumática.....	29
5.3 Procedimiento para la fijación y extracción del tejido cerebral	32
5.4 Procedimiento para la obtención de muestras de tejido.....	32
5.5 Protocolo de Inmunohistoquímica	34
5.6 Análisis estadístico	36
6 Resultados	37
6.1 Inmunorreactividad de la proteína MAP2 en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo	38

6.2	Cambios morfológicos en las neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3 tras la lesión y el efecto de la administración del fármaco.	41
6.3	Inmunorreactividad de la proteína MAP2 en las áreas M1 y vM1 del córtex frontal 44	
6.4	Cambios morfológicos en las neuronas piramidales de las regiones M1 y vM1 tras la lesión y el efecto de la administración del fármaco.	47
6.5	Densidad y morfología de las células de microglía de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo.....	50
6.5.1	Densidad de células de microglía en las regiones CA1 y CA3, cambios pos-lesión y efecto del fármaco.....	50
6.5.2	Longitud de los procesos de la microglía en las áreas CA1 y CA3, cambios pos-lesión y efecto del fármaco.....	53
6.6	Densidad y morfología de las células de microglía de las áreas M1 y vM1 del córtex frontal.....	56
6.6.1	Densidad de células de microglía en las regiones M1 y vM1, cambios pos-lesión y efecto del fármaco.....	56
6.6.2	Longitud de los procesos de la microglía en las áreas M1 y vM1, cambios pos-lesión y efecto del fármaco.....	59
7	Discusión.....	63
7.1	Resumen de los resultados.....	63
7.2	Alteraciones en la morfología dendrítica tras el TCE. Contraste con reportes previos.....	64
7.3	Características de la activación de las células de microglía en TCE.....	65
7.4	Medidas de neuroprotección y daño secundario en TCE.....	67
7.5	Mecanismos de acción del RSV.....	68
7.6	Implicaciones de los resultados.....	70
7.7	Perspectivas.....	71
7.7.1	Uso de isoflurano.....	71
7.7.2	El impacto de la craneotomía en el proceso de daño neuronal.....	72
7.7.3	Perspectivas en el desarrollo de medidas de neuroprotección.....	72
8	Conclusiones.....	74
A.	Anexo: Acta de aprobación por parte del Comité de Ética.....	75
9	Referencias.....	77

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Daño primario y daño secundario. Secuencia temporal de las respuestas.....	4
Figura 1-2: Mecanismos fisiopatológicos de la muerte celular acontecida tras el TCE.....	8
Figura 2-2: Modelos experimentales para el estudio de los TCE.....	12
Figura 2-3: Ilustración de los elementos componentes del modelo de Marmarou.	14
Figura 3-4: Algunas plantas que contienen resveratrol. Imagen tomada de Aggarwal, et al (2014).....	23
Figura 5-5: Esquema detallado de la posición del animal en el modelo de lesión aceleración caída libre de peso.....	30
Figura 5-6: Corte coronal empleado como guía para la obtención de muestras de tejido del lóbulo frontal.....	33
Figura 5-7: Corte sagital empleado como guía para obtener las muestras de hipocampo.	33
Figura 6-8: Inmunorreactividad de MAP2 en la región CA1.....	38
Figura 6-9: Cambios en la inmunorreactividad de MAP2 en la región CA3.	40
Figura 6-10: Morfología de las células piramidales de la región CA1, los cambios inducidos por la lesión y el efecto del fármaco.	41
Figura 6-11: Morfología de las células piramidales de la región CA3, los cambios inducidos por la lesión y el efecto del fármaco.	42
Figura 6-12: Inmunorreactividad de la proteína MAP2 en M1.....	44
Figura 6-13: Inmunorreactividad de la proteína MAP2 en vM1.....	45
Figura 6-14: Morfología de las células piramidales del córtex M1, los cambios inducidos por la lesión y el efecto del fármaco.	47
Figura 6-15: Morfología de las células piramidales del córtex vM1, los cambios inducidos por la lesión y el efecto del fármaco.	48
Figura 6-16: Densidad de las células microgliales en los campos CA1.....	51
Figura 6-17: Densidad de las células microgliales en los campos CA3.....	52
Figura 6-18: Longitud de los procesos y diámetro del soma de las células microgliales de la región CA1.....	53
Figura 6-19: Longitud de los procesos y diámetro del soma de las células microgliales de la región CA3.....	54
Figura 6-20: Densidad de las células microgliales en el área M1.....	56
Figura 6-21: Densidad de las células microgliales en el área vM1.....	58

Figura 6-22: Longitud de los procesos y diámetro del soma de las células microgliales en el área M1	59
Figura 6-23: Longitud de los procesos y diámetro del soma de las células microgliales en el área vM1	60

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Características patológicas de los TCE en humanos y la capacidad de réplica de los modelos de lesión.....	15
Tabla 2. Técnicas y terapias comúnmente empleadas en los últimos 4 años.....	18
Tabla 3. Relación de agentes farmacológicos, moléculas implicadas en la acción metabólica y los efectos neurológicos reportados.	20
Tabla 4 Respuestas implicadas en la acción neuroprotectora del RSV	24
Tabla 5. Pesos y dosis administradas	31

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>ATP</i>	Adenosín trifosfato
Ca^{2+}	Ion de Calcio
<i>CLP</i>	Caída libre de peso de Marmarou
<i>DAB</i>	Diaminobencidina
<i>DAD</i>	Daño axonal difuso
<i>EF</i>	Experimental fármaco
<i>ERK</i>	Cinasa reguladora de la señal extracelular
<i>ERO</i>	Especies reactivas de oxígeno
<i>EV</i>	Experimental vehículo
<i>GAD</i>	Glutamato descarboxilasa
<i>IBA-1</i>	Molécula adaptadora de union a calcio
<i>ICC</i>	Impacto cortical controlado
<i>IL-1α</i>	Interleucina 1alfa
<i>IL-1β</i>	Interleucina 1 beta
<i>IL-6</i>	Interleucina 6
<i>IL-8</i>	Interleucina 8
<i>PLF</i>	Percusión lateral por fluido
<i>M1</i>	Área motora primaria
<i>MAP2</i>	Proteína asociada a mmicrotúbulos
<i>MAPK</i>	Vía de las proteínas quinasas activadoras de quinasas
<i>MDA</i>	Malondialdehído
<i>NeuN</i>	Proteína específica para la marcación de núcleos neuronales
<i>NMDA</i>	N-metil-D-aspartato
<i>NO</i>	Óxido nítrico
<i>ODC</i>	Ornitina descarboxilasa
<i>PBS</i>	Buffer fosfato salino
<i>PFA</i>	Paraformaldehído
<i>RSV</i>	Resveratrol
<i>SIRT</i>	Sirtuína
<i>SNC</i>	Sistema Nervioso Central
<i>SONn</i>	Sintasa del óxido nítrico neuronal
<i>TBI</i>	Traumatic Injury Brain
<i>TCE</i>	Trauma craneoencefálico
<i>TNFα</i>	Factor de necrosis tumoral alfa
<i>vM1</i>	Área motora de las vibrisas
<i>β APP</i>	Proteína β amiloide

Efectos neuroprotectores del resveratrol en trauma craneoencefálico inducido
por el modelo de impacto aceleración por caída libre de peso

CSF-1

Factor estimulante de colonias de macrófagos

Introducción

El traumatismo craneoencefálico (TCE) es el problema de salud pública con mayor índice de morbilidad y mortalidad en el mundo (2; 3; 4). En Estados Unidos se estima que los TCE ocasionan déficits neurológicos significativos al 35% de los sobrevivientes (5; 6) implicando así grandes costos individuales y sociales. Un estudio epidemiológico realizado en la ciudad de Cali durante los años 2003 y 2004 reveló que cerca del 70% de las urgencias atendidas en diferentes instituciones hospitalarias de la ciudad correspondieron a este tipo de lesión cerebral (7).

Las investigaciones en torno a los TCE se han incrementado en los últimos años, sobre todo aquellas dirigidas a la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos involucrados en el daño celular y aquellas centradas en las medidas de neuroprotección (8). Los desarrollos derivados de éste interés y los avances tecnológicos, han incidido favorablemente en el incremento de la probabilidad de supervivencia de una persona tras un TCE. Sin embargo, dada su heterogeneidad y complejidad, hasta el momento no se ha podido establecer una relación directa entre la fuerza del impacto, los hallazgos histopatológicos y las alteraciones cognitivas subsecuentes. Variables como el tipo de intervención practicada poco tiempo después del incidente y las condiciones premórbidas de los pacientes son aspectos que modulan la respuesta tras un TCE (9). Esta situación motiva el desarrollo de nuevas propuestas de investigación, encaminadas principalmente a disminuir la gravedad de las secuelas neurológicas que con frecuencia se asocian al daño secundario, en concreto al daño axonal difuso (DAD), así como también a los procesos proinflamatorios, al incremento en la agregación de péptido β amiloide (10), entre otros. Medidas de intervención oportuna ante el trauma o medidas eficaces y eficientes de neuroprotección y rehabilitación, podrían eventualmente mejorar la calidad de vida de los pacientes y disminuir el impacto socioeconómico asociado a los TCE en razón de la atención médica que dispensan y de la alta tasa de incapacidad que pueden provocar.

Para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos implicados en los TCE se han empleado modelos animales, ya que permiten la reproducción de lesiones focales y difusas similares a las observadas en los seres humanos (11); no obstante, pese a ser considerados la mejor herramienta, continúan siendo simples ante la heterogeneidad molecular de las lesiones cerebrales evidenciadas en un TCE (12; 13; 14; 15). En contraste, las investigaciones con tejido humano *post mortem* aún son escasas. En relación a las medidas de neuroprotección se han descubierto algunos agentes farmacológicos capaces de detener la progresión del daño secundario, incrementar la supervivencia neuronal y atenuar o disminuir las secuelas neurológicas a largo plazo (16), tal es el caso de la rapamicina, con la cual se ha logrado disminuir la degeneración neuronal hipocámpica (17), de la curcumina (18), los estrógenos (19), la simvastatina (20) y el resveratrol (21). También se ha documentado la efectividad de algunas intervenciones dietéticas (22), tales como la dieta cetogénica que ha demostrado efectividad principalmente en ratas jóvenes (23) o la restricción calórica que incrementa la supervivencia neuronal (3; 24). La efectividad encontrada en modelos animales de trauma tras la aplicación de varias de estas intervenciones, se reduce significativamente cuando la medida se implementa en los seres.

En el caso particular del resveratrol, si bien varios estudios ratifican su carácter neuroprotector, principalmente en las neuronas hipocámpicas, los mecanismos que subyacen a dicha acción son variados y aún no se ha establecido cuál es el principal. Una de los mecanismos recientemente estudiado es la influencia del resveratrol sobre la expresión de la sirtuína. Estudios previos señalaron que la regulación al alta estaba de la sirtuína estaba asociada con la disminución de la patología axonal, sin embargo, recientes estudios cuestionan este conclusión y por el contrario argumentan que es la regulación a la baja de la expresión de la proteína la que actúa como factor de protección (25).

1 Aspectos fisiopatológicos de los TCE

Las lesiones traumáticas se producen cuando una fuerza externa desplaza abruptamente el encéfalo e interrumpe la actividad neurológica (26; 27). La severidad y tipo de daño subsecuente depende de la intensidad y rapidez con la que se libera la energía que desplaza al encéfalo de forma brusca y a la combinación de las fuerzas de aceleración y desaceleración (28). Tras el evento traumático se producen diversas respuestas moleculares que se clasifican en dos: el daño primario y daño secundario, ambos caracterizados por cambios metabólicos que afectan la supervivencia y los patrones de conectividad celular.

Las lesiones focales o difusas, visibles con la ayuda de técnicas de neuroimagen, y que ocurren de forma inmediata conforman el daño primario. Fracturas craneales, contusiones y/o laceraciones cerebrales, y alteraciones axonales y vasculares que se producen a consecuencia de las deformidades mecánicas propias del momento del trauma (28). En pocos minutos el flujo sanguíneo se altera o se interrumpe, entonces la membrana de la célula pierde la estabilidad iónica y se produce un incremento acelerado en los niveles de Ca^{2+} que a su vez inducen la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (29). Estas alteraciones se extenderán en el tiempo y darán paso al daño secundario.

Las lesiones secundarias son alteraciones frecuentemente observadas en el área subyacente y adyacente a la lesión acontecida en un periodo de horas, días e incluso semanas después del insulto y que podrían ser la principal causa de los déficits neurológicos (30; 31). El edema cerebral, los hematomas intracraneales, las lesiones por hipoxia/isquemia, la atrofia difusa y el daño axonal difuso – DAD – son característicos del daño secundario. Estas alteraciones son persistentes a través de las diferentes fases de evolución del TCE (aguda, subaguda y crónica) e inducen una mayor proporción de muerte neuronal (28; 2).

El daño secundario induce apoptosis mediante la activación de la vía intrínseca dependiente de las caspasas. Las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, Bax, Bak y BH3, alteran la funcionalidad de la mitocondria e inducen la liberación del citocromo c, necesario para formar el complejo apoptosómico activador y así activar a la caspasa 3, que activa las enzimas de fragmentación del ADN (endonucleasas) y lleva a la célula a su muerte (32; 33). A su vez se activan vías pro apoptóticas y vías pro supervivencia, éstas últimas permiten la liberación de citoquinas antiinflamatorias, factores de crecimiento y antioxidantes endógenos (32; 34).

López *et al* (2015) relacionan las diferentes respuestas enfatizando el tiempo para denotar que existen respuestas que acontecen de forma inmediata e irreversible tras la lesión, mientras que la persistencia y duración de otras tantas permiten la amplificación del daño.

Figura 1-1: Daño primario y daño secundario. Secuencia temporal de las respuestas

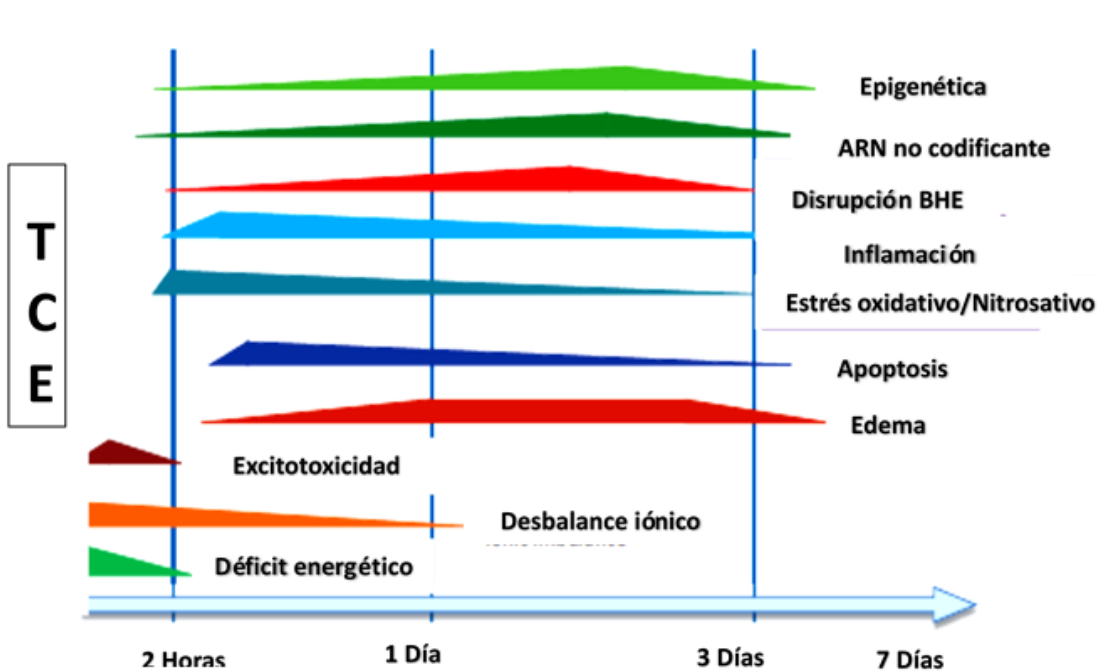


Imagen tomada de López *et al* (2015), modificada y traducida por la autora. En ella se relacionan las respuestas acontecidas tras el daño cerebral traumático.

El daño tisular se extiende a las zonas proximales al área contusa gracias a la acción de los radicales libres y al proceso de peroxidación lipídica (35). El edema, la inflamación y la muerte neuronal incrementan por acción del estrés oxidativo (36). La persistencia del desbalance iónico en la membrana, los niveles bajos de ATP al interior de la célula, la excitotoxicidad, la proteólisis, la disfunción mitocondrial (37; 26; 38) y la acumulación de calcio intracelular (12; 39) ayudan a la progresión del daño. Zhao (2012) afirma que estas respuestas están mediadas por activación de la vía MAPK/ERK. La disfunción mitocondrial se asocia con la interrupción del flujo sanguíneo cerebral, ya que incrementa la producción de radicales libres acelerando así el proceso de apoptosis de las células comprometidas. Por otra parte, la activación de la microglía afecta los procesos metabólicos y de plasticidad, en concreto, la persistencia de la cicatrización glial está asociada con el desarrollo de focos epileptogénicos. En la actualidad esta respuesta está siendo estudiada para ser empleada como biomarcador de la evolución de la lesión (40). La muerte y el daño neuronal también pueden evidenciarse a través del uso de anticuerpos sensibles a la identificación de proteínas específicas de neuronas, es el caso de las proteínas nucleares específicas (NeuN) y de las proteínas del citoesqueleto como la proteína asociada a microtúbulos (MAP2). NeuN es un antígeno detectado en el núcleo de las neuronas y ampliamente empleado para estimar la cantidad de neuronas, principalmente corticales. En condiciones patológicas la inmunorreactividad del anticuerpo anti-NeuN se reduce (41). El anticuerpo MAP2 se ha empleado para marcar células piramidales de la corteza y sus procesos apicales. En condición de lesión se ha podido establecer un descenso en la inmunorreactividad que suele acompañarse de cambios en la dendroarquitectura de las células más evidentes en unas capas que en otras. Estas alteraciones son progresivas y evidencian la gravedad del daño (9).

1.1 Estrés oxidativo

Proceso en el cual la célula pierde la homeostasis entre los agentes prooxidantes y antioxidantes debido a la excesiva producción de ERO (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radical de hidroxilo), a consecuencia del incremento en los niveles de calcio intracelular. El anión superóxido se forma por la transformación de la xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa y la sobre activación de las isoformas de la sintasa del

óxido nítrico neuronal (SONn) elevando así los niveles de óxido nítrico (NO) (32). La combinación de NO con el anión superóxido induce la formación del peroxinitrito, molécula con gran capacidad oxidativa.

1.2 Excitotoxicidad

Proceso que refiere a la muerte neuronal provocada por la sobreactivación de receptores de aminoácidos. Cuando las neuronas glutamatérgicas pierden el soporte nutricional o la estabilidad de la membrana, se despolarizan e inducen la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, por ende, se incrementa la liberación de glutamato al espacio extracelular (42). Las neuronas sobreexpuestas al glutamato activan sus canales de NMDA y AMPA/Kainato permitiendo la entrada masiva de Ca^{2+} , agua y sodio, que forman el edema citotóxico y se fortalece la respuesta de estrés oxidativo (32).

1.3 Respuesta inflamatoria

Reacción iniciada y regulada por las citoquinas, proteínas producidas por las células gliales y los leucocitos (43). El incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular activa la producción de enzimas citotóxicas, como la mieloperoxidasa que altera la estabilidad de la membrana celular. Los astrocitos activan la síntesis de neurotrofinas necesarias para la formación de la cicatriz glial y de esta forma se alteran los procesos de conectividad celular. La activación de la vía de señalización p38 α MAPK en la microglía está relacionada con la producción de citoquinas proinflamatorias, principalmente las isoformas IL-1 β y IL-8, cuya expresión tras un TCE se encuentra significativamente elevada (44).

Las células microgliales forman parte del sistema inmunitario del SNC, están implicadas en la respuesta inflamatoria, tienen acción fagocitaria y en algunas regiones cerebrales participan de la inducción de muerte controlada, angiogénesis y depuración de terminales sinápticas. En estado basal presentan un soma alargado y grandes terminaciones con las cuales constantemente monitorean el entorno. Ante una lesión, el área implicada presenta un número mayor de células microgliales, con notorios cambios morfológicos: un soma

más ancho y de forma ovoide y unas prolongaciones más cortas; características que se convierten en un marcador sensible al daño secundario. Estas células secretan moléculas proinflamatorias (citoquinas como TNF- α) con el objetivo de eliminar las células dañadas y los agentes patógenos potencialmente dañinos que amenazan la supervivencia de las neuronas sanas. No obstante, también están en capacidad de producir moléculas antiinflamatorias para detener el proceso inflamatorio e incrementar la supervivencia de las células viables.

Recientes estudios mediante uso de imágenes con tensor de difusión, permiten detectar cambios microscópicos en la arquitectura celular, que evidencian alteraciones en los índices de difusión y direccionalidad de las moléculas de agua e integridad funcional de las fibras de la sustancia blanca, indicadores clave del proceso que involucra activación de la microglía, aclaramiento de la mielina y astrocitosis (45). Aún no está claro si la activación de la microglía en TCE promueve la supervivencia neuronal o si exacerba el daño en la célula (46). La secreción de TNF- α incrementan rápidamente pocas horas tras la lesión, TNF- α estimula la proliferación y activación de la microglía. Las células microgliales continúan expresando TNF- α como parte del mantenimiento y amplificación de la cascada inflamatoria 2 – 5 días después de la injuria (47).

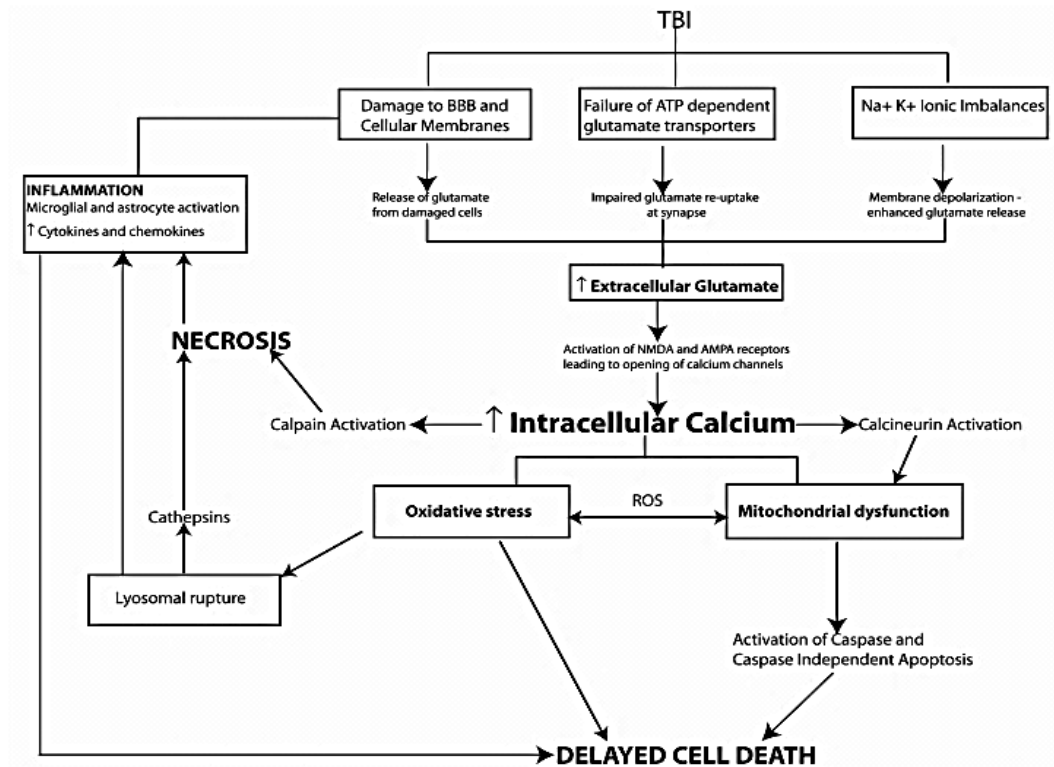
Una forma de resumir lo que hasta aquí se ha dicho sobre los aspectos fisiopatológicos del TCE la ofrece el esquema de Walker & Tesco (2013) y corresponde a la Figura 1-1 del presente texto. En él los autores relacionan los cambios moleculares del daño primario y secundario que serían responsables de la pérdida neuronal y con ella de los déficits cognitivos observados tras un TCE. Un aspecto relevante de mencionar es que varios trabajos han aportado luces sobre los mecanismos implicados; no obstante, en el caso de los TCE humanos, es la secuencia de los mismos la que aún permanece en observación.

Rovegno, Soto, Sáez b y Von Bernhardic (2012) analizan la respuesta molecular asociada al daño secundario y concluyen que la propagación y mantenimiento de los cambios asociados al daño secundario se debe a la compleja interacción entre las alteraciones asociadas al daño primario y las respuestas asociadas al daño secundario. El abordaje de la interacción entre las respuestas podría entonces ayudar a comprender la heterogeneidad clínica observada en los pacientes y la variabilidad que se aprecia en los procesos de rehabilitación.

Dicha interacción está mediada por variables genéticas y ambientales; en el primer caso, se sabe que la presencia del alelo $\epsilon 4$ de la apolipoproteína E (Apo E) que codifica para la proteína β amiloide (β APP) y que se asocia comúnmente con la enfermedad de Alzheimer, se relaciona con un peor pronóstico del paciente a largo plazo. Apo E4 incrementa la formación de placas β APP en el cerebro que alteran el metabolismo en las células e inducen muerte neuronal al constituir un ambiente neurotóxico para las neuronas. En los casos de TCE moderado y severo, la presencia del alelo constituye un marcador sensible de daño axonal (48). El incremento en la acumulación de agregaciones de β APP en las regiones corticales es una de las características frecuentemente evidenciadas en los pacientes tras varios años de acontecida la lesión, éstos mismos pacientes desarrollan alteraciones neurológicas con patrones sintomatológicos y clínicos semejantes a los que caracterizan las demencias corticales. Ello evidencia que el incremento en la acumulación β APP, principalmente en los axones, compromete a largo plazo la calidad de la respuesta funcional tras un TCE (49). Las investigaciones desarrolladas en torno al tema concluyen que las inclusiones de β APP incrementan la susceptibilidad de la célula a los agentes neurotóxicos, la posibilidad de desarrollar isquemia cerebral (49) y el diagnóstico de Enfermedad de Alzheimer años más tarde. APOE 4 proteína asociada con mantenimiento, reparación de la membrana neuronal y crecimiento (50), también Interviene en la respuesta inflamatoria (51). En la página siguiente se encuentra un esquema que sintetiza la respuesta molecular del daño primario y secundario.

Figura 1-2: Mecanismos fisiopatológicos de la muerte celular acontecida tras el TCE.

La imagen podrá verse en la siguiente página.



El esquema ha sido tomado de la publicación realizada en 2013 por los autores Walker, K. y Tesco, G., en ella los autores analizan los mecanismos moleculares implicados en la disfunción cognitiva que se observa tras ocurrida la lesión (52).

2 Modelos experimentales para estudiar la fisiopatología del TCE

La muerte celular seguida a la lesión es irreversible, por ello los modelos ofrecen esencialmente la oportunidad de ampliar la comprensión del daño secundario que prolonga y expande la cascada de activación del daño primario (53). Dentro de los modelos experimentales desarrollados para estudiar la fisiopatología del TCE y los procesos de neuroprotección, se encuentran aquellos que reproducen de manera exclusiva un tipo particular de lesión, como por ejemplo las lesiones focales (hematomas y contusiones), aquellos que reproducen lesiones difusas (DAD y edema cerebral difuso o *swelling* cerebral) y otros de carácter mixto con los que pretende integrar las dos tipologías de lesiones en un intento de emular lo que en realidad sucede en un traumatismo craneoencefálico. Sin embargo, si bien los modelos experimentales ofrecen la mejor manera de acercarse a la comprensión de la fisiopatología derivada de un TCE, aún resultan básicos e incapaces de reproducir a cabalidad la heterogeneidad del mismo (11).

2.1 Modelos *in vivo* e *in vitro*

Diversas investigaciones reportan el uso de modelos animales para reproducción de todo tipo de lesión focal o difusa secundaria a un TCE. Para la reproducción de lesiones focales se encuentran el modelo de daño criogénico, de caída de un peso sobre el cráneo, de percusión lateral por fluido (modelo ampliamente utilizado para la reproducción de daño focal), de impacto cortical controlado y de inflado de balón. Otros modelos empleados para reproducir lesiones difusas son, el modelo de aceleración por inercia, de impacto-aceleración por caída libre de un peso y el modelo de impacto-aceleración por aire comprimido (11).

Los modelos de abordaje *in vitro* permiten observar las condiciones específicas del daño celular traumático. Los modelos para el estudio del daño axonal difuso se basan en la

transección, compresión traumática, presión hidrostática, cambios hidrodinámicos, estiramiento celular (13) y el modelo de arañado o rasgado (11). Estos modelos permiten observar los cambios sobre el balance iónico, niveles de calcio intracelular, permeabilidad de la membrana y expresión de proteínas del citoesqueleto en relación a un fármaco (13). Los modelos mixtos permiten estudiar los dos tipos de lesiones, es el caso del modelo de inducción de hipoxia o hipotensión.

Albert-Weissenberger & Sirén (2010) brindan una clasificación de los principales modelos experimentales empleados para el estudio de los TCE, pueden apreciarse en la figura 2.1.

Figura 2-3: Modelos experimentales para el estudio de los TCE

Model	Species	Injury	Strengths	Weaknesses
Weight-drop models				
Feeney's weight-drop	rat [22]	predominantly focal	injury mechanism and inflicted injury is close to human TBI	high mortality rate due to apnea and skull fractures
Shohami's weight-drop	rat [14], mouse [15]	predominantly focal	severity of injury can be adjusted	not highly reproducible
Marmarou's weight-drop	rat [16,17], mouse [43]	predominantly diffuse	well characterized neuroscoring immediately after injury allows randomization	
FP models				
MFP	rat [46,47]	mixed	severity of injury can be adjusted	requires craniotomy that may compensate for ICP increases
LFP	rat [48], mouse [49]	mixed	inflicted injury is highly reproducible within one laboratory	no immediate post-injury neuroscoring possible inflicted injury is variable between laboratories high mortality rate due to apnea
CCI	rat [72], mouse [73]	predominantly focal	severity of injury can be adjusted inflicted injury is highly reproducible	requires craniotomy no immediate post-injury neuroscoring
Cryogenic brain lesion	rat [92], mouse [93]	focal	severity of injury can be adjusted inflicted injury is highly reproducible and easily quantifiable	mimics only conditionally human TBI

Fuente: Albert-Weissenberger & Sirén, L. (2010). Experimental traumatic brain injury

A continuación serán detallados tres de los modelos más referenciados en las investigaciones de daño cerebral traumático, en su orden: el modelo de percusión lateral

por fluido, el modelo de impacto cortical controlado y el modelo de impacto aceleración por caída libre de peso (4).

2.1.1 Modelo de percusión lateral por fluido -PLF-

Este modelo fue adaptado para su uso en ratas en 1987, se usa para producir lesiones focales mediante la deformación directa del parénquima cerebral. Brinda la posibilidad de generar contusiones en un solo hemisferio y su aplicación requiere de craneotomía, previa anestesia, para cementar en el cráneo un tapón de plástico sobre la superficie dural intacta. A continuación, al tapón se adapta el extremo de un tubo que debe estar contenido en un cilindro de Plexiglás relleno con solución salina isotónica estéril. Al otro extremo se encuentra un péndulo que genera un pulso de presión sobre el fluido contenido al interior del tubo y que causará la deformación en el tejido (11). La severidad de la lesión puede determinarse variando el pulso de presión, mientras que la localización de la craneotomía determina si se pueden apreciar o no lesiones en la corteza contralateral (53; 11).

Este modelo permite apreciar daño primario y secundario como la formación de contusiones corticales, citotoxicidad, edema y patología vascular, tanto en el lugar de la lesión como en el área pericontusional ipsilateral. Se ha empleado para estudiar disfunción cognitiva y demencia secundaria a TCE. Pese a ser altamente reproducible y brindar control sobre la severidad de la lesión; su uso se encuentra limitado, ya que el incremento en la fuerza del pulso afecta la funcionalidad del tallo cerebral incrementando el riesgo de inducir edema pulmonar neurogénico y así elevar la tasa de mortalidad (53).

2.1.2 Modelo de impacto cortical controlado -ICC-

Este modelo fue inicialmente diseñado para ratones, pero se adaptó su uso en ratas en 1995. Reproduce contusiones cerebrales y permite apreciar lesiones focales. La lesión se produce por la aplicación de aire presurizado proveniente de un impactador sólido que al libera energía mecánica sobre la duramadre íntegra para así deformar el tejido cerebral (11). Requiere de craneotomía y emplea un aparato estereotáxico para fijar la cabeza del animal. Una vez posicionado el animal bajo el cilindro neumático se liberará una cantidad de aire que impulsa el impactador e induce la lesión cuya severidad depende principalmente de la profundidad de la lesión y de la velocidad del impactador (54). La velocidad del impacto comúnmente empleada está entre los 0,5 a 10 m/s. Se emplea cera

de hueso para cerrar el cráneo y así evitar que la descomposición ósea afecte el proceso de evolución de la lesión (11).

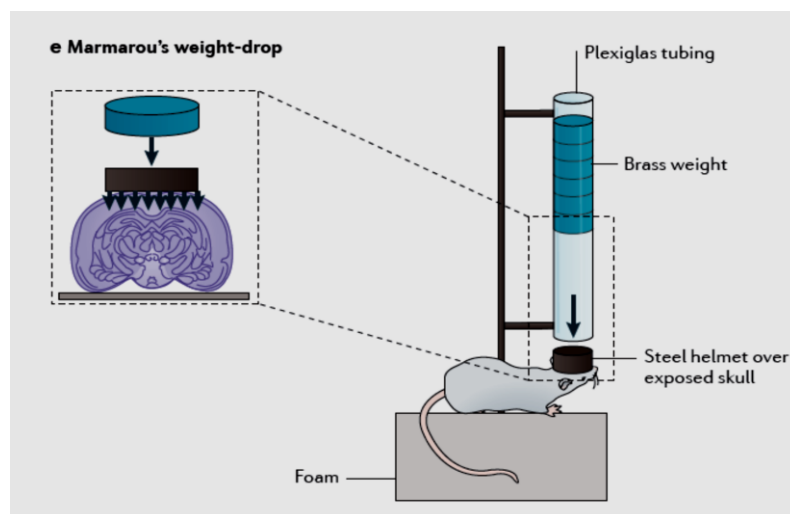
Ampliamente empleado para el estudio de la fisiopatología del daño secundario inducido por la lesión focal y para la comprensión epilepsia post-traumática (53).

Un estudio desarrollado en 1991 en el cual se analizó el efecto de las variaciones en la magnitud del impacto sobre la respuesta neurológica, vascular e histopatológica, permitió concluir que el modelo permite apreciar muchas de las características observadas en otros modelos, como por ejemplo contusiones, hemorragia y daño axonal; además, se pudo observar una relación directa entre la severidad de la lesión y la afección del tallo cerebral, demostrando así que el modelo es una herramienta muy eficiente para la investigación en TCE (55).

2.1.3 Modelo de impacto aceleración por caída libre de peso

Ampliamente utilizado para reproducir lesiones difusas similares a las evidenciadas en los humanos con TCE de distinto grado de severidad. Creado en 1991 por Marmarou se ha empleado para caracterizar los cambios neurofisiológicos, histopatológicos y funcionales de las lesiones traumáticas cerradas (56). La figura 2-3 ilustra los elementos que componen el modelo. La imagen fue tomada de Marmarou, C.R., Prieto, R., Taya, K., Young, H.F. & Marmarou, A. (2009).

Figura 2-4: Ilustración de los elementos componentes del modelo de Marmarou.



Como puede apreciarse en la figura, el modelo se compone de un tubo de plexiglás transparente que se fija a un soporte y por medio del cual se desliza una barra de metal de aproximadamente 450gms peso que impacta sobre un disco metálico previamente fijado sobre la cabeza del animal, previa anestesia del mismo y exposición del cráneo. La altura el tubo y el peso determinan la severidad de la lesión, así, con el peso promedio señalado arrojado por un tubo de 1,70 metros, se tendrá una lesión traumática moderada. El modelo induce lesiones difusas que afectan la estabilidad de las neuronas, axones, dendritas y capilares; y que se relacionan con déficits motores y cognitivos (4). Estas lesiones son altamente variables, situación que se ha cuestionado ampliamente, pero que correspondería a lo que usualmente se observa en las lesiones traumáticas en humanos.

Feeney y el grupo de trabajo de Shohami llevaron a cabo modificaciones del modelo para inducir, en el primer caso, lesiones corticales, y para adaptarlo a ratones, en el segundo caso. Xiong, Mahmood y Chopp (2013) analizaron las propiedades de los distintos modelos de lesión y determinaron que el modelo de Marmarou y Shohami replicaba con buena fidelidad cinco de las principales respuestas observadas tras la lesión traumática observadas en los casos de TCE por accidentes de vehículo en humanos, en la tabla 1 tomada de la fuente en mención, traducida y modificada por la autora, ofrece un resumen del análisis realizado y los resultados arrojados.

Tabla 1. Características patológicas de los TCE en humanos y la capacidad de réplica de los modelos de lesión.

Modelo	Características patológicas asociadas a los TCE					
	Modelo de lesión TCE	Contusión	Concusión	Daño axonal	Hemorragia	Fractura de cráneo
Caída de peso de Shohami y Marmarou		++	+	++	+	+/-
Caída de peso de Feeney		+	++	+	+	-
Contusión cortical de Maryland		+	-	++	+	-
Percusión lateral por fluido PLF		+	++	+	+	-
Impacto cortical controlado		+	++	+	++	-
Modelo de lesión por explosión		+	+/-	++	+	+/-

Modelo de lesión penetrante por disparo	++	++	+	++	+/-
---	----	----	---	----	-----

-No replica la condición observada en los humanos, +/- posiblemente replica la condición observada en humanos, + replica en algún grado la condición observada en los humanos; y ++ replica con alta fidelidad la condición observada en los humanos.

Dentro de los modelos de lesión cerrada, el modelo de aceleración por caída libre de peso de Shohami y Marmarou replica con alta fidelidad las contusiones y el daño axonal, replica en menor grado la hemorragia y el estado concusional y en menor medida replica la respuesta observada tras la fractura de cráneo. Estas características respaldan el uso frecuente del mismo en el estudio de los TCE.

En la tabla se incluyen tres modelos más, el modelo de contusión cortical de Maryland, el modelo de lesión por explosión y el modelo de lesión penetrante por disparo. El primero modelo induce lesión traumática en la porción anterior del cráneo por medio del impacto que causa una pelota de metal con un peso de ,0535gms lanzada a través de una plataforma de 2,1 metros de alta que tiene un ángulo de inclinación de 66°. En el caso del segundo modelo la lesión está ocasionada por la generación de una onda de choque, pretendiendo emular las lesiones observadas en TCE ocasionado por una onda explosiva. Finalmente, el modelo de lesión penetrante por disparo busca simular las lesiones traumáticas ocasionadas por disparos, para tal fin emplea un proyectil que genera una onda de choque penetrando la cavidad craneana. La severidad de la lesión está condicionada por la fuerza de disparo del proyectil y el área lesionada.

3 Neuroprotección

Se trata de la generación de intervenciones capaces de prevenir o atenuar o detener la progresión de los cambios metabólicos responsables del daño y la muerte celular. La eficacia de estas medidas puede estar relacionada con el tiempo en el cual se implementan, la biodisponibilidad, en el caso de las intervenciones farmacológicas, la forma de administración y el tiempo de duración de la misma. En relación al tiempo de implementación Wagner et al. (2011) afirman que las primeras 72 horas post injuria configuran una ventana terapéutica viable para el éxito de las intervenciones, pues durante este tiempo se observa un incremento significativo de la proliferación de factores proapoptóticos.

Han sido varias las intervenciones estudiadas para detener el daño celular asociado a TCE, entre ellas se encuentran las de administración de agentes farmacológicos y otros derivados naturales hasta las que proponen implementar técnicas como el congelamiento y el diseño de dietas ricas en antioxidantes.

Para conocer cuáles son las principales técnicas de neuroprotección sobre las cuales más se ha escrito en los últimos años se realizó una revisión de la base de datos científica *Science Direct*. Para la búsqueda inicial se usaron como criterios las palabras *Neuroprotection* y *TBI* (Traumatic Brain Injury), como resultado se obtuvieron 1706 artículos; entonces la búsqueda se depuró ingresando las palabras: *TBI*, *Brain injury*, *traumatic brain injury*, entonces los resultados se redujeron a 178 artículos. Dado que el interés principal de esta revisión está centrado en reportar la eficacia de las medidas de neuroprotección frente al TCE, se dejaron de lado los artículos de revisión. De los 178 artículos filtrados, 73 eran de carácter empírico; sin embargo, 15 de ellos analizaban la expresión de proteínas, activación de vías metabólicas y otra serie de cambios asociados al daño secundario, con las cuales se establece una hipótesis sobre las moléculas que habrían de ser intervenidas para lograr efectos neuroprotectores. Los 58 artículos

publicados en 24 diferentes revistas analizaban técnicas y distintos agentes farmacológicos con efectos neuroprotectores bajo la condición de TCE, en la mayoría de los casos de severidad moderada.

Tabla 2. Técnicas y terapias comúnmente empleadas en los últimos 4 años

Técnica/terapia	Biomodelo experimental empleado / Modelo de lesión	Resultados obtenidos
Aplicación de campos electromagnéticos de frecuencia extremadamente baja (57)	Ratas Sprague–Dawley PLF	Aplicado durante las primeras 12 horas post trauma, disminuye la apoptosis neuronal, la inflamación y el edema. Mejora el flujo sanguíneo, promueve la proliferación, desarrollo y diferenciación celular e incide positivamente en la recuperación funcional.
Privación de sueño (58)	Ratas Wistar ICC	Reduce el daño morfológico, la respuesta inflamatoria mediada por IL-6 y IL-10 y mejora la recuperación funcional.
Ejercicio y dieta enriquecida con DHA (59)	Ratas Sprague–Dawley PLF	Induce incremento de los niveles de DHA, contrarresta la peroxidación lipídica y restablece la homeostasis de la membrana celular. Facilita la plasticidad cerebral
Consumo de aceite de pescado (60)	Ratas Long-Evans de 17 días de nacidas ICC unilateral	Disminuyó los déficits motores. Inhibió la expresión de Mmp9 y previno la disrupción de la barrera hematoencefálica.
Enriquecimiento ambiental (61)	Ratas Sprague–Dawley ICC de Cheng	Incrementó la tasa de supervivencia de las células de los campos CA1 y CA3 del hipocampo. Disminuyó el volumen de la lesión y mejoró el desempeño de las tareas motoras y de memoria.
Oxígeno hiperbárico (62)	Ratones ICC	Redujo el volumen de la lesión, la respuesta inflamatoria y la apoptosis neuronal. Atenuó el edema cerebral y mejoró la función cognitiva y motora.
Oxígeno hiperbárico (63; 64)	Ratas Sprague–Dawley PLF	Inhibió la apoptosis, principalmente en el hipocampo. La duración del beneficio depende de la pronta y prolongada administración. Atenuó la apoptosis neuronal, redujo la actividad inflamatoria, el volumen de la lesión y la activación de la microglía mediada por la expresión de TNF- α .
Trasplante de células progenitoras neurales en el área pericontusional (65)	Ratas Wistar PLF	Favoreció la secreción de neurotrofinas, redujo la vulnerabilidad cortical y el volumen de la lesión, tanto en el hipocampo como en la corteza. Mejoró el desempeño en tareas de memoria espacial.
Trasplante de células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea humana (66)	Ratas Sprague–Dawley CLP de Marmarou	El trasplante de células madre con soporte de colágeno incrementó la supervivencia y diferenciación neuronal. Mejoró la recuperación funcional de la respuesta sensoriomotora y de la memoria espacial.

Trasplante de células madre mesenquimales combinados con glicerol hipertónico o manitol (67)	Ratas Wistar PLF	El trasplante de células mesenquimales combinado con manitol mejora la respuesta comportamental y reduce los marcadores de estrés oxidativo
--	------------------	---

PLF: percusión lateral por fluido, CLP: caída libre de peso de Marmarou, ICC: impacto cortical controlado, ICC de Cheng: de impacto cortical controlado adaptado por Cheng y ICC unilateral: impacto cortical controlado unilateral.

La capacidad de la técnica para disminuir la apoptosis y mediar la respuesta inflamatoria, fueron constantemente registradas. En detalle, se evaluó con frecuencia la liberación de agentes antiinflamatorios, la disminución en el tamaño de la lesión, el mejoramiento en el desbalance iónico de la membrana y la disminución de la emergencia de cambios morfológicos en las neuronas, principalmente hipocámpicas que usualmente se registran en condición de daño, fueron las características tenidas en cuenta para determinar el efecto neuroprotector de la técnica. Por otra parte, en algunos casos se registraron cambios comportamentales y cognitivos, es decir, que se evaluó la capacidad de la técnica para mejorar el desempeño motor del animal y la capacidad de memoria espacial.

3.1 Neuroprotección mediada por fármacos

Distintos fármacos se han empleado para el estudio de la neuroprotección en TCE. Los resultados obtenidos tras el uso de fármacos neuroprotectores en modelos animales ha demostrado buena efectividad; sin embargo, su impacto disminuye ostensiblemente en los ensayos clínicos de la fase II y III con humanos (4). Por lo pronto, Houlden (50) considera que el uso de medicamentos y la implementación de terapia de rehabilitación cognitiva reducen las alteraciones neurológicas a largo plazo. En la tabla N° 2 se relacionan las moléculas más estudiadas durante los últimos 4 años, según la base de datos *Science Direct* y sus efectos sobre la respuesta molecular intervenida.

Inmunoglobulina (88)	TNF- α	↓	↓	↓	↓	↓	↑	
Inosina (89)	Mst3b	-	-				↑	↑
Lipoxina A4 (90)	R TNF- α , IL-1 β y IL-6		↓	↓	↓			
Luteolin (91; 92)	Nrf2-ARE	↓		↓	↓	↓		
Melatonina (93; 94)	Citoquinas		↓	↓	↓	↓		
Minociclina (95)	No reportada	↓	↓				↑	
MLC901 (96)	Acuaporina 4, BDNF y VEGF	↓	↓				↑	↑
N-acetilcisteína amida (NACA) (97)	GSH y de ATP	↓	↓		↓	↓	↑	
NGF (98)	NF- κ B GSK-3 β				↓		↑	
Nimesulida (99)	COX-2				↓			↑
Progesterona (100; 101; 102; 103)	COX-2		↓		↓		↑	↑
Rapamicina (104)	mTOR-p53-Bax axis		↓		↓			↑
Resatorvid (105)	TAK1, p-TAK1, TNF- α , y IL-1 β				↓			↑
rhSDF-1 α (106)	SDF-1/CXCR4 axis				↓	↑		↑
Rolipram (107)	Inactivación de respuesta microglía		—	—	—		—	—
Solución salina rica en hidrógeno SRH (108)	SIRT2					↓	↑	
Sulfuro de hidrógeno (H2S) (109)	mitoKATP	↓	↓	↓		↓		
T3 hormona tiroidea (110)	BDNF y GDNF		↓		↓		↑	↑
Tamoxifeno (111)	p-ERK1/2				↓			↑
Tanespimicina (17-AAG) (112)	HSP70		↓					↑
tert-butylhydroquinone (tBHQ) (113)	Nrf2	↓			↓	↓	↑	↑

E.C.: edema, I.: inflamación, V.L.: Volumen de la lesión, D.BHE: Disrupción de la barrera hematoencefálica, D/MC: Daño celular/ muerte neuronal, A.: Angiogénesis, E.O.: Estrés oxidativo, M.C.: Mejora cognitiva, M.NC.: Mejora neuroconductual. Las flechas indican el incremento ↑ o ↓ decremento en la respuesta analizada. Solo una de las moléculas

estudiadas no presentó efectos favorables sobre las respuestas evaluadas y por ello aparece con una línea horizontal.

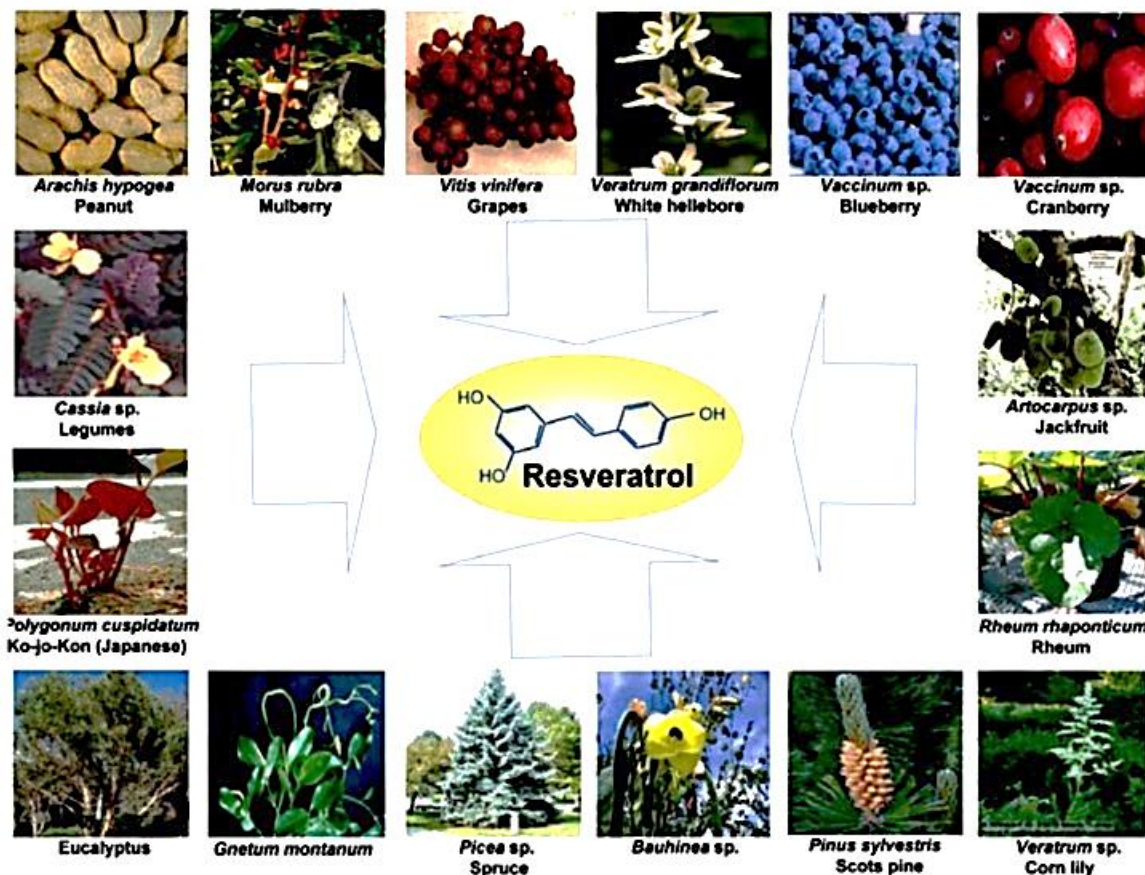
Los fármacos ensayados en su mayoría presentan efectos positivos sobre distintas respuestas moleculares asociadas al daño primario y secundario. Como podrá apreciarse, para determinar la acción neuroprotectora del fármaco se evalúa con frecuencia la disminución en la proporción de muerte o daño celular y la atenuación de la respuesta inflamatoria. Los estudios realizados para evaluar la acción de los fármacos se centran en la evaluación de los cambios cognitivos y neurocomportamentales, una de las razones que más se aluden para argumentar realizar dicha evaluación se relaciona con el propósito de pretender conocer la persistencia del efecto favorable del agente farmacológico, dado que cuando algunos de estos agentes se ha empleado con los humanos el efecto no se presenta o no persiste.

3.1.1 Acción neuroprotectora del resveratrol

El resveratrol (RSV) es un compuesto químico presente en varias plantas, entre las que se encuentran las uvas, algunos frutos rojos y el maní (ver Figura 2). Induce la producción de fitoalexinas, metabolitos secundarios capaces de regular los genes esenciales del crecimiento y desarrollo de la planta. Su liberación se produce bajo condiciones de estrés tales como el incremento de la radiación ultravioleta, el uso de agentes químicos nocivos y el ataque de algunas variedades de hongos. Durante las primeras ocho horas después del daño la liberación del RSV es elevada y sostenida (114).

El nombre de RSV procede de la combinación entre la estructura química de la molécula, resina, y el nombre de la planta de la cual se aisló, la *Veratrum*. El RSV es un polifenol sintetizado por la acción de la estilbeno sintasa, un hidrocarburo aromático. El interés por su estudio entró en auge después de que en 1990 fuera publicado un estudio realizado en Francia en el cual se sugirió que la baja tasa de mortalidad a causa de enfermedades coronarias o cardíacas, pese al alto consumo de grasas saturadas por parte de la población, guardaba relación con el consumo elevado de vinos (115).

Figura 3-5: Algunas plantas que contienen resveratrol. Imagen tomada de Aggarwal, et al (2014)



El RSV es un componente abundante en los vinos rojos y es responsable de la reducción de los lípidos séricos. En la actualidad existen varios suplementos dietarios que contienen RSV bien sea como único componente o en combinación con otros para incrementar su baja biodisponibilidad, entre ellos se encuentran: glucosamina, flavonoides, estilbenoides, ácidos fenólicos y vitaminas. Las dosis de administración son muy variadas, van desde los 0,2 hasta los 1.000 mg (116).

El RSV ha demostrado acción antitumoral y protectora en enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes, isquemia cerebral y TCE, entre otras. Su acción en el SNC permite atenuar el daño neuronal, principalmente en el hipocampo, disminuir la respuesta inflamatoria, el estrés oxidativo y la apoptosis (21), efectos relacionados con la recuperación de la actividad de glutamato descarboxilasa (GAD) mediante la acción de la

vía PPAR α . El RSV regula al alza enzimas antioxidantes como glutatión peroxidasa, catalasa y quinona reductasa, inhibe la peroxidación lipídica, la ornitina descarboxilasa (ODC), las proteína quinasas y regula la apoptosis mediada por distintas vías incluyendo la regulación al alta de p53, la activación de caspasas, el decremento en Bcl-2 y Bcl-xl, el incremento en Bax, la inhibición de ciclinas tipo D, y la mediación de las cascadas NF- κ B and AP-1. Regula al alta proteínas antioxidantes (por ejemplo, SOD) y proteínas antiinflamatorias como por ejemplo IL-10, a la vez que disminuye las citoquinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6, TNF- α y TGF- β 1 (117; 118).

Con el objetivo de conocer la acción del resveratrol en TCE, se llevó a cabo una revisión de artículos publicados en las bases de datos *Science Direct* y *PubMed*. Como criterios de búsqueda se emplearon las palabras: resveratrol y *traumatic brain injury*, la búsqueda inicial en la base *Science Direct* arrojó 256 artículos publicados en revistas desde 1996 hasta el presente año; la búsqueda se depuró filtrando los artículos que tenían las dos palabras en el título, las palabras clave o el resumen, como resultado se obtuvo 5 artículos, tres de ellos eran revisiones. En PubMed se encontraron 11 artículos, cuatro estaban relacionados en la base de datos anterior. En total se analizaron 12 artículos, seis artículos originales. Se prestó atención a las respuestas metabólicas analizadas, al modelo de lesión y biomodelo, y a la dosis administrada. En la tabla 4 se encuentra el resumen de los resultados obtenidos.

Tabla 4 Respuestas implicadas en la acción neuroprotectora del RSV

Elementos de análisis	Método	Respuesta/Moléculas evaluadas	Conclusión
Eficacia a nivel preclínico de fármacos con acción antioxidante (119)		Estrés oxidativo	RSV incrementa la supervivencia celular
Estrés oxidativo y nitrosativo en la respuesta neuroinflamatoria y el metabolismo anormal de la dopamina (120)		Estrés oxidativo Neuroinflamación	El estrés y la peroxidación lipídica inducen y prolongan la activación de la microglía.
Vías metabólicas de acción del RSV en TCE, isquemia y daño en la espina dorsal (121)		Estrés oxidativo Neuroinflamación (microglía)	La sinergia de las vías activadas atenúa el daño secundario.
Datos experimentales y clínicos del consumo de suplementos dietarios en daño cerebral adquirido y no adquirido (122)		Neuroinflamación (TNF- α , IL-1 β)	El RSV atenúa la activación de la microglía a través de la regulación al alta de la SIRT1 y la activación de la vía MAPK.

Papel de la alimentación en la recuperación y evolución de los pacientes con TCE (123)		RSV Q10 Vitamina E	El consumo de ácidos grasos como omega 3, la vitamina D y el zinc facilitan la recuperación.
Papel de la reacción reducción-oxidación en la fisiología del TCE (124)		Estrés oxidativo	RSV inhibe la peroxidación lipídica y activa el factor de transcripción Nrf2/ARE
Acción del RSV sobre la muerte celular por apoptosis y por autofagia (125)	Ratones Modelo in vivo e in vitro de TCE	LC3-II GSK-3 β Estrés oxidativo	RSV suprime la acción de GSK-3 β que interviene en los procesos de apoptosis y autofagia.
Papel del RSV en la activación de la microglía y la producción de IL3 y IL12 (126)	Ratones ICC	IL-3 IL-12	Administración aguda del RSV decremента la respuesta neuroinflamatoria.
Capacidad del RSV para regular los niveles extracelulares de gliotransmisores y la activación de la vía MAP quinasa p38 (127)	Cultivo de astrocitos Compresión de tejido	Expresión de GFAP, OX42, APC y beta-tubulina I	RSV inhibe la liberación de gliotransmisores y la fosforilación de p38 a través del bloqueo de los canales de calcio
Evaluó el efecto del RSV sobre el estrés oxidativo (128)	Ratas Wistar Modelo CLP	MDA, GSH, NO, XO	El RSV reduce el estrés oxidativo y el volumen de la lesión
Analiza el efecto del RSV sobre el daño al hipocampo y los déficits comportamentales (22)	Ratas de 7 días de nacidas.	Respuesta motora y memoria	El RSV preserva en mayor medida las células del hipocampo y mejora la respuesta motora y la memoria
Acción del RSV sobre la regulación del transportador de dopamina (DAT) en el estriado de ratones hembras (129)	Ratones hembra Injuria por contusión	Receptores de estrógeno alfa y beta	Los receptores de estrógeno están involucrados en la regulación al alta de los receptores DAT, acción mediada por el RSV en las neuronas dopaminérgicas.

La dosis administrada de RSV estaba entre 20 mg/kg hasta los 100 mg/kg, siendo las dosis altas las que mejor resultado presentaron. Un solo artículo mostraba los resultados del RSV sobre la respuesta neuroconductual y cognitiva. A nivel histopatológico se analizó la respuesta del RSV en el córtex y el hipocampo. En su mayoría los resultados obtenidos postulan al RSV como un fármaco seguro para el uso en humanos, pese a que en la revisión no se encontró ningún artículo que relacionara el uso del RSV en humanos post-lesión, su uso ha estado condicionado en la modalidad de pretratamiento administrado como suplemento dietario donde los beneficios sobre la evolución del paciente han sido favorables, pese a que se discute su interacción con otros factores como el ambiente en el que se encuentre el paciente.

En lo que a los TCE se refiere se ha podido establecer que la administración de RSV reduce la activación de la microglía en el córtex cerebral, el cuerpo caloso y el giro dentado (126) e incrementa la supervivencia neuronal. En modelos murinos se ha demostrado que el tratamiento con RSV en una dosis única y administrada de forma inmediata tras el TCE, induce disminución en los niveles de algunos indicadores de toxicidad celular tales como malondialdehído o MDA, que se emplea como marcador de la degradación oxidativa (128).

Si bien existen diversos estudios que ratifican el carácter neuroprotector de ésta molécula, principalmente sobre las neuronas hipocámpicas, los mecanismos que subyacen a dicha acción se encuentran aún en discusión. Una de las hipótesis que se ha trabajado afirma que la acción neuroprotectora del RSV se debe a que induce la expresión al alta de una proteína nuclear llamada sirtuína 1 (SIRT 1), proteína catalizadora de la desacetilación de proteínas acetiladas en residuos de lisina que emplean como segundo sustrato dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD⁺), para producir la proteína desacetilada, nicotinamida y ADP-Ribosa acetilada (130). SIRT 1 forma parte de la familia de sirtuínas, en total siete, que cumplen funciones de silenciamiento génico y regulación metabólica útiles para la supervivencia celular, principalmente la de tipo 1 y 2.

La activación de la SIRT1 disminuye el proceso de degeneración walleriana lenta, proceso en el cual los axones pierden su conexión con el cuerpo celular por efecto de la degradación de los microtúbulos del citoesqueleto. La SIRT1 también puede ser activada por el RSV o aplicando restricción calórica controlada (128), ésta última es una medida de neuroprotección en la cual se altera el funcionamiento de la mitocondria para reducir la producción excesiva de ERO. No es claro hasta ahora la influencia precisa que tiene el RSV sobre la expresión de las sirtuínas, en especial la de tipo 1. Estudios previos habían señalado que la regulación al alta estaba asociada con la disminución de la patología axonal, sin embargo, recientes estudios cuestionan este punto y por el contrario argumentan que es la regulación a la baja de la expresión de la proteína la que actúa como factor de protección (25). Determinar este aspecto es complejo en la medida en que el RSV tiene la capacidad de inducir varios efectos a través de mecanismos relacionados entre sí (115).

4 Objetivos

4.1 Objetivo general

Evaluar en el hipocampo, regiones CA1 y CA3, y en la corteza frontal, áreas motora primaria y motora de las vibrisas, el efecto neuroprotector de la administración aguda y en baja dosis del resveratrol en ratas Wistar macho sometidas a traumatismo craneoencefálico mediante el modelo de impacto-aceleración por caída libre de peso.

4.2 Objetivos específicos

Evaluar el efecto del resveratrol en la condición de lesión sobre la expresión de la proteína MAP2 y la morfología de las neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo y en las cortezas motora primaria y de las vibrisas

Evaluar el efecto del resveratrol en la condición de lesión sobre la activación de las células de microglía (densidad y morfología) de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo y de las cortezas motora primaria y de las vibrisas, detectada a través de la expresión de la proteína IBA-1.

5 Metodología

Este es un estudio descriptivo y experimental, ya que pretende evaluar en un modelo in vitro el efecto del Resveratrol sobre la supervivencia neuronal y la respuesta inflamatoria en el contexto de los TCE, ambas respuestas evaluadas mediante la expresión de la proteína MAP2 y de la activación de la microglía.

5.1 Diseño experimental

5.1.1 Animales de experimentación

Para el desarrollo de esta investigación se trabajó con 15 ratas de la cepa Wistar, machos, de 3 meses de edad con peso aproximado entre 400 - 500 gramos, provenientes del Instituto Nacional de Salud. Los animales se alojaron bajo condiciones ambientales y nutricionales según establece la Ley 84 de 1989 y la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, por las cuales se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación biomédica con animales de laboratorio. El proyecto contó con la aprobación del Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia (Anexo A).

Los animales fueron alojados durante dos semanas en el laboratorio de fisiología de la Facultad de Medicina Veterinaria en cajas elaboradas en policarbonato con cubierta de acero inoxidable de 32 cm de ancho, 38 cm de largo y 18 cm de altura, en grupos de tres animales según el diseño propuesto y se mantuvieron bajo un ciclo de luz - oscuridad 12h / 12h (la luz se enciende a las 7:00 am), a una temperatura de 20 +/- 1° C a una humedad del 50 +/- 10 % y con disposición de comida *ad libitum*. La tercera semana iniciaron las sesiones experimentales que se desarrollaron durante el periodo de luz, entre las 7:00 y las 13:00 horas. Los animales se asignaron de forma aleatoria a uno de los siguientes tres grupos que se detallan a continuación:

Grupo control (C). Ratas sin tratamiento a las que les aplicó el protocolo de anestesia, la fijación del disco metálico sobre el cráneo y la disposición bajo el lesionador, pero sin que caiga el peso.

Grupo experimental trauma craneal y vehículo (EV). Ratas sometidas a protocolo de anestesia y lesión que inmediatamente fueron inyectadas en la región intraperitoneal con la solución compuesta por etanol absoluto diluido en salina fisiológica (95%) en una única dosis.

Grupo experimental trauma craneal y resveratrol (EF). Ratas a las cuales se les aplicó el protocolo de anestesia y lesión, seguido de forma inmediata por la inyección del fármaco en la región intraperitoneal en única dosis en promedio de 20mg/kg de resveratrol (Santa Cruz biotechnology inc.: sc-200808) disuelto en etanol absoluto y diluido en salina fisiológica (95%). La dosis promedio reportada en estudios previos para el mismo modelo de lesión es de 100mg/kg de resveratrol disuelto en etanol al 2% y diluido en salina fisiológica (50%) administrada en única dosis tras la lesión o en dosis reiteradas por un periodo de tiempo determinado que va desde las primeras 24 horas pos lesión hasta inclusive varios días después (131; 132; 128; 126). Teniendo en cuenta que en la actualidad se discute sobre la relación que existe entre la dosis del fármaco y la respuesta de neuroprotección, en la medida en que existen resultados que afirman que las dosis altas disminuyen la respuesta de neuroprotección (131), se decidió evaluar la respuesta de las neuronas del hipocampo y de la corteza frontal, áreas motora primaria y secundaria, a una única baja dosis del fármaco, administrada de forma aguda; de igual forma, también se redujo el tiempo de sobrevivencia tras el trauma a 8 horas, con el ánimo de analizar la acción del fármaco sobre los primeros signos del daño secundario.

Estos protocolos de fueron avalados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia.

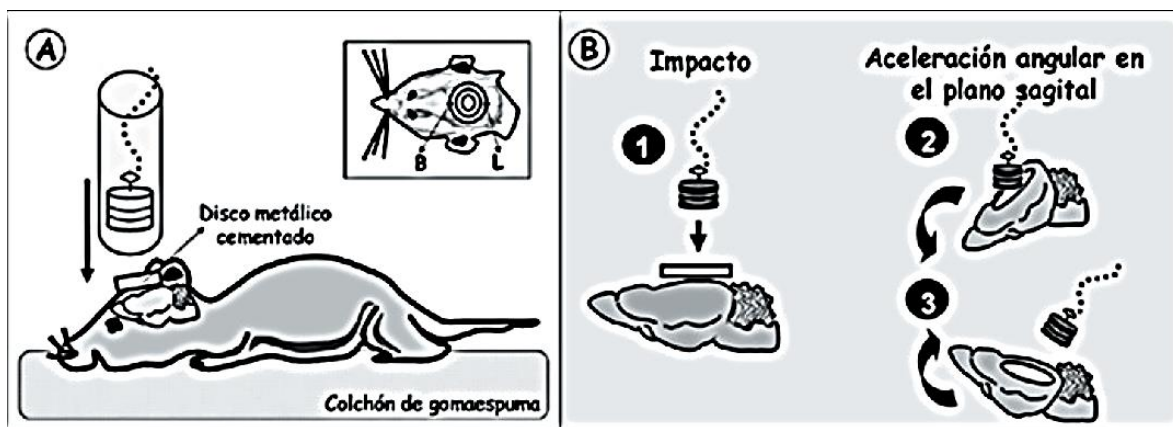
5.2 Procedimiento para inducir la lesión traumática

En el presente estudio se empleó el modelo de impacto-aceleración por caída libre de peso de Marmarou, para su correcto empleo se siguieron los pasos descritos por el autor (91). Se trata de un modelo sencillo que emplea poco tiempo y que se utiliza para reproducir

gran parte de las alteraciones fisiológicas evidenciadas en un TCE globales y cerrados, como lo son las alteraciones asociadas al daño axonal difuso (88). Consiste en dejar caer de forma libre sobre la cabeza del animal una pesa que se encuentra localizada dentro de un cilindro metálico que controla su caída y que impacta sobre un disco metálico de 10mm y 3mm de diámetro que se adhiere previamente al cráneo del animal con el ánimo de distribuir el impacto y generar una lesión difusa (89). El animal fue previamente anestesiado con isoflurano y luego dispuesto bajo el impactador. La altura desde la cual cae la pesa y el peso de la misma definen la intensidad del trauma (90), en este caso la pesa de 450 gms cae desde una altura de 1,70 metros. Dado que el objetivo era producir una lesión difusa, se siguió la recomendación de emplear una plataforma flexible, un colchón elaborado en gomaespuma con una constante de elasticidad de 4-0 tipo E. Para disminuir el riesgo de mortalidad por apnea se empleó soporte respiratorio (90).

La Figura 5-5 detalla la posición del animal, la localización del disco metálico y el peso en el modelo de impacto-aceleración por caída libre de peso de Marmarou.

Figura 5-6: Esquema detallado de la posición del animal en el modelo de lesión aceleración caída libre de peso.



Tomada de Prieto et al (2009). En A se puede apreciar la posición del animal sobre el colchón de gomaespuma, y la dirección del cilindro y la pesa, en la imagen del recuadro se aprecia la posición del disco metálico sobre la cabeza del animal. En B se observa 2 variaciones del ángulo de caída del peso sobre la cabeza del animal. En lo que respecta a ésta investigación la representación 1 es la que fue empleada.

Los animales se anestesiaron en cámara de gases con Isoflurano al 5% para la inducción y al 3% para el mantenimiento (55). Una vez alcanzado el nivel de profundidad de la anestesia, los animales fueron dispuestos en posición decúbito prono en la plataforma de goma-espuma, previa disposición del disco metálico sobre su cabeza (88). Se mantuvo al animal de con soporte respiratorio e insoflurano durante la lesión y por dos minutos tras la misma. La administración de la inyección intraperitoneal del vehículo o del fármaco, en el caso de los grupos experimentales, se realizó de forma inmediata tras la lesión.

El fármaco empleado tiene una solubilidad de 500mg en 10ml de etanol absoluto (99.6%). Se preparó una solución madre con 50mg del fármaco disuelto en 1ml de etanol, a continuación se tomó 1ml de la solución madre y se diluyó en 19ml de solución salina; entonces cada ml de la solución final contenía 2,5 mg de resveratrol en etanol al 5%. La dosis promedio calculada fue de 8ml/Kg por rata, es decir que cada rata recibió en promedio 10mg de resveratrol. A continuación la tabla N° 3 se detallan los pesos y dosis de los animales pertenecientes al grupo TR.

Tabla 5. Pesos y dosis administradas

Código	Peso del animal en gramos al día de la lesión	Dosis administrada de RSV	Dosis administrada de solución vehículo
C1	490		
C2	441		
C3	507		
C4	525		
C5	464		
TV1	510		4,08ml
TV2	570		4,56ml
TV3	444		3,552ml
TV4	422		3,376ml
TV5	413		3,304ml
TR1	441	3,528ml	
TR2	448	3,584ml	
TR3	560	4,48ml	
TR4	429	3,432ml	
TR5	486	3,888ml	

El código está compuesto por las iniciales del grupo al cual corresponde el animal seguido del número asignado dentro del grupo. **C** grupo control, **TV** grupo con lesión traumática y

solución vehículo y **TR** grupo con lesión traumática y resveratrol. En promedio se administró una dosis próxima a los 4ml por animal de la solución con el fármaco, mientras que al grupo **TV** le fue administrado un poco más de 4ml de solución vehículo compuesta por etanol absoluto diluido en salina fisiológica (95%).

5.3 Procedimiento para la fijación y extracción del tejido cerebral

Tras aplicar el protocolo de anestesia y lesión, según al grupo al que corresponde, el animal es retornado a su caja. 8 horas después los animales fueron anestesiados de manera profunda con Isoflurano al 5% para ser perfundidos transcardialmente con solución salina isotónica hasta exanguinarlos. Posteriormente se perfundieron con solución de paraformaldehído (PFA) al 4% y en solución salina tamponada con fosfatos (PBS), ph = 7,4, para fijar y posteriormente remover el cerebro rápidamente. El cerebro se almacenó en tubos falcon con PFA hasta su uso para la obtención de muestras.

5.4 Procedimiento para la obtención de muestras de tejido

Para la obtención de las muestras de tejido los cerebros fueron cortados en 4 secciones gruesas, dos de la porción anterior y dos de regiones mediales, con ayuda de los moldes plásticos para cortes en vibrátomo. Se realizó la inmersión de una sección anterior y una sección medial en PBS para proceder a cortar muestras de tejido de 30µm de espesor. Los parámetros del vibrátomo para los cortes fueron: velocidad de 4 y amplitud de 7, los primeros 3 cortes de la muestra fueron rechazados. De la porción anterior fueron evaluadas las regiones motora primaria y secundaria del lóbulo frontal (coordenadas: interaural 10.68 mm y bregma 1,68 mm) y de la porción medial para apreciar los campos CA1 y CA3 del hipocampo (coordenadas: interaural 6.00 mm y bregma -3.00 mm). Los cortes se tomaron con referencia en las figuras 13 y 58 del atlas de coordenadas estereotaxicas de Paxinos y Watson, sexta edición (Ver figuras 5-6 y 5-7). Los cortes seriados se almacenaron en tubos de eppendorf de 2ml con solución anticongelante preparada con PB, agua destilada, sacarosa y etilenglicol, hasta su utilización.

Figura 5-7: Corte coronal empleado como guía para la obtención de muestras de tejido del lóbulo frontal.

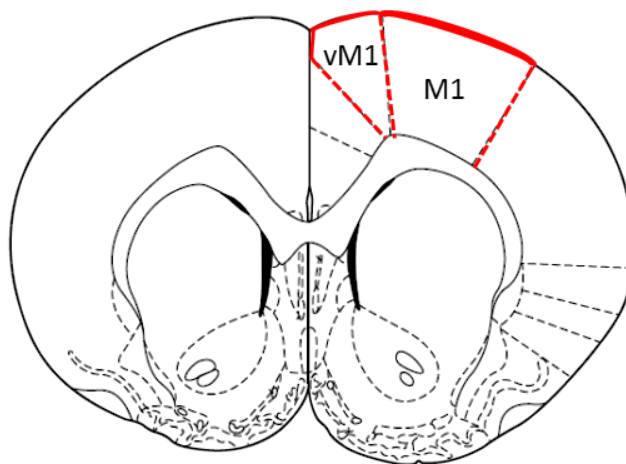


Figura tomada del Atlas de coordenadas estereotáxicas de cerebro de rata de George Paxinos y Charles Watson, sexta edición. Delimitadas en rojo las áreas corticales de interés, el área motora primaria (M1) y el área motora de las vibrisas (vM1).

Figura 5-8: Corte sagital empleado como guía para obtener las muestras de hipocampo.

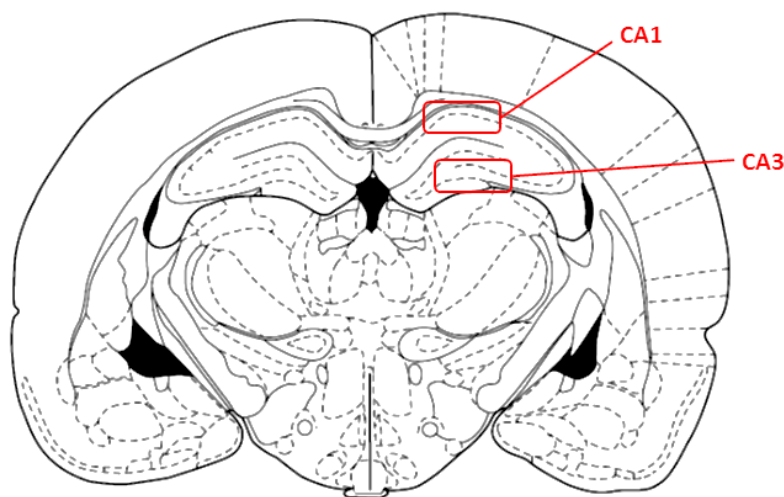


Figura 58 del Atlas de coordenadas estereotáxicas de cerebro de rata de George Paxinos y Charles Watson, sexta edición. Delimitadas en rojo el hipocampo, los campos CA1 y CA3 son las regiones de interés.

5.5 Protocolo de Inmunohistoquímica

Para ésta investigación se evaluó la expresión de la proteína MAP2 y la proteína de unión a calcio con el anticuerpo Iba-1 para determinar la actividad de la microglía. A continuación se presenta referencia a la acción de las proteínas a evaluar. Los microtúbulos son componentes del citoesqueleto, estructuras que permiten el tránsito celular y brindan soporte estructural a la célula (84). Las proteínas asociadas a los microtúbulos (Tau, MAP2) permiten las modificaciones a la estructura y funcionamiento de los mismos. MAP2 forman parte de una familia de proteínas termoestables que participan en la morfogénesis neuronal, mantenimiento de la arquitectura celular, organización interna, división celular y otros procesos (85). Frente a un TCE se incrementa la fosforilación y degradación proteolítica de MAP2 principalmente en el soma y en las dendritas (86).

El estudio realizado por Riascos y colaboradores (2008) de la Universidad del Valle, mediante la aplicación de la técnica de cultivo organotípico, permitió observar respuestas histopatológicas diversas en el tejido lesionado y en las proximidades al mismo, cambios referentes a la organización de las proteínas del citoesqueleto, en virtud de las variaciones en los procesos apicales implicados en los patrones de conectividad (41). La investigación se realizó con tejido de la corteza cerebral de 6 pacientes con diagnóstico de TCE severo a los cuales les fue practicada craniectomía descompresiva. Los cambios reportados se relacionan con la pérdida de la inmunorreactividad tanto en NeuN como en MAP2, es decir cambios en el marcador neuronal como en los microtúbulos, éste compromiso fue mayor en las capas supragranulares, con preservación de las láminas corticales. La expresión de NeuN en el tejido contuso se apreció disminuida y fragmentada en el núcleo, fenómeno predominante en la capa III; por otra parte, la intensidad de la marcación de MAP2 disminuyó y se fragmentó. La pérdida de la inmunorreactividad fue heterogénea en relación a la zona focal de la lesión y a las zonas proximales al mismo.

En relación a la activación de la microglía en TCE no está claro si su activación promueve la supervivencia neuronal o si exacerba el daño en la célula (46). El incremento y proliferación en la actividad microglial se debe a la secreción de TNF- α , cuya expresión incrementa rápidamente pocas horas tras la lesión. Las células microgliales continúan expresando TNF- α como parte del mantenimiento y amplificación de la cascada

inflamatoria 2 – 5 días después de la injuria (47). Ésta es una vía de intervención que ha sido estudiada mediante el uso de fármacos encontrando respuesta favorable.

Para evaluar la expresión de las proteínas los cortes fueron dejados 30 minutos antes en Buffer Fosfato Salino (PBS). Para evaluar la expresión de MAP2 se realizaron 4 lavados en PBS por 3 minutos cada uno, se permeabilizó el tejido con PBS más 0,5% de tritón X100 y luego se lavó 2 veces el tejido por 8 minutos cada una. Para el bloqueo de la peroxidasa endógena se sumergió el tejido por 20 minutos en una solución compuesta por de agua destilada, PB 2x, etanol y peróxido de hidrógeno. Se lavó el tejido 2 veces por 10 minutos en PBS. El tejido fue equilibrado con PBS más 0,5% de tritón X100 y se bloquearon las uniones inespecíficas del anticuerpo primario con PBS más 0,5% de tritón, gelatina de piel de cerdo y suero fetal bovino, durante una hora. Las muestras fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario contra MAP2 (Abcam, Rabbit Policlonal Antibody, ab32454) diluido en la solución de bloqueo a una concentración de 1:700. Se lavó el exceso de anticuerpo primario con PBS más 0,5% de tritón X100, luego las muestras fueron incubadas con el anticuerpo secundario goat anti-rabbit IgG biotinilado (Kit ABC Vectastain goat anti-Rabbit IgG K-4001) diluido en la solución de bloqueo por una hora. El revelado se realizó con DAB (Kit DAB Vector Sk 4100). Las muestras se lavaron en PBS, se montaron en láminas cargadas y se deshidrataron en alcoholes de concentración creciente. Las muestras se cubrieron con láminas cubre objetos y se usó como medio de montaje Entelan diluido en Xilol.

Para la marcación de la microglía se empleó el siguiente protocolo desarrollado por el grupo de neurociencias de la Universidad de Antioquia:

Se lavaron las muestras en PB 0,1M 5 veces por 5 minutos, luego se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena con solución de PB 0,1M, agua destilada y Metanol, se repitió el lavado inicial y se bloquearon las uniones inespecíficas con la solución de bloqueo compuesta por: PB 0,1M, Gelatina de piel de cerdo, suero fetal bovino, y tritón X100. Se empleó como anticuerpo primario anti Iba -1 Rabbit (Wako: 019-19741), que reconoce la proteína de unión a Calcio, diluido en la solución de bloqueo a una concentración de 1:1000 durante toda la noche a 4°C. Las muestras fueron lavadas en PB 0,1M 4 veces por 5 minutos y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario goat anti-rabbit IgG biotinilado (Kit ABC Vectastain gota anti-Rabbit IgG K-4001) durante 2 horas. Se lavó el exceso de anticuerpo secundario con PB 0,1M y se incubó por 2 horas en la solución ABC.

Finalmente, las muestras fueron lavadas y se procedió al revelado con DAB. Las muestras se montaron en láminas cargadas y se realizó una contra tinción con violeta de cresilo. Las muestras se cubrieron con láminas cubre objetos y se usó como medio de montaje Entenal diluido en Xilol.

Para la captura de las microfotografías se empleó el microscopio óptico (Microscopio Axioskop 40 marca Zeiss) y la cámara Canon Power Shot G10. Se capturaron microfotografías digitales con una magnificación de 5X, 10X y 40X. Los parámetros para determinar la densidad óptica de MAP2 fueron:

Ajuste de tamaño: Alto: 640 y Ancho: 8538 bits

Selección de muestra: 120 por 550B&C: 131 y 167

El análisis de las imágenes se realizó mediante el software de procesamiento y análisis de imágenes digitales Image J, programa desarrollado por el Instituto Nacional de Salud Mental de Estados Unidos, que permite, a partir de la reconstrucción tridimensional, cuantificar y obtener los datos de carácter morfométrico y densiométrico.

5.6 Análisis estadístico

Para el procesamiento de los datos obtenidos se usó el paquete estadístico SPSS versión 20, mediante el cual se realizó el análisis de varianza (ANOVA), las pruebas *t* planeadas y el análisis de corrección y comparaciones múltiples Bonferroni. Todos los datos se presentan como promedio +/-SD o SEM según sea el caso. Se determinó el tamaño del efecto a través del cálculo de la *d* de Cohens.

6 Resultados

En este capítulo se presentan los cambios asociados a la lesión y el impacto del fármaco sobre los mismos. Se relacionan los resultados obtenidos por cada grupo sobre: 1) las variaciones en inmunorreactividad de la proteína MAP2; 2) las alteraciones morfológicas de las neuronas piramidales; y 3) los cambios asociados al proceso de activación de las células de microglía. Inicialmente se muestran los cambios en las regiones hipocámpicas, CA1 y CA3, y posteriormente en las áreas corticales, motora primaria y motora de las vibrisas.

Los cambios en la expresión de la proteína MAP2 se determinaron mediante el cálculo de las unidades de densidad óptica y se analizó la intensidad y uniformidad en la marcación sobre las neuronas y los procesos dendríticos. Para la evaluación de la integridad y orientación de los procesos de las células piramidales se tuvo en cuenta el reporte previo que señala que tras el TCE éstos se aprecian tortuosos, edematosos, interrumpidos (fragmentación) y orientados en forma oblicua y no vertical (28).

Con base en los reportes previos sobre vulnerabilidad a la lesión traumática se eligieron las áreas corticales y regiones hipocámpicas para análisis. Se escogió trabajar con el lóbulo frontal porque con frecuencia se encuentra comprometido en las lesiones traumáticas de humanos (133).

Para el análisis de los cambios en la respuesta de activación de las células de microglía se tuvieron en cuenta los criterios definidos por Loncarevic-Vasiljkovic y colaboradores (2012): densidad, longitud de los procesos, tamaño y forma del soma. Los autores describieron que en estado de reposo de las células de la microglía presentan ramificaciones con procesos extensos y finos, y un soma alargado. La activación moderada se evidencia por un discreto incremento en el número de células, acortamiento de los procesos y engrosamiento del soma; mientras que en la activación intensificada

incrementa la densidad de células de forma significativa y los cuerpos celulares toman una forma amebode o redondeada con una marcada retracción de los procesos (3).

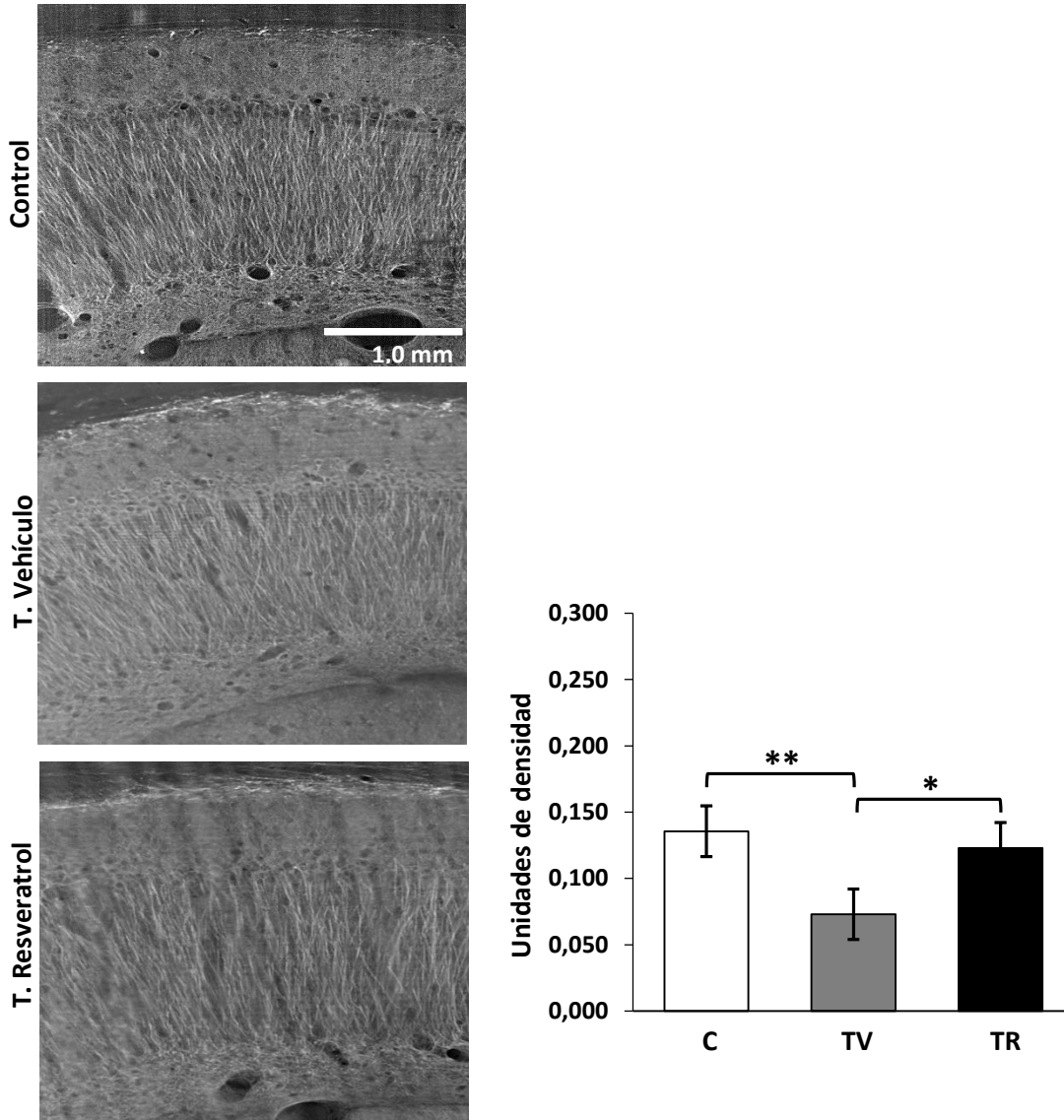
Para establecer la significancia de las diferencias en cada uno de los aspectos evaluados se realizaron pruebas *t* de *Student* planeadas con una distribución de dos colas. Se realizó una ANOVA de dos vías y un *pos hoc* Bonferroni para el análisis de las comparaciones múltiples intra e inter grupos. También se realizó el cálculo de la *d* de Cohen para estimar el tamaño del efecto, entendido este como el grado de generalidad del resultado que indica que existe una diferencia significativa entre determinados grupos (134).

6.1 Inmunorreactividad de la proteína MAP2 en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo

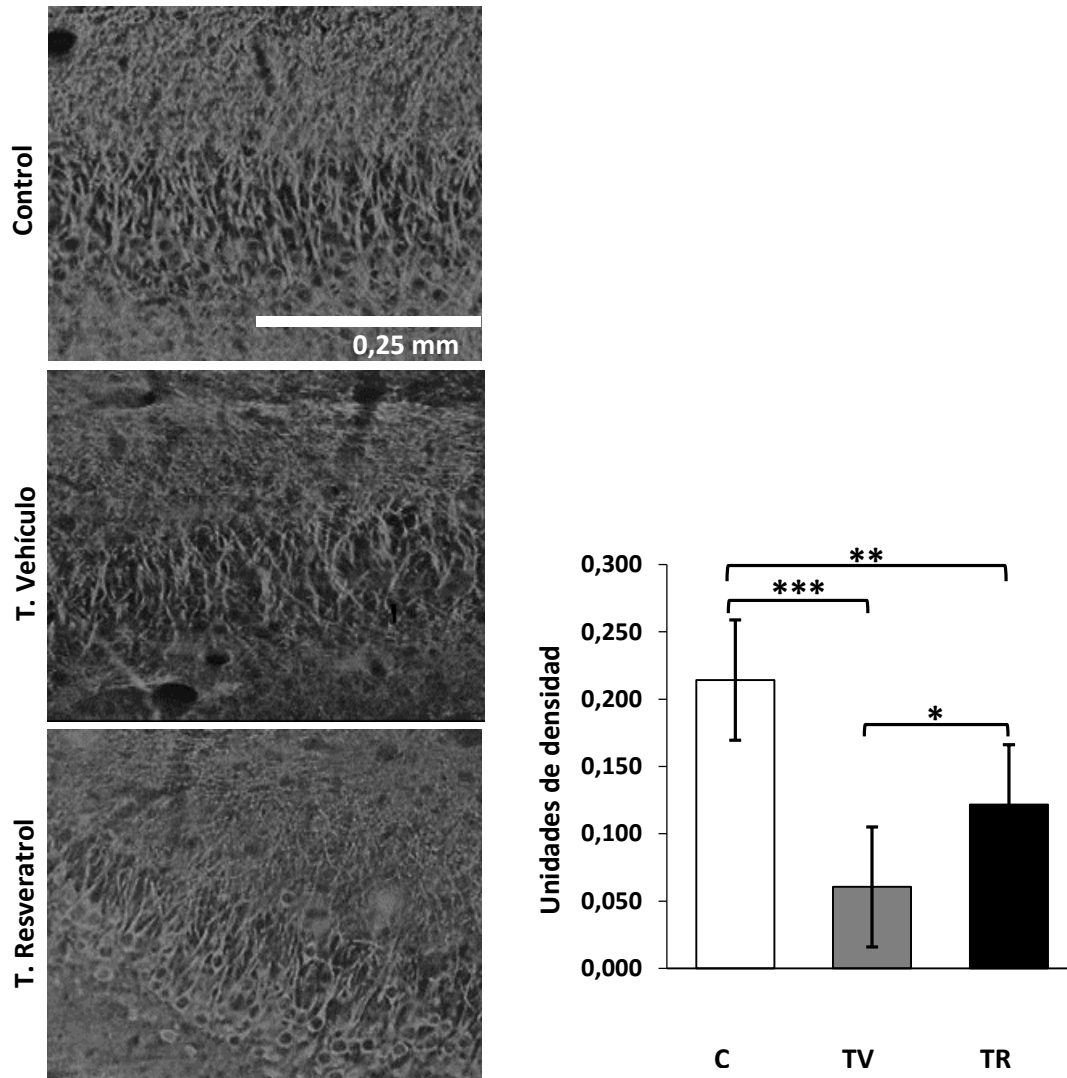
En la Figura 6-8 y 6-9 se aprecia que la lesión traumática induce un descenso significativo de la IR de la proteína MAP2 en ambas regiones, pero es evidente que la pérdida de la IR en la región CA3 ($P < 0,000$) es mayor a la registrada en la región CA1 ($P < 0,009$). La administración de la dosis de RSV logra atenuar la respuesta en ambas regiones. El efecto de la inyección del RSV es más evidente en la región CA3 ($P < 0,025$) que en CA1 ($P < 0,05$). En síntesis, se encontró que la región CA3 presenta mayor vulnerabilidad que la región CA1 en relación con la pérdida de IR de la proteína por efecto de la lesión traumática, y la alteración en ambas regiones es atenuada de forma significativa por la administración del fármaco.

Figura 6-9: Inmunorreactividad de MAP2 en la región CA1

La figura podrá verse en la siguiente página.



Micrografías tomadas a 10X con zoom digital de 1,8. La gráfica de barras presenta el promedio de la cuantificación por unidades de densidad de la expresión de la proteína MAP2 en la región CA1 del hipocampo. Se presenta la media y el error estándar por grupo; se asumió un $*P < 0.05$. Puede apreciarse que la lesión induce un descenso muy significativo de la inmunoreactividad de la proteína ($P < 0,009$), indicando un grave compromiso de las neuronas piramidales; por otra parte, esta respuesta se ve atenuada por la administración aguda del resveratrol de forma significativa ($P < 0,050$), posiblemente ello indique que las neuronas tengan un compromiso menor y en virtud de ello una mejor funcionalidad.

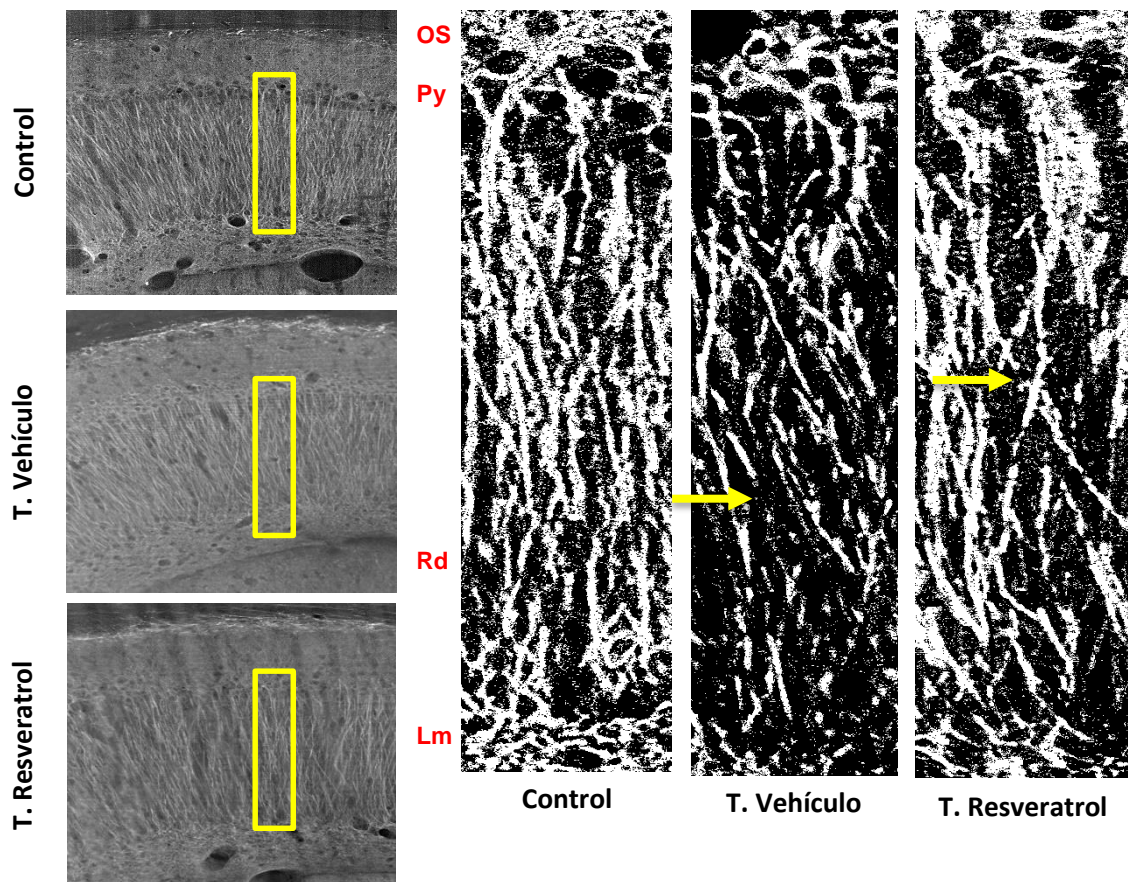
Figura 6-10: Cambios en la inmunorreactividad de MAP2 en la región CA3.

Micrografías tomadas a 10X con zoom digital de 1,8. La gráfica de barras presenta el promedio de la cuantificación por unidades de densidad de la expresión de la proteína MAP2 en la región CA1 del hipocampo. Se presenta la media y el error estándar por grupo; se asumió un $*P < 0.05$. El descenso de la IR de la proteína es muy significativo ($P < 0,000$) y mucho más dramático que lo observado en el campo CA1, ello indica que CA3 es más vulnerable a la lesión, no obstante la administración del fármaco logra que dicha respuesta tenga un menor impacto. La dosis administrada de RSV logra atenuar de forma muy significativa ($P < 0,025$) la disrupción del citoesqueleto en CA3, con tal impacto que la respuesta alcanza niveles similares a los registrados en el grupo control.

6.2 Cambios morfológicos en las neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3 tras la lesión y el efecto de la administración del fármaco.

A continuación se evaluaron los cambios morfológicos de las neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3 tras la lesión, y el efecto que la administración del fármaco pudiera tener sobre los mismos. En la Figura 6-10 se aprecia la disposición de las neuronas piramidales de la región CA1. En el grupo control puede verse que las células son más abundantes, la marcación de la proteína es más intensa y homogénea, delimitando claramente somas y terminales dendríticas. La imagen ampliada de una porción de la región permite apreciar la orientación e integridad de los procesos dendríticos en el grupo control y las alteraciones en los mismos en los grupos con trauma.

Figura 6-11: Morfología de las células piramidales de la región CA1, los cambios inducidos por la lesión y el efecto del fármaco.

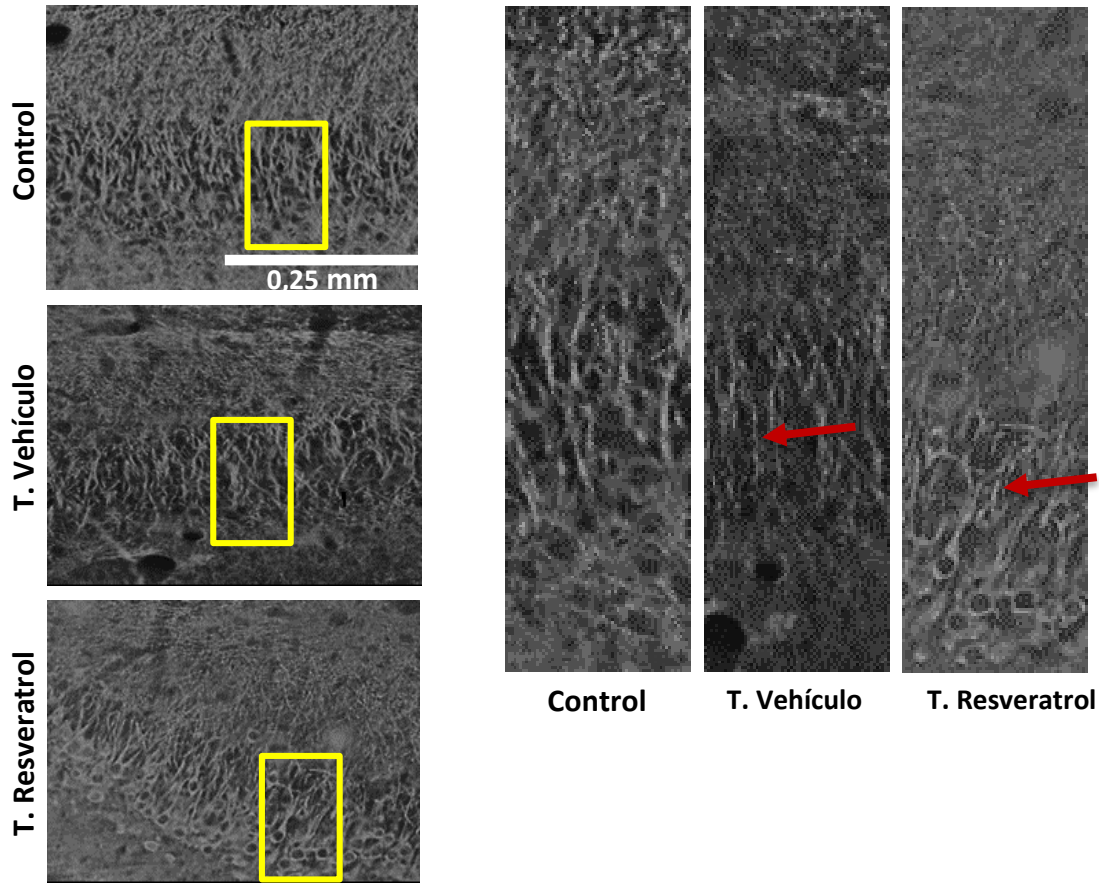


A la izquierda las micrografías tomadas a 10X y zoom digital de 1,8 de las muestras de tejido de los grupos control, trauma vehículo y trauma resveratrol. En amarillo se delimitó la región a la cual corresponde cada una de las imágenes de la derecha. El tratamiento de las imágenes se realizó con la ayuda del *software Image J*. Se aprecian secciones de las muestras anteriores aumentadas con zoom digital e inversión de color (250 ancho x 1300 largo). Se encuentran las secciones de cada grupo y se dispuso al lado la organización laminar de las células de dicha región (**OS**: *Estratum Oriens*, **Py**: *Piramidal*, **Rd**: *Radial* y **MI**: *Lacunosum Molecular*).

En la condición de lesión los procesos se fragmentan (flechas), se observa tortuosidad y cambios en la orientación, de vertical a oblicua. Estos cambios fueron evidenciados principalmente en el *radiatum* de las muestras de los grupos con lesión traumática. En este aspecto la acción del RSV no se evidencia.

Figura 6-12: Morfología de las células piramidales de la región CA3, los cambios inducidos por la lesión y el efecto del fármaco.

La figura podrá verse en la página siguiente.



En la Figura 6-11 se observan los cambios morfológicos pos-lesión de las neuronas piramidales de la región CA3. A la izquierda las micrografías tomadas a 10X y zoom digital de 1,8 de las muestras de tejido de cada grupo. A la derecha se aprecian secciones de las muestras anteriores aumentadas con zoom digital e inversión de color lograda con la ayuda del programa *image J* (65 ancho 235 alto).

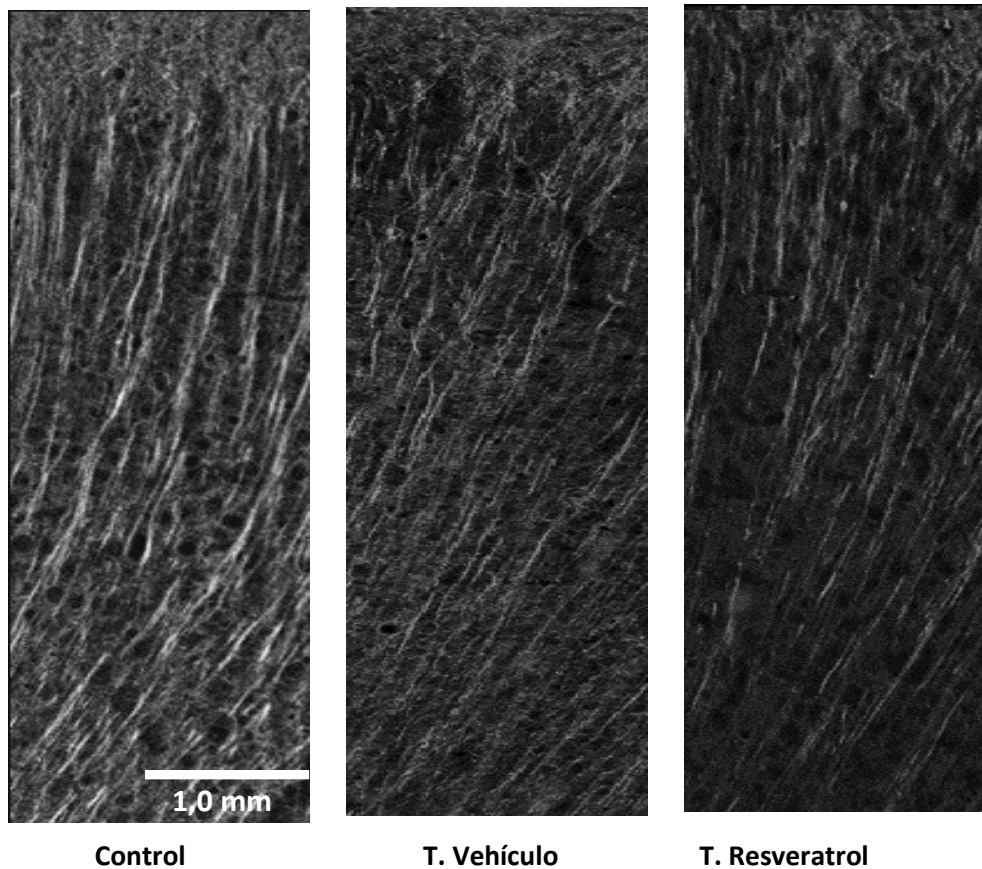
En CA3 la marcación de la proteína es mucho más intensa en el grupo control donde se aprecia un número abundante de células. La lesión traumática redujo drásticamente la intensidad de la marcación, ello relacionado con las alteraciones del citoesqueleto. Se observa que la lesión alteró la integridad de los procesos dendríticos e indujo se observa tortuosidad en los procesos, señalada con la flecha roja, efecto mayormente presentado en la muestra del grupo con trauma y solución vehículo. Sin embargo, el RSV no atenuó los cambios observados y se observan células con los núcleos y somas delimitados y en menor magnitud se aprecian procesos tortuosos.

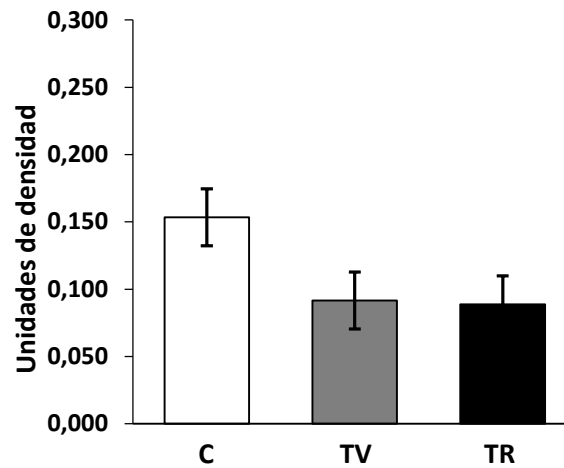
Los cambios morfológicos de los procesos se acompañan de la reducción de la IR de la proteína como consecuencia de la lesión traumática, y éstos mismos no logran ser atenuados por la administración del RSV.

6.3 Inmunorreactividad de la proteína MAP2 en las áreas M1 y vM1 del córtex frontal

La IR de la proteína MAP2 tras la lesión traumática desciende. Dicho descenso alcanza valores estadísticamente significativos en el área vM1 ($P < 0,002$), área en donde la inyección del fármaco atenuó de forma significativa la respuesta ($P < 0,048$). Los resultados del ANOVA y la comparación entre grupos permiten apreciar que la respuesta es muy heterogénea entre las áreas analizadas.

Figura 6-13: Inmunorreactividad de la proteína MAP2 en M1.

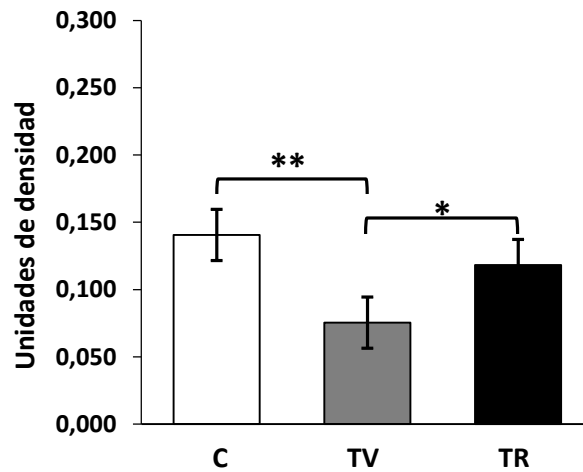
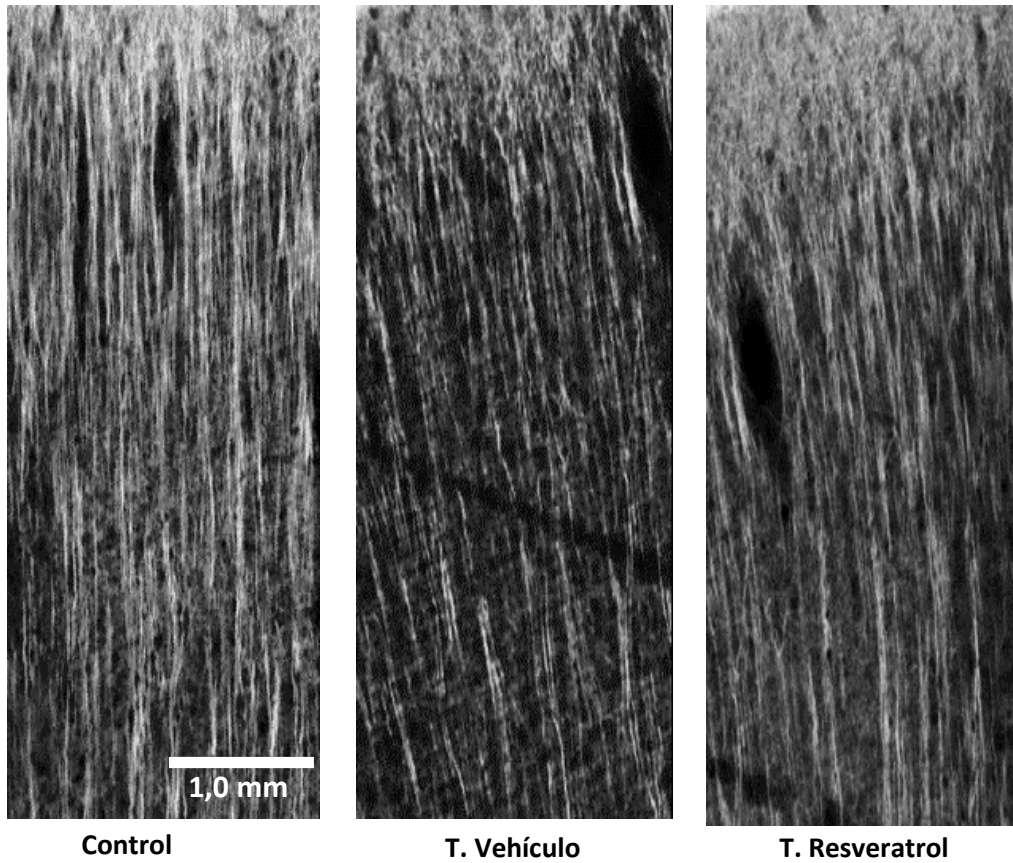




En la página anterior se aprecian las micrografías tomadas a 40X y zoom digital de 2,8. La gráfica de barras presenta el promedio de la cuantificación por unidades de densidad de la expresión de la proteína MAP2 en la corteza M1. Se presenta la media y el error estándar por grupo; se asumió un $*P < 0.05$. En ausencia de lesión la IR de la proteína en las neuronas piramidales de la corteza M1 presenta mayor intensidad. La lesión induce un descenso en la IR de la proteína, señalizando el daño que ha sufrido la estructura de las neuronas. Dicho descenso no es estadísticamente significativo y no es atenuado por la administración del fármaco.

Figura 6-14: Inmunorreactividad de la proteína MAP2 en vM1

La figura podrá verse en la página siguiente.



En la parte superior se aprecian las micrografías tomadas a 40X y zoom digital de 2,8. La gráfica de barras presenta el promedio de la cuantificación por unidades de densidad de la expresión de la proteína MAP2 en la corteza vM1. Puede observarse un descenso muy significativo de la intensidad de la marcación ante la lesión propinada al animal ($P < 0,002$).

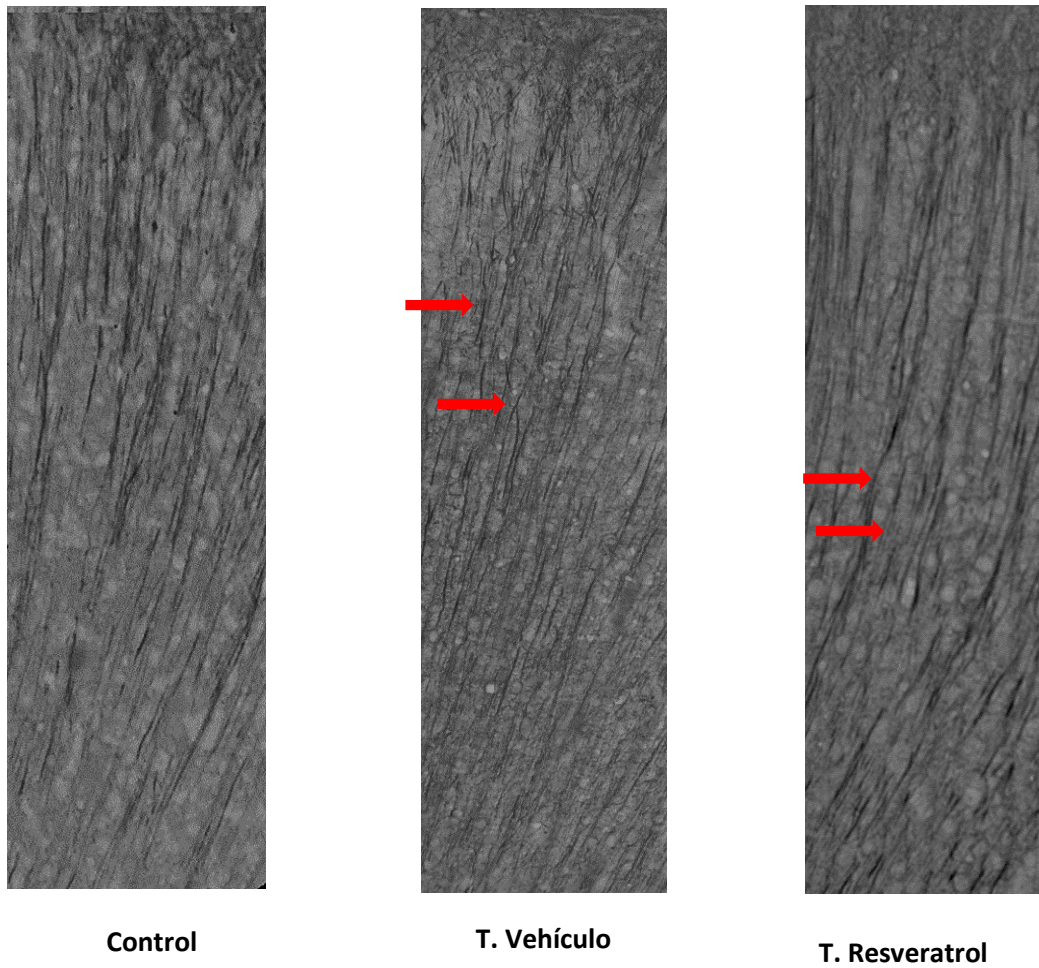
De la misma forma, como había acontecido con la región CA3, la administración del RSV atenúa de forma significativa la respuesta ($P < 0,048$). La expresión de la proteína en la condición de lesión y RSV se aproxima a los valores encontrados en el grupo control.

6.4 Cambios morfológicos en las neuronas piramidales de las regiones M1 y vM1 tras la lesión y el efecto de la administración del fármaco.

En la Figura 6-14 se observa la morfología de las neuronas piramidales del área M1 sin lesión y después de la inducción de la lesión traumática en las condiciones vehículo y RSV. En el grupo control la marcación de la proteína es más intensa, mientras que en los grupos experimentales, vehículo y fármaco, la intensidad desciende y los procesos dendríticos aparecen tortuosos y fragmentados sin que el fármaco atenúe de forma significativa dichos cambios. Los cambios encontrados corresponden con los reportes previos, es decir, cambios en la integridad de los procesos tortuosidad (27). En la Figura 6-14 se presentan micrografías que dan cuenta de las alteraciones morfológicas pos-lesión y el efecto del fármaco en el área M1; mientras que en la Figura 6-15 se presentan los resultados encontrados en el área vM1.

Figura 6-15: Morfología de las células piramidales del córtex M1, los cambios inducidos por la lesión y el efecto del fármaco.

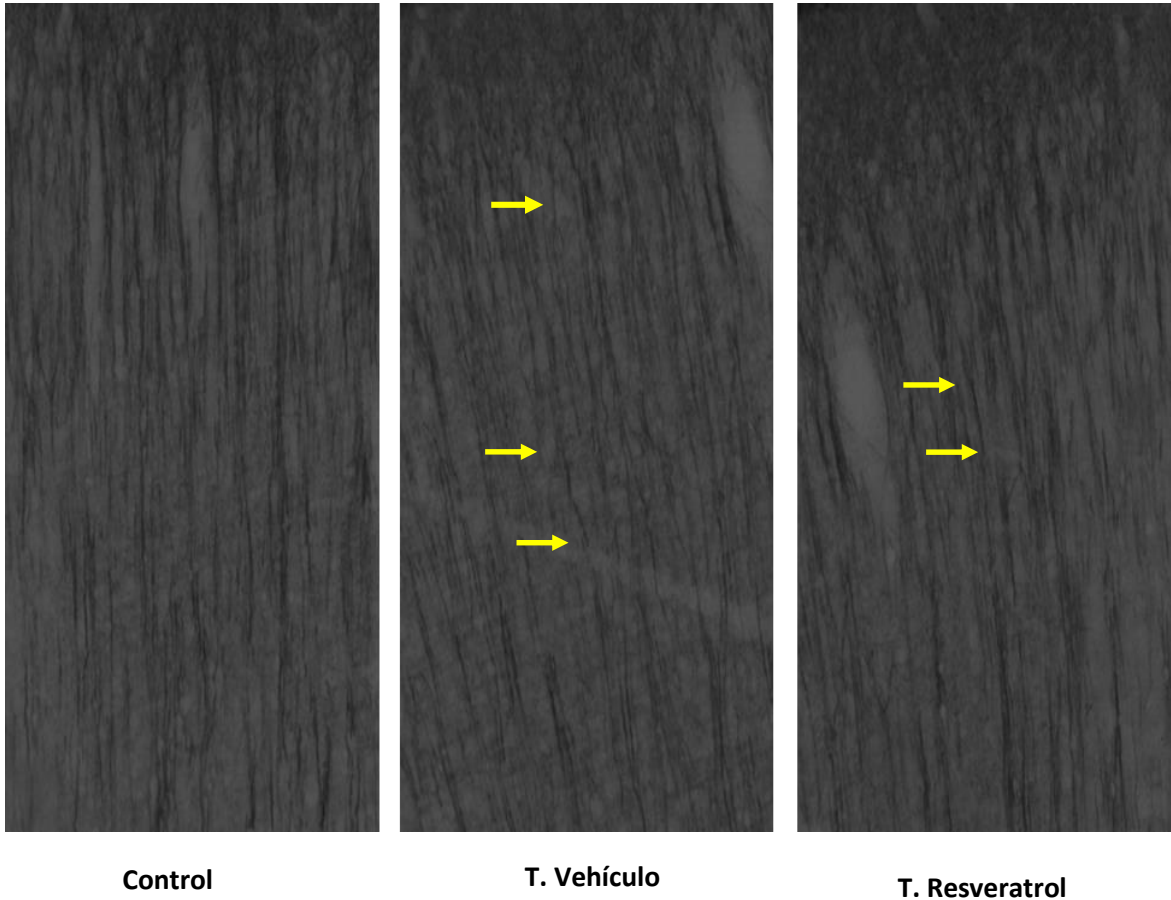
Las imágenes podrán observarse en la página siguiente.



Todas las imágenes fueron tomadas a 40X y zoom digital de 2,2. Se observan cambios en la intensidad de la marcación, y en la integridad y orientación de los procesos dendríticos. Se observa mayor número de procesos tortuosos o fragmentados en la condición experimental vehículo que en la condición fármaco.

Figura 6-16: Morfología de las células piramidales del córtex vM1, los cambios inducidos por la lesión y el efecto del fármaco.

La imagen podrá verse en la página siguiente.



Todas las imágenes fueron tomadas a 10X y zoom digital de 2.2. La primera micrografía corresponde a una muestra representativa del grupo control, en ella se aprecia mayor intensidad de la marcación de la proteína, intensidad que disminuye en la muestra de los grupos lesionados, particularmente en el grupo inyectado con la solución vehículo el descenso es más evidente, mientras que hay una leve recuperación en la muestra del grupo lesionado e inyectado con el fármaco. Se aprecian como signos característicos la pérdida de la orientación, tortuosidad y fraccionamiento de los procesos, señalados por las flechas amarillas. En ausencia de lesión los procesos se orientan de forma vertical, son continuos y la IR de la proteína permite que se aprecien con mayor claridad. A comparación de los signos característicos del córtex motor primario, en vM1 la pérdida de la IR de la proteína es más significativa en algunos sectores, siendo mucho más evidente el cambio en la condición de fármaco que en la condición de vehículo; en esta última el signo más evidente es la tortuosidad y la pérdida de la orientación.

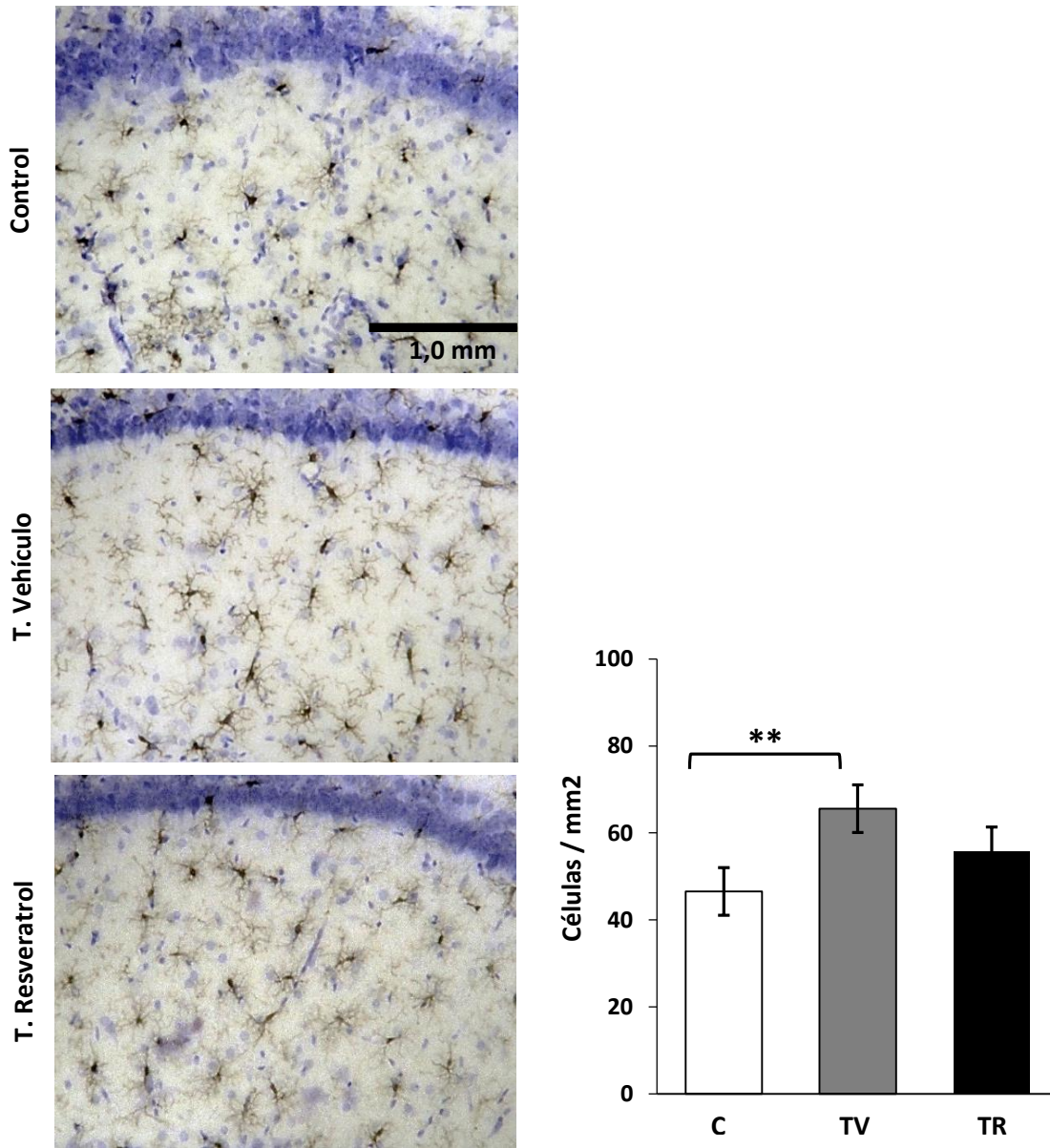
6.5 Densidad y morfología de las células de microglía de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo

Como se refirió anteriormente, tras la lesión traumática un número de células de microglía son atraídas al lugar de la lesión, incrementando así la densidad de las mismas. Mientras que las células residentes rápidamente manifiestan cambios en la longitud de sus procesos y tamaño del soma. Se presentan inicialmente los cambios en la densidad de células y posteriormente se abordarán las alteraciones en la morfología de las células: longitud de los procesos y tamaño del soma.

6.5.1 Densidad de células de microglía en las regiones CA1 y CA3, cambios pos-lesión y efecto del fármaco

En la Figura 6-16 se presenta la densidad de células de microglía registrada en CA1; mientras que en la Figura 6-17 se aprecia la misma respuesta pero en CA3. En las muestras que corresponden a los controles la densidad de células es menor a la registrada en las condiciones experimentales vehículo y fármaco. En ambas regiones se observa incremento en la densidad de células, siendo estadísticamente significativo únicamente en CA1 ($P < 0,004$). El fármaco parece afectar el proceso de reclutamiento de células, pues se aprecia un descenso en la densidad en comparación con el grupo inyectado con la solución vehículo, no obstante el cambio no es estadísticamente significativo. Al comparar las regiones se observa que la región CA3 está más densamente poblada antes de la inducción de la lesión, de igual forma como se verá más adelante la morfología de las células también difiere un poco entre las regiones analizadas.

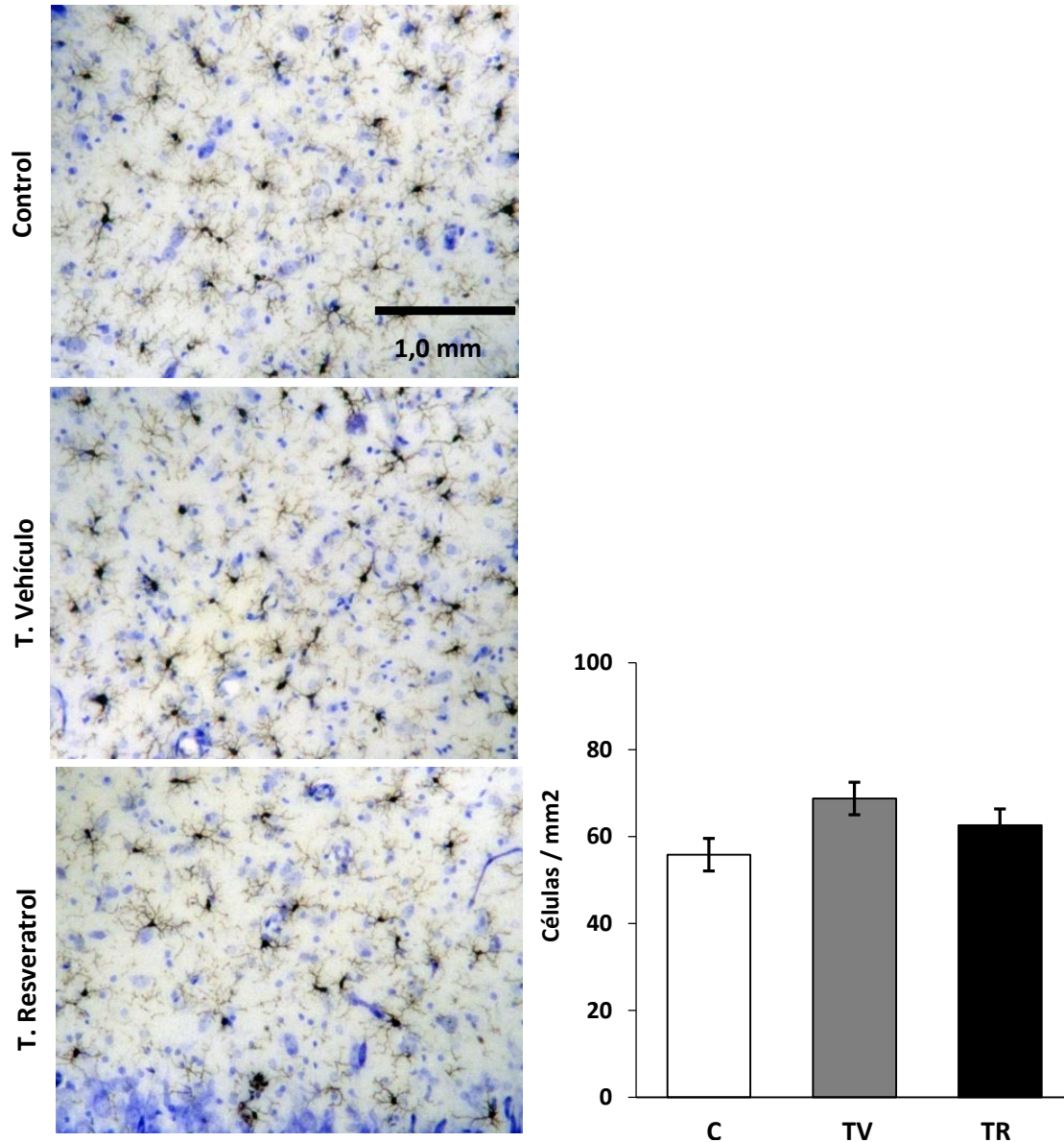
Los cambios en la densidad de las células de microglía pueden apreciarse en la página siguientes en la figura 6-16. La imagen puede apreciarse en la página siguiente.

Figura 6-17: Densidad de las células microgliales en los campos CA1

A la izquierda: micrografías tomadas a 10X y zoom digital de 2,8. A la derecha: gráfica de barra con los valores promedio de la cuantificación de las células de microglía en las muestras analizadas por grupo. Se presenta la media y el error estándar por grupo; se asumió un $*P < 0.05$. En café se encuentran las células de microglía marcadas con el anticuerpo Iba-1, en violeta están los núcleos de distintas células, evidentes a través del proceso de contratinción con violeta de cresilo. En la región CA3 del hipocampo se evidencia un rápido y significativo incremento del número de células de microglía ($P <$

0,004), atraídas hasta allá por las señales emitidas por parte de los factores proinflamatorios liberados. La administración del RSV tiene un efecto parcial.

Figura 6-18: Densidad de las células microgliales en los campos CA3



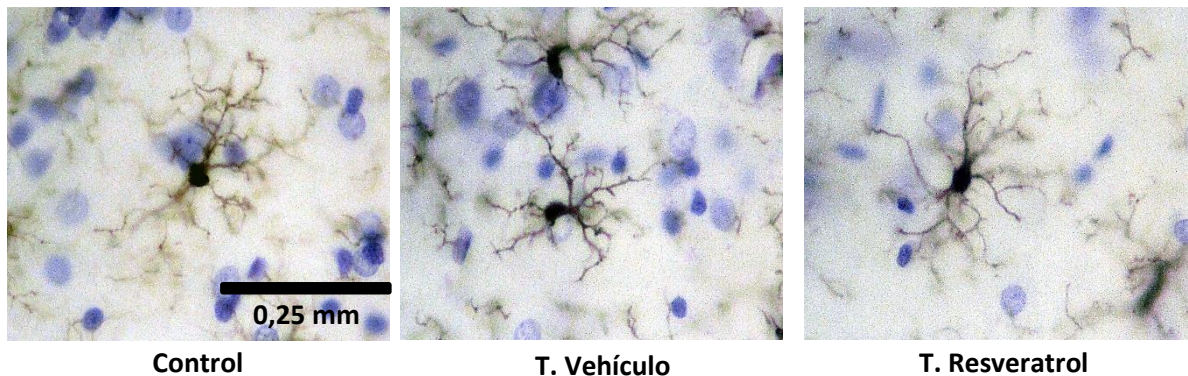
Micrografías tomadas a 10X y zoom digital de 2,8 del campo CA3. Se presenta el promedio del cálculo de la densidad de células de microglía por mm² encontradas en cada una de las muestras por grupo; se asumió un $*P < 0.05$. Se observan diferencias en la densidad

de células previo a la lesión, hay un incremento estadísticamente no significativo. En ausencia de lesión la región CA3 presenta una mayor cantidad de células de microglía, con procesos más prominentes. En condición de lesión el reclutamiento de células es menor a las ocho horas de la lesión y la administración del fármaco presenta un efecto parcial. CA1 y CA3 presentan una respuesta distinta en relación a la migración de células de microglía.

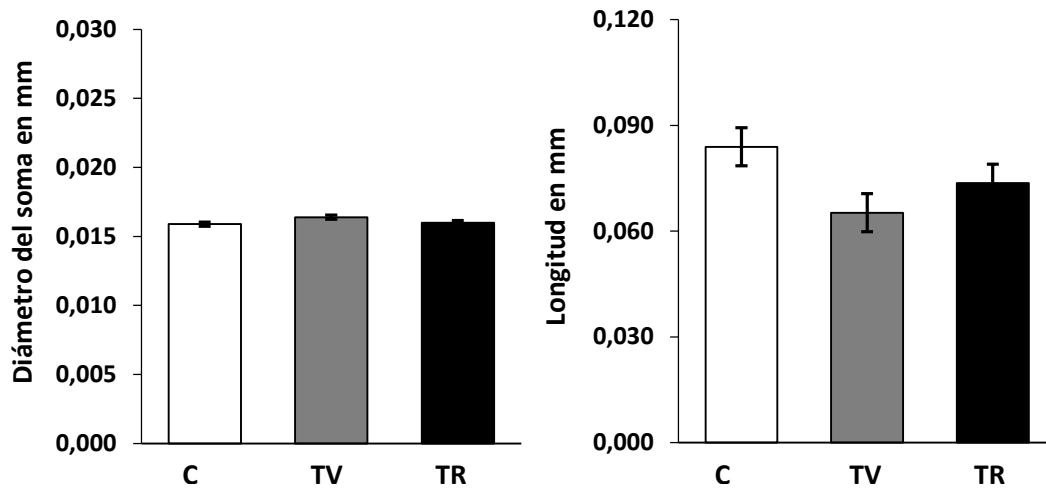
6.5.2 Longitud de los procesos de la microglía en las áreas CA1 y CA3, cambios pos-lesión y efecto del fármaco

En ausencia de lesión los procesos de las células de microglía usualmente se observan largos, finos y prominentes. De acuerdo con reportes previos, la lesión traumática induce retracción de los procesos, disminución en el número de ramificaciones y agrandamiento del soma. En la Figura 6-18 se presenta la longitud promedio de los procesos de las células de microglía registrados en el grupo control y en los grupos experimental vehículo y fármaco. En la región CA3 se encontró una disminución estadísticamente significativa de la longitud de los procesos ($P < 0,000$), respuesta que fue atenuada por la administración del fármaco ($P < 0,046$).

Figura 6-19: Longitud de los procesos y diámetro del soma de las células microgliales de la región CA1



En la página siguiente podrán observarse las gráficas con los resultados y el nivel de significancia de los mismos.

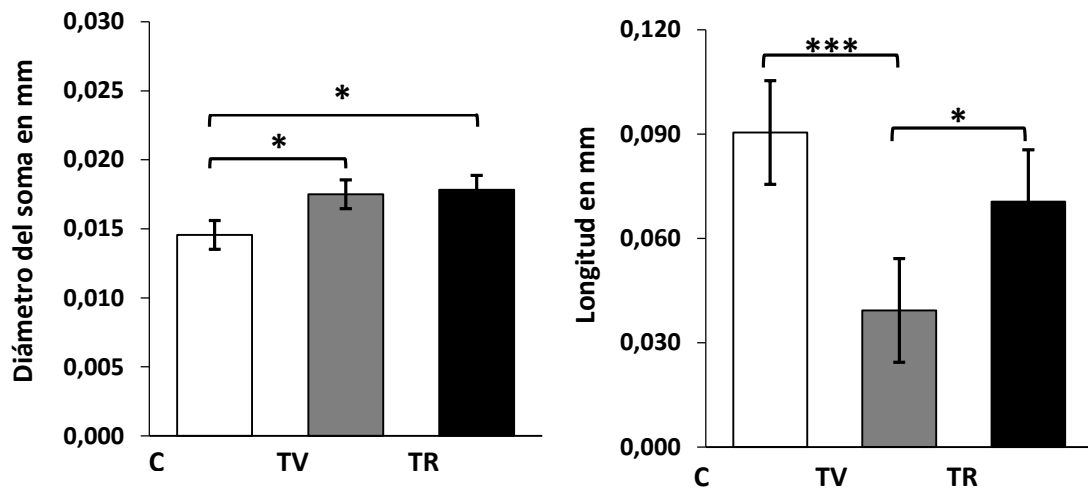
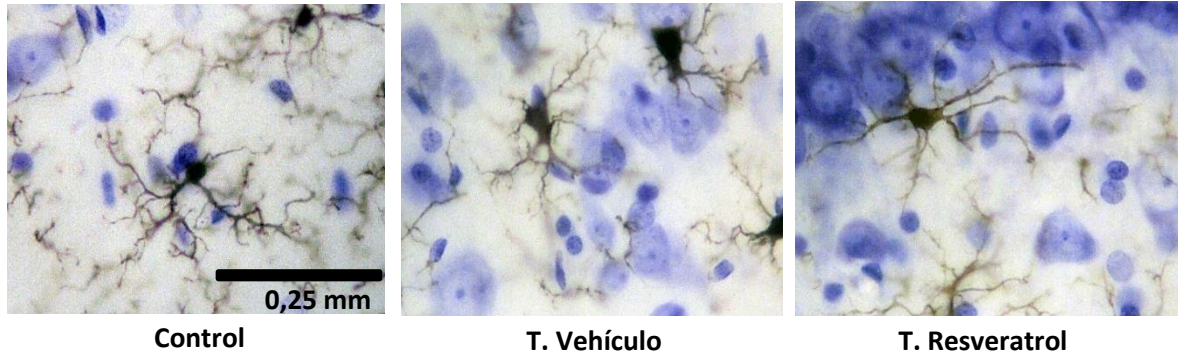


En página anterior se encuentran las micrografías tomadas a 40X y zoom digital de 2,8. La gráfica de barra refleja el promedio del resultado de la medición de la longitud de los procesos y del diámetro del soma de las células de microglía en cada grupo. Para cada caso se presenta la media y el error estándar por grupo; se asumió un $*P < 0.05$.

En CA1 se encuentran células de microglía con un soma redondeado, múltiples y finas ramificaciones. Los cambios evidenciados en la longitud de las ramificaciones por efecto de la lesión, no es estadísticamente significativo, pero parece estar parcialmente afectado por la administración del RSV. En relación al incremento del diámetro del soma, la respuesta no fue estadísticamente significativa tras la lesión. En CA3, como se verá a continuación, los cambios morfológicos son más evidentes y estadísticamente significativos.

Figura 6-20: Longitud de los procesos y diámetro del soma de las células microgliales de la región CA3.

La figura podrá observarse en la página siguiente.



Micrografías tomadas a 40X y zoom digital de 2,8. La gráfica de barra contiene la media y el error estándar por cada grupo; se asumió un $*P < 0.05$. En el campo CA3 las células de microglía presentan un soma redondeado y pequeño, y unos procesos finos, múltiples y alargados. En condición de lesión la longitud de los procesos desciende drásticamente ($P < 0,000$), respuesta sobre la cual hay un efecto positivo y estadísticamente significativo de la administración del fármaco ($P < 0,046$); mientras que sobre el incremento significativo del diámetro del soma ($P < 0,011$), no se aprecia la acción del RSV. En este último, el diámetro de las células guarda casi las mismas proporciones que las registradas en el grupo al que se le administró la solución vehículo y dista del tamaño encontrado en el soma de las células del grupo control ($P < 0,013$). En concreto, tanto en CA1 como en CA3 la lesión induce principalmente la retracción de los procesos, pero esta respuesta es mucho más evidente en las células de microglía del campo CA3. Este cambio indica entonces una vulnerabilidad mayor a la lesión por parte del campo CA3.

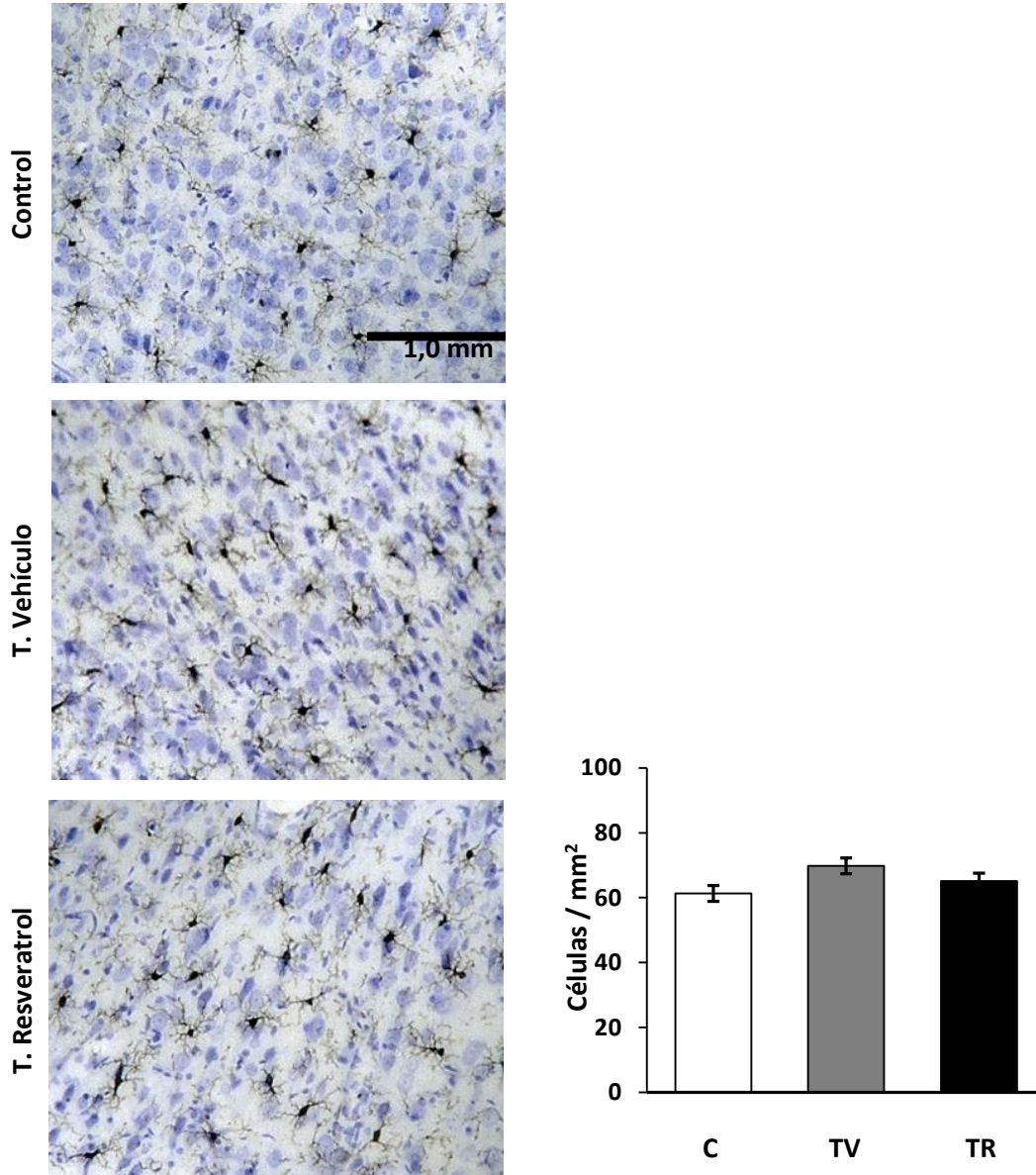
6.6 Densidad y morfología de las células de microglía de las áreas M1 y vM1 del córtex frontal

6.6.1 Densidad de células de microglía en las regiones M1 y vM1, cambios pos-lesión y efecto del fármaco

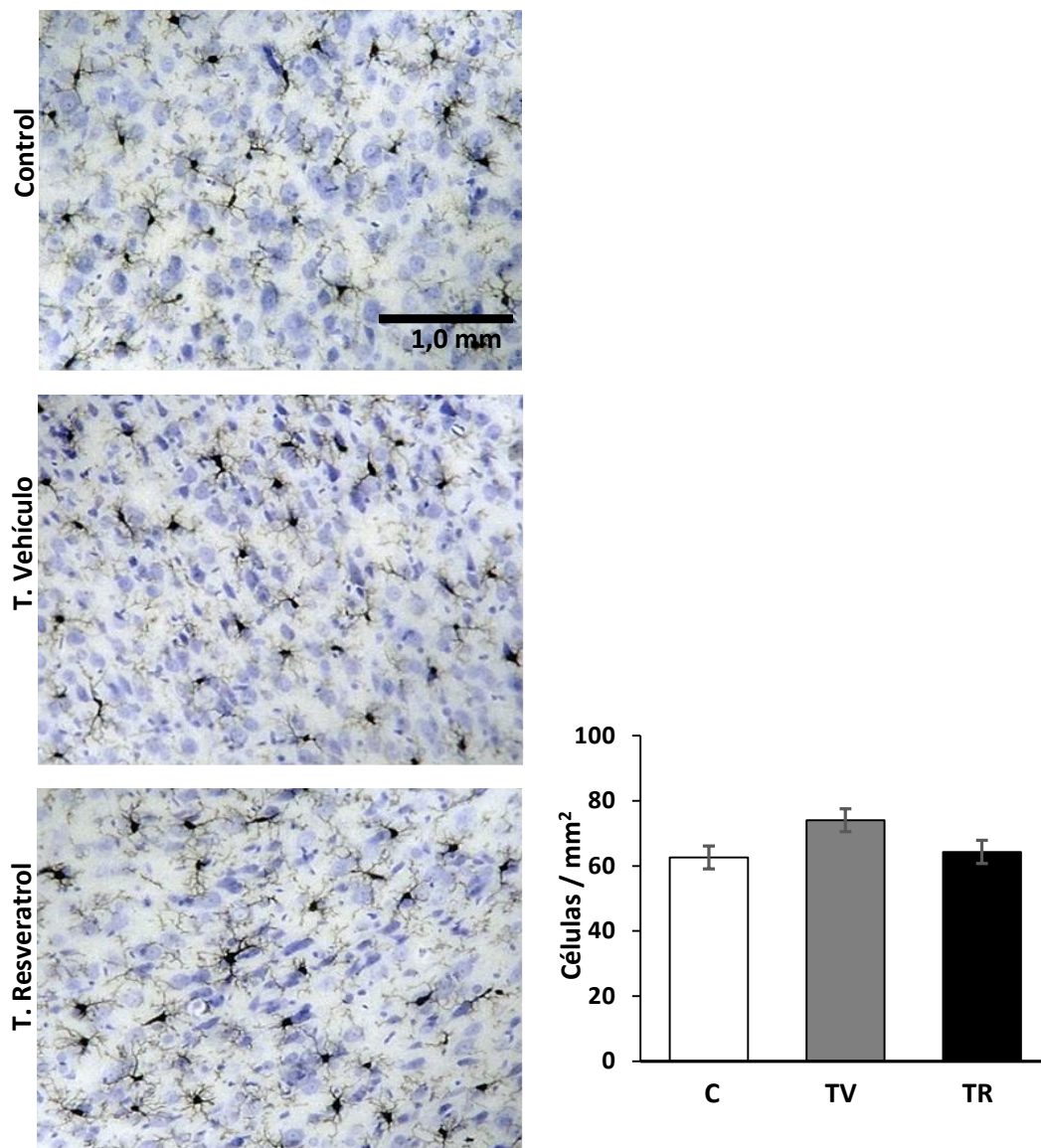
Como se mencionó previamente, la lesión traumática permite un ingreso mayor de leucocitos, entre otros, que facilitan el proceso de migración de las células de microglía al lugar de la lesión. En el caso de las lesiones globales, este proceso podría estar mediado por el hecho de recibir o no el impacto con mayor fuerza. Las regiones del hipocampo tienen una localización más profunda en relación a las áreas corticales sobre las cuales podrían entonces esperarse cambios más significativos en el proceso de activación. A continuación se relacionan los cambios encontrados por efecto de la lesión y la administración del fármaco en las regiones de la corteza M1 y vM1, iniciando por los cambios en la densidad.

Figura 6-21: Densidad de las células microgliales en el área M1.

La figura podrá observarse en la página siguiente.



Se presentan micrografías tomadas a 10X con zoom digital de 2,8. En las gráficas de barras se presenta el promedio del cálculo de la densidad de células de microglía por mm² por cada muestra. Para cada caso se presenta la media y el error estándar por grupo; se asumió un $*P < 0.05$. En ausencia de lesión la región M1 presenta una densidad de células de microglía similar al registrado en el grupo control. La lesión traumática, si bien indujo un incremento de las mismas, éste no fue estadísticamente significativo.

Figura 6-22: Densidad de las células microgliales en el área vM1.

Micrografías tomadas a 10X y zoom digital de 2,8. La gráfica de barras sigue los parámetros previamente definidos en la gráfica anterior. Se aprecia que la lesión induce un incremento ligero de las células de microglía, respuesta sobre la cual la administración del RSV no presenta efecto evidente.

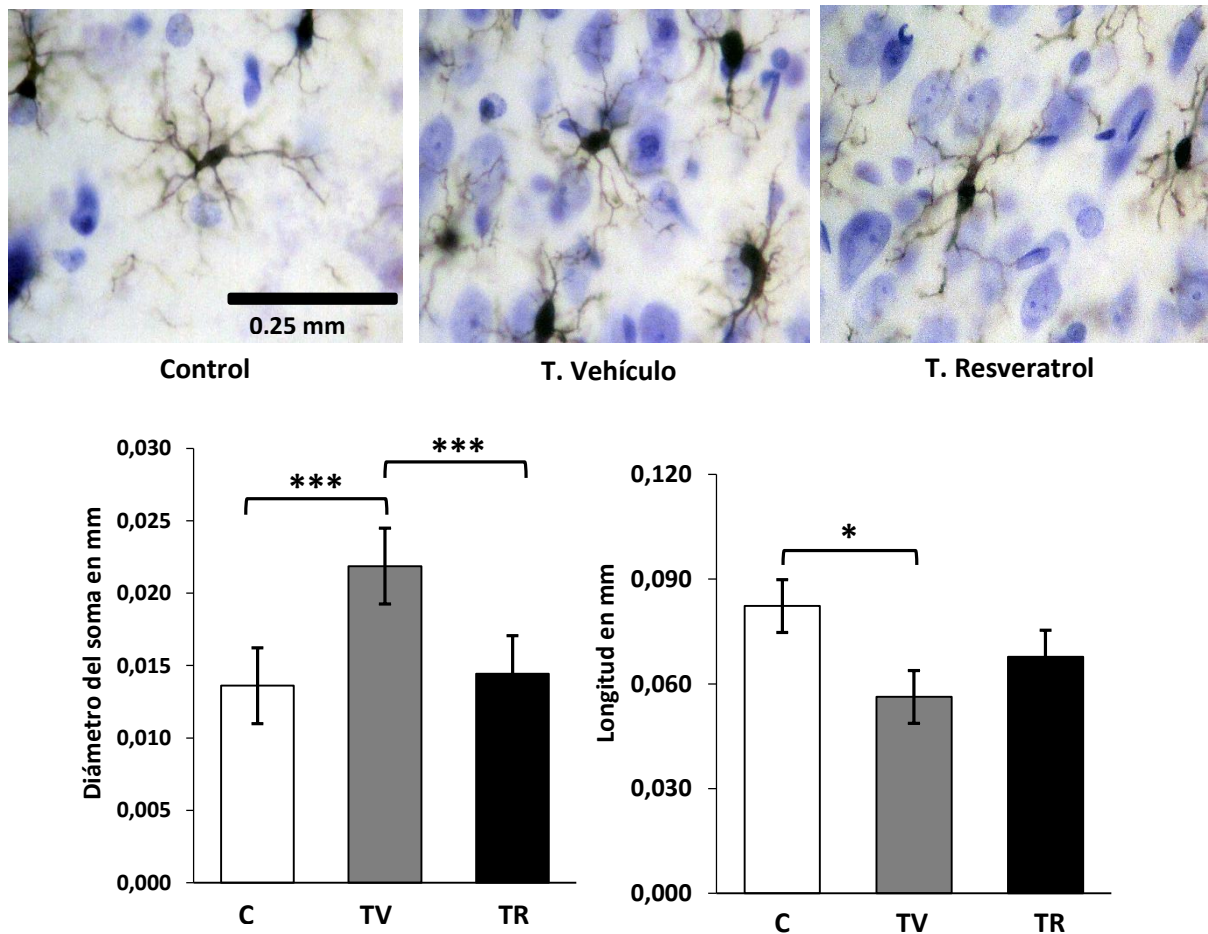
Tanto el área M1 como vM1 son prominentes en células de microglía, con procesos finos pero de menor tamaño en comparación con los procesos de las células microgliales del

hipocampo. En las áreas corticales analizadas se encontró que la lesión no afecta de forma significativa la densidad de las mismas, pero induce cambios sobre su morfología, como podrá observarse en las siguientes figuras.

6.6.2 Longitud de los procesos de la microglía en las áreas M1 y vM1, cambios pos-lesión y efecto del fármaco

En las Figuras 6-22 y 6-23 se podrá observar la forma prototípica de las células de microglía y el efecto de la lesión sobre la morfología de las mismas.

Figura 6-23: Longitud de los procesos y diámetro del soma de las células microgliales en el área M1

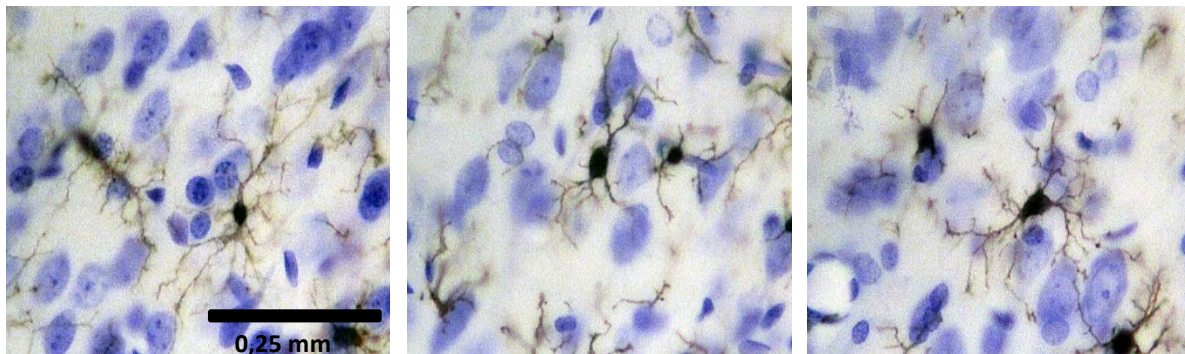


En la parte superior se encuentran las micrografías tomadas a 40X con zoom digital de 2,8. En la parte inferior las gráficas de barras presentan el promedio de las muestras

analizadas por cada grupo en relación a las dos medidas, diámetro del soma y longitud de los procesos. Para cada caso se presenta la media y el error estándar por grupo; se asumió un $*P < 0.05$.

En el área M1, en ausencia de lesión, se aprecian células de soma alargado y pequeño, y procesos mediamente largos, finos, sin muchas ramificaciones. En condición de lesión rápidamente los procesos han sido retraídos ($P < 0,011$), pero el cambio más significativo se presenta en el incremento del diámetro del soma ($P < 0,000$). La administración del RSV atenúa la retracción de los procesos de forma significativa ($P < 0,000$) y presenta un efecto parcial sobre el incremento del diámetro del soma. La magnitud del efecto del tratamiento con el fármaco en los cambios analizados en el área M1 tiene un tamaño significativo (d de Cohen = 4,48).

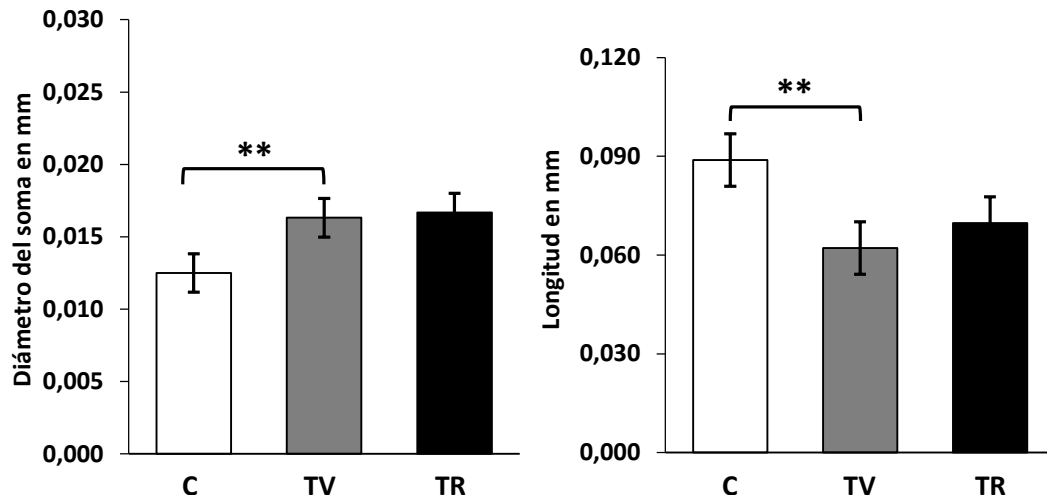
Figura 6-24: Longitud de los procesos y diámetro del soma de las células microgliales en el área vM1



Control

T. Vehículo

T. Resveratrol



En la página anterior se aprecian las micrografías tomadas a 40X con zoom digital de 2,8. En esta página se encuentran las gráficas de barras con los promedios del total de las muestras analizadas por grupo. Para cada caso se presenta la media y el error estándar por grupo; se asumió un $*P < 0.05$. Las células de microglía del área vM1 presentan características similares a las evidenciadas en las células de microglía del área M1. En este caso la lesión induce retracción estadísticamente de los procesos ($P < 0,006$) e incremento también significativo del diámetro del soma ($P < 0,006$). Tras la administración del RSV no se aprecia efecto sobre el incremento del diámetro, mientras que en relación al decremento de los procesos, se observa un efecto parcial.

7 Discusión

7.1 Resumen de los resultados

En este estudio se encontró que ocho horas después de acontecida la lesión traumática ocurrió una alteración en la morfología dendrítica, evidenciada por: 1) un descenso significativo de la inmunorreactividad (IR) de la proteína MAP2, predominante en las regiones CA1 ($P < 0,009$) y CA3 ($P < 0,000$) del hipocampo, y en el área vM1 ($P < 0,002$); y, 2) discontinuidad y tortuosidad de las dendritas tanto en el hipocampo como en las cortezas motoras analizadas. De otra parte, se encontró evidencia de activación de la microglía evaluada a través de: 1) la retracción de los procesos en las áreas motoras ($P < 0,006$ para vM1 y $P < 0,011$ para M1) y en la región CA3 del hipocampo ($P < 0,000$); 2); el incremento en el diámetro del soma en M1 ($P < 0,000$) y en la región CA3 ($P < 0,011$), y 3) el aumento en la densidad de las células de microglía en la región CA1 del hipocampo ($P < 0,004$). Estos cambios provocados por el trauma fueron revertidos parcialmente por la administración inmediatamente después del trauma de una sola dosis de 20mg/kg de resveratrol (RSV). Así, la IR de MAP2 en las regiones CA1 ($P < 0,05$) y CA3 ($P < 0,026$) del hipocampo y en el área vM1 del córtex frontal ($P < 0,048$) fue significativamente mayor que en el grupo lesionado e inyectado con la solución vehículo. De otra parte, los procesos microgliales en la región CA3 fueron significativamente más largos ($P < 0,045$) y el diámetro somático en M1 fue significativamente menor ($P < 0,000$) que en los animales lesionados e inyectados con la solución vehículo. En la región CA1 se encontró un incremento significativo en la densidad de células de microglía ($P < 0,004$). Los cambios en la morfología de las células de esta región, aunque fueron evidentes, no fueron estadísticamente significativos.

7.2 Alteraciones en la morfología dendrítica tras el TCE. Contraste con reportes previos

MAP2 es la proteína más abundante del citoesqueleto y tiene por función estabilizar a los microtúbulos mientras preserva sus propiedades dinámicas que permiten el crecimiento del axón y las dendritas, y la plasticidad morfológica (135). El descenso significativo y progresivo de la IR de MAP2 evidenciado en casos de daño cerebral, isquémico o traumático, correlaciona con la destrucción de los neurofilamentos (136) y es un indicador de daño neuronal. En los casos de TCE moderado se ha reportado que la corteza y el hipocampo presentan una reducción mayor de la IR de esta proteína (137; 138), principalmente en la región CA3. Lewén y sus colaboradores señalan que en las lesiones difusas tras un TCE el descenso de la marcación de esta proteína es notorio desde los primeros diez minutos y persiste fluctuante hasta siete horas (137). De forma consistente con estos reportes, en la presente investigación se observó mayor vulnerabilidad de la región CA3 en el hipocampo y del área vM1 en la corteza frontal.

Por otra parte, en relación a los cambios morfológicos, reportes previos derivados de la observación de tejido contuso humano demostraron la coexistencia en una misma región de células aparentemente normales y células con alteraciones del citoesqueleto, distribución anormal de NeuN (antígeno nuclear neuronal) y procesos dendríticos edematizados y tortuosos, hallazgos similares a los encontrados en casos de isquemia cerebral (139). Riascos y sus colaboradores evaluaron cultivos de neuronas corticales de humano con TCE y encontraron cambios en la IR de la proteína MAP2 progresivos y dependientes del tiempo, con una clara respuesta diferencial del compromiso laminar, principalmente evidenciado en las láminas III y V (140). En el presente estudio se evidenciaron alteraciones en los procesos dendríticos dados por un marcaje fragmentado de la proteína y tortuosidad en los mismos y se encontró que el resveratrol no tuvo una acción significativa sobre estos cambios.

Tanto en los casos de TCE como de isquemia cerebral se plantea que el descenso y proteólisis de la proteína MAP2 está asociado con el incremento en el influjo de Ca^{2+} al interior de la célula, lo que permite la activación de las calpaínas (141). Sin embargo,

distintos mecanismos moleculares estarían implicados en las alteraciones del citoesqueleto; por un lado, la anoikis (muerte celular por pérdida de contacto o contacto inadecuado de la célula con la matriz extracelular) podría explicar las alteraciones fisiopatológicas y, por otro, la pérdida celular estaría relacionada con la liberación de elementos proapoptóticos activadores de la vía extrínseca activada por caspasas, y con cambios en la expresión génica que a su vez darían cuenta de la especialización tisular (139).

7.3 Características de la activación de las células de microglía en TCE

La respuesta neuroinflamatoria en un TCE puede tener efecto neuroprotector o citotóxico, dependiendo de la severidad de la lesión y de la persistencia de la respuesta. Tales efectos están mediados por la liberación de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias. La microglía interviene en la remodelación de neuronas y circuitos neuronales, la actividad sináptica y la regeneración axonal (142; 143); pero su activación prolongada induce la producción de moléculas citotóxicas que, junto con el incremento del estrés oxidativo, permiten el progreso del daño secundario (143). La comprensión de la compleja interacción entre las moléculas proinflamatorias y antiinflamatorias abrirá nuevas opciones terapéuticas para detener el daño secundario y mejorar el pronóstico funcional de los pacientes (144).

Después del TCE la microglía se activa rápidamente, prolifera y migra hacia el lugar de la injuria en respuesta a la liberación de ATP al espacio extracelular a partir de las lesiones focales (145), el mantenimiento prolongado de la activación microglía se asocia al incremento en el volumen de la lesión y a la persistencia del deterioro funcional. Las células gliales en general proliferan rápidamente después del daño, pero sus patrones temporales son distintos así como la función, algunos traen consigo beneficios mientras otros exacerban la respuesta de daño celular (146). El patrón de activación temporal de la microglía ha sido establecido recientemente. Se ha reportado que al tercer día pos-injuria la activación alcanza el pico más alto y se mantiene significativamente elevada durante los primeros 28 días (147) y hasta por un año en el caso de los humanos (148). Los cambios

morfológicos característicos de la activación son muy significativos en la región CA3 del hipocampo (149), región en donde también hay gran pérdida neuronal (148). En concordancia con este hallazgo, en la presente investigación también se observó mayor vulnerabilidad de la región CA3 del hipocampo. También se registraron cambios morfológicos significativos en la corteza motora primaria, en tanto que en la corteza motora de las vibrisas fueron visibles, pero no estadísticamente significativos ($P < 0,06$).

Las variaciones en la respuesta de las regiones tras la lesión puede deberse a que la microglía presenta una distribución y morfología irregular en el cerebro de las ratas maduras (150). Se ha reportado una mayor densidad de las células de microglía en la corteza, el tálamo, el hipotálamo y el hipocampo (151). Savchenko, Nikonenko, Skibo y McKanna (1997) reportaron variaciones regionales no solo en la densidad sino en la morfología, encontrando que el hipocampo, la sustancia nigra, el estriado y la corteza, en particular el córtex frontal, presentan mayor densidad de células de microglía. Asimismo en la sustancia blanca las células de microglía presentan un soma ovalado y un número reducido de procesos; por el contrario, en la sustancia gris el número de células es mayor, el soma es más redondo y las prolongaciones son más prominentes. La heterogeneidad en la densidad y morfología podría relacionarse con aspectos tales como la función que cumplen las células de la región, el tipo de neuronas y los neurotransmisores secretados. Estos investigadores afirman que las sustancias biológicamente activas de algunas regiones cerebrales podrían estimular el crecimiento de los procesos y proponen una relación directamente proporcional entre la mayor densidad de células de microglía y la presencia de neuronas dopaminérgicas en una determinada región, como es el caso del córtex frontales.

En este estudio se registró incremento estadísticamente significativo de células de microglía en la región CA1, acompañado de cambios morfológicos de menor impacto. Probablemente la respuesta no fue significativa en las demás regiones analizadas debido al poco tiempo transcurrido tras la lesión, pues aunque el proceso de migración puede evidenciarse desde las primeras tres horas de acontecido el daño (152), el pico de máxima actividad migratoria se alcanza entre el quinto y séptimo día pos-lesión pudiendo presentar variaciones que se relacionan con el tipo de lesión (147; 146). En las lesiones traumáticas el incremento agudo en la producción de quimiocinas contribuye a la migración masiva de

células inflamatorias periféricas durante las primeras seis horas pos-lesión, pero la migración de macrófagos y microglía alcanza su pico de intensidad entre los tres y siete días pos-lesión (148). En las lesiones isquémicas focales la disrupción de la barrera hematoencefálica permite la rápida infiltración de células de microglía que alcanzan su pico máximo al tercer día (153), en tanto que el acortamiento de los procesos y el incremento del soma son significativos dentro de las primeras ocho horas (154), tal como se evidenció en el presente estudio y en concordancia con lo reportado en el caso de lesión quimiotóxica por administración de ácido quinolínico (155).

7.4 Medidas de neuroprotección y daño secundario en TCE

La creciente evidencia que confirma la participación de distintos tipos de células en la progresión y mantenimiento del daño secundario en el TCE y otros tipos de daño cerebral adquirido, modificó la perspectiva neuronocéntrica que dominó el campo de la neuroprotección. Hasta ahora se empieza a dilucidar el papel que tienen la microglía, las células endoteliales y algunos precursores celulares en la generación del daño secundario. Al respecto, recientemente se reportó que la activación prolongada de la microglía puede extender el daño neuronal al inhibir el crecimiento del cono axonal e impedir la regeneración de las dendritas (156; 157). Hallazgos como estos constituyen evidencias para considerar que la propagación y mantenimiento del daño neuronal se deben a la interacción entre la respuesta neuroinflamatoria y el proceso de neurotoxicidad (121), no obstante, son pocas las investigaciones que han explorado dicha relación (158).

En los TCE las medidas de neuroprotección desarrolladas durante los últimos años se enfocan en el daño secundario, que comprende una serie de cambios metabólicos (respuesta inflamatoria, estrés oxidativo y excitotoxicidad) que permiten la propagación del área de la lesión, el incremento en la muerte neuronal y las alteraciones en los patrones de conexión neuronal. Después del TCE se pierde el equilibrio iónico a través de la membrana celular, descienden los niveles de energía y se produce edema; además, se liberan de forma masiva aminoácidos excitatorios, en especial glutamato, que al estimular a los receptores glutamatérgicos, inotrópicos y metabotrópicos, permite un mayor influjo

de Ca^{2+} , Na^+ y K^+ , y facilitan la liberación de ERO y la activación de las vías de señalización de muerte celular (124). Por otra parte, el citoesqueleto de las células se degrada debido al incremento de la fosforilación de la proteína MAP2, respuesta dependiente del tiempo y que podría estar relacionada con la activación de las calpaínas secundaria al incremento en la concentración de Ca^{2+} (159; 141). Los fármacos con acción antioxidante y aquellos que intervienen en la respuesta neuroinflamatoria han demostrado eficacia sobre la pérdida neuronal (124) y la recuperación funcional (160), como es el caso del resveratrol.

7.5 Mecanismos de acción del RSV

El RSV es un polifenol fitoalexina con efectos antioxidantes, neuroprotectores y antiinflamatorios, cuya acción implica distintas vías de señalización (158). La acción antioxidante del RSV no está esclarecida completamente, pero se ha relacionado con el decremento en los niveles de MDA (marcador de degradación oxidativa de la membrana celular), la prevención de la formación de ERO, la regulación al alza de la SIRT1 y la posterior activación de la vía MAPK que permite la síntesis de las proteínas necesarias para el funcionamiento y división de la mitocondria, proceso conocido como biogénesis mitocondrial (161). La acción neuroprotectora del RSV ha sido asociada con: la prevención del desbalance iónico entre Na^+ y K^+ en las membranas pre- y post- sinápticas por inhibición de la sobre-estimulación de los receptores NMDA, el decremento de la activación de GSK-3 β (glucógeno sintasa quinasa 3 beta) y la prevención del clivaje de la caspasa 3 (121). Finalmente, la acción antiinflamatoria se relaciona con la inhibición de las citoquinas proinflamatorias: IL-6, IL12 (162), TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa), MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1); y la estimulación de la liberación de citoquinas antioxidantes por parte de la microglía y los astrocitos (163). En el primer caso la reducción estaría relacionada con la vía de señalización dependiente de NF- κ B y en el segundo con la estimulación de la vía pro-supervivencia Akt que reduce de forma significativa la apoptosis de las neuronas corticales al incrementar los niveles de la proteína fosforilada Akt (164). La acción del RSV sobre distintas vías puede implicar que estas interaccionan y que la sinergia entre ellas permite la efectividad del fármaco (121).

Sobre la acción del RSV parece estar condicionada por: la dosis, el momento de administración y la frecuencia de administración. Estos aspectos son muy relevantes en la medida en que el RSV tiene baja biodisponibilidad. El fármaco alcanza el pico de concentración a los 30 minutos y permanece activo hasta 18 horas después de la administración pero con una progresiva reducción en su concentración que llega al 10% (165). La baja biodisponibilidad del fármaco es uno de los aspectos que más se discute en los resultados obtenidos en los ensayos clínicos con humanos.

Sobre la dosis y el momento de administración se ha reportado que solo las dosis elevadas administradas tras el TCE reducen el daño y la muerte neuronal (163; 166; 167). Las dosis bajas administradas como pre-tratamiento modulan la cascada excitotóxica y reducen el daño neuronal en modelos de isquemia cerebral (168). Un número significativo de artículos refiere efectos neuroprotectores tras la administración de dosis que están entre los 60 mg/kg y los 100 mg/kg (128; 21; 116). En esta investigación, aunque se administró un tercio de la dosis mínima reportada (es decir, 20 mg/kg), se obtuvieron efectos positivos sobre la expresión de MAP2 y la activación de la microglía. Sin embargo, el tiempo de evaluación de la respuesta fue menor al considerado en estudios previos, 24 horas en adelante. Se determinó dejar las ocho horas como punto de corte porque: 1) como se relacionó antes, existen reportes que confirman que dentro de las primeras ocho horas es posible observar cambios notorios en las respuestas a evaluar tras la lesión; 2) el RSV administrado vía intraperitoneal alcanza un pico de máxima concentración a los 30 minutos; y 3) la consideración hecha por Wagner y colaboradores (2011) según la cual las primeras horas pos-lesión constituyen una ventana terapéutica que incrementa la posibilidad de éxito de las intervenciones. Esas condiciones hacían posible considerar que trascurridas ocho horas el fármaco podría presentar efectos, como en efecto sucedió; sin embargo, no hay forma de determinar si los efectos observados pueden persistir en el tiempo. Probablemente esto no ocurra por efecto de las mismas consideraciones antes hechas, puesto que la acción del fármaco no cambia la cascada molecular de daño secundario, solo la atenúa; por lo tanto, es probable que en ausencia de nuevas administraciones del RSV continúe el ciclo generador del daño secundario.

7.6 Implicaciones de los resultados

Este es el primer estudio conocido que describe en detalle los cambios morfológicos asociados a la activación de la microglía a las ocho horas de ocurrido el TCE y la acción del RSV sobre los mismos. Existen varios reportes previos que relacionan la actividad de la microglía en los TCE, pero la respuesta se determinó mediante la expresión de proteínas que dan cuenta del estado de activación de la microglía (157; 169). Es uno de los pocos estudios en los que se relacionan los cambios acontecidos en el córtex motor frontal.

Los resultados de la presente investigación permiten avanzar en el conocimiento de la acción de un fármaco neuroprotector sobre la respuesta neuroinflamatoria. Es el primer estudio conocido en donde se demuestra que la administración a baja dosis del fármaco puede atenuar algunas de las respuestas propias de lesión traumática; sin embargo, no es posible concluir sobre la persistencia de los cambios registrados en la medida en que la baja biodisponibilidad del fármaco haría necesaria la administración de dosis posteriores. El RSV se absorbe rápidamente tras la administración oral, su vida media es de 9.2 horas y a los 30 minutos alcanza la mayor concentración en plasma. La sulfatación y la glucuronización en intestino delgado parecen ser los pasos limitantes en la biodisponibilidad (170).

El RSV ha sido descrito como un fármaco seguro con potencial uso terapéutico que impacta diferentes vías implicadas en el daño secundario y atenúa los distintos fenómenos neurodegenerativos inducidos por TCE y, por ello, amerita ser evaluado en entornos clínicos.

Teniendo en cuenta que el patrón de daño tisular y muerte celular evidenciado en los TEC guarda similitud con los hallazgos reportados en los casos de isquemia cerebral (121; 165), los resultados de esta investigación también podrían ser aplicados en modelos de isquemia cerebral, en los que el fármaco ya ha mostrado efectos favorables.

7.7 Perspectivas

La investigación básica con animales no humanos tiene vital importancia en la ciencia aplicada. Permite la comprensión de un fenómeno mediante su simulación y control de las condiciones que se relacionan con el curso y magnitud del mismo. Los modelos de lesión traumática en animales permiten emular algunos de los componentes de la fisiopatología de la lesión para así evaluar el impacto de las medidas de intervención. Sin embargo, durante su uso han de tenerse en cuenta algunos aspectos recientemente analizados y que podrían incidir en los resultados.

7.7.1 Uso de isoflurano

El uso de isoflurano como anestésico para la inducción de lesiones traumáticas es ampliamente referido. Existe evidencia de la acción neuroprotectora del isoflurano aun cuando en baja dosis (171) y se ha demostrado su capacidad de interactuar con otros fármacos que pretenden reducir la muerte celular (172). También se ha reportado la existencia de una relación entre los anestésicos gaseosos administrados y la emergencia de alteraciones de carácter neurodegenerativo dependientes de la dosis y tiempo de administración (173). En modelos de isquemia cerebral se piensa que la acción neuroprotectora está asociada con la activación de vía MAPK 38; mientras que en el caso de las lesiones traumáticas ha demostrado disminuir la excitotoxicidad e incrementar la estabilidad fisiológica mediante la reducción de la liberación de glutamato, la reducción de la tasa metabólica y la regulación de la acción de los factores proapoptóticos (174). Dada la evidencia, debe considerarse el impacto que pueda tener principalmente en las investigaciones que evalúan la acción de un fármaco.

7.7.2 El impacto de la craneotomía en el proceso de daño neuronal

Por otra parte, se ha demostrado que la craneotomía es suficiente para inducir la activación de las vías de señalización que inducen proliferación celular (175). En el modelo de impacto aceleración por caída libre, se debe hacer una escisión en el cuero del animal para fijar el disco metálico que permite propagar la fuerza del golpe, posteriormente se realizará la craneotomía, es posible entonces cuestionarse sobre el impacto que este procedimiento pudiera tener sobre la activación de vías de daño neuronal.

7.7.3 Perspectivas en el desarrollo de medidas de neuroprotección

En modelos animales de TCE se ha observado elevados niveles de interleucina 1alfa (IL-1 α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α). Estudios desarrollados con humanos muestran elevación de los niveles de algunas de estas moléculas en el líquido cefalorraquídeo (139). Estos hallazgos permiten postular a estas moléculas como posibles marcadores de pronosis en TCE. Por otro lado, la demostrada eficacia en modelos animales de las intervenciones que alteran o bloquean la liberación de estas moléculas en la reducción del volumen de la lesión y la respuesta funcional, las hace buenas candidatas para la intervención con humanos.

Dado que en el SNC los factores anti-inflamatorios se relacionan con procesos tales como: la neurogénesis, angiogénesis, oligodendrogénesis y remielinización, procesos esenciales para restaurar el tejido lesionado, es posible que las investigaciones enfocadas en determinar los mecanismos reguladores de la expresión de moléculas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias relacionadas con la activación de la microglía puedan derivar buenos resultados en el campo de la neuroprotección (176; 146). Un avance al respecto, ha permitido establecer que la homeostasis de la microglía en los ratones adultos es altamente dependiente de la actividad del factor estimulante de colonias de macrófagos

(CSF-1) sobre el receptor CD115, se sugiere entonces a CSF-1 como *target* de nuevas investigaciones en neuroprotección (153).

Finalmente, dentro de todos los fármacos que han presentado acción neuroprotectora existen reportes de la acción efectiva del ibuprofeno. Su administración durante la primera semana pos-lesión en modelos animales atenuó la activación de genes asociados con la respuesta inflamatoria en un modelo de TCE difuso (143), este resultado lo convierte también en un buen *target* de investigación.

8 Conclusiones


Ocho horas después de un trauma craneoencefálico inducido por aceleración por caída libre de peso se observó:

1. Reducción de la IR de la proteína MAP2 en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo y en la corteza motora primaria.
2. Activación de la microglía residente, evidenciada por el incremento en el tamaño del soma y acortamiento de los procesos en la región CA3 del hipocampo y en la corteza motora primaria.
3. Incremento de la densidad de células de microglía en la región CA1 del hipocampo.

Ocho horas después de la administración inmediata de 20 mg/kg de resveratrol a ratas Wistar sometidas a TCE inducido por aceleración por caída libre de peso, se observó:

1. Atenuación de la pérdida de la inmunorreactividad de la proteína MAP2 en las regiones CA1 y CA3 del hipocampo, pero no en las cortezas motoras tras ocho horas de acontecida la lesión.
2. Disminución de cambios relacionados con la activación de la microglía en la región CA3 del hipocampo y en la corteza motora primaria.
3. Ausencia de acción significativa sobre la morfología de las dendritas.

A. Anexo: Acta de aprobación por parte del Comité de Ética


 UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
 SEDE BOGOTÁ
 FACULTAD DE MEDICINA
 COMITÉ DE ÉTICA
 ACTA DE EVALUACIÓN

CE – 003
 ACTA DE EVALUACIÓN N°. 017-14
 Fecha: 13 de marzo de 2014

Nombre completo del proyecto: "EFECTOS NEUROPROTECTORES DEL RESVERATROL EN TRAUMA CRANEENCEFÁLICO INDUCIDO POR EL MODELO DE IMPACTO ACELERACIÓN POR CAÍDA LIBRE DE PESO".

Versión número: 01

Sometido por: la estudiante Johana Andrea Falcao Eraso

Presentado por: el profesor Humberto Arboleda Granados, Coordinador

Departamento o Sección: Maestría en Neurociencias de la Facultad de Medicina

Fecha en que fue sometido a consideración del Comité: 13 de marzo de 2014

El COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE MEDICINA. Se constituyó mediante la Resolución 152, (Acto No. 43 del 5 de diciembre de 1996 actualizado mediante resolución 006 (Acto 03 de 27 de enero de 2011), de Consejo de Facultad el Comité de Ética de investigación, al cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia que estableció las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964, última revisión del año 2000; y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de los sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991).


El Comité de Ética de la Facultad de Medicina certifica que:

- Sus miembros revisaron los siguientes documentos del presente proyecto:
 - ✓ Carta de presentación del proyecto generada por la unidad básica o el departamento.
 - ✓ Copia de la evaluación de los jurados o pares académicos que evaluaron y aprobaron al trabajo(s)
 - ✓ Copia del proyecto completo de investigación,
 - ✓ Dos resúmenes ejecutivos
 - ✓ Dos copias del consentimiento informado (en español y cuando la investigación lo amerita).
 - ✓ Hojas de vida resumidas de los investigadores y coinvestigadores del proyecto
 - ✓ Consideraciones éticas según resolución 8430 Ministerio de Salud.
 - ✓ Resultados de evaluación por otros comités (si aplica)
- El presente proyecto fue evaluado y aprobado por los siguientes miembros del Comité:

1	Amador Luis Roberto	Departamento de Psicología
2	Arteaga Díaz Clara Eugenia	Departamento de Obstetricia y Ginecología
3	Guarero Fonseca Carlos Arturo	Departamento de Ciencias Fisiológicas
4	Parrá Pineda Mario Orlando	Departamento de Obstetricia y Ginecología

EN: Avenida F. A.

Carrera 30 No. 45-03, FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471 Piso 4º, Oficina 401
 Teléfono: (57-1) 316 5251 Corredor: (57-1) 316 5000 Ext. 15167 – 15008
 Correo electrónico: eticasajud_fmboq@unal.edu.co
 Bogotá, Colombia, Sur América


UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA
VIRREINATO
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA
ACTA DE EVALUACIÓN

3. El Comité consideró que el presente estudio:

- Es válido desde el punto de vista ético.
- El Comité considera que las medidas que están siendo tomadas para proteger animales experimentales son adecuadas.

4. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales:

- Todo desacato de los investigadores a las resoluciones del Comité.
- Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.

5. El Comité informará inmediatamente a las directivas, toda información que reciba acerca de:

- Lesiones o daños a sujetos humanos con motivo de su participación en la investigación. Problemas imprevistos que involucren riesgos para los sujetos u otras personas.
- Cualquier cambio o modificación a este proyecto que haya sido revisado y aprobado por este comité.

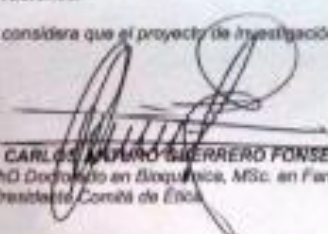
6. Cuando el proyecto sea aprobado, será por un periodo de un (1) año a partir de la fecha de aprobación.

7. El Investigador principal deberá:

- Informar de cualquier cambio que se proponga introducir en el proyecto. Estos cambios no podrán ejecutarse sin la aprobación previa del COMITÉ DE ÉTICA DE LA FACULTAD DE MEDICINA excepto cuando sean necesarios para minimizar o suprimir un peligro inminente o un riesgo grave para los sujetos que participan en la investigación.
- Avisar de cualquier situación imprevista que se considere implica algún signo de riesgo para los sujetos o la comunidad o el medio en el cual se lleva a cabo el estudio.
- Informar de cualquier evento adverso serio de algún paciente, comunicando la situación al secretario y al presidente del Comité de Ética, de acuerdo con la normatividad que el INVIMA a generado a este respecto.
- Poner en conocimiento del comité toda información nueva importante respecto al estudio, que pueda afectar la relación riesgo/beneficio de los sujetos participantes.
- Comunicar cualquier decisión tomada por otros comités con respecto a la investigación que se lleva a cabo.
- Informar de la terminación prematura o suspensión del proyecto explicando las causas o razones.
- Presentar a este comité un informe cuando haya transcurrido un año, contado a partir de la aprobación del proyecto. Los proyectos con duración mayor a un año, serán reevaluados a partir del informe de avance integrado.
- Todos los proyectos deben entregar al finalizar un informe final de cierre del estudio, este cierre puede ser el informe final en formato completo o en formato de resumen de cierre de estudio, firmado por el investigador responsable del estudio.

E. Observaciones:

El comité considera que el proyecto de investigación no presenta dilemas éticos por lo tanto emite Concepto Aprobatorio.



Nombre: CARLOS AMPARO SIERRA FONSECA
Título: PhD Doctorado en Bioquímica, MSc. en Farmacología y MSc. en Genética Humana
Cargo: Presidente Comité de Ética

REV. 0000000 P. 01

Carrera 80 No. 45 85, FACULTAD DE MEDICINA, Edificio 471 Piso 2º, Oficina 401
Teléfono: (57-2) 318 1251 Correo electrónico: (57-1) 318 5000 Fax: (57-2) 318 87 11008
Correo electrónico: gte@unad.edu.co, gte@unad.edu.co
Bogotá, Colombia, Sur América

9 Referencias

1. *Mecanismos biológicos involucrados en la propagación del daño en el traumatismo encéfalo craneano.* **Rovegnoa, M., Sotob, P., Sáezb, J., y von Bernhardic, R.** 1, 2012, Medicina Intensiva, Vol. 36.
2. *Autophagy is involved in traumatic brain injury-induced cell death and contributes to functional outcome deficits in mice.* **C.-L. Luo, B.-X. Li, Q.-Q. Li, X.-P. Chen, Y.-X. Sun, H.-J. Bao, D.-K. Dai, Y.-W. Shen, H.-F. Xu, H. Ni, L. Wan, Z.-H. Qin, L.-Y. Tao, Z.-Q. Zhao.** Shanghai : Neuroscience, 2011, Vol. 184, págs. 54–63.
3. *Caloric Restriction Suppresses Microglial Activation and Prevents Neuroapoptosis Following Cortical Injury in Rats.* **Loncarevic-Vasiljkovic, et al.** 5, 2012, Plos One, Vol. 7, págs. 1-10.
<http://www.sinab.unal.edu.co:2108/ehost/pdfviewer/pdfviewer?sid=7097c0e2-d91c-40e3-9c32-5f97e30e6574%40sessionmgr113&vid=6&hid=122>.
4. *Animal models of traumatic brain injury.* **Xiong Y, Mahmood A, Chopp M.** 2, Febrero de 2013, Nature Reviews Neurociencia, Vol. 14, págs. 128-142.
5. *Brain Trauma.* **Dunn, I. F., Kim, A. H. & Gormley, W. B.** Boston : Encyclopedia of Neuroscience, 2009, págs. 407–416.
6. *Graded model of diffuse axonal injury for studying head injury-induced cognitive dysfunction in rats.* **Maruichi, K., Kuroda, S., Chiba, Y., Hokari, M., Shichinohe, H., Hida, K. and Iwasaki, Y.,** 132–139. doi:10.1111. (2), s.l. : Neuropatholog, 2009, Vol. 29.
7. **Guzmán, F. & Pedroza, A.** *Epidemiología y pronóstico del trauma craneoencefálico 2003- 2004.* Cali : Servicio de Neurocirugía del Hospital Universitario del Valle. Documento interno., 2005.
8. *Radicales libres y lesión cerebral.* **Gil, N., J. Gómez, y A. Gómez.** (2), s.l. : Universitasmédica, 2008, Vol. 49, págs. 231-242.
9. *Caracterización de un modelo organotípico de cultivos de neuronas corticales de humano derivadas de trauma craneoencefálico.* **Riascos, D., F. Guzmán, E. Buriticá, M. Palacios, M. Escobar y H. Pimienta.** (3), 2008, Colombia Médica, Vol. 39, págs. 29-37.
10. *Traumatic Brain Injury Precipitates Cognitive Impairment and Extracellular Ab Aggregation in Alzheimer's Disease Transgenic Mice.* **Tajiri, N, S. L. Kellogg, T. Shimizu, G. W. Arendash & C. V. Borlongan.** 11, 2013, Plos One, Vol. 8. e78851. doi:10.1371/journal.pone.0078851.

11. *Modelos experimentales de traumatismo craneoencefálico.* **Prieto et al.** 2009, Neurocirugía, Vol. 20, págs. 225-244.
12. *Hypothermia and Pharmacological Regimens That Prevent Overexpression and Overactivity of The Extracellular Calcium-Sensing Receptor (CaSR) Protect Neurons Against Traumatic Brain Injury.* **Kim JY, Kim N, Yenari M, Chang W.** 2013, Journal of neurotrauma . En prensa .
13. *Experimental models of traumatic axonal injury.* **Wang, H.C. & Ma, Y.B.** 2, Febrero de 2010, Journal of Clinical Neuroscience, Vol. 17, págs. 157-162.
14. *Neuroprotective properties of resveratrol in different neurodegenerative disorders.* **Albani, D., Polito, L., Signorini, A. & Forloni, G.** 5, Milán : Biofactors, 2010, Vol. 36. doi. 10.1002.
15. *Fisiopatología del trauma craneoencefálico.* **Guzmán, F.** 3, 2008, Colombia Médica, Vol. 39, págs. 78-84.
16. *Pharmacotherapy for Postacute Traumatic Brain Injury: A Literature.* **Waldron-Perrine, B., A. R. Hanks, and S. A. Perrine.** (4), 2008, Rehabilitation Psychology, Vol. 53, págs. 426–444.
17. *Rapamycin attenuates the development of posttraumatic epilepsy in a mouse model of traumatic brain injury.* **Guo, D., L. Zeng, D.L. Brody and M. Wong.** (5), 2013, Vol. 8, págs. 1-12.
18. *Dietary curcumin supplementation counteracts reduction in levels of molecules involved in energy homeostasis after brain trauma.* **Sharma S, Y. Zhuang, Z. Ying, A. Wu and F. Gomez-Pinilla.** (4), 2009, Neuroscience, Vol. 161, págs. 1037-1044.
19. *Effect of estrogens on blood glutamate levels in relation to neurological outcome after TBI in male rats.* **Zlotnik A., A. Leibowit, B. Gurevich, S. Ohayon, M. Boyko, M. Klein, B. Knyazer, Y. Shapira, V. Teichberg.** (1), 2012, Intensive Care Medicine , Vol. 38, págs. 137-144.
20. *Simvastatin reduces VEGF and NO levels in acute stages of experimental traumatic brain injury.* **Yüksel H, Yavuz O, Iş M, Comunoğlu N, Uzüm G, Akyüz F, Yıldırım HA.** 2013, Neurological Science. En prensa.
21. *Acute resveratrol treatment modulates multiple signaling pathways in the ischemic brain.* **Shin, J.A., L. Kyung-Eun and K. Hee-Sun.** 2012, Neurochem Res.
22. *Neuroprotective effects of resveratrol against traumatic brain injury in immature rats.* **Sönmeza, Ü., Sönmezb, A., Erbila, G., Tekmena, I. y Baykaraa, B.** 2, Izmir : Neuroscience Letters, 2007, Vol. 420, págs. 133–137.

23. *The effects of a ketogenic diet on behavioral outcome after controlled cortical impact injury in the juvenile and adult rat.* **Appelberg, A.S., D.A. Hovda and M.L. Prins.** 2009, Journal of Neurotrauma, Vol. 26, págs. 497–506.
24. *Chronic caloric restriction reduces tissue damage and improves spatial memory in a rat model of traumatic brain injury.* **Rich NJ, Van Landingham JW, Figueiroa S, Seth R, Corniola RS, Levenson CW.** 13, Octubre de 2010, Journal of Neuroscience Research, Vol. 88, págs. 2933-2949.
25. *Interactions between SIRT1 and MAPK/ERK regulate neuronal apoptosis induced by traumatic brain injury in vitro and in vivo.* **Zhao, Y., Luo, P., Guo, Q., Li, S., Zhang, L., Zhao, M., Xu, H., Yang, Y., Poon, W. y Fei, Z.** Hong Kong : s.n., 2012, Experimental Neurology, Vol. 237, págs. 489–498.
26. *A review of the use of early hypothermia in the treatment of traumatic brain injuries.* **Arcure, J. and E.E. Harrison.** (3), 2009, Journal of Special Operations Medicine, Vol. 9.
27. *Traumatic axonal injury in the mouse is accompanied by a dynamic inflammatory response, astroglial reactivity and complex behavioral changes.* **Ekmark-Lewén, S., et al.** 44, 2013, Journal of Neuroinflammation, Vol. 10, págs. 1-19.
28. *Alteración de la organización laminar y de la dendroarquitectura de la corteza cerebral del humano post-trauma craneoencefálico.* **Escobar, et al.,.** 3, 2008, Colombia Médica, Vol. 39, pág. 52.
29. *Antioxidant therapies in traumatic brain and spinal cord injury.* **Bains, M. & Hall, E.** Lexington : Biochimica et Biophysica Acta, 2012, págs. 675–684.
30. *Diffuse axonal injury induced by simultaneous moderate linear and angular head accelerations in rats.* 2010. **Li, Li, Feng & Gu.** (11), 2010, Neuroscience, Vol. 169.
31. *Traumatic Axonal Injury in the Optic Nerve: Evidence for Axonal Swelling, Disconnection, Dieback, and Reorganization.* **Wang, J., R. J. Hamm, and J. T. Povlishock.** 2011, J. of Neurotrauma, Vol. 28, págs. 1185–1198.
32. *Agentes y mecanismos neuroprotectores relacionados con el estrés oxidante en el infarto cerebral.* **Díaz-Ruiz, A. y C. Ríos.** México : s.n., 2012, Mensaje Bioquímico, Vol. 36, págs. 171 – 199. Tesis.
33. *Axon Retraction and Degeneration in Development and Disease.* **Luo, L. y D.M. O’Leary.** 2005, Annual Review Neuroscience, Vol. 28, págs. 127-156.
34. *Exacerbated inflammatory responses related to activated microglia after traumatic brain injury in progranulin-deficient mice.* **Tanaka Y, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M.** 231, Febrero de 2013, Neuroscience, Vol. 12, págs. 49-60.

35. *Effects of halothane, isoflurane, and sevoflurane on lipid peroxidation following experimental closed head trauma in rats.* **Yurdakoc, A., I. Gunday, and D. Memis.** 2008, *Acta Anaesthesiol Scand*, Vol. 52, págs. 658–663.
36. *Neuroprotective effect of Pycnogenol® following traumatic brain injury.* **Scheff, S.W., Ansari, M.A. & Roberts, K.** Lexington : *Experimental Neurology*, 2013, Vol. 239, págs. 183–191. doi. 101016.
37. — **Stephen, W.S., A.A. Mubeen, and Roberts, K.N.** 2013, *Experimental Neurology*, Vol. 239, págs. 183–191.
38. *Poloxamer 188 Attenuates in vitro Traumatic Brain Injury-Induced Mitochondrial and Lysosomal Membrane Permeabilization Damage in Cultured Primary Neurons.* **Luo CL, Chen XP, Li LL, Li QQ, Li BX, Xue AM, Xu HF, Dai DK, Shen YW, Tao LY, Zhao ZQ.** 7, 2013, *Journal of neurotrauma*, Vol. 30, págs. 597-607.
39. *The role of mitochondrial calcium uniporter in neuroprotection in traumatic brain injury.* **Cheng G, Fu L, Zhang HY, Wang YM, Zhang LM, Zhang JN.** 2, 2013, *Medical Hypotheses*, Vol. 80, págs. 115-127.
40. *A Rehabiliomics focused perspective on molecular mechanisms underlying neurological injury, complications, and recovery after severe TBI.* **Wagner, A. K. & Zitelli, K. T.** 2013, *Pathophysiology*, Vol. 20, págs. 39-48. doi:10.1016/j.pathophys.2012.02.007.
41. *NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates.* **Mullen, R.J., Buck, C.R. & Smith, A.M.** 1, 1992, *Development*, Vol. 116, págs. 201-11.
42. *Altered neurochemical profile after traumatic brain injury: H-MRS biomarkers of pathological.* **Harris, J.L., et al.** 2012, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, Vol. 32, págs. 2122–2134.
43. *The role of markers of inflammation in traumatic brain injury.* **Woodcock T, M.C. Morganti-Kossmann.** 18, Marzo de 2013, *Frontiers in neurology*, Vol. 4, págs. 1-18.
44. *The p38 α MAPK regulates microglial responsiveness to diffuse traumatic brain injury.* **Bachstetter AD, Rowe RK, Kaneko M, Goulding D, Lifshitz J, Van Eldik LJ.** 33, Abril de 2013, *The Journal of Neuroscience*, Vol. 3, págs. 6143-6153.
45. *Wallerian Degeneration in Central Nervous System: Dynamic Associations between Diffusion Indices and Their Underlying Pathology.* **Qin, W., et al.** (7), 2012, *Plos One*, Vol. 7, págs. 1-11.
46. *Caloric Restriction Suppresses Microglial Activation and Prevents Neuroapoptosis Following Cortical Injury in Rats.* **Loncarevic-Vasiljkovic, et al.** (5), s.l. : *Plos One*, 2012, Vol. 5, págs. 1-10.

47. *Microglial-Neuronal interactions in synaptic damage and recovery.* **recovery, Bruce - Keller AJ.** 1999, *J. Neuroscience Res*, Vol. 58, págs. 191-201.
48. *Meta-Analysis of APOE4 Allele and Outcome after Traumatic Brain Injury.* **Zhuo, W., Xu, D., Peng, X., Zhang, Q., Jia, J. & Crutcher, K.** 2008, *Journal of Neurotrauma*, Vol. 25, págs. 279–290.
49. *sAPP α rescues deficits in amyloid precursor protein knockout mice following focal traumatic brain injury.* **Corrigan F, Vink R, Blumbergs PC, Masters CL, Cappai R, van den Heuvel C.** 1, Junio de 2012, *Journal of neurochemistry*, Vol. 122, págs. 208-220.
50. *Apolipoprotein E4 and traumatic brain injury.* **Houlden, H. and R Greenwood.** 10, Junio de 2006, *Journal Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, Vol. 77, págs. 1106–1107.
51. *Meta-analysis of APOE4 allele and outcome after traumatic brain injury.* **Zhou W, Xu D, Peng X, Zhang Q, Jia J, Crutcher KA.** (4), Abril de 2008, *Journal of neurotrauma*, Vol. 25, págs. 279-290.
52. *Molecular mechanisms of cognitive dysfunction following traumatic brain injury.* **Walker, K. y Tesco, G.** 29, 2013, *J. Frontiers in Aging Neuroscience*, Vol. 5, págs. 1-25. doi: 10.3389/fnagi.2013.00029.
53. *Experimental Traumatic Brain Injury.* **Albert-Weissenberger, C. & Sirén, A.L.** 16, 2010, *Experimental & Translational Stroke Medicine*, Vol. 2, págs. 3-8.
54. *A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat.* **Dixon, C.E., Clifton, G.L., Lighthall, J.W., Yaghamai, A.A. & Hayes, R.L.** 3, 1991, *J Neurosci Methods*, Vol. 39, págs. 253-262.
55. *A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat.* **Dixon, C.E., Clifton, G.L., Lighthall, J.W., Yaghamai, A.A. & Hayes, R.L.** 3, 1991, *J Neurosci Methods.*, Vol. 39, págs. 253-562.
56. **Marmarou, C.R., Prieto, R., Taya, K., Young, H.F. & Marmarou, A.** Chapter 34. *Marmarou Weight Drop Injury Model.* [aut. libro] J. Chen. *Animal Models of Acute Neurological Injuries.* Virginia : Humana Press, 2009, págs. 393-407.
57. *cute neuroprotective effects of extremely low-frequency electromagnetic fields after traumatic brain injury in rats.* **Yang, Y., Ling, L., Yan-Gang, W., Zhou, F., Jun, Z., Li-Zhou, W., Qian-Fa, L. & Wei-Ping, L.** 1, 2012, *Neuroscience Letters*, Vol. 516, págs. 15-20.
58. *Sleep deprivation has a neuroprotective role in a traumatic brain injury of the rat.* **Martinez-Vargas, M., Estrada-Rojo, F., Tabla-Ramon, E., Navarro-Argüelles, H., Ortiz-Lailzon, N., Hernández-Chávez, A., Solis, B., Martinez, R., Pérez, A., Morales-**

Gómez, J., González-Rivera, R., Nava Tavera, K. & Navarro, L. 2, 2012, *Neuroscience Letters*, Vol. 529, págs. 118-122.

59. *Exercise facilitates the action of dietary DHA on functional recovery after brain trauma.* **Wu, A., Ying, Z. & Gomez-Pinilla, F.** 2013, *Neuroscience*, Vol. 248, págs. 655-663.

60. *Fish oil improves motor function, limits blood–brain barrier disruption, and reduces Mmp9 gene expression in a rat model of juvenile traumatic brain injury.* **Russell, K.L., Berman, N.E.J., Gregg, P.R.A. & Levant, B.** 1, 2014, *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)*, Vol. 90, págs. 5-11.

61. *Environmental enrichment promotes robust functional and histological benefits in female rats after controlled cortical impact injury.* **Monaco, C., Mattioli, V., Folweiler, K., Tay, J., Yelleswarapu, N., Curatolo, L., Matter, A., Cheng, J. & Kline, A.** 2013, *Experimental Neurology*, Vol. 247, págs. 410-418.

62. *Interleukin-10 mediates the neuroprotection of hyperbaric oxygen therapy against traumatic brain injury in mice.* **Chen, X., Duan, X.-S., Xu, L.-J., Zhao, J.-J., She, Z.-F., Chen, W.-W., Zheng, Z.-J. & Jiang, G.-D.** 266, 2014, *Neuroscience*, págs. 235-243.

63. *The effects of different hyperbaric oxygen manipulations in rats after traumatic brain injury.* **Yang, Y., Zhang, Y., Lin, G., Xie, H., Pan, H., Huang, B., Liu, J., Liu, H., Zhang, N., Li, L. & Chen, J.** 2014, *Neuroscience Letters*, Vol. 56, págs. 38-43.

64. *Microglial activation induced by traumatic brain injury is suppressed by postinjury treatment with hyperbaric oxygen therapy.* **Lim, S., Wang, C., Wang, Y., Chio, C., Niu, K. & Kuo, J.** 2, 2013, *Journal of Surgical Research*, Vol. 184, págs. 1076-1084.

65. *Neural progenitor cell transplantation promotes neuroprotection, enhances hippocampal neurogenesis, and improves cognitive outcomes after traumatic brain injury.* **Blaya, M., Tsoulfas, P., Bramlett, H. & Dietrich, W.** 2015, *Experimental Neurology*, Vol. 264, págs. 67-81.

66. *Qianqian Han, Jun Gao, Ming Feng, Xinjie Bao, Jianwu Dai, Renzhi Wang, Transplantation of human mesenchymal stem cells loaded on collagen scaffolds for the treatment of traumatic brain injury in rats.* **Guan, J., Zhu, Z., Zhao, R., Xiao, Z., Wu, C., Han, Q., Chen, L., Tong & W., Zhang, J.** 24, 2013, *Biomaterials*, Vol. 34, págs. 5937-5946.

67. *Mannitol enhances therapeutic effects of intra-arterial transplantation of mesenchymal stem cells into the brain after traumatic brain injury.* **Okuma, Y., Wang, F., Toyoshima, A., Kameda, M., Hishikawa, T., Tokunaga, K., Sugiu, K., Liu, K., Haruma, J., Nishibori, M., Yasuhara, T., Date, I.** 2013, *Neuroscience Letters*, Vol. 554, págs. 156-161.

68. *Neuronal damage and functional deficits are ameliorated by inhibition of aquaporin and HIF1 α after traumatic brain injury (TBI).* **Shenaq, M., Kassem, H., Peng, C., Schafer, S., Ding, J., Fredrickson, V., Guthikonda, M., Kreipke, C., Rafols, J. y Ding, Y.** 1–2, 2012, *Journal of the Neurological Sciences*, Vol. 323.
69. *Inhibition of transforming growth factor beta-activated kinase 1 confers neuroprotection after traumatic brain injury in rats.* **Zhang, D., Hu, Y., Sun, Q., Zhao, J., Cong, Z., Liu, H., Zhou, M., Li, K. y Hang, C.** 2013, *Neuroscience*, Vol. 238.
70. *Elucidating the role of 5-HT_{1A} and 5-HT₇ receptors on 8-OH-DPAT-induced behavioral recovery after experimental traumatic brain injury.* **Yelleswarapu, N., Tay, J., Fryer, W., Shah, M., Garcia, M., Cheng, J. y Kline, A.** 2, 2012, *Neuroscience Letters*, Vol. 515.
71. *Administration of palmitoylethanolamide (PEA) protects the neurovascular unit and reduces secondary injury after traumatic brain injury in mice.* **Ahmad, A., Crupi, R., Impellizzeri, D., Campolo, M., Marino, A., Esposito, E. y Cuzzocrea, S.** 8, 2012, *Brain, Behavior, and Immunity*, Vol. 26.
72. *The effects of adrenomedullin in traumatic brain injury.* **Demir, H., Onur, O., Denizbasi, A., Akoglu, H., Eroglu, S., Ozpolat, C. y Akoglu, E.** 2013, *Peptides*, Vol. 43.
73. *The neuroprotective effect of acute moderate alcohol consumption on caspase-3 mediated neuroapoptosis in traumatic brain injury: The role of lysosomal cathepsin L and nitric oxide.* **Kanbak, G., Kartkaya, K., Ozcelik, E., Guvenal, A., Kabay, S., Arslan, G. y Durmaz, R.** 2, 2013, *Gene*, Vol. 512.
74. *Allicin protects rat cortical neurons against mechanical trauma injury by regulating nitric oxide synthase pathways.* **Zhou, Y., Li, W., Han, H., Gao, D., He, X., Li, L., Song, J. y Fei, Z.** 2014, *Brain Research Bulletin*, Vol. 100.
75. *Amantadine preserves dopamine level and attenuates depression-like behavior induced by traumatic brain injury in rats.* **Tan, L., Ge, H., Tang, J., Fu, C., Duanmu, W., Chen, Y., Hu, R., Sui, J., Liu, X. y Feng, H.** 2015, *Behavioural Brain Research*, Vol. 279.
76. *Caffeine prevents acute mortality after TBI in rats without increased morbidity.* **Lusardi, T., Lytle, N., Szybala, C. y Boison, C.** 1, 2012, *Experimental Neurology*, Vol. 234.
77. *Activation of metabotropic glutamate receptor 5 reduces the secondary brain injury after traumatic brain injury in rats.* **Wang, J., Wang, H., Cong, Z., Zhang, X., Zhou, X. & Zhang, D.** 3, 2013, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol. 430, págs. 1016-1021.

78. *Curcumin pretreatment attenuates brain lesion size and improves neurological function following traumatic brain injury in the rat.* **Samini, F., Samarghandian, S., Borji, A., Mohammadi, G., & Bakaian, M.** 2013, *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, Vol. 110, págs. 238-244. .
79. *Attenuation of axonal injury and oxidative stress by edaravone protects against cognitive impairments after traumatic brain injury.* **Ohta, M, Higashi, Y., Yawata, T., Kitahara, M., Nobumoto, A., Ishida, E., Tsuda, M, Fujimoto, Y. & Shimizu, K.** 2013, *Brain Research*, Vol. 1490, págs. 184-192. .
80. *Etazolate, an α -secretase activator, reduces neuroinflammation and offers persistent neuroprotection following traumatic brain injury in mice.* **Mehrnaz, M. & Tehrani, J.** 2013, *Neuropharmacology*, Vol. 67, págs. 183-192.
81. *The antioxidative, non-psychoactive tricyclic phenothiazine reduces brain damage after experimental traumatic brain injury in mice.* **Songarj, P., Luh, C., Staib-Laszczik, I., Engelhard, K., Moosmann, B. & Thal, S.** 2015, *Neuroscience Letters*, Vol. 584, págs. 253-258.
82. *FTY720 does not protect from traumatic brain injury in mice despite reducing posttraumatic inflammation.* **MencI, S., Hennig, N., Hopp, S., Schuhmann, M., Albert-Weissenberger, C., Sirén, A. & Kleinschnitz C.** 1-2, 2014, *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 274, págs. 125-131.
83. *Neuroprotection by genipin against reactive oxygen and reactive nitrogen species-mediated injury in organotypic hippocampal slice cultures.* **Hughes, R., Silva, V., Ahmed, I., Shreiber, D. & Morrison B.** 2014, *Brain Research*, Vol. 1534, págs. 308-314. .
84. *Glycyrrhizin inhibits traumatic brain injury by reducing HMGB1–RAGE interaction.* **Okuma, Y., Liu, K., Wake, H., Liu, R., Nishimura, Y., Hui, Z., Teshigawara, K., Haruma, J., Yamamoto, Y., Yamamoto, H., Date, I., H. Takahashi, Mori, S. & Nishibori, M.** 2014, *Neuropharmacology*, Vol. 85, págs. 18-26.
85. *Glucose administration after traumatic brain injury improves cerebral metabolism and reduces secondary neuronal injury.* **Moro, N., Ghavim, S., Harris, N., Hovda, D. & Sutton, R.** 2013, *Brain Research*, Vol. 1535, págs. 124-136.
86. *Early ghrelin treatment attenuates disruption of the blood brain barrier and apoptosis after traumatic brain injury through a UCP-2 mechanism.* **Lopez, N., Gaston, L., Lopez, K., Coimbra, R., Hageny, A., Putnam, J., Eliceiri, B., Coimbra, R. & Bansal, V.** 2012, *Brain Research*, Vol. 1489, págs. 140-148.
87. *Intravenous administration of Honokiol provides neuroprotection and improves functional recovery after traumatic brain injury through cell cycle inhibition.* **Wang, H.,**

- Liao, Z., Sun, X., Shi, Q., Huo, G., Xie, Y., Tang, X., Zhi, X. & Tang, Z. 2014, *Neuropharmacology*, Vol. 86, págs. 9-21.
88. *Intravenous immunoglobulin G improves neurobehavioral and histological outcomes after traumatic brain injury in mice.* Jeong, S., Lei, B., Wang, H., Dawson, H. & James, M. (1–2), 2014, *Journal of Neuroimmunology*, Vol. 276, págs. 112-118.
89. *Inosine improves functional recovery after experimental traumatic brain injury.* Dahir, S., Shabashov, D., Trembovler, V., Alexandrovich, A., Benowitz, L. & Shohami, E. 2014, *Brain Research*, Vol. 1555, págs. 78-88.
90. *Lipoxin A4 attenuates brain damage and downregulates the production of pro-inflammatory cytokines and phosphorylated mitogen-activated protein kinases in a mouse model of traumatic brain injury.* Li, L., Li, B., Zhao, Z. & Tao, L. 2013, *Brain Research*, Vol. 1502, págs. 1-10. .
91. *Luteolin provides neuroprotection in models of traumatic brain injury via the Nrf2–ARE pathway.* Xu, J., Wang, H., Ding, K., Zhang, L., Wang, C., Li, T., Wei, W. & Lu, X. 2014, *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 71, págs. 186-195.
92. *Posttraumatic administration of luteolin protects mice from traumatic brain injury: Implication of autophagy and inflammation.* Xu, J., Wang, H., Lu, X., Ding, K., Zhang, L., He, J., Wei, W. & Wu, Y. 2014, *Brain Research*, Vol. 1582, págs. 237-246.
93. *Melatonin reduced microglial activation and alleviated neuroinflammation induced neuron degeneration in experimental traumatic brain injury: Possible involvement of mTOR pathway.* Ding, K., Wang, H., Xu, J., Lu, X., Zhang, L., & Zhu, L. s.l. : 76, 2014, *Neurochemistry International*, págs. 23-31.
94. *Effect of Melatonin on Intracranial Pressure and Brain Edema Following Traumatic Brain Injury: Role of Oxidative Stresses.* Dehghan, F., Khaksari-Hadad, M., Asadikram, G., Najafipour, H. & Hahrokhi, N. 4, 2013, *Archives of Medical Research*, Vol. 44, págs. 251-258.
95. *Evaluation of late cognitive impairment and anxiety states following traumatic brain injury in mice: The effect of minocycline.* Siopi, E., Llufríu-Dabén, G., Fanucchi, F., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C. & Jafarian-Tehrani, M. 2, 2012, *Neuroscience Letters*, Vol. 511, págs. 110-115.
96. *MLC901, a Traditional Chinese Medicine induces neuroprotective and neuroregenerative benefits after traumatic brain injury in rats.* Quintard, H., Lorivel, T., Gandin, C., Lazdunski, M. & Heurteaux, C. 2014, *Neuroscience*, Vol. 277, págs. 72-86.
97. *N-acetylcysteine amide confers neuroprotection, improves bioenergetics and behavioral outcome following TBI.* Pandya, J., Readnower, R., Patel, S., Yonutas, H.,

Pauly, J., Goldstein, G., Rabchevsky A. & Sullivan P. 2014, *Experimental Neurology*, Vol. 257, págs. 106-113.

98. *Intranasal nerve growth factor attenuates tau phosphorylation in brain after traumatic brain injury in rats.* **Lv, Q., Lan, W., Sun, W., Ye, R., Fan, X., Ma, M., Yin, Q., Jiang, Y., Xu, G., Dai, J., Guo, R. & Liu, X.** (1-2), 2014, *Journal of the Neurological Sciences*, Vol. 345, págs. 48-55.

99. *Effects of selective and non-selective cyclooxygenase inhibition against neurological deficit and brain oedema following closed head injury in mice.* **Girgis, H., Palmier, B., Croci, N., Soustrat, M., Plotkine, M. & Marchand-Leroux, C.** 2013, *Brain Research*, Vol. 1491, págs. 78-87.

100. *Progesterone treatment improves cognitive outcome following experimental traumatic brain injury in rats.* **Si, D., Wang, H., Wang, Q., Zhang, C., Sun, J., Wang, Z., Zhang, Z. & Zhang, Y.** 2013, *Neuroscience Letters*, Vol. 553, págs. 18-23.

101. *In vivo leukocyte-mediated brain microcirculatory inflammation: a comparison of osmotherapies and progesterone in severe traumatic brain injury.* **Kumasaka, K., Marks, J., Eisenstadt, R., Murcy, M., Samadi, D., Li, S., Johnson, V., Browne, K., Smith, D., Schwab, C. & Pascual, J.** 6, 2014, *The American Journal of Surgery*, Vol. 208, págs. 961-968.

102. *Improved cognitive outcome after progesterone administration is associated with protecting hippocampal neurons from secondary damage studied in vitro and in vivo.* **Si, D., Yang, P., Jiang, R., Zhou, H., Wang, H. & Zhang, Y.** 2014, *Behavioural Brain Research*, Vol. 264, págs. 135-142.

103. *Differences in brain edema and intracranial pressure following traumatic brain injury across the estrous cycle: Involvement of female sex steroid hormones.* **Maghool, F., Khaksari, M. & Siahposht-Khachki, A.** 2013, *Brain Research*, Vol. 1497, págs. 61-72.

104. *Rapamycin protects against apoptotic neuronal death and improves neurologic function after traumatic brain injury in mice via modulation of the mTOR-p53-Bax axis.* **Ding, K., Wang, H., Wu, Y., Zhang, L., Xu, J., Li, T., Ding, Y., Zhu, L. & He, J.** s.l. : 1, 2014, *Journal of Surgical Research*.

105. *TLR4 inhibitor resatorvid provides neuroprotection in experimental traumatic brain injury: Implication in the treatment of human brain injury.* **Zhang, D., Li, H., Li, T., Zhou, M., Hao, S., Yan, H., Yu, Z., Li, W., Li, K. & Hang, C.** s.l. : 75, 2014, *Neurochemistry International*, págs. 11-18.

106. *SDF-1 α induces angiogenesis after traumatic brain injury.* *Brain Research*, 1444, 76-86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2011.12.055>. **Li, S., Wei, M., Zhou, Z., Wang, B., Zhao, X. & Zhang, J.** s.l. : 1444, 2012, *Brain Research*, págs. 76-86.

107. *Effects of early rolipram treatment on histopathological outcome after controlled cortical impact injury in mice.* **Coleen, M. Atkins, M., Cepero, Y., Kang, D., Liebl, J., Dietrich, W.** 4, 2013, *Neuroscience Letters*, Vol. 532, págs. 1-16.
108. *Hydrogen-rich saline protects against oxidative damage and cognitive deficits after mild traumatic brain injury.* **Hou, Z., Luo, W., Sun, X., Hao, S., Zhang, Y., Xu, F., Wang, Z. & Liu, B.** 6, 2012, *Brain Research Bulletin*, Vol. 88, págs. 560-565.
109. *Protective effects of hydrogen sulfide in a rat model of traumatic brain injury via activation of mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels and reduction of oxidative stress.* **Jiang, X., Huang, Y., Lin, W., Gao, D. & Fei, Z.** 2, 2013, *Journal of Surgical Research*, Vol. 184, págs. 27-35.
110. *Exogenous T3 administration provides neuroprotection in a murine model of traumatic brain injury.* **Crupi, R., Paterniti, I., Campolo, M., Di Paola, R., Cuzzocrea, S. & Esposito, E.** 1, 2013, *Pharmacological Research*, Vol. 70, págs. 80-89.
111. *Extracellular signal-regulated kinase 1/2 is involved in a tamoxifen neuroprotective effect in a lateral fluid percussion injury rat model.* **Tsai, Y., Wang, C., Leung, P., Lin, K., Chio, C., Hu, C. & Kuo, J.** 1, 2014, *Journal of Surgical Research*, Vol. 189, págs. 106-116.
112. *Pharmacological induction of the 70-kDa heat shock protein protects against brain injury.* **Kim, N., Kim, J.Y. & Yenari, M.A.** 22, 2015, *Neuroscience*, Vol. 284, págs. 912-919.
113. *The nuclear factor erythroid 2-like 2 activator, tert-butylhydroquinone, improves cognitive performance in mice after mild traumatic brain injury.* **Saykally, J.N., Rachmany, L., Hatic, H., Shaer, A. Rubovitch, V., Pick, C.G. & Citron, B.A.** 25, 2012, *Neuroscience*, Vol. 223, págs. 305-314.
114. *Role of Resveratrol in Prevention and Therapy of Cancer: Preclinical and Clinical Studies.* **Aggarwal, B., Bhardwaj, A., Aggarwal, R., Seeram, N., Shishodia, S., y Takada, Y.** Texas : *Anticancer Research*, 2004, *Anticancer Research*, Vol. 24, págs. 2783-2840.
115. *The phenomenon of resveratrol: redefining the virtues of promiscuity.* **Pezzuto, J.** 2011, *Annals of the New York academy of science*, págs. 123-130.
116. *The pharmacology of resveratrol in animal and humans.* **Park, E. & Pezzuto.** 2015, *Biochimica et Biophysica Acta* 1852, págs. 1071-1113.
117. *Resveratrol as a chemopreventive agent: a promising.* **Delmas, D., Lancon, A., Colin, D. Jannin, B., Latruffe, N.** 2006, *Curr Drug Targets*, págs. 423-442.

118. *Biological effects of resveratrol*. **Bhat K, Kosmeder, JW & Pezzuto, JM.** 2001, *Antioxid Redox Signal*, págs. 1041-1064.
119. *Antioxidant Therapies for Traumatic Brain Injury*. **Hall, E.D., Vaishnav, R.A. & Mustafa, A.G.** 1, 2010, *Neurotherapeutics*, Vol. 7, págs. 51-61.
120. *Oxidative and nitrative stress in neurodegeneration*. **Cobb, C.A. & Cole, M.P.** 2015, *Neurobiology of Disease*, Vol. En prensa.
121. *Resveratrol neuroprotection in stroke and traumatic CNS injury*. . **Lopez, M.S., Dempsey, R.J. & Vemuganti, R.** 2015, *Neurochemistry International*, Vol. En prensa.
122. *Supplemental substances derived from foods as adjunctive therapeutic agents for treatment of neurodegenerative diseases and disorders*. **Bigford, G.E. & Del Rossi, G.** 4, 2014, *Advances in Nutrition J.* , Vol. 5, págs. 394-403.
123. *Nutritional treatment for acute and chronic traumatic brain injury patients*. **Curtis, L. & Epstein, P.** 3, 2014, *J Neurosurg Sci.*, Vol. 58, págs. 151-160.
124. *Perspectives on Molecular Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Strategies in Traumatic Brain Injury*. **Mendes, A.M., de Souza, L.F., Walz, R. & Dafre, A.R.** 2014, *BioMed Research International*, Vol. 2014, págs. 1-19.
125. *Resveratrol protects astrocytes against traumatic brain injury through inhibiting apoptotic and autophagic cell death*. **Lin, C.J., Chen, T.H., Yang, L.Y. & Shih, C.M.** e1147, 2014, *Cell Death and Disease*, Vol. 5.
126. *Resveratrol decreases inflammation in the brain of mice with mild traumatic brain injury*. **Gatson JW, Liu MM, Abdelfattah K, Wigginton JG, Smith S, Wolf S, Minei JP.** 2, Febrero de 2013, *The Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, Vol. 74, págs. 470-485.
127. *Effect of resveratrol on gliotransmitter levels and p38 activities in cultured astrocytes*. **Zhou, H., Chen, Q., Kong, D.L., Guo, J., Wang, Q. & Yu, S.Y.** 1, 2011, *Neurochem Res.*, Vol. 36, págs. 17-26. .
128. *Neuroprotection by resveratrol against traumatic brain injury in rats*. **Ates O, S. Cayli, E. Altinoz, I. Gurses, N. Yucel, M. Sener, A. Kocak and S. Yologlu.** 1-2, Enero de 2006, *Molecular and cellular biochemistry*, Vol. 294, págs. 137-144.
129. *Involvement of estrogen receptors in the resveratrol-mediated increase in dopamine transporter in human dopaminergic neurons and in striatum of female mice*. **Di Liberto, et al. ().** 2, 2012, *Neuropharmacology*, Vol. 62, págs. 1011-1018. .

130. **Santos, Leonardo.** *Sirtuínas, enzimas moduladoras del metabolismo energético.* s.l. : UdeLaR, 2011.
131. *Resveratrol attenuates behavioral impairments and reduces cortical and hippocampal loss in a rat controlled cortical impact model of traumatic brain injury.* **Singleton, R.H., H.Q. Yan, W. Fellows-Mayle, and C.E. Dixon,** s.l. : Neurotrauma, , 2010, Vols. 27(6):1091-9.
132. *Neuroprotective effects of resveratrol against traumatic brain injury in immature rats.* **Sönmeza, Ü., Sönmezb, A., Erbila, G., Tekmena, I. & Baykaraa, B.** 2, Izmir : Neuroscience Letters, 13 de junio de 2007, Vol. 420, págs. 133–137. doi. 101016.
133. *Neuropsychological and neuroimaging findings in traumatic brain injury and post-traumatic stress disorder.* **Brenner, L.A.** 3, 2011, Dialogues in Clinical Neuroscience, Vol. 13.
134. *Tamaño del efecto: revisión teórica y aplicaciones con el sistema estadístico vista.* **Ledesma, R., Macbeth, G. & Cortada de Kohan, N.** 3, Revista Latinoamericana de Psicología, Vol. 40, págs. 425-439.
135. *Cytoskeletal plasticity in cells expressing neuronal Microtubule-Associated Proteins.* **Kaech, S., Ludin, B. & Matus, A.** 1996, Neuron, Vol. 17, págs. 1189–1199.
136. *Effect of stab injury in the rat cerebral cortex on temporal pattern of expression of neuronal cytoskeletal proteins: An immunohistochemical study.* **Lavrnja I., Savic D., Parabucki, A., Dacic, S., Laketa, D., Pekovic & Stojiljkovic, S.** 2, 2015, Acta Histochemica, Vol. 117, págs. 155–162. doi:10.1016/j.acthis.2014.12.004.
137. *Changes in microtubule-associated protein 2 and amyloid precursor protein immunoreactivity following traumatic brain injury in rat: influence of MK-801 treatment.* **Lewén, A., Li, G.L., Olsson, Y. & Hillered, L.** 1996, Brain Research, Vol. 719., págs. 161-171.
138. *Temporal response and effects of excitatory amino acid antagonism on microtubule-associated protein 2 immunoreactivity following experimental brain injury in rats.* **Hicks, R.R., Smith, D.H. & McIntosh, T.K.** 1995, Brain Research, Vol. 678, págs. 151-160.
139. *Apoptosis neuronal: la diversidad de señales y de tipos celulares.* **Becerra, L.V. & Pimienta, H.** 1, 2009, Colombia Médica, Vol. 40, págs. 124-133.
140. *Caracterización de un modelo organotípico de cultivos de neuronas corticales de humano derivadas de trauma craneoencefálico.* **Riascos, D., Guzmán, F., Buriticá, E., Palacios, M. Escobar, M.I. & Pimienta, H.** 3, 2008, Colombia Médica, Vol. 39, págs. 29-37.

141. *Morphological alteration and reduction of map2-immunoreactivity in pyramidal neurons of cerebral cortex in a rat model of focal cortical compression.* **Furutani, R. & Kibayashi, R.** 2012, *Journal of Neurotrauma*, Vol. 29, págs. 1266–1276.
142. *Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS.* **Salter, M.W. & Beggs, S.** 2014, *Cell*, Vol. 158, págs. 15-24.
143. *Morphological and genetic activation of microglía after diffuse traumatic brain injury in the rat.* **Cao, T., Thomas, T.C., Zeibell, J.M., Pauly, J.R. & Lifshitz, J.** 2012, *Neuroscience*, Vol. 225., págs. 65-75.
144. *High Resolution Microdialysis. Methodological issues and application to the study of inflammatory brain response.* **De Los Rios, J., Sahuquillo, J., Merino, M., Poca, M. & Expósito, L.** 5, 2009, *Neurocirugía*, Vol. 20, págs. 433-448.
145. *Progressive Neurodegeneration after Experimental Brain Trauma: Association with Chronic Microglial Activation.* **Loane, D., Kumar, A., Stoica, B., Cabatbat, R., & Faden, A.** 1, 2014, *J. Neuropathol Exp Neurol*, Vol. 73, págs. 1-28.
146. *Temporal patterns of cortical proliferation of glial cell populations after traumatic brain injury in mice.* **Susarla, B., Villapol, S., Yi, J.H., Geller, H.M. & Symes, A.J.** 2, 2014, *Asn Neuro*, Vol. 6, págs. 159-170.
147. *Macrophagic and microglial responses after focal traumatic brain injury in the female rat.* **Turtzo, L.C., Lescher, J., Janes, L., Dean, D., Budde, M.D., & Frank, J.** 82, 2014, *Journal of Neuroinflammation*, Vol. 11, págs. 1-14.
148. *Strategies for CNS repair following TBI.* **Aertker, B.M., Bedi, S. & Cox, C.S.** 2015, *Experimental Neurology*, Vol. En prensa.
149. *Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices.* **Stence, N., Waite, M. & Dailey, M.** 3, 2001, *Glia*, Vol. 33, págs. 256-266.
150. *Distribution of Microglia and Astrocytes in Different Regions of the Normal Adult Rat Brain.* **Savchenko, V.L., Nikonenko, I.R., Skibo, G.G. & McKanna, J.A.** 6, 1997, *Neurophysiology*, Vol. 29, págs. 343-351.
151. *Toll-like receptor activation reveals developmental reorganization and unmasks responder subsets of microglia.* **Scheffel, J., Regen, T., Van Rossum, D., Seifert, S., Ribes, S., Nau, R., ... Hanisch, U.K.** 12, 2012, *Glia*, Vol. 60, págs. 1930–1943.
152. *Microglia dynamics and function in the CNS.* **Parkhurst, C.N. & Gan, C.B.** 2010, *Current Opinion in Neurobiology*, Vol. 20, págs. 595–600.

153. *Proliferation of parenchymal microglia is the main source of microgliosis after ischaemic stroke.* **Li, T., Pang, S., Yu, Y., Wu, X., Guo, J. & Zhang, W.** 2013, *Barin: a journal of neurology*, Vol. 136, págs. 3578–3588.
154. **Rojas, L.M.** *Caracterización de la respuesta microglial en un curso temporal postisquémia consecuente con embolismo arterial inducido experimentalmente en rata wistar.* Ibagué (T) : Universidad del Tolima, 2014.
155. *Time course of glial proliferation and glial apoptosis following excitotoxic CNS injury.* **Dihné, M., Block, F., Korr, H. & Töpper, R.** 2001, *Brain Research*, Vol. 902, págs. 178–189.
156. *Another barrier to regeneration in the CNS: activated macrophages induce extensive retraction of dystrophic axons through direct physical interactions.* **Horn, K.P., Busch, S.A., Hawthorne, A.L., van Rooijen, N. & Silver, J.** 38, 2008, *J. Neuroscience*, Vol. 28, págs. 9330–9341.
157. *Activated microglia inhibit axonal growth through RGMA.* **Kitayama, M., Ueno, M., Itakura, T. & Yamashita, T.** 9, 2011, *Plos One*, Vol. 6, págs. 1-9.
158. *Resveratrol rescues the impairments of hippocampal neurons stimulated by microglial over-activation in vitro.* **Wang, F., Cui, N., Yang, L., Shi, L. & Li, Q.** 2015, *Cell Mol Neurobiol*.
159. *Alteración de la organización laminar y de la dendroarquitectura de la corteza cerebral del humano post-trauma craneoencefálico.* **Escobar, M., Guzman, F., Buriticá, E., Riascos, D., Villamil, L. & Pimienta, H.** 3, 2008, *Colombia Médica*, Vol. 39, págs. 51-59.
160. *Microglial activation induced by brain trauma is suppressed by post-injury treatment with a PARP inhibitor.* **d'Avila, J., Lam, T., Bingham, D., Shi, J., Won, S., Kauppinen, T., Massa, S., Liu, J., Swanson, R.** 31, 2012, *Journal of Neuroinflammation*, Vol. 9, págs. 1-11.
161. *SIRT1 is required for AMPK activation and the beneficial effects of resveratrol on mitochondrial function.* **Price, N.L., A.P., Ling, A.J., Duarte, A.F., Martin-Montalvo, A., North, B.J. y otros.** s.l. : 15, 2012, *Cell Metab*, Vol. 5, págs. 675–690.
162. *Resveratrol decreases inflammation in the brain of mice with mild traumatic brain injury.* **Gatson, J.W., Liu, M.M., Abdelfattah, K., Wigginton, J.G., Smith, S., Wolf, S. & Minei, J.P.** 2, 2013, *J. Trauma Acute Care Surg.*, Vol. 74, págs. 470-474.
163. *Resveratrol differentially modulates inflammatory responses of microglia and astrocytes.* **Lu, X., Ma, L., Ruan, L., Kong, Y., Mou, H., Zhang, Z., Wang, Z., Wang, J. & Le, Y.** 46, (2010), *Journal of Neuroinflammation*, Vol. 7, págs. 2-14.

164. *Resveratrol prevents neuronal apoptosis in an early brain injury model.* **Zhou, X.M., Zhou, M.L., Zhang, X.S., Zhuang, Z., Li, T. Shi, J.X., & Zhang, X.** 2014, Journal of surgical research, Vol. 189, págs. 159-165.
165. *Trans-resveratrol as a neuroprotectant.* *Molecules.* **Robb, E.L. & Stuart, J.A.** 2010, Molecules, Vol. 15.
166. *The molecular targets of resveratrol.* **Kulkarni, S.S. & Cantó, C.** 2015, Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1852, págs. 1114–1123.
167. *Resveratrol prevents neuronal apoptosis in an early brain injury model.* **Zhou, X.M., Zhou, M.L., Zhang, X.S., Zhuang, Z., Li, T. Shi, J.X., & Zhang, X.** 2014, Journal of surgical research, Vol. 189, págs. 159-165.
168. *Resveratrol downregulates glutamate-1 transporter expression and microglia activation in the hippocampus following cerebral ischemia reperfusion in rats.* **Girbovan, C. & Plamondon, H.** 2015, Brain Research, págs. 1-12.
169. *Exacerbated inflammatory responses related to activated microglia after traumatic brain injury in progranulin-deficient mice.* **Tanaka, Y., Matsuwaki, T., Yamanouchi, K. & Nishiara M.** 2013, Neuroscience, Vol. 231, págs. 49-60.
170. *Bioavailability of Resveratrol.* **Walle, T.** 15, 2011, Ann N y Acad Sci, Vol. 9.
171. *Isoflurane exerts neuroprotective actions at or near the time of severe traumatic brain injury.* **Statler, K.D., Alexander, H., Vagni, V., Holubkov, R., Dixon, C.E., Clark, R.S., Jenkins, L., Kochanek, P.M.** 1, 2006, Brain Res., Vol. 1076, págs. 216-224.
172. *Neuroprotection for traumatic brain injury: translational challenges and emerging therapeutic strategies.* **Loane, D.J. & Faden, A.I.** 12, 2010, Trends in Pharmacological Sciences, Vol. 31, págs. 596-604.
173. *Anaesthetic-related neuroprotection: intravenous or inhalational agents?* **Schifilliti, D., Grasso, G., Conti, A. & Fodale, V.** 11, 2010, CNS Drugs, Vol. 24, págs. 893-907. doi: 10.2165/11584760-000000000-00000..
174. *Anestesia total intravenosa versus anestésicos inhalados en neurocirugía.* **Zuleta-Alarcón, A., Castellón-Larios, K., Niño-de Mejía, M.C., & Bergese, S.D.** 1, 2015, Rev Colomb Anestesiol., Vol. 43, págs. 9-14. DOI: 10.1016/j.rca.2014.07.011.
175. *Controlled cortical impact and craniotomy induce strikingly similar profiles of inflammatory gene expression, but with distinct kinetics.* **Lagraoui, M., Latoche, J.R., Cartwright, N.G., Sukumar, G., Dalgard, C.L. & Schaefer, B.C.** 155, 2012, Frontiers Neurology, Vol. 3, págs. 1-14.

176. *Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated.* **Loane, D. & Kumar, A.** 2015, *Experimental Neurology*, págs. 1-41.

177. *Impaired axoplasmic transport is the dominant injury induced by an impact acceleration injury device: an analysis of traumatic axonal injury in pyramidal tract and corpus callosum of rats.* **Kallakuri S, Li Y, Zhou R, Bandaru S, Zakaria N, Zhang L, Cavanaugh JM.** 1452, Mayo de 2012, *Brain Research*, Vol. 3, págs. 29-38.

178. *Neuroaxonal regeneration is more pronounced in early multiple sclerosis than in traumatic brain injury lesions.* **Schirmer L, Merkler D, König FB, Brück W, Stadelmann C.** (1), Enero de 2013, *Brain Pathology*, Vol. 23, págs. 2-12.

179. *Evolución de los pacientes con trauma craneoencefálico en el Hospital Universitario del Valle: Seguimiento a 12 meses.* **F. Guzmán, M. Moreno, y Montoya, A.** (3), s.l. : Colombia Médica.20:225-244, 2008, Vol. 39.