

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**Sede Sur**

**Departamento de Farmacobiología**

**“Evaluación del efecto del propilparabeno en el daño celular y excitabilidad  
hipocampal inducidos  
por traumatismo craneoencefálico severo en ratas”**

Tesis que presenta:

**Q.F.B. Cindy Lizbeth Santiago Castañeda**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Neurofarmacología y Terapéutica Experimental**

Directora de la tesis:

**Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta**

✚ La presente investigación se realizó en el laboratorio No. 8 del Departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N. (CINVESTAV, Sede Sur) bajo la dirección de la Dra. Luisa L. Rocha Arrieta. Con el apoyo de la Dra. Sandra A. Orozco Suárez, de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional, Siglo XXI, IMSS.

✚ Durante la elaboración de esta tesis se contó con el apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de maestría número 615621 y proyecto 220365. También se contó con el apoyo del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) con la beca número 99097560.

## Agradecimientos

A la **Dra. Luisa Rocha** por toda la confianza, apoyo, disponibilidad, atención y asesoría recibida durante la elaboración de este proyecto ¡Muchas gracias!. Es realmente una persona a la cual yo admiro infinitamente, gracias por permitirme ser parte de su laboratorio y por ser la mejor asesora que puedo tener.

A la **Dra. Sandra Orozco** por abrirme las puertas de su laboratorio de investigación, por su amabilidad, compromiso, sugerencias y la siempre disponibilidad para resolver cualquier duda. Todo su apoyo me ayudó a mejorar este proyecto.

Al **Dr. David Centurión** por sus valiosas contribuciones en cada avance, por sus acertadas preguntas y por su disponibilidad siempre en cada momento. Su asesoría me ayudó enriquecer este trabajo.

A la **Q.F.I. Francia Carmona** por todo el apoyo técnico recibido durante la elaboración de este proyecto de investigación. Por su gran amistad y por siempre regalarme una sonrisa en los peores momentos.

A **Carmen Baltazar** por su amistad, cariño y apoyo técnico recibido en el proceso de histología.

Al **Ing. José Rodolfo Fernández Calderón** por disposición para ayudar en el soporte técnico y mantenimiento de todos los equipos utilizados.

Al personal que labora en el **Bioterio** del CINVESTAV-sur por su apoyo en el cuidado y entrega de los animales a tiempo y su cumplimiento con las normas vigentes.

A la **Lic. María del Pilar Quinteros Carrillo** por proporcionar recursos y apoyo en la búsqueda de material bibliográfico.

A mis amigos del laboratorio 8:

**Dra. Ivette Bañuelos** por todo el apoyo técnico recibido durante la estandarización del modelo en el laboratorio, por su apoyo profesional y bibliográfico. Realmente eres una persona única, con gran conocimiento y paciencia ante las adversidades. Gracias!

---

Al **Dr. Cesar Emmanuel Santana Gómez** muchas gracias por toda su asesoría y tiempo invertido en el aprendizaje de la técnica de UPD. Gracias por su amistad y por siempre tener una sonrisa en su rostro aligerando el trabajo con su buen sentido del humor.

A la **M.C. María Guadalupe Valle Dorado** por todo su apoyo profesional que me brindó siempre y en cada momento para la realización de las pruebas histológicas. Por ser una gran amiga y escucharme siempre.

Al **Dr. Leonardo Lara** por su apoyo profesional para resolver dudas sobre el fármaco de interés de este proyecto y por amistad.

A la **Dra. Manola Cuellar** por su amistad, por las pláticas amenas y por sus sugerencias en cada seminario.

A la **M.C. María de los Ángeles Núñez Lumbreras** no tengo palabras para agradecerte tu amistad, el siempre estar aquí conmigo en los buenos y malos momentos, porque eres para mí más que una amiga, eres una hermana. Eres una persona admirable en todos los sentidos. Gracias por tener siempre un buen consejo para mí a pesar de mi terquedad. ¡Te quiero mucho!

Al **Médico Daniel Pérez Pérez** por el apoyo bibliográfico, asesoría y sugerencias para ayudarme a resolver dudas respecto a este trabajo. Por ser un gran amigo y tenerme paciencia.

A **Psicóloga Marysol Segovia** por el apoyo complementario mutuo para la estandarización y desarrollo de algunos grupos experimentales y por tu amistad. Conocemos lo difícil que fue sacar adelante este proyecto.

Al **Médico Ana Torres** por su invaluable amistad, por todo el apoyo brindado en mejorar esquemas y presentaciones, por su paciencia, comprensión y cariño.

A los nuevos y no tan nuevos integrantes del laboratorio: Christopher Martínez, Alma Pinedo, Christian Frías, Daniel Fonseca y Víctor Navarrete gracias por las risas, por las comidas, por todos los momentos compartidos. Gracias por su amistad. Ojalá el tiempo nos permita pasar más momentos juntos, mis mejores deseos en todo lo académico y laboral.

---

---

A mis amigos:

**Q.F.B. Saul Huerta de la Cruz**, amigo mío gracias por no dejarme ir cuando yo no tenía más esperanzas en mí misma, siempre has estado para mí y eso no tengo como pagarlo. Gracias por tus consejos, por los viajes y por todas las risas, gracias por los regaños y por echarme porras, mis mejores deseos en lo profesional y en lo personal. El éxito está escrito con tu nombre. ¡Te quiero mucho!

**Q.B.P. Ana Belén Salinas Abarca**. Gracias por esa primera oportunidad, por abrirme las puertas de tu casa, gracias por todos los consejos para mejorar la redacción de esta tesis. Gracias por ser mi amiga y mi familia, a tu lado la distancia de casa fue menos, porque junto a ti & a Lía los momentos felices fueron incontables. Las adoro con todo mi corazón. Eres una de las personas más brillantes que conozco, mereces mucho y lo sabes. Mi agradecimiento y admiración.

**Q.F.B. Erick Josué Rodríguez Palma** gracias por tu amistad, por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos, por siempre ser una persona razonable y brindarme tu apoyo. ¡Gracias!

**Q.F.B. Itzel García Tolentino** gracias por estar siempre en los momentos más grises pero también en los más felices, por todas tus ocurrencias, tus buenos y malos consejos, ¡eres única!

**Q.F.B. Andrea Román Sánchez** por ser mi amiga y familia, por estar a mi lado siempre a pesar de todo.

*Si hoy no tuvieras miedo ¿Qué harías?*

---

## Dedicatorias

Este trabajo de investigación está dedicado a mis padres **Norma Castañeda** y **Jesús Santiago**, sin ustedes nada de esto hubiera sido posible, son mi pilar mi vida y mi corazón. Gracias por acompañarme en cada paso, por ser parte de mis aventuras y por apoyarme en cada decisión tomada. Gracias por su amor incondicional. Mami todo el tiempo en que han sufrido mi ausencia, estoy segura valdrá pena. Porque gracias a ustedes se logró otra meta más. Para ustedes todo mi amor y admiración. ¡Los amo!

Para mi pequeño hermano **Ángel Santiago** porque quiero siempre ser ejemplo de que todo se puede si se le pone el empeño suficiente, porque a tu corta edad aprendo de ti. Te amo.

Para mis tíos **Carmen Castañeda** y **Rafael Villalobos**, no tengo palabras que describan lo que mi corazón quiere agradecerles, todo lo que hago siempre también es pensado en ustedes, que la vida me permita regresarles un poco de su amor y cariño incondicional.

Para mis tías: **Rosy, Elda Luz, Candelaria** muchas gracias por todo su apoyo incondicional.

A la persona más importante de mi vida, porque con el todo y sin el nada.

**Índice general**

I. Índice figuras .....	i
II. Índice tablas .....	ii
III. Abreviaturas .....	iii
IV. Resumen .....	v
V. Abstract .....	vi
1. Introducción .....	1
1.1. Traumatismo Craneoencefálico .....	1
1.1.1. Definición .....	1
1.1.2. Epidemiología .....	1
1.1.3. Clasificación .....	1
1.1.4. Fisiopatología .....	2
1.1.4.1. <i>Lesión primaria</i> .....	2
1.1.4.2. <i>Lesión secundaria</i> .....	3
1.1.5. Tratamiento para la lesión primaria .....	4
1.1.6. Consecuencias tardías subsecuentes a la lesión secundaria .....	5
1.2. Hipocampo .....	6
1.2.1. Lesión hipocampal secundaria a un TCE .....	7
1.2.1.1. <i>Hemorragias y Edemas</i> .....	7
1.2.1.2. <i>Atrofia</i> .....	8
1.2.1.3. <i>Excitotoxicidad</i> .....	8
1.2.1.4. <i>Muerte neuronal</i> .....	8
1.2.1.5. <i>Hiperexcitabilidad</i> .....	9
1.3. Búsqueda de nuevos tratamientos para las consecuencias a largo plazo de TCE .....	10
1.3.1. Propilparabeno .....	11
1.3.1.1. <i>Mecanismo de acción y efectos</i> .....	11
2. Justificación .....	13
3. Hipótesis y Objetivos .....	14
3.1. Hipótesis .....	14
3.2. Objetivos .....	14
3.2.1. General .....	14

---

---

3.2.2. Específicos .....	14
4. Metodología experimental.....	15
4.1. Animales.....	15
4.2. Inducción de TCE.....	15
4.2.1. Craneotomía .....	15
4.2.2. Lesión lateral por percusión de fluidos (LLFP) .....	15
4.2.3. <i>Neuroscore</i> .....	16
4.3. Evaluación de la excitabilidad hipocampal .....	17
4.3.1. Cirugía.....	17
4.3.2. Determinación del umbral post-descarga (UPD) .....	17
4.4. Evaluación histológica.....	18
4.4.1. Perfusión, obtención y preparación del tejido cerebral.....	18
4.4.2. Tinción de Hematoxilina-Eosina (HyE).....	19
4.4.3. Inmunohistoquímica de NeuN .....	19
4.4.4. Estereología.....	19
5. Experimento 1: Caracterización del daño y los cambios en la excitabilidad en hipocampo inducidos por un TCE severo en ratas Wistar.....	21
5.1. Metodología.....	21
5.1.1. TCE-Vehículo .....	21
5.1.2. SHAM .....	22
5.2. Resultados.....	23
5.2.1. Grupo SHAM .....	23
5.2.2. Grupo TCE .....	23
6. Experimento 2: Evaluación el efecto del PPB en el daño celular y excitabilidad hipocampal inducidos por un TCE severo en ratas Wistar.....	30
6.1.1. Metodología .....	30
6.1.2. Grupo TCE-PPB.....	30
6.1.3. Grupo PPB .....	31
6.2. Resultados.....	32
6.2.1. Grupo PPB .....	32
6.2.2. Grupo TCE-PPB.....	32

---



6.3. Discusión .....	39
6.3.1. TCE y consecuencias físicas .....	39
6.3.2. TCE y muerte neuronal .....	40
6.3.3. TCE e hiperexcitabilidad.....	42
6.3.4. Otros posibles mecanismos neuroprotectores del PPB .....	46
6.3.5. Ventajas y desventajas del tratamiento con PPB .....	46
7. Conclusiones.....	49
8. Perspectivas .....	50
9. Referencias .....	51
10. Anexos .....	63

---

**I. Índice figuras**

**Figura. 1** Fisiopatología de un TCE.....2

**Figura. 2** Fármacos en fases clínicas para el control de cascadas subsecuentes a un TCE ...4

**Figura. 3** Estructura hipocampal (Rata).....6

**Figura. 4** Circuitos neuronales hipocampales. ....7

**Figura. 5** Ampliación de una sección coronal a nivel de hilus de giro dentado marcada con fluoro-jade.....9

**Figura. 6** Hiperexcitabilidad postraumática en giro dentado.....9

**Figura. 7** Estructura molecular del PPB ..... 11

**Figura. 8** Modelo de LLFP ..... 16

**Figura. 9** Protocolo experimental utilizado para caracterizar el daño celular y los cambios en la excitabilidad hipocampal posterior a un TCE.....21

**Figura 10.** El TCE induce pérdida de peso.....25

**Figura 11.** El TCE induce hematoma intracraneal.....25

**Figura 12.** El TCE induce daño neuromotor.....26

**Figura 13.** El TCE aumenta la excitabilidad hipocampal.....27

**Figura 14.** El TCE induce muerte neuronal hipocampal (ipsilateral).....28

**Figura 15.** El TCE induce muerte neuronal hipocampal (contralateral).....29

**Figura 16.** Protocolo experimental utilizado para evaluar el efecto del PPB en el daño celular y los cambios en la hiperexcitabilidad subsecuente al TCE.....30

**Figura 17.** La administración de PPB previene la disminución de peso posterior al TCE..34

**Figura 18.** La administración de PPB mejora el daño motor post-traumático.....34

**Figura 19.** La administración de PPB disminuye la hiperexcitabilidad post-traumática....35

**Figura 20.** Preservación neuronal de la región neuronal hipocampal ipsilateral a la lesión.....36

**Figura 21.** Preservación neuronal de la región neuronal hipocampal contralateral a la lesión.....37

**Figura 22.** Estructuras cerebrales involucradas en la propagación de la post-descarga (Prueba de UPD).....44

**Figura 23.** Posibles mecanismos del PPB.....45

**II. Índice tablas**

**Tabla 1** Escala de Racine (modificada de Racine b, 1972)..... 18

**Tabla 2** Fases conductuales detectadas en respuesta al UPD (Experimento 1) .....27

**Tabla 3** Fases conductuales detectadas en respuesta al UPD (Experimento 2) .....35

**Tabla 4** Microfotografías representativas de inmunohistoquímica de NeuN .....38

### III. Abreviaturas

°C	Grados centígrados
4-AP	4-aminopiridina
μA	Microamperios
μl	Microlitro
μM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
asf	Área evaluada
ATP	Adenosín trifosfato
CA1	Cuerno de Ammon área 1
Ca <sup>2+</sup>	Calcio
CDC	Centros de Control y Prevención de Enfermedades (por sus siglas en inglés)
EE	Error estándar
GD	Giro dentado
h	Horas
h	Altura del disector
HyE	Tinción de Hematoxilina-Eosina
Hz	Hertz
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
K <sup>+</sup>	Potasio
kg	Kilogramo
LLPF	Lesión lateral por percusión de fluidos
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
ms	Milisegundo
N	Normalidad
Na <sup>+</sup>	Sodio
NeuN	Proteína neuronal nuclear (siglas en inglés)
nm	Nanómetro
NMDA	N-metil-D-aspartato
PEG	Polietilenglicol
PPB	Propilparabeno
PBS	Buffer de fosfatos
Q-	Número de células positivas
s	Segundos
SE	<i>Status Epilepticus</i>
SNC	Sistema Nervioso Central

ssf	Fracción de muestreo
SV	“ <i>Screening</i> ” virtual
t	Espesor del corte
TCE	Traumatismo craneoencefálico
UPD	Umbral post-descarga

## IV. Resumen

Se sabe que como consecuencia de un traumatismo craneoencefálico (TCE) severo se producen alteraciones de la función hipocampal. En este estudio se evaluó el efecto del tratamiento subcrónico con Propilparabeno (PPB). El PPB demostró un efecto neuroprotector ante las consecuencias corto y largo plazo del *status epilepticus* (SE). Tomando en cuenta las características fisiopatológicas que comparten SE-TCE se desconoce si existe un efecto neuroprotector del PPB ante las consecuencias de un TCE. Para tal propósito, se utilizaron 29 ratas macho de la cepa Wistar (250-300 g). Los cuales se dividieron en 4 grupos independientes: 1) SHAM y 2) TCE los cuales recibieron una administración de vehículo; 3) PPB (control) y 4) TCE-PPB los cuales recibieron el tratamiento con PPB (178 mg/kg). El tratamiento o su respectivo vehículo se administraron por vía i.p. durante 5 días post-craneotomía o post-TCE. Para la inducción del trauma se utilizó el modelo de lesión por percusión lateral de fluidos (2.8-3.3 atm). Posteriormente, se evaluó que el TCE indujera hematoma intracraneal, apnea y convulsiones. Adicionalmente, se realizó la prueba de *neuroscore* para evaluar el daño motor. Al día 23 post-TCE o post-craneotomía, los animales fueron implantados a nivel de hipocampo ventral ipsilateral con un electrodo bipolar para la evaluación de la excitabilidad hipocampal (umbral post-descarga (UPD)) al día 30. A continuación, los animales fueron sacrificados para la obtención de su tejido cerebral con el propósito de realizar pruebas histológicas para la evaluación de la preservación neuronal (inmunohistoquímica NeuN) en CA1, CA3, hilus y giro dentado (GD). El TCE indujo hematoma intracraneal, apnea ( $15.2 \pm 5.1$  seg) y en un 36.6% convulsiones inmediatamente después del trauma. El UPD del grupo SHAM ( $299 \pm 22.5 \mu\text{A}$ ) se consideró como el 100%, mismo que no se modificó en el grupo PPB ( $291.7 \pm 21.58 \mu\text{A}$ ). El grupo TCE mostró una reducción del 64.2% ( $107.4 \pm 25.15 \mu\text{A}$ ,  $p < 0.001$ ) del UPD, en comparación con el SHAM. Contrario a esto, el UPD del grupo TCE-PPB ( $249.5 \pm 75.17 \mu\text{A}$ ,  $p > 0.05$ ) fue similar al UPD del grupo SHAM. Además, en la prueba de *neuroscore* el grupo con TCE mostró una disminución significativa en el puntaje obtenido con respecto al SHAM al día 2 ( $p < 0.001$ ), 23 ( $p < 0.05$ ) y 31 ( $p < 0.05$ ) post-TCE. La administración del PPB post-TCE disminuyó el daño neuromotor observado al día 23 ( $p > 0.001$ ) y 31 post-TCE ( $p > 0.001$ ). El grupo PPB no mostró cambios significativos ( $28.00 \pm 0.0$  al día 2,  $27.43 \pm 0.29$  al día 23 y  $28.00 \pm 0.0$  al día 31,  $p = 0.0953$ ) respecto al SHAM. Por otra parte, en la evaluación de la preservación neuronal se observó una disminución significativa (ipsilateral: GD, 59% ( $p = 0,0061$ ); hilus, 74% ( $p = 0,0056$ ); CA1, 55% ( $p = 0,0081$ ) y CA3, 52% ( $p = 0,0009$ ); y contralateral: GD, 58%, ( $p = 0,0011$ ); hilus, 60% ( $p = 0,0017$ ); CA1 70% ( $p = 0,0002$ ) y CA3 76% ( $p = 0,0001$ )) en el conteo de núcleos neuronales del grupo TCE en todas las áreas evaluadas con respecto al SHAM. El tratamiento con PPB post-TCE (TCE-PPB) preservó un mayor número de núcleos neuronales (35% para CA1, ( $p = 0,0003$ ); un 44% para CA3 ( $p = 0,0059$ ), un 42% para GD ( $p = 0,0534$ ) y un 57% para hilus ( $p = 0,0243$ ), datos similares a los obtenidos del área contralateral un 45% para CA1 ( $p = 0,0167$ ), un 49% para CA3 ( $p = 0,0099$ ), un 48% para GD ( $p = 0,0015$ ) y un 43% para hilus ( $p = 0,072$ )). Este parámetro no se modificó en el grupo control PPB respecto al SHAM. Por tanto, el tratamiento subcrónico con PPB evita la hiperexcitabilidad hipocampal y disminuye la muerte neuronal subsecuente a un TCE severo. Estos resultados permiten vislumbrar al PPB como una estrategia terapéutica para evitar las consecuencias del TCE en la función hipocampal.

## V. Abstract

It is well known that alterations in hippocampal function occur as a consequence of severe traumatic brain injury (TBI). In this study, the effect of subchronic treatment with Propylparaben (PPB) was evaluated. The PPB demonstrated a neuroprotective effect on the short and long-term consequences of status epilepticus (SE). Considering the physiopathological characteristics shared by SE-TBI, it is unknown whether there is a neuroprotective effect of PPB on TBI-induced damage. To investigate that, 29 male Wistar rats (250-300 g) were used. Animals were divided into 4 independent groups: 1) SHAM and 2) TBI which received a vehicle administration; 3) PPB (control) and 4) TBI-PPB which received the treatment with PPB (178 mg/kg). The treatment or its respective vehicle were administered i.p. for 5 days post-craniotomy or post-TBI. Lateral fluid percussion injury model (2.8-3.3 atm) was used to induce trauma. Subsequently, it was evaluated whether the TBI induced intracranial hematoma, apnea and seizures. Additionally, the neuroscore test was performed to evaluate motor damage. On day 23 post-TBI or post-craniotomy, the animals were implanted at the ipsilateral ventral hippocampus level with a bipolar electrode for evaluation of hippocampal excitability (after-discharged threshold (ADT) at day 30. Then, the animals were sacrificed to obtain their brain tissue to perform histological methods and evaluate neuronal preservation (NeuN immunohistochemistry) in CA1, CA3, hilus and dentate gyrus (GD). The TBI induced intracranial hematoma, apnea ( $15.2 \pm 5.1$  seg) and convulsions (36.6%) immediately after the trauma. The ADT of SHAM group ( $299 \pm 22.5 \mu\text{A}$ ) was considered as 100% and was not modified in PPB group ( $291.7 \pm 21.58 \mu\text{A}$ ). TBI group showed a reduction of 64.2% ( $107.4 \pm 25.15 \mu\text{A}$ ,  $p < 0.001$ ) of the ADT compared to SHAM group. Conversely, the ADT of TBI-PPB group ( $249.5 \pm 75.17 \mu\text{A}$ ,  $p > 0.05$ ) was similar to the ADT of SHAM group. In addition, in neuroscore test, TBI group showed a significant decrease in the score obtained compared to SHAM at days 2 ( $p < 0.001$ ), 23 ( $p < 0.05$ ) and 31 ( $p < 0.05$ ) post-TBI. The administration of PPB in TBI-PPB group decreased the neuromotor damage observed at day 23 ( $p > 0.001$ ) and 31 post-TBI ( $p > 0.001$ ). The PPB group showed no significant changes ( $28.00 \pm 0.0$  at day 2,  $27.43 \pm 0.29$  at day 23 and  $28.00 \pm 0.0$  at day 31,  $p = 0.0953$ ) compared to SHAM. On the other hand, in the evaluation of neuronal preservation it was observed a significant decrease (ipsilateral: GD, 59% ( $p = 0,0061$ ); hilus, 74% ( $p = 0,0056$ ); CA1, 55% ( $p = 0,0081$ ) and CA3, 52% ( $p = 0,0009$ ); contralateral: GD, 58%, ( $p = 0,0011$ ); hilus, 60% ( $p = 0,0017$ ); CA1 70% ( $p = 0,0002$ ) and CA3 76% ( $p = 0,0001$ )) in neuronal nuclei of TBI group in all the areas evaluated compared to SHAM group. The treatment with PPB post-TBI (TBI-PPB) preserved a greater number of neuronal nuclei (35% CA1, ( $p = 0,0003$ ); 44% in CA3 ( $p = 0,0059$ );  $p < 0.05$  vs SHAM), 42% in GD ( $p = 0,0534$ ) and 57% in hilus ( $p = 0,0243$ ), contralateral 45% in CA1 ( $p = 0,0167$ ), un 49% in CA3 ( $p = 0,0099$ ), 48% in GD ( $p = 0,0015$ ) and 43% in hilus ( $p = 0,072$ )). This parameter was not modified in PPB control group to refer with SHAM. In conclusion, subchronic treatment with PPB avoids the hippocampal hyperexcitability induced by severe TBI. These results reveal the PPB as a therapeutic strategy to avoid the consequences of the TBI in hippocampal function.

## 1. Introducción

### 1.1. Traumatismo Craneoencefálico

#### 1.1.1. Definición

El traumatismo craneoencefálico (TCE) es causado por una fuerza externa, como un golpe, sacudida, aceleración, desaceleración o por una herida penetrante en la cabeza que induce cambios estructurales y/o alteraciones fisiopatológicas que interrumpen alguna función normal del cerebro (CDC, 2013; Johnson *et al.*, 2015). Un paciente con TCE presenta una perturbación de la función cerebral, como por ejemplo pérdida de conciencia, pérdida de memoria de eventos inmediatamente antes o después del accidente, alteraciones del estado mental en el momento del accidente (aturdimiento, desorientación o confusión) y déficit neurológico focal que puede o no ser transitorio (Head, 1993; Frieden *et al.*, 2015).

#### 1.1.2. Epidemiología

El TCE es la principal causa de muerte y discapacidad grave en personas menores de 45 años. Cada año aproximadamente 1.7 millones de personas en los EE. UU sufren algún tipo de TCE que requiere al menos una visita al hospital. En México, el TCE es la tercera causa de muerte con un índice de mortalidad de 38.8 por cada 100 mil habitantes y con mayor incidencia en hombres de 15 a 45 años. Por otro lado, modelos estadísticos determinaron que se espera la presencia de 64 a 74 millones de casos nuevos de TCE cada año (Ontiveros *et al.*, 2014; Dewan *et al.*, 2018).

Aunque el TCE es un problema de importancia médica y socioeconómica, su patogénesis no se entiende completamente, y es difícil reconstruir los acontecimientos que llevan a las lesiones cerebrales primarias y secundarias de diferente gravedad. Anualmente, el TCE representa el 22% de la incidencia de accidentes y por lo general, deja a los sujetos con déficit persistentes que llevan para el resto de la vida. (Finnie y Blumbergs, 2002; Kay *et al.*, 2003).

#### 1.1.3. Clasificación

No existe una sola clasificación del TCE que abarque todas las características clínicas, patológicas, celulares y moleculares de este complejo proceso. La gravedad de la lesión



puede ser determinada en el periodo agudo post-traumático. Se han desarrollado una serie de clasificaciones clínicas a lo largo de los años, ejemplo de ellas es la escala de Coma de Glasgow (GSC). Ésta considera componentes como la apertura ocular, respuesta verbal y respuestas motoras. Dependiendo del déficit determinado, se podrá dividir al TCE como leve, moderado o severo (Friedland y Hutchinson, 2013; Teasdale, 1974).

Otros sistemas de clasificación pueden ser patológicos o mecánicos. Los mecánicos dividen al TCE como TCE abierto (penetración al tejido) o cerrado. Mientras que los patológicos pueden ser anatómicos (lesiones focales o difusas) o fisiopatológicos (lesiones primarias y secundarias). Todas estas clasificaciones en conjunto tienen la finalidad de predecir consecuencias a largo plazo secundarias al TCE (Smith, 2011; Thurman, 2016).

### 1.1.4. Fisiopatología

#### 1.1.4.1. Lesión primaria

El TCE es un proceso dinámico que implica una fisiopatología cambiante. Inmediatamente después del impacto se produce la lesión primaria consecuencia del daño biomecánico causado por el desgarro y/o estiramiento de neuronas, axones, glía y vasos sanguíneos (Loane y Faden, 2010; Lozano *et al.*, 2015).

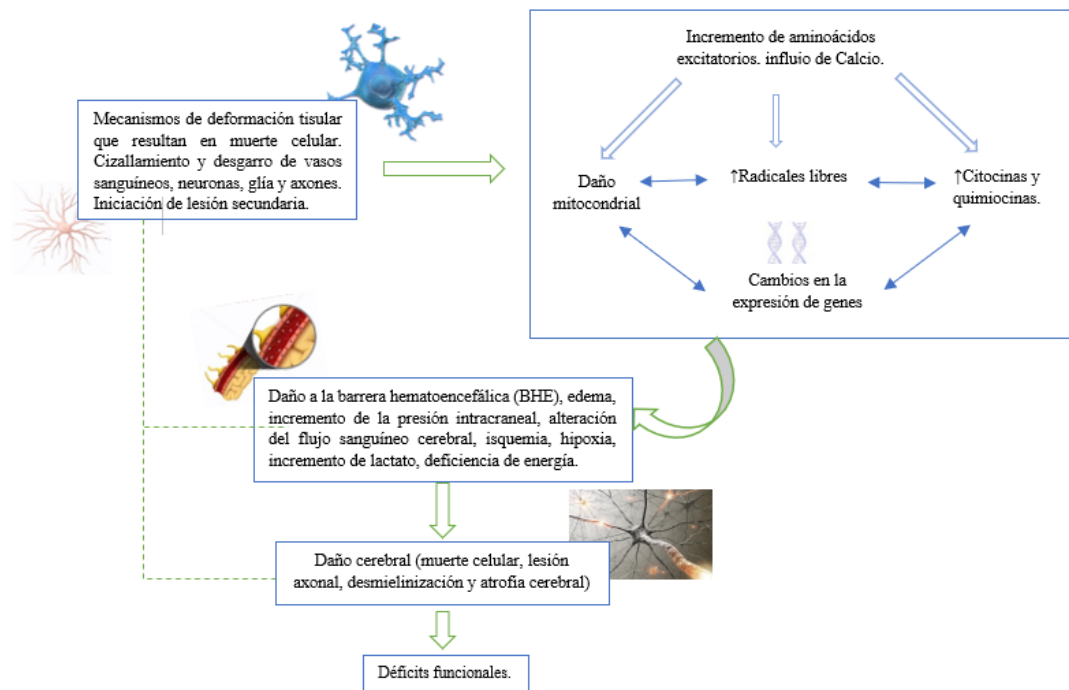


Figura. 1 Fisiopatología de un TCE. (Modificado de Xiong, et al., 2013)

La lesión primaria puede ser difusa, focal o una combinación de ambos. Esta lesión incluye daño tisular directo, alteración del metabolismo celular, como disminución de las reservas de ATP, así como la falla de las bombas iónicas de la membrana celular (Alted *et al.*, 2009; Lozano *et al.*, 2015; Xiong, *et al.*, 2013). Como consecuencia de estos mecanismos, se genera una lesión axonal y vascular, un incremento de la presión intracraneal y hemorragias (intracerebral, subdural, epidural y subaracnoidea). Estas últimas favorecen la muerte celular por mecanismos aún no determinados (Xi, 2006).

Por otro lado, se describió formación de edema vasogénico, en el cual se encuentra involucrada la disrupción a la barrera hematoencefálica y la extravasación de metabolitos como prostaglandinas y leucotrienos que contribuyen a incrementar los procesos de inflamación (Başkaya *et al.*, 2007). Otras consecuencias incluyen la presencia de pseudoaneurisma, contusión e isquemia. Esta última puede ser global o focal y dependerá del grado de lesión. Todo en conjunto resulta en pérdida neuronal directa por muerte celular necrótica, así como el desencadenamiento de la lesión secundaria. (Girgis *et al.*, 2016; Hatton, 2001; Moore *et al.*, 2012).

### 1.1.4.2. Lesión secundaria

Para los sujetos que sobreviven la lesión primaria, la morbilidad y mortalidad serán determinadas por los procesos de lesión secundaria (Figura 1), la cual es progresiva y silenciosa, y se asocia a la activación de cascadas bioquímicas que conducen a cambios metabólicos y celulares. Esta activación ocurre desde los primeros minutos después del trauma y puede durar días, meses o años (Kabadi y Faden, 2014).

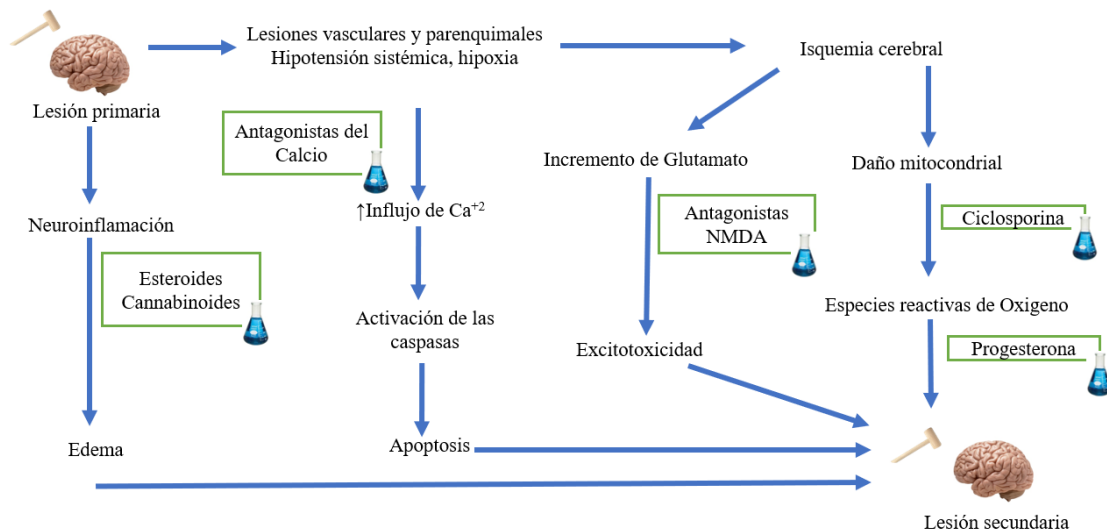
Algunos mecanismos inmediatos de lesión secundaria más importantes implican la despolarización sostenida de la membrana neuronal, excitotoxicidad producida por el incremento de neurotransmisores excitadores (glutamato y aspartato) así como la activación de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^{+}$  dependientes de voltaje. También se observa la falla de la bomba  $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$  ATPasa, que a su vez conduce a un desequilibrio de la homeostasis iónica entre el espacio intra- y extracelular, con el riesgo de conducir a lisis neuronal (Pinheiro *et al.*, 2018; Greve *et al.*, 2009).

El daño celular post-traumático es exacerbado por el exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, el cual activa a peroxidasas lipídicas, proteasas y fosfolipasas que en conjunto aumentan la concentración intracelular de ácidos grasos y radicales libres. Aunado a esto, la ruptura de la barrera hematoencefálica junto con la activación de la microglía, astrocitos y liberación prolongada de mediadores proinflamatorios (IL-6 y  $\text{TNF } \alpha$ ), incrementan el daño neuronal mediante la liberación de moléculas neurotóxicas como óxido nítrico (NO) (Byrnes y Faden, 2007; Kabadi y Faden, 2014).

En el proceso secundario a la lesión también existe la activación de caspasas y endonucleasas que conducen a cambios progresivos en la estructura membranal, así como a la fragmentación e inhibición de la reparación del ADN. La sumatoria de estos procesos conducen a la muerte celular necrótica o programada (apoptosis). Sin embargo, el tratamiento clínico post-traumático solo se enfoca en controlar condiciones subsecuentes de la lesión primaria (Diaz-Arrastia *et al.*, 2014; Ghajar, 2000).

### 1.1.5. Tratamiento para la lesión primaria

En la clínica el tratamiento para sujetos con TCE se basa en atender y controlar las condiciones como el aumento de la presión intracraneal (ICP), presión arterial media, neuroinflamación, hemorragias, edema y el nivel electrolítico (Roberts, *et al.*, 1998).



**Figura. 2** Fármacos en fases clínicas para el control de cascadas subsecuentes a un TCE (Modificado de *Beauchamp et al.*, 2008)

Fármacos como esteroides, ciclosporinas, cannabinoides, antagonistas NMDA, antagonistas de calcio y progesterona (Figura 2), entre otros, controlan algunos de los eventos de la cascada fisiopatológica primaria. Sin embargo, estos tratamientos no evitan los procesos de lesión secundaria, los cuales son responsables de la neurodegeneración crónica y del deterioro neurológico progresivo. Estos procesos en conjunto derivan de la atrofia significativa en varias áreas del encéfalo que conducen a consecuencias tardías post-traumáticas. (Beauchamp *et al.*, 2008; Freedom *et al.*, 2013; Ríos-Romenets *et al.*, 2007).

### 1.1.6. Consecuencias tardías subsecuentes a la lesión secundaria

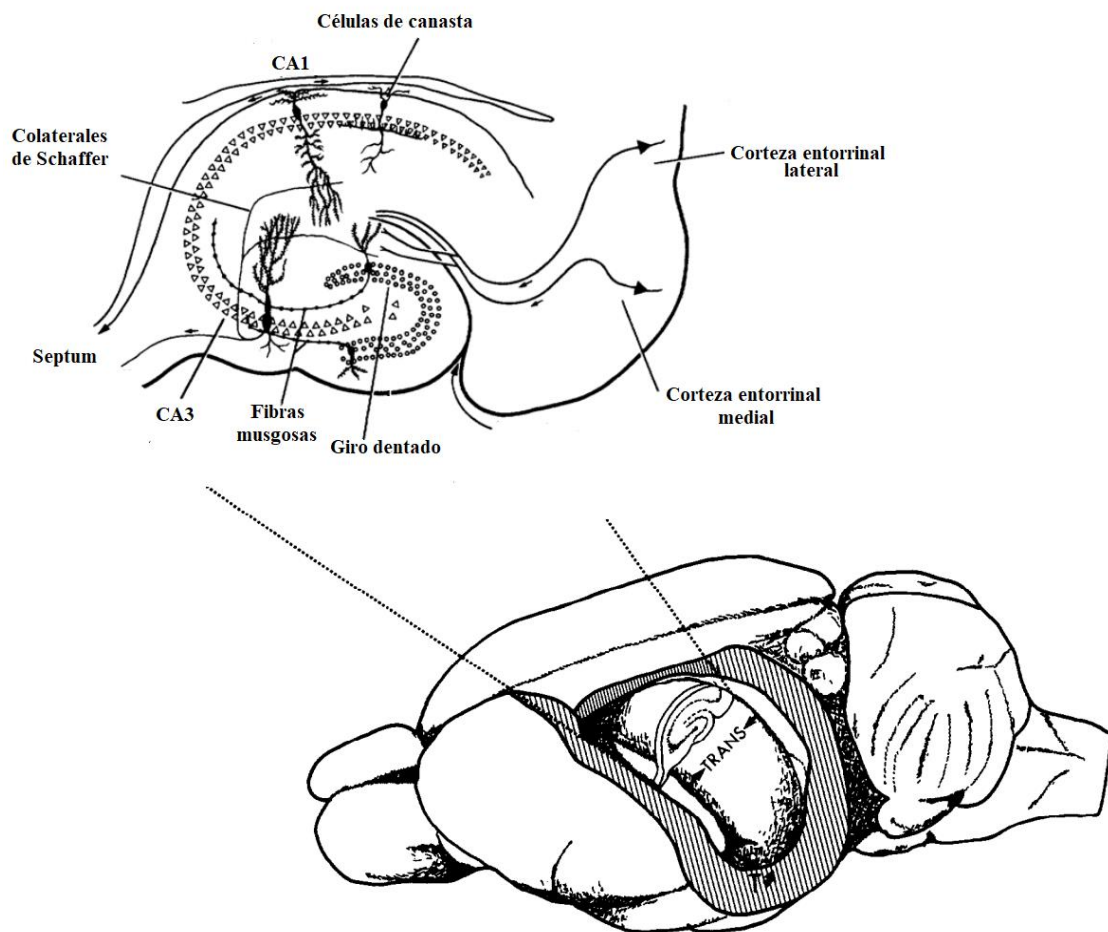
Las consecuencias tardías a un TCE derivan de la interacción de las diversas cascadas bioquímicas de lesión secundaria. Investigaciones clínicas y experimentales demostraron una atrofia progresiva del sistema nervioso central (SNC) post-traumático que puede resultar en una variedad de trastornos cerebrales. Cada año más de 80 mil personas presentan discapacidades neurológicas a largo plazo relacionadas con un TCE (Ghajar, 2000).

Los trastornos neuropsiquiátricos asociados con TCE incluyen deterioro cognitivo, trastornos del estado de ánimo, trastorno de ansiedad, psicosis y problemas de conducta (Rao y Lyketsos, 2000). Aunque los déficits cognitivos varían con la gravedad de la lesión, generalmente incluyen problemas de atención, concentración, memoria y funcionamiento ejecutivo (Warden *et al.*, 2006). Estudios en animales y en pacientes sugieren una relación entre antecedentes de un TCE y el desarrollo esporádico de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica y epilepsia (Gavett *et al.*, 2010; Uryu *et al.*, 2007).

Varios autores sugieren que el desarrollo de estas patologías después de un TCE puede estar relacionado con las lesiones encontradas en diversas estructuras cerebrales, que incluyen a la corteza cerebral, sustancia blanca, sustancia gris, tálamo, ganglios basales, cuerpo calloso e hipocampo. Este último es altamente susceptible a las reacciones excitotóxicas, periodos de hipoxia-isquemia y a los cambios metabólicos característicos del TCE (Finnie y Blumbergs 2002; Junqué, 1999; Masel y Dewitt, 2010; Werner y Engelhard, 2007).

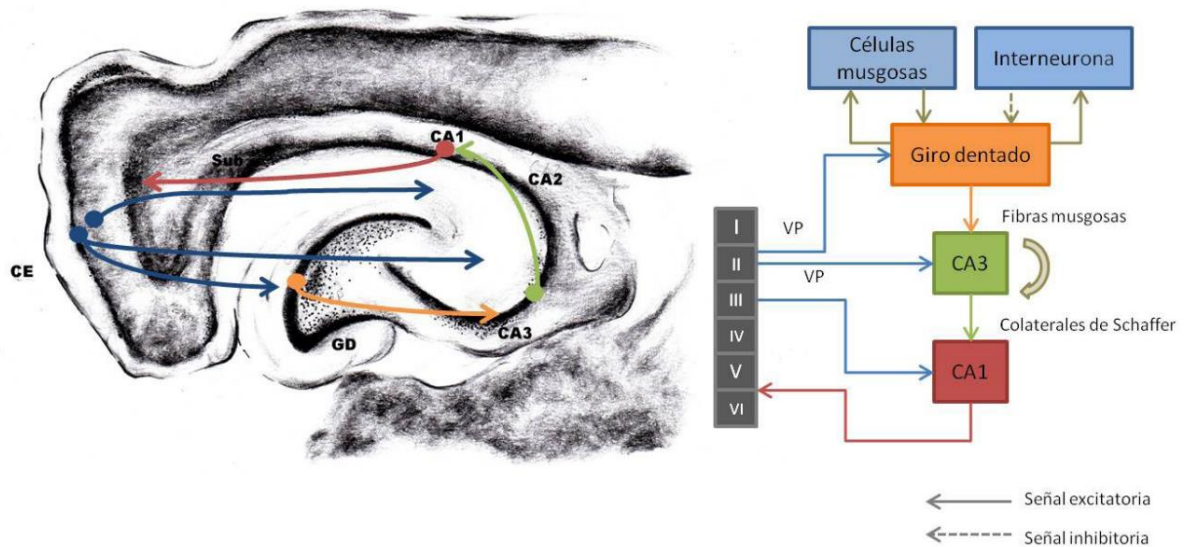
## 1.2. Hipocampo

El hipocampo forma parte del lóbulo temporal, en la región medial del telencéfalo. El término de hipocampo fue adquirido debido a su semejanza con un “caballito de mar”, otros acuñaron el término “cuerpo de carnero” en honor a Amón Ra (Egipto). El hipocampo es una estructura compuesta por 4 regiones. Entre las que se incluye: el área de giro dentado, el cuerno de Amón compuesto por subcampos (CA1, CA2, CA3), el complejo subicular (subículum, presubículum y parasubículum) así como proyecciones hacia corteza entorrinal (media y lateral) (Figura 3) (Amaral y Witter, 1989; Olivares *et al.*, 2015; Ulmer y Jansen, 2013).



**Figura. 3** Estructura hipocampal (Rata)  
(Modificado de Amaral y Witter, 1989; Fallis, 2013)

El hipocampo forma parte del sistema límbico y sus funciones se relacionan con aprendizaje y memoria. La población neuronal del hipocampo es heterogénea y destacan 2 tipos de neuronas, las piramidales (CA1, CA2 y CA3) y las granulares (giro dentado). Entre otros tipos celulares destacan las interneuronas, predominantes en el área de hilus de giro dentado. Las vías que se activan en hipocampo son unidireccionales y se pueden dividir en 4: perforante, colaterales de Shaffer, fibras musgosas y la vía de CA1-Corteza entorrinal. Todas en conjunto son conocidas como la tradicional vía excitatoria trisináptica (Figura 4) (Leuner y Gould. 2010; Miki *et al.*, 2000; Olivares *et al.*, 2015; Scharfman y Myers, 2013).



**Figura. 4** Circuitos neuronales hipocampales.

La tradicional vía excitatoria trisináptica (CE-GD)-CA3-CA1-CE) es descrita por las flechas de colores (flecha azul: vía perforante; flecha naranja: vía de fibras musgosas; flecha verde: colaterales de Schaffer; flecha roja; proyecciones de CA1 hacia la CE). CE: corteza entorrinal; GD: giro dentado; Sub: subiculum (Modificado de Olivares *et al.*, 2015)

### 1.2.1. Lesión hipocampal secundaria a un TCE

#### 1.2.1.1. Hemorragias y Edemas

En modelos animales de TCE durante las primeras horas posteriores al trauma, se ha descrito presencia de hemorragia hipocampal (McIntosh *et al.*, 1989). En la región CA3 de hipocampo de ratas con TCE moderado se observó edema vasogénico desde las primeras 4 horas y edema citotóxico a las 24 horas post-TCE. La presencia de edema y hemorragia desde

las primeras horas post-traumáticas, inician procesos de atrofia hipocampal (Cernak *et al.*, 2004; Başkaya *et al.*, 1997).

### 1.2.1.2. *Atrofia*

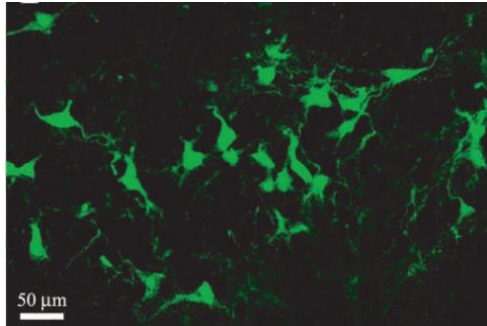
Estudios de imagen de resonancia magnética (IRM) registrados por Ariza y colaboradores en sujetos con antecedentes de TCE 2 años antes del estudio, revelaron una atrofia significativa del hipocampo anterior que involucra ambas regiones de este. Esta atrofia era independiente de la localización de la lesión primaria (Ariza *et al.*, 2006).

### 1.2.1.3. *Excitotoxicidad*

En ratas con TCE moderado, hay un incremento en la liberación de aminoácidos excitadores como aspartato y glutamato, en las áreas de CA2 y CA3 del hipocampo, situación evidente desde los 20 minutos y que permanece por lo menos una hora después del trauma (Benveniste, 1984; Katayama *et al.*, 1989). Hallazgos similares se reportaron en pacientes, los cuales presentaron aumentos significativos de glutamato por varios días incluso semanas posterior al trauma a nivel cerebral (Andrew *et al.*, 1993). Adicionalmente, la constante activación de receptores N-metil d-aspartato (NMDA) por el exceso de glutamato se relaciona con la activación de cascadas que llevan a hipoxia y muerte neuronal hipocampal (Ariza *et al.*, 2006; Ikonomidou y Turski, 2002).

### 1.2.1.4. *Muerte neuronal*

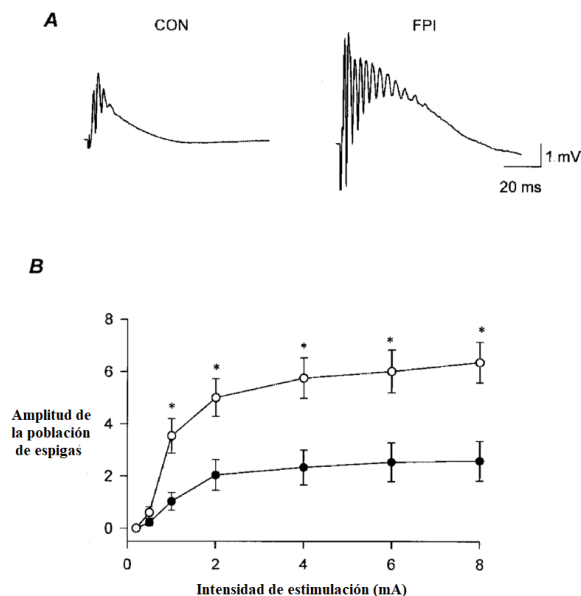
Se ha establecido una relación entre el nivel de muerte neuronal y la gravedad de la lesión. A través de técnicas de cuantificación estereológicas se determinó una reducción significativa del número de neuronas hilares (~40%), del área CA2 y CA1 del hipocampo de ratas. Esta pérdida hilar predomina casi en su totalidad en el área ipsilateral a la lesión y se observa desde las primeras 2 semanas hasta el primer mes post-TCE. En secciones histológicas de hipocampo (Figura 5) se reporta pérdida significativa hilar desde el día 1. La destrucción neuronal junto con los desequilibrios iónicos promueve cambios en el patrón de excitabilidad del hipocampo (Pinheiro *et al.*, 2018; Grady *et al.*, 2003).



**Figura. 5** Ampliación de una sección coronal a nivel de hilus de giro dentado marcada con fluoro-jade (Tomada de *Grady et al.*, 2003)

#### 1.2.1.5. Hiperexcitabilidad

La pérdida de neuronas hilares posterior a un TCE puede conducir a un incremento de la excitación neuronal y dar lugar a una disfunción celular (*Lyeth et al.*, 1990). Esto es debido a que las neuronas hilares participan en la inhibición celular que controla la excitabilidad hipocampal. Una reducción hilar lleva a desequilibrios en la excitación-inhibición que conlleva al desarrollo de patologías a largo plazo (*Lowenstein et al.*, 1992). Ejemplo de ello, es lo reportado en sujetos con antecedentes de TCE con presencia de convulsiones y descargas epileptiformes de más de 10 minutos de duración.



**Figura. 6** Hiperexcitabilidad postraumática en giro dentado.

(A) Respuestas poblacionales representativas obtenidas de la capa granular de células de control simulado (CON) y un animal con TCE (FPI). (B) Resumen de los datos obtenidos de las espigas del panel A (Modificado de *Santhakumar et al.*, 2000).



Estudios electrofisiológicos reportaron hiperexcitabilidad en el área de giro dentado subsecuente a un TCE. Esto fue estimulando la vía perforante hipocampal de células de rebanadas cerebrales de ratas con TCE y comparándolas con animales de cirugía simulada (SHAM). Se observó un incremento en la amplitud de espigas de las ratas con TCE a una estimulación baja (2 mA) que permaneció elevada durante todo el experimento en comparación con las SHAM (Figura 6) (Santhakumar *et al.*, 2000).

La relación entre TCE y todas las consecuencias antes descritas son consistentes con la hipótesis de que la disfunción, muerte neuronal, atrofia e hiperexcitabilidad del hipocampo pueden explicar la patogénesis de trastornos a largo plazo. Como ejemplo, deterioro en aprendizaje y memoria, así como el desarrollo de enfermedades como Alzheimer, Parkinson y epilepsia post-traumática (EPT) (Golarai *et al.*, 2001; Lowenstein *et al.*, 1992).

A pesar de las diversas investigaciones que proponen al TCE como un proceso dinámico que no tiene fin, los objetivos terapéuticos se siguen enfocando en la lesión primaria dejando a un lado la prevención de consecuencias post-traumáticas a largo plazo.

### **1.3. Búsqueda de nuevos tratamientos para las consecuencias a largo plazo de TCE**

Uno de los componentes claves en la industria farmacéutica es la búsqueda de nuevas moléculas, lo cual implica inversión económica en desarrollo y producción de nuevos medicamentos. Consecuencia de esto, se ve reflejado un aumento en los costos de las terapias, costos de atención médica e inaccesibilidad para ciertas poblaciones a estos medicamentos (DiMasi *et al.*, 2003). En el desarrollo de nuevas moléculas, pasando por la fase preclínica, fases clínicas y llegando finalmente al mercado se invierte un costo aproximado de 350 millones de dólares y un tiempo de más de 10 años de investigación, con tan solo un 5% de probabilidad de éxito global de aprobar todas estas etapas (Löscher *et al.*, 2013).

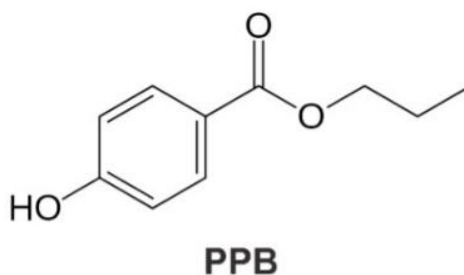
El desarrollo de nuevas tecnologías y estrategias de reutilización de moléculas se hacen presentes como nuevas formas de innovación y que son aceptadas en la industria farmacéutica. “La reutilización de fármacos” es una herramienta que permite ahorrar en costos y tiempo, ya que se comprueba un segundo uso de moléculas de las cuales se conoce su farmacocinética, farmacodinamia y que han comprobado su seguridad en pruebas

toxicológicas. Ejemplo de estas herramientas es el desarrollo de plataformas computacionales como el “*Screening virtual*” (SV). El SV se basa en algoritmos y modelos computacionales para la identificación y selección de nuevos compuestos bioactivos de posible interés terapéutico (Rollinger *et al.*, 2008; Sleigh y Barton, 2010).

En el 2007 mediante SV se describió al propilparabeno (PPB) como una molécula con potencial efecto terapéutico en el tratamiento de las convulsiones (Talevi *et al.*, 2007) y más recientemente se describió como un agente neuroprotector en *status epilepticus* (SE) (Santana-Gómez, *et al.*, 2017)

### 1.3.1. Propilparabeno

El PPB es un éster del ácido *para*-hidroxibenzoico (Figura 7) que se usa desde hace 50 años como conservador en la industria alimenticia, farmacéutica y cosmética. Su uso popular se debe a que presenta baja toxicidad, aceptación en la normativa mundial, biodegradabilidad y bajo costo. Una ventaja adicional es su excelente estabilidad química en relación con el pH (eficaz entre pH 4,5-7,5) y temperatura (Soni *et al.*, 2001).



**Figura. 7** Estructura molecular del PPB (Tomado de Santana-Gómez, 2017)

#### 1.3.1.1. Mecanismo de acción y efectos

Los mecanismos elucidados del PPB en bacterias son la interacción con canales mecanosensibles bacterianas, así como la inhibición de la síntesis del ADN y ARN (efecto-antimicrobial) (Nguyen *et al.*, 2005; Ma y Marquis, 1996; Bredin *et al.*, 2005). En rebanadas cerebrales de rata, el PPB demostró ser un bloqueador de canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje en células piramidales de CA1. En estas últimas, inhibe el disparo sostenido de ráfagas de potenciales de acción, disminuyendo así la actividad neuronal (Lara-Valderrabano

*et al.*, 2016). En cardiomicitos aislados de rata se observó un efecto cardioprotector mediado por el bloqueo de canales de sodio (Ji *et al.*, 2004).

Estudios previos concluyeron que los efectos del PPB reducen la actividad epileptiforme y la actividad sináptica espontánea inducida por 4-aminopiridina (4-AP) *in vitro* (Lara-Valderrabano *et al.*, 2017). En modelos *in vivo*, la administración única de PPB revierte el incremento en la liberación de glutamato y disminuye el daño neuronal inducido por SE en ratas (Santana-Gómez *et al.*, 2017).

Adicionalmente, se demostró que la administración subcrónica de PPB al término del SE induce efectos significativos en las alteraciones observadas durante el proceso de epileptogénesis inducido por el SE. Estas observaciones están relacionadas con la cuantificación neuronal y excitabilidad hipocampal. El tratamiento subcrónico con PPB en animales con crisis recurrentes espontáneas (CRE) presenta una preservación neuronal en todas las áreas de hipocampo siendo más evidente en la zona ventral. Respecto a excitabilidad hipocampal el PPB disminuye la hiperexcitabilidad hipocampal en animales con CRE. Estos eventos podrían estar relacionados con la disminución en la liberación de glutamato observado en la fase aguda de SE con tratamiento de PPB (Santana-Gómez *et al.*, 2017).

Debido a los antecedentes protectores del PPB en eventos que comparten características fisiopatológicas con el TCE, se esperaría un efecto similar en las consecuencias de un TCE.

## **2. Justificación**

A la fecha no existen fármacos que eviten el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas subsecuentes a un TCE. De manera especial, el hipocampo de los sujetos con TCE es susceptible a presentar muerte neuronal e hiperexcitabilidad post-traumática.

La administración de PPB demostró un efecto neuroprotector hipocampal ante las consecuencias a corto y largo plazo del SE. Tomando en cuenta que después de un TCE se presentan procesos como hiperexcitabilidad, excitotoxicidad y daño celular al igual que en el SE, es posible sugerir un efecto neuroprotector sobre las consecuencias del TCE.

### **3. Hipótesis y Objetivos**

#### **3.1. Hipótesis**

El PPB reducirá el daño celular y cambios en la hiperexcitabilidad en el hipocampo que resultan de un TCE severo.

#### **3.2. Objetivos**

##### **3.2.1. General**

Analizar el efecto del PPB en el daño celular e hiperexcitabilidad en el hipocampo inducidos por un TCE severo.

##### **3.2.2. Específicos**

- Caracterizar el daño y los cambios en la excitabilidad en el hipocampo inducidos por un TCE severo en ratas Wistar.
- Evaluar el efecto del PPB en el daño celular y excitabilidad en el hipocampo inducidos por un TCE severo en ratas Wistar.

## 4. Metodología experimental

### 4.1. Animales

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar con un peso de entre 300-350 g. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico transparente bajo condiciones ambientales controladas (ciclos de luz/oscuridad 12 h, 22-25 °C), con acceso a alimento y agua *ad libitum*. El protocolo experimental se realizó de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) y los Comités de Ética del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (protocolo # 0125-15).

### 4.2. Inducción de TCE

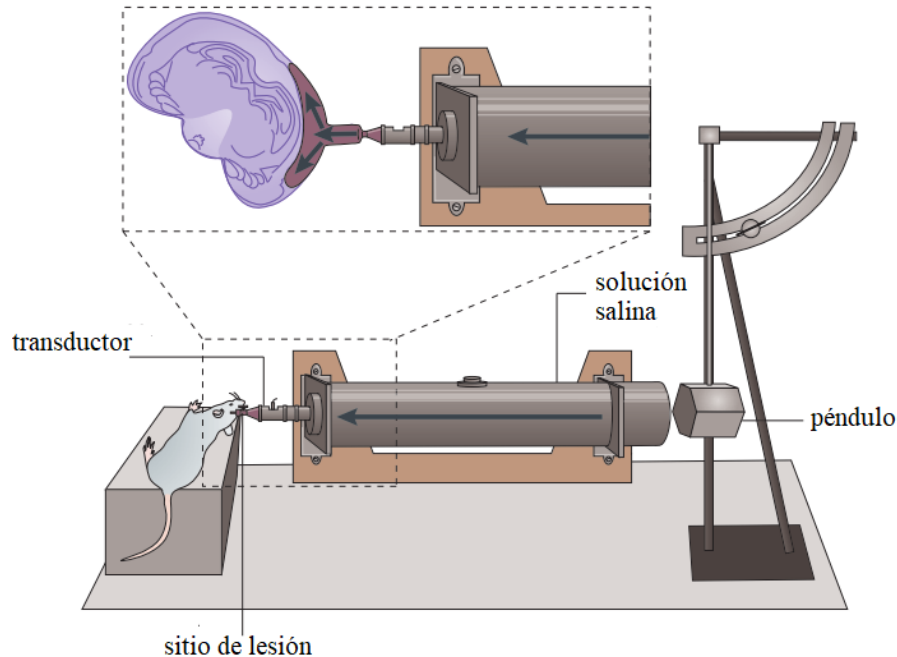
#### 4.2.1. Craneotomía

Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (80 mg/kg, i.p.) y xilacina (20 mg/kg, i.m.). Posteriormente se montaron sobre el marco estereotáxico y se procedió a realizar una incisión sagital de 1,5 cm en la línea media entre las orejas extendiéndose hacia la nariz. Con la ayuda de un hisopo de algodón se eliminó el periostio que recubre el cráneo. Se realizó un trépano de 5 mm de diámetro lateral a la línea media (5 mm de lambda y bregma y 4,0 mm de la sutura sagital). Se observó que la duramadre estuviera intacta, se fijó el “*luer-lock*” al diámetro del trépano y se rellenó con solución salina para verificar la ausencia de fugas en la base del cráneo. Se colocó 1 tornillo de acero inoxidable en la parte lateral anterior a bregma para dar soporte temporalmente al casco de acrílico dental. La inducción del TCE se realizó 90 minutos posteriores al inicio de a la anestesia (McIntosh, *et al.*, 1989).

#### 4.2.2. Lesión lateral por percusión de fluidos (LLFP)

El fundamento de LLFP se basa en un pulso de presión aplicado al cerebro a través de la duramadre intacta (Rostami, 2016). El equipo de LLFP modelo FP302 (Figura 8) está compuesto por un cilíndrico de Plexiglás relleno de solución salina estéril con un extremo terminal unido a un transductor que se conecta al “*luer lock*” del casco de acrílico dental. La lesión se generó por medio de un péndulo que golpeó el pistón del cilindro y que generó un pulso de presión. Este último viajó a través del transductor hasta el cráneo del animal. La gravedad de la lesión dependió de la fuerza del pulso de presión. Se consideró que los

animales recibieron una lesión severa si el pulso de presión entró en el rango de 2.8 a 3.3 atm (McIntosh *et al.*, 1989). Después de la inducción del TCE los animales que perdieron más del 30% de su peso inicial, se descartaron para los experimentos posteriores.



**Figura. 8** Modelo de LLFP (Modificado de Xiong *et al.*, 2013)

#### 4.2.3. Neuroscore

El *neuroscore* es una escala de evaluación de la función motora post-traumática. Se evaluó cada uno de los siguientes índices: capacidad para mantenerse sobre un plano inclinado a diferentes ángulos (35° a 75°) de forma vertical y lateral (izquierda (I) y derecha (D)) contraflexión de extremidad posterior (I-D), contraflexión de extremidad anterior (I-D) durante la suspensión por la cola y el nivel de resistencia a la pulsión lateral (I-D). La puntuación para cada prueba inició en 4 puntos para una función normal a una puntuación de 0 si el animal perdió completamente la función. Los animales con un *neuroscore* de 28 puntos se consideraron controles y aquellos con puntuación inferior o igual a 15 se consideraron con TCE severo (Pierce *et al.*, 1998).

### **4.3. Evaluación de la excitabilidad hipocampal**

#### **4.3.1. Cirugía**

Los animales se anestesiaron con una mezcla de ketamina (80 mg/Kg, i.p.) y xilacina (20 mg/Kg, i.m.). Posteriormente, se montaron sobre el marco estereotáxico para la colocación de un electrodo conformado por dos hebras enrolladas de alambre de acero inoxidable aislado con excepción de las puntas. Este último se implantó a nivel de hipocampo ventral izquierdo de acuerdo con las siguientes coordenadas (referencia a bregma): anteroposterior -5.3 mm; lateral -5.2 mm; profundidad - 7.5 mm dependiente de la superficie craneal (Paxinos y Watson, 2007). Adicionalmente se colocaron 3 tornillos de acero inoxidable en el cráneo sobre la corteza frontal y cerebelar para dar soporte. El electrodo se fijó al cráneo con acrílico dental. Finalmente, las ratas se dejaron recuperar durante 7 días antes de cualquier manipulación adicional.

#### **4.3.2. Determinación del umbral post-descarga (UPD)**

La estimación del UPD es una herramienta que permite evaluar la excitabilidad neuronal de un área específica del cerebro y su generalización hacia otras áreas. El UPD se define como la intensidad mínima de corriente eléctrica necesaria para producir un cambio conductual y/o post-descarga electrográfica mayor a 3 segundos. Esta determinación consistió en la aplicación de un estímulo eléctrico en el hipocampo ventral, mediante una serie de estímulos (pulsos cuadrados de 1 ms, 60 Hz por 1 s) en intervalos de 1 min comenzando con una corriente de 10  $\mu$ A e incrementándola en forma progresiva un 20% de la corriente inmediata anterior cada minuto hasta que se alcanzó el umbral (Racine, 1972a). Los estímulos eléctricos se generaron con un estimulador modelo GRASS S-48.

Los cambios conductuales inducidos por la estimulación se clasificaron en crisis parciales o generalizadas con base en la escala de Racine (tabla 1). Estos cambios se relacionaron con la presencia o no, de generalización de la post-descarga hacia otras áreas cerebrales. Esto último mediante el análisis de duración de la post-descarga (segundos) así como el número de espigas (Hz) en el electroencefalograma (Racine b, 1972).



**Tabla 1** Escala de Racine (modificada de Racine b, 1972)

Escala	Características	
<b>Fase I</b>	Inmovilidad, masticación y movimiento facial	Crisis parciales
<b>Fase II</b>	Sacudida de cabeza	
<b>Fase III</b>	Movimiento clónico de miembros anteriores	Crisis generalizadas
<b>Fase IV</b>	La rata se pone de pie sobre sus patas traseras	
<b>Fase V</b>	Convulsiones generalizadas	

El UPD de cada animal se representó en  $\mu\text{A}$ . Los datos obtenidos por grupo se promediaron y se analizaron utilizando ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc.

#### 4.4. Evaluación histológica

##### 4.4.1. Perfusión, obtención y preparación del tejido cerebral

Los animales se anestesiaron con pentobarbital (100 mg/Kg, ip) y se perfundieron vía ventrículo izquierdo con solución salina-heparina (0.9%-1mg/l) durante 30 min, aproximadamente 250 ml. Inmediatamente después, los animales se perfundieron con paraformaldehído al 4% (250 ml). Después de la perfusión, se realizó una craneotomía para la obtención del tejido cerebral, el cual se colocó en paraformaldehído al 4%, durante 24 h a una temperatura de 4 °C (Luna, 1968).

Los tejidos cerebrales se deshidrataron utilizando un tren de alcoholes (70%, 96%, 100%) durante 15 minutos cada uno, seguido de 2 cambios de Xileno por 15 min a una temperatura de 50 °C. Finalmente se colocaron en 2 cambios de parafina líquida (Surgipath, Leica) por 2 horas.

Se obtuvieron cortes coronales seriados a nivel del hipocampo dorsal y ventral que se montaron en laminillas previamente tratadas con adhesivo poli-L-lisina (Sigma Aldrich). Para la evaluación del sitio de implante (Tinción de Hematoxilina-Eosina) y para la observación de preservación neuronal (Inmunohistoquímica de NeuN) se utilizaron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor.

#### 4.4.2. Tinción de Hematoxilina-Eosina (HyE)

La hematoxilina es un colorante catiónico, que tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura (núcleos celulares). Por su parte la eosina es un colorante aniónico que tiñe componentes básicos en tonos de color rosa (proteínas citoplasmáticas) (Luna, 1968).

Para realizar esta tinción los cortes de tejido cerebral se rehidrataron y se sumergieron en hematoxilina durante 5 min. Posteriormente, se lavaron con agua destilada para eliminar los excesos de colorante y se pasaron rápidamente por alcohol ácido (28 ml de etanol al 50% + 1.2 ml de ácido clorhídrico concentrado). Las laminillas se lavaron nuevamente con agua y se sumergieron en eosina durante 30 s. Los cortes se deshidrataron utilizando concentraciones crecientes de alcohol (70%, 96%, 100%) y xileno 100% (5 min en cada solución). Las muestras se cubrieron con resina sintética y se analizaron a través de un microscopio óptico

#### 4.4.3. Inmunohistoquímica de NeuN

La población neuronal se evaluó mediante inmunohistoquímica de proteína nuclear anti-neuronal (NeuN). Las laminillas con los cortes cerebrales desparafinados y rehidratados se incubaron en una solución DIVA (pH 8.0) caliente durante 10 min. Posteriormente, se lavaron con 2 veces con buffer de fosfatos 1x (PBS por sus siglas en inglés) durante 5 min y se incubaron con peróxido 30% por 15 min, seguido de 2 lavados con PBS (5 min). Inmediatamente se bloquearon con suero normal bovino (1:200) por 30 minutos, y se procedió a incubarlas con un anticuerpo primario monoclonal de ratón dirigido contra NeuN (1:200; Millipore Corporation, Billerica, EE. UU.) durante 48 h a una temperatura de 4° C, una vez concluido el tiempo de incubación se lavaron con PBS-Tritón 1x (5 min). A continuación, se incubaron con un anticuerpo secundario antiratón peroxidasa (1:200; Vector Laboratories International, Burlingame, EE. UU.) por 3 h. Finalmente, se utilizó tetraclorhidrato de diaminobencidina (Sigma-Aldrich) durante 5 min para su posterior revelación (Faure *et al.*, 2013).

#### 4.4.4. Estereología

La estimación del número de neuronas por volumen ( $\text{mm}^3$ ) de las diferentes regiones de hipocampo (Giro dentado (GD), hilus, CA1, CA2 y CA3) se determinó utilizando conteo fraccionario (West *et al.*, 1991). De los cortes coronales (5  $\mu\text{m}$ ) seriados se evaluó 1 corte de

cada serie (3 series en total) el conteo fraccionario de las células se realizó mediante la fórmula que se muestra a continuación:

$$N = (\sum Q-) \cdot (t/h) \cdot (1/asf) \cdot (1/ssf)$$

donde N representó el número total de células por mm<sup>3</sup>, Q el número de células positivas para NeuN en una fracción de volumen conocido, t es el espesor del corte, h la altura del disector, asf el área (cuadrado)/área (x, y) que correspondió al área de conteo (0.460 · 0.600 mm) y ssf que representó la fracción de muestreo que corresponde en este caso a 1/3 (West *et al.*, 1991).

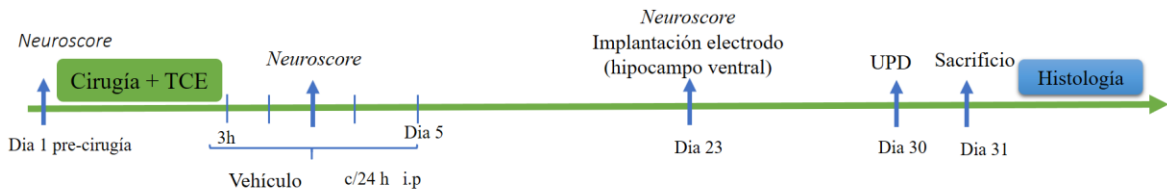
Para la comparación de la densidad de células positivas a NeuN se realizó el análisis estadístico de ANOVA de una vía seguida de una prueba post-hoc. Los valores se expresaron como la media ± el EE del número de células positivas por mm<sup>3</sup>.

## 5. Experimento 1: Caracterización del daño y los cambios en la excitabilidad en hipocampo inducidos por un TCE severo en ratas Wistar

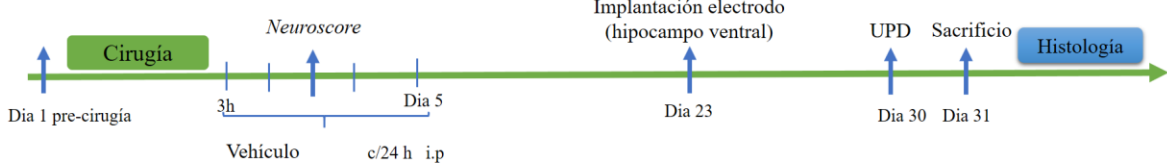
Este experimento se diseñó para determinar si el TCE inducido por el modelo de LLFP replicaba las características de interés de este trabajo (muerte neuronal e hiperexcitabilidad hipocampal) en ratas Wistar macho adultas.

### 5.1. Metodología

#### TCE-Vehículo (n=7)



#### Sham (n=7)



Vehículo: Polietilenglicol (PEG)

**Figura. 10** Protocolo experimental utilizado para caracterizar el daño celular y los cambios en la excitabilidad hipocampal posterior a un TCE.

#### 5.1.1. TCE-Vehículo (n=7)

Se utilizaron ratas a las cuales se les realizó una craneotomía e inducción de un TCE severo utilizando el modelo de LLFP (ver sección 4.2). Tres horas posteriores a la lesión se realizó la administración intraperitoneal (i.p) de una dosis de vehículo (polietilenglicol 30%), que se repitió cada 12 horas por 5 días. Veintitrés días posteriores al TCE se realizó una cirugía para la implantación de un electrodo bipolar en el hipocampo ipsilateral (ver sección 4.3.1). Después de la implantación se dejaron a los animales en recuperación por 7 días. La determinación de la excitabilidad hipocampal se realizó al día 30 por medio de la prueba de UPD (ver sección 4.3.2). Al día 31 post-TCE se sacrificaron a los animales y se determinó el

grado de daño neuronal hipocampal a través de pruebas histológicas (ver sección 4.4). A todos los animales se les realizó la prueba de *Neuroscore* 24 horas antes de la craneotomía y al día 2, 23 y 31 post-TCE (ver sección 4.2.3). Adicionalmente, se realizó seguimiento del peso de los animales para su evaluación física durante la administración del vehículo, implantación de electrodo y prueba de UPD.

#### **5.1.2. Falsamente Operados (SHAM) (n=7)**

Los animales de este grupo se manejaron idénticamente a lo descrito en la sección anterior con la diferencia que no se sometieron a inducción de TCE (Fig. 9).

## 5.2. Resultados

### 5.2.1. Grupo SHAM

Los animales del grupo de SHAM (n=7) presentaron un peso promedio de  $284.2 \pm 28.9$  g durante el experimento. Los animales ganaron ~40% de peso al final del experimento respecto a su peso inicial (Fig. 10). Los puntajes obtenidos en la prueba de *neuroscore* se mantuvieron estables a lo largo del experimento ( $27.29 \pm 0.4$  al día 2;  $25.71 \pm 1.3$  al día 23;  $27.00 \pm 0.6$  puntos al día 31) (Fig. 12).

El promedio de los valores de UPD obtenidos fue de  $299.3 \pm 22.53$   $\mu$ A (Figura 13). La preservación neuronal en hipocampo dorsal para cada una de las áreas evaluadas fueron los siguientes: para el área ipsilateral de CA1 ( $1914 \pm 210$  NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>), CA3 ( $1308 \pm 39$  NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>), GD ( $2897 \pm 314$  NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>) e hilus ( $823.3 \pm 35.80$  NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>), mientras que para el área contralateral fueron los siguientes: CA1 ( $2892 \pm 65.61$  NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>), CA3 ( $2892 \pm 65.61$  NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>), GD ( $3103 \pm 198.9$  NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>) e hilus ( $848.4 \pm 41.07$  NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>) respectivamente (Figura 14 y 15).

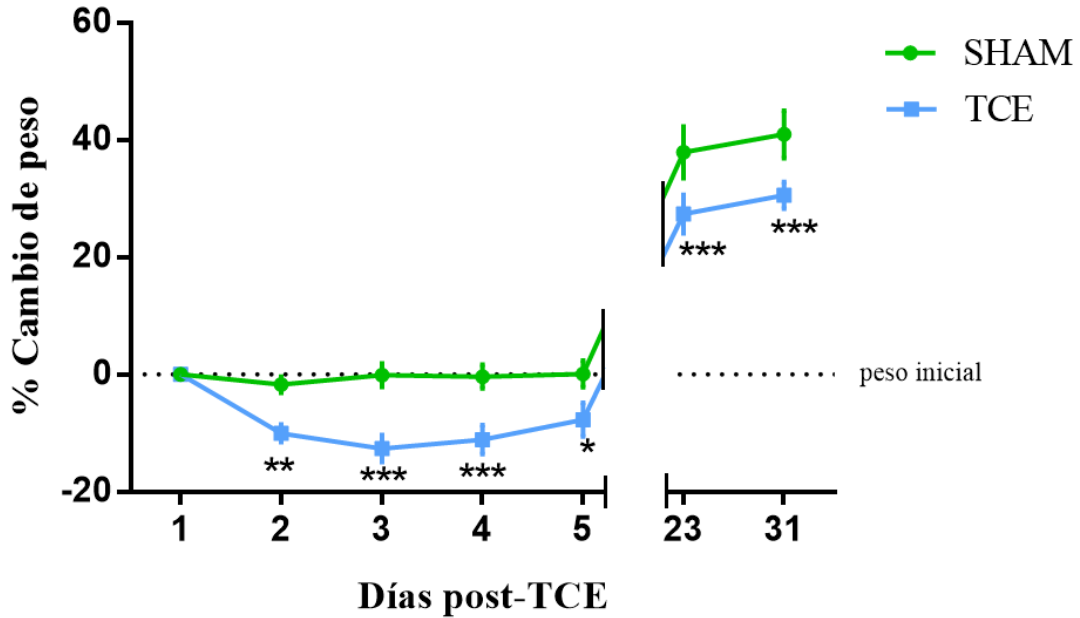
### 5.2.2. Grupo TCE

Inmediatamente después de la inducción del trauma, los animales presentaron hematoma intracraneal (100%), apnea (100%,  $15.2 \pm 5.1$  seg) y un 36.6% de los animales presentaron convulsiones (Fig. 11). El porcentaje de supervivencia en los animales fue de un 64%. Los animales presentaron una disminución de peso estadísticamente significativo con respecto al grupo SHAM ( $p < 0.05$  al día 2;  $p < 0.01$  al día 4 y 5;  $p < 0.001$  al día 3, 23 y 31 post-TCE) (Fig. 10)

El puntaje obtenido en la prueba de *neuroscore* demostró una disminución de la capacidad motora de los animales que se mantuvo durante todo el experimento (día 2  $p < 0.001$ , día 23  $p < 0.05$ , día 30  $p < 0.05$  vs SHAM) (Fig. 12). El promedio de los valores de UPD fue de  $107.4 \pm 25.15$   $\mu$ A (64.2 % menor, con respecto al grupo SHAM,  $p < 0.001$ ), lo que se interpreta como mayor hiperexcitabilidad (Figura 13). Derivado de la evaluación del UPD, un 28.5% de los animales (2 de 7) presentaron crisis fase IV, 57.2% crisis fase II (4 de 7 animales) y 14.3% fase I (1 de 7) en la escala de Racine. En el 100% de los animales se

indujo post-descarga, con una duración promedio de  $85.00 \pm 20.1$  segundos a una frecuencia de  $6.3 \pm 0.24$  Hz (tabla 2) (Racine, 1972).

Los animales mostraron menor preservación de neuronas en el hipocampo dorsal en todas las áreas evaluadas respecto al SHAM, de manera ipsilateral GD 59%,  $p= 0.0061$ ; hilus, 74%,  $p= 0.0056$ ; CA1, 55%,  $p= 0.0081$  y CA3, 52%,  $p=0.0009$ ; contralateral: GD 58%,  $p=0.0011$ ; hilus, 60%,  $p=0.0017$ ; CA1, 70%,  $p=0.0002$  y CA3, 76%,  $p=0.0001$  (Figura 14 y 15).



**Figura 10.** El TCE induce pérdida de peso. Análisis del registro de peso del experimento 1. Nótese la disminución del peso del grupo con TCE severo en contraste con el grupo SHAM. Los valores representan la media  $\pm$  EE. ANOVA 2V-Sidak \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs SHAM.

Craneotomía sin TCE

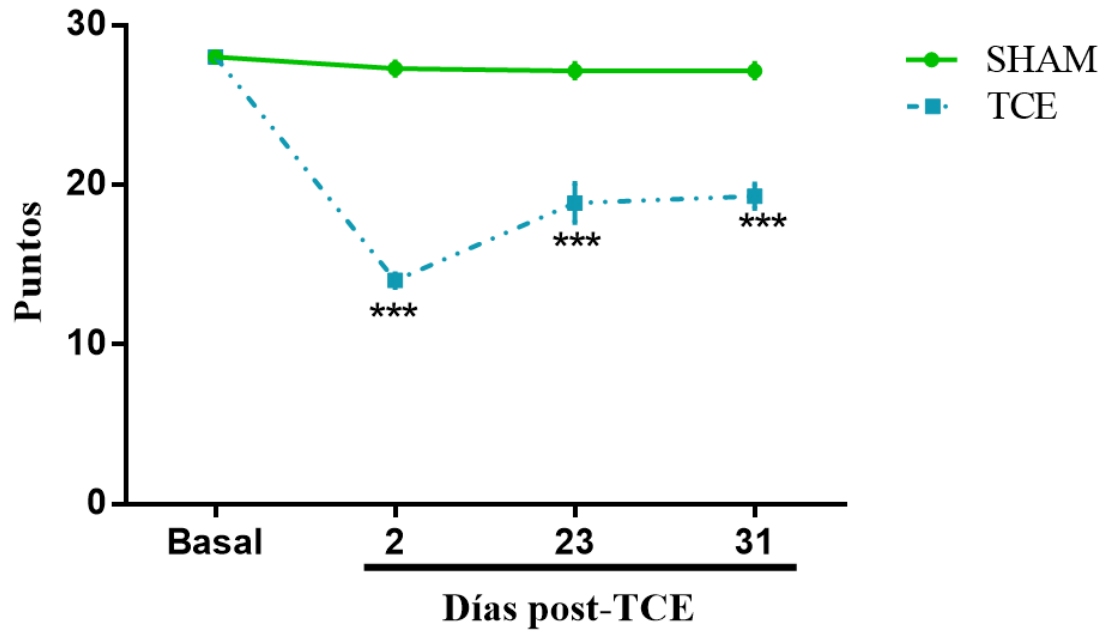


Craneotomía con TCE

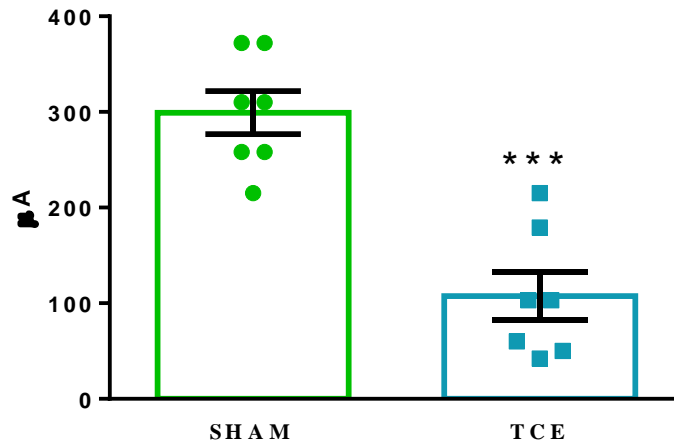


**Figura 11.** El TCE induce hematoma intracraneal. Imágenes representativas de la presencia de hematoma intracraneal (Craneotomía con TCE) posterior a un trauma severo vs una craneotomía sin TCE.





**Figura 12.** El TCE induce daño neuromotor. Análisis del puntaje registrado en la prueba de *neuroscore* al día 2, 23 y 31 post-traumático del grupo TCE vs SHAM. Nótese la disminución del puntaje al día 2 que sigue siendo evidente hasta el día 31 post-traumático en contraste con el grupo SHAM. t-test \*\*\* $p < 0.001$  vs SHAM.

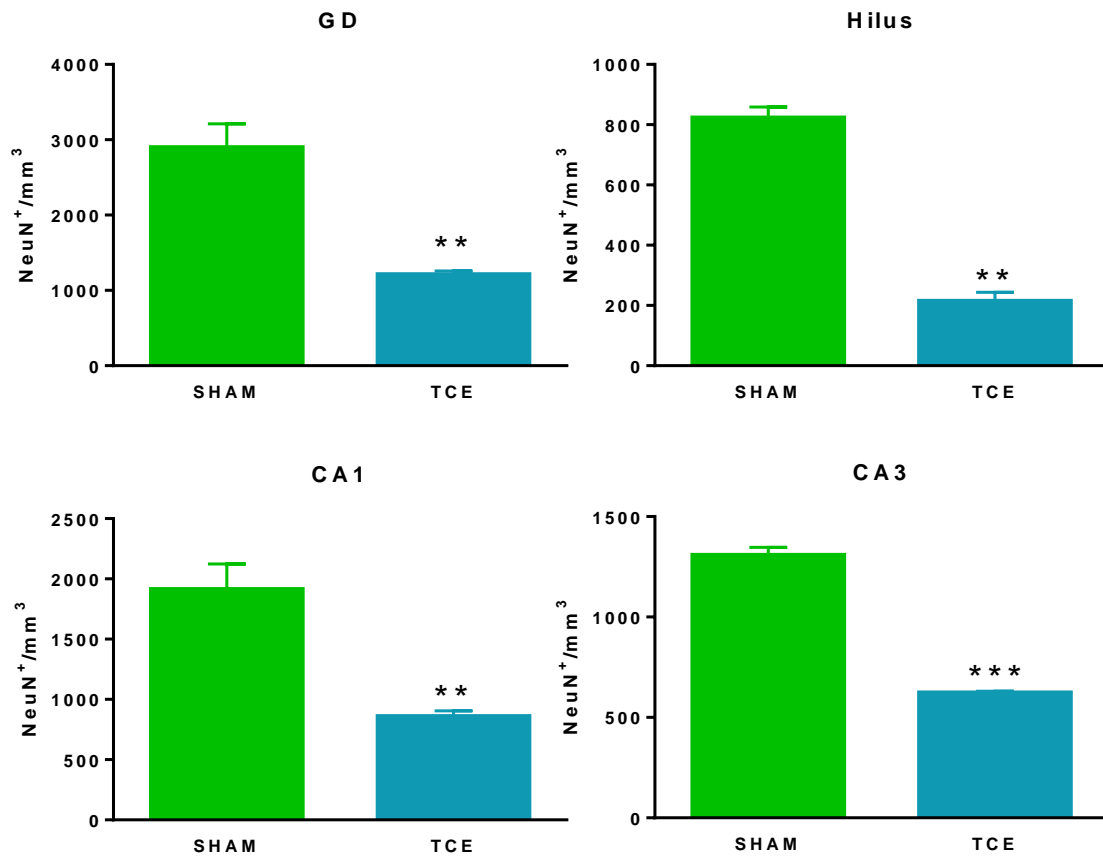


**Figura 13.** El TCE aumenta la excitabilidad hipocámpal. Gráfica en la que se muestra los valores de UPD al día 30 posterior al TCE. Nótese la disminución en el umbral post-descarga de los animales sometidos a TCE respecto al grupo SHAM. Los valores representan la media  $\pm$  EE de la corriente necesaria para la generación del UPD ( $\mu$ A). t-test \*\*\* $p < 0.001$  vs SHAM.

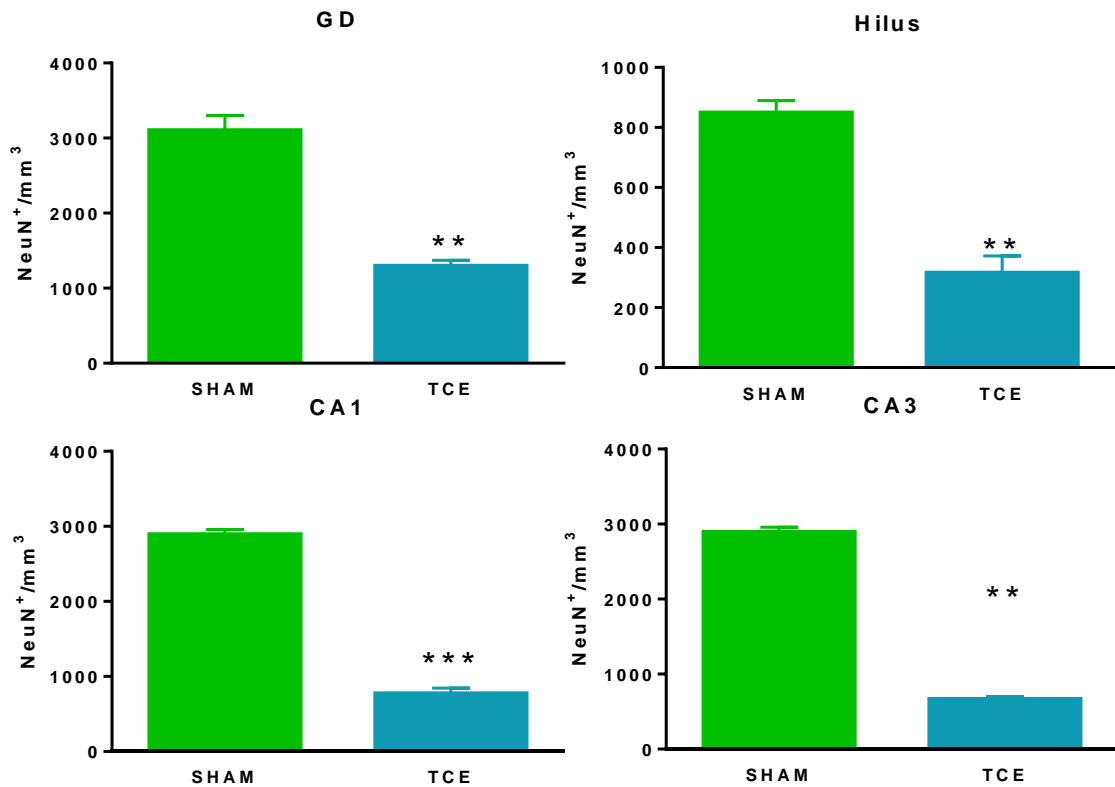
**Tabla 2** Fases conductuales detectadas en respuesta al UPD (Experimento 1)

Grupo	Fase (I-V)	Duración post-descarga (s) % animales	Frecuencia (Hz)
SHAM	Fase I (100%)	0	0
TCE	Fase I (14.3%) Fase II (57.2%) Fase IV (28.5%)	85.00 $\pm$ 20.21 (100%)	6.300 $\pm$ 0.24

Se observó en el 100% de los animales con TCE presencia de post-descarga. En rojo se muestra el porcentaje de animales con crisis generalizadas. Los valores representan el % de los animales clasificados respecto a las fases observadas, la media  $\pm$  EE del tiempo de post-descarga y frecuencia de espigas (Hz).



**Figura 14.** El TCE induce muerte neuronal hipocampal (ipsilateral). Gráfica en la que se muestra la preservación neuronal por inmunohistoquímica de NeuN. Los animales al día 30 post-TCE presentan un decremento en el conteo de núcleos neuronales con respecto al grupo SHAM. Los valores representan el promedio de preservación neuronal por  $\text{mm}^3 \pm \text{EE}$ . t-test (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs SHAM).



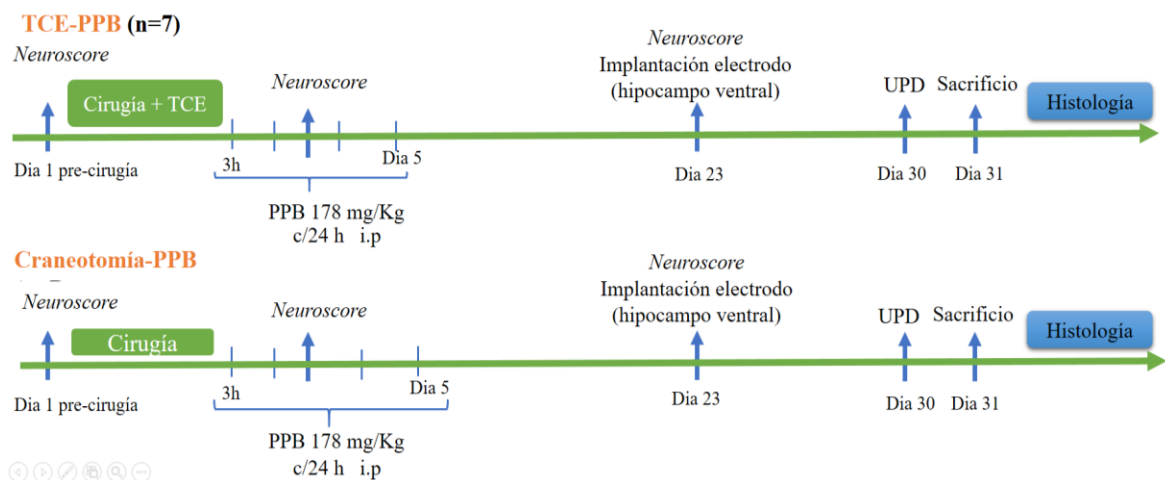
**Figura 15.** El TCE induce muerte neuronal hipocampal (contralateral). Gráfica en la que se muestra la preservación neuronal por inmunohistoquímica de NeuN. Los animales al día 30 post-TCE presentan un decremento en el conteo de núcleos neuronales con respecto al grupo SHAM. Los valores representan el promedio de preservación neuronal por  $\text{mm}^3 \pm \text{EE}$ . t-test (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  vs SHAM).

## 6. Experimento 2: Evaluación el efecto del PPB en el daño celular y excitabilidad hipocampal inducidos por un TCE severo en ratas Wistar.

Este experimento se diseñó para determinar si la administración subcrónica con PPB post-TCE severo modifica las consecuencias subsecuentes al trauma como el daño neuromotor, pérdida de peso, muerte e hiperexcitabilidad hipocampal que se observaron son inducidos por el modelo de LLPF en ratas (experimento 1).

(Los resultados de este experimento incluyen la comparación con los datos del experimento 1).

### 6.1.1. Metodología



**Figura 16.** Protocolo experimental utilizado para la evaluación del efecto del PPB en el daño celular y cambios en la excitabilidad hipocampal posterior a un TCE.

### 6.1.2. Grupo TCE-PPB (n=8)

Se utilizaron ratas a las cuales previamente se les realizó la prueba de *neuroscore* un día antes de la realización de una craneotomía para la inducción de un TCE severo (ver sección 4.2). Tres horas posteriores a la lesión se realizó la administración i.p. de una dosis de PPB (178 mg/Kg) diluido en polietilenglicol (PEG 30%). Dicha administración se repitió cada 12 horas por 5 días. La prueba de *neuroscore* se repitió al día 2. A partir del día 23 en adelante se procedió de manera similar al grupo TCE-Vehículo (ver apartado 5.1.1).

**6.1.3. Grupo PPB (n=7)**

Los animales de este grupo se manejaron idénticamente a lo descrito en la sección 6.1.1 con la diferencia que no se sometieron a inducción de TCE (Fig. 16).

## 6.2. Resultados

### 6.2.1. Grupo PPB

Los animales del grupo de PPB presentaron un peso similar al registrado en el grupo SHAM ( $280 \pm 22.6$  gramos  $p=0.9768$ ) (Fig.17). El análisis del puntaje para la prueba de *neuroscore* no demostró cambios significativos en la capacidad motora de los animales administrados con PPB ( $28.00 \pm 0.0$  al día 2,  $27.43 \pm 0.29$  al día 23 y  $28.00 \pm 0.0$  al día 31 post-craneotomía  $p=0.0953$ ) en contraste con el grupo SHAM (Fig. 18). El promedio de los valores de UPD fue de  $291.7 \pm 21.58$   $\mu\text{A}$  el cual no fue significativamente diferente de los valores del grupo SHAM ( $p= 0.8123$ ) (Figura 19). Derivado de la evaluación del UPD en los animales del grupo PPB un 100% de los animales (7 de 7) presentaron crisis fase I en la escala de Racine sin presencia de post-descarga (tabla 3).

La inmunohistoquímica de NeuN no mostro diferencias significativas en el conteo de núcleos neuronales respecto al SHAM (área ipsilateral CA1 ( $1532 \pm 103.1$  NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>,  $p=0.1351$ ), CA3 ( $1122 \pm 124.4$  NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>,  $p= 0.2265$ ) GD ( $2749 \pm 93.71$  NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>,  $p=0.6268$  e hilus ( $668.2 \pm 23.86$  NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>,  $p=0.0519$ ); área contralateral, CA1  $2555 \pm 224$  NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>,  $p= 0.2230$ ), CA3 ( $1157 \pm 104.7$  NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>,  $p= 0.5848$ ), GD ( $2398 \pm 269.2$  NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>,  $p= 0.1073$ ) e hilus ( $712.3 \pm 70.72$  NeuN<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>,  $p= 0.1473$ ) (Figura 20, 21 y tabla 4).

### 6.2.2. Grupo TCE-PPB

Los animales del grupo TCE-PPB presentaron una disminución de peso estadísticamente significativa al día 4 y 5 ( $p<0.05$  vs SHAM). Esta pérdida de peso se recuperó a valores controles al SHAM al día 23 y 31 ( $p>0.05$  vs SHAM;  $p<0.001$  vs TCE) (Fig.17). El análisis del *neuroscore* mostró una disminución significativa de la capacidad motora de los animales durante nuestras condiciones experimentales al día 3, 23 ( $p<0.001$  vs SHAM) y 31 post-traumático ( $p<0.01$  vs SHAM). Esta disminución fue menos evidente que el obtenido por el grupo TCE al día 23 ( $p<0.01$ ) y 31 ( $p<0.001$ ) (Fig. 18).

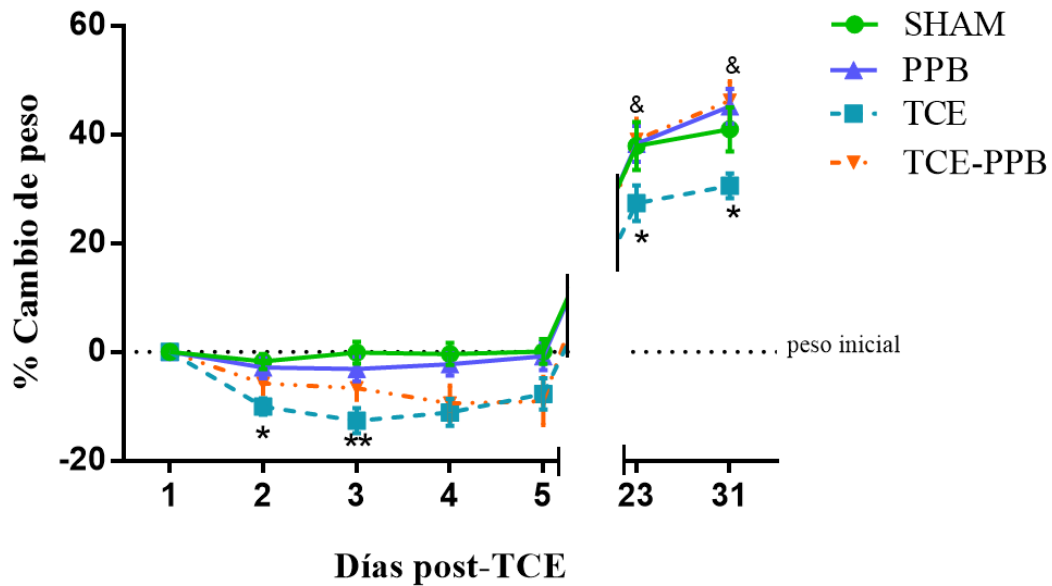
El promedio de los valores de UPD fue de  $317.6 \pm 26.78$   $\mu\text{A}$  (66.2% mayor con respecto al grupo TCE  $p<0.001$ , sin modificaciones respecto al SHAM) (Fig. 19). Derivado de la evaluación del UPD el 25% de los animales (2 de 8) presentaron crisis fase II y un 75%

crisis fase I (6 de 8) en la escala de Racine. El 75% de los animales presentaron post-descarga ( $17.83 \pm 4.3$  segundos  $p < 0.001$  vs TCE) contrario a un 28.5% en la cual no se observó presencia (protegidos). Respecto a la frecuencia de espigas, existe una disminución de estas con respecto al grupo TCE ( $3.56 \pm 0.8$  Hz,  $p < 0.01$ ).

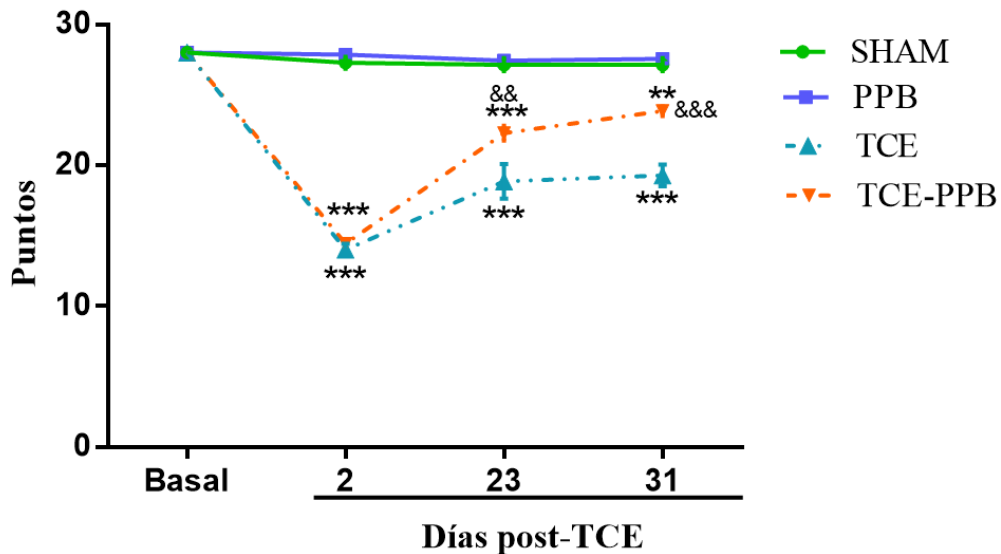
Respecto al conteo de núcleos neuronales por inmunohistoquímica de NeuN, el tratamiento con PPB incrementa la preservación neuronal post-TCE en el área ipsilateral a la lesión el 35% para CA1 ( $p < 0.05$  vs TCE;  $p > 0.01$  vs SHAM), el 44% para CA3 ( $p = 0.0059$  vs TCE;  $p < 0.05$  vs SHAM), el 42% para GD ( $p < 0.5$  vs TCE) y el 57% para hilus ( $p < 0.001$  vs TCE), datos similares a los obtenidos del área contralateral el 45% para CA1 ( $p = 0.0167$  vs TCE;  $p < 0.01$  vs SHAM), el 49% para CA3 ( $p = 0.0099$  vs TCE), el 48% para GD ( $p = 0.0015$  vs TCE) y el 43% para hilus ( $p = 0.0723$  vs TCE;  $p < 0.05$  vs SHAM). Por lo tanto, el PPB tiene un efecto neuroprotector en la muerte neuronal producida por un TCE severo en ratas (Figura 20, 21 y tabla 4).

.

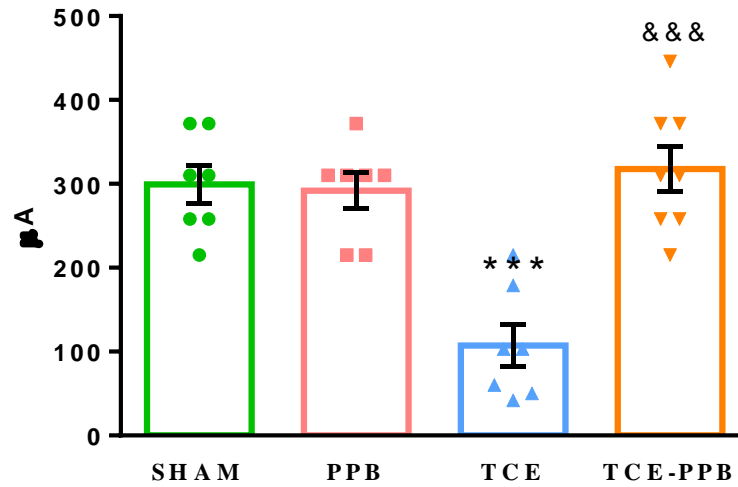




**Figura 17.** La administración de PPB previene la disminución de peso posterior al TCE. Gráfica en la que se muestra el análisis del registro de peso del experimento 2. Iniciando con los 5 días de la administración respectiva de propilparabeno (178 mg/kg + PEG 30%), al día 23 del implante hipocampal y al día 31 del sacrificio. Nótese la recuperación de peso del grupo TCE-PPB en contraste con el grupo TCE. Los valores representan la media  $\pm$  EE. ANOVA 2V-Tukey (\* $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs SHAM; & $p < 0.001$  vs TCE).



**Figura 18.** La administración de PPB mejora el daño motor post-traumático. Análisis del puntaje obtenido en la prueba de *neuroscore* al día 1 pre-cirugía, 3, 23 y 31 post-traumático de los diferentes grupos experimentales. Nótese el aumento del puntaje tanto al día 23 y 31 post-traumático del grupo TCE-PPB en contraste con el grupo TCE. Anova 2V-Tukey (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p > 0.001$  vs SHAM; && $p < 0.01$ , &&& $p < 0.001$  vs TCE).

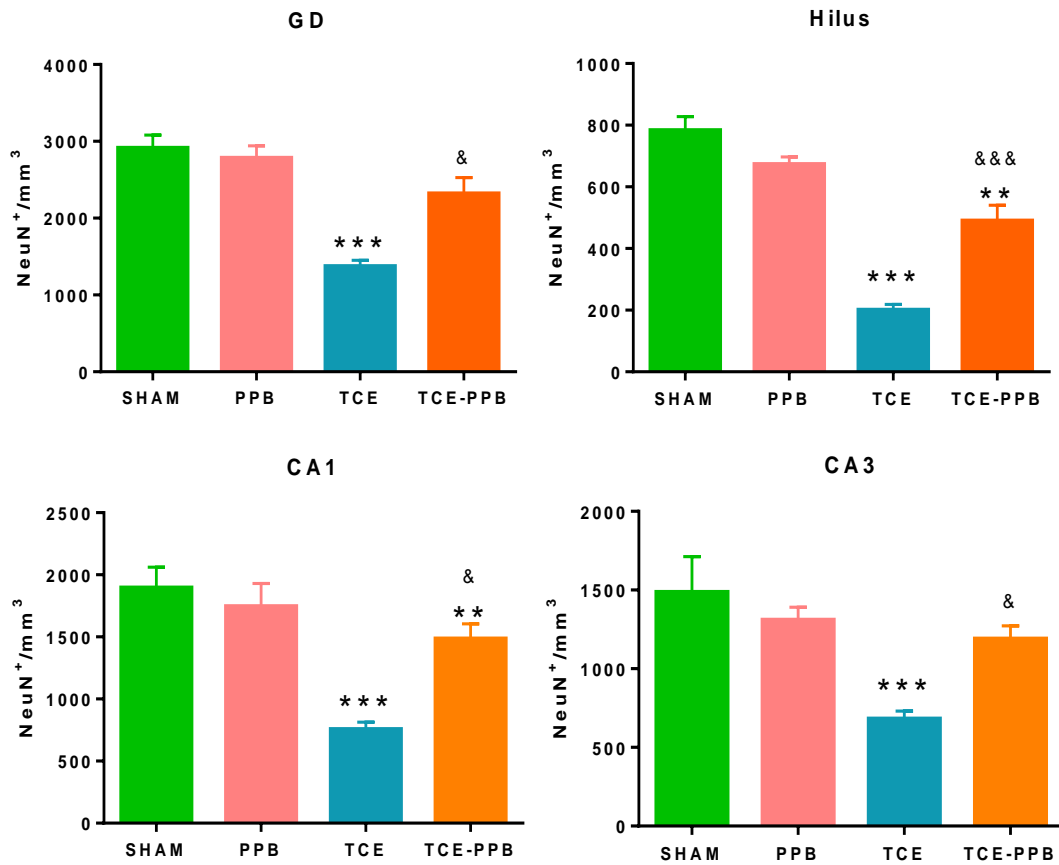


**Figura 19.** La administración de PPB disminuye la hiperexcitabilidad post-traumática. Gráfica en la que se muestran los valores de UPD al día 30 posterior al TCE de los diferentes grupos experimentales. Nótese la disminución de la hiperexcitabilidad hipocampal de los animales TCE-PPB respecto al grupo TCE. Los valores representan la media  $\pm$  EE de la corriente necesaria para la generación del UPD ( $\mu$ A). Anova de 1V- Tukey \*\*\* $p > 0.001$  vs SHAM; &&& $p < 0.001$  vs TCE).

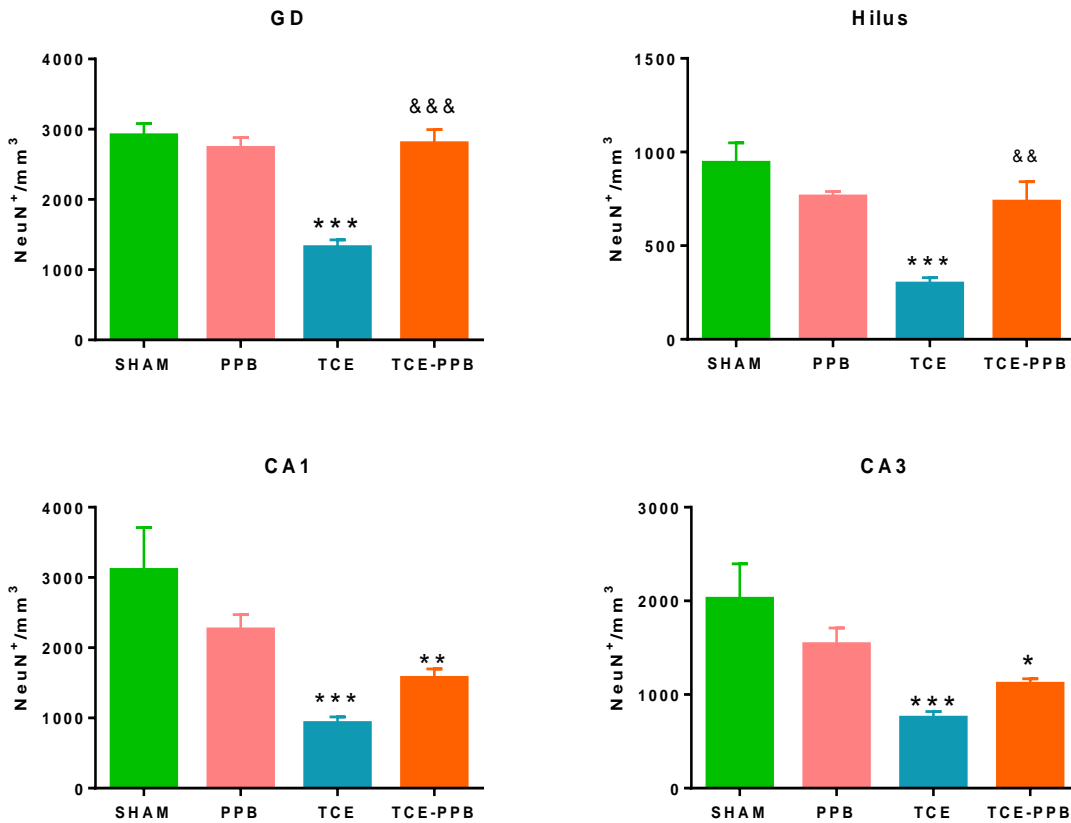
**Tabla 3** Fases conductuales detectadas en respuesta al UPD (Experimento 2)

Grupo	Fase (I-V) (% animales)	Duración post-descarga (s) (% animales)	Frecuencia (Hz)
SHAM	Fase I (100%)	0	0
PPB	Fase I (100%)	0	0
TCE	Fase I (14.3%) Fase II (57.2%) Fase IV (28.5%)	85.00 $\pm$ 20.21 (100%)	6.300 $\pm$ 0.24
TCE-PPB	Fase I (71.5%) Fase II (28.5%)	17.83 $\pm$ 4.3 (75%)*** 0 (25%)	3.56 $\pm$ 0.8**

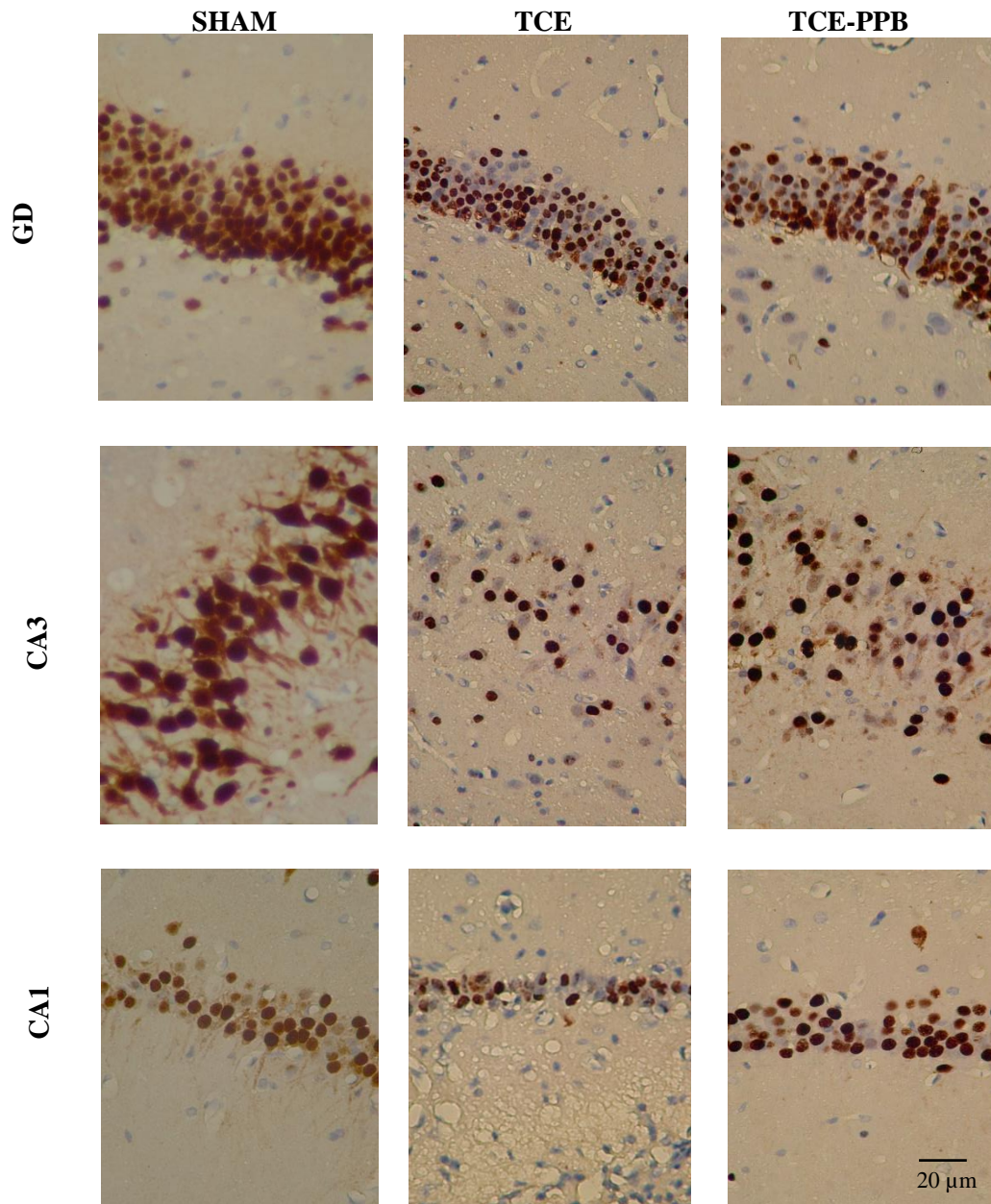
Nótese que el 100% de los animales del grupo TCE-PPB presentaron crisis parciales. En rojo se muestra los animales con crisis generalizadas. En azul se muestran los animales con TCE que no presentaron post-descarga. Existe una disminución en el tiempo de post-descarga del grupo TCE-PPB ( $p < 0.001$  vs TCE) así como en la frecuencia de espigas del grupo ( $p < 0.01$  vs TCE). Los valores representan el porcentaje (%) de los animales clasificados respecto a las fases observadas, la media  $\pm$  EE del tiempo de post-descarga y frecuencia de espigas (Hz) de los diferentes grupos experimentales



**Figura 20.** Preservación neuronal de la región neuronal hipocampal ipsilateral a la lesión. Los animales tratados subcrónicamente con PPB al día 30 post-TCE presentan un incremento en la preservación neuronal (NeuN) con respecto al grupo TCE. Los valores representan el promedio de preservación neuronal por mm<sup>3</sup> ± EE. Anova 1V-Tukey (\*p<0.05; \*\*p<0.01; \*p<0.001 vs SHAM; &p<0.05; &&&p<0.001 vs TCE).



**Figura 21.** Preservación neuronal de la región neuronal hipocámpal contralateral a la lesión. Los animales tratados subcrónicamente con PPB al día 30 post-TCE presentan un incremento en la preservación neuronal (NeuN) con respecto al grupo TCE. Los valores representan el promedio de preservación neuronal por mm<sup>3</sup> ± EE. Anova 1V-Tukey (\*p<0.05; \*\*\*p<0.001 vs SHAM; &&p<0.005; &&&p<0.001 vs TCE).

**Tabla 4** Microfotografías representativas de inmunohistoquímica de NeuN a nivel de hipocampo dorsal

Microfotografías representativas de secciones coronales de GD, CA3 y CA1 en la región dorsal del hipocampo de los grupos SHAM, TCE y TCE-PPB. Las secciones se evaluaron mediante la inmunohistoquímica de NeuN. Nótese la disminución de la densidad neuronal en el grupo TCE vs al SHAM. Estos cambios fueron menos evidentes en el grupo TCE-PPB.

### 6.3. Discusión

En el presente estudio se utilizó el modelo de LLFP para inducir un TCE severo en ratas. Durante todo el experimento se observó una disminución en la ganancia de peso y la capacidad neuromotora de los animales con TCE comparado contra el grupo SHAM. También, se comprobó la presencia de muerte neuronal e hiperexcitabilidad hipocampal al día 30 post-TCE. Finalmente, un porcentaje de animales presentó crisis convulsivas generalizadas (Fase IV) inmediatamente después de la estimulación (UPD) lo que indica una generalización de la post-descarga a otras áreas cerebrales.

Bajo nuestras condiciones experimentales, la administración subcrónica de PPB (178 mg/kg) durante 5 días en ratas con TCE redujo el daño neuromotor y la pérdida de peso. Al día 30 post-TCE, en la prueba de UPD se observó una disminución de la hiperexcitabilidad hipocampal post-traumática. Las fases conductuales evocadas de esta estimulación se aislaron a crisis parciales fase (I y fase II). A pesar de la presencia de post-descarga en un número de animales con TCE-PPB, el tiempo de post-descarga y la frecuencia de espigas fueron significativamente menor con respecto al grupo TCE. Un porcentaje significativo de animales no presentó post-descarga. Respecto a la preservación neuronal, el tratamiento subcrónico con PPB incrementa la preservación neuronal post-TCE del hipocampo de manera bilateral.

#### 6.3.1. TCE y consecuencias físicas

Se sabe que el TCE inducido por LLFP en ratas resulta en déficits motores y cognitivos significativos que permanecen a lo largo del tiempo (desde los primeros días-hasta un año) (Bruns y Hauser; 2003; Gooijers *et al.*, 2016; Kabadi *et al.*, 2010). Esto concuerda con la incidencia (13 millones por año) de déficits motores en pacientes con TCE (Pinheiro *et al.*, 2018).

En nuestros resultados se observó una disminución significativa de la capacidad neuromotora de los animales durante los primeros días con una recuperación parcial de la misma al día 23 y 31 sin llegar a valores controles. Estos últimos datos coinciden con lo reportado desde 1987 y 1989 por McInstosh y colaboradores, donde se observó en ratas con TCE severo una disminución de la capacidad motora desde las primeras 24 horas posteriores

al trauma con una recuperación parcial a las 4 semanas post-TCE (McIntosh *et al.*, 1987; McIntosh *et al.*, 1989).

Este déficit neuromotor, está asociado directamente con el daño en los mecanismos neuronales que controlan los movimientos, así como la lesión directa a estructuras como corteza motora primaria (Irimia y Horn, 2015). Se ha descrito que esta ruptura en los mecanismos es exacerbada por la lesión axonal difusa (Kasahara *et al.*, 2011) y el edema cerebral (Cernak *et al.*, 2004). Este último, alcanza su daño máximo durante los primeros días después del TCE y se considera un factor causal de déficits motores subsecuentes (Hakon *et al.*, 2015).

Por otro lado, respecto a la disminución observada en la ganancia de peso de los animales con TCE se puede relacionar cualitativamente con la pérdida de fuerza y movilidad de los animales para conseguir su alimento. Nuestras observaciones coinciden con la hechas en 1995 donde reportan una disminución de la actividad motora y el comportamiento de alimentación durante los primeros 8 días post-traumáticos (Schimidt y Grady, 1995). Sin embargo, pese a la diversidad de estudios en TCE, no existen reportes en animales donde sugieran mecanismos alterados relacionados con los núcleos hipotalámicos que controlan el apetito y la saciedad o el posible papel del dolor post-traumático como limitante en la alimentación. Por otro lado, en sujetos con TCE solo se tienen estudios longitudinales de seguimiento de peso, donde el 42% de los pacientes ganaron peso y el 28% perdieron peso durante un período de 38 meses. Sin embargo, en estos estudios solo se realizó la analogía con la ingesta de alimentos, la pérdida de peso en terapia intensiva, problemas de ansiedad, depresión o síndrome metabólico (Creen, *et al.*, 2014). Por lo que se requieren estudios que profundicen en vislumbrar mecanismos que pudieran estar alterados después de un TCE y su relación con el patrón de alimentación.

### 6.3.2. TCE y muerte neuronal

Estudios previos en sujetos y en modelos animales de TCE reportaron la presencia de muerte neuronal subsecuente a un trauma en diversas áreas cerebrales como: corteza, cerebelo, tálamo e hipocampo. Se sabe que este daño es dependiente de la gravedad (leve, moderado o severo) de la lesión inicial (Hicks *et al.*, 1993; Raghupathi, 2004; Ross *et al.*, 1993; Stoica y Faden, 2010).

En congruencia con nuestros datos en hipocampo de ratas con TCE, la expansión del daño celular se observó de manera bilateral, a pesar de que la inducción de la lesión se realizó de manera unilateral. Este daño está presente desde las primeras horas post-TCE y es progresivo hacia semanas y meses (Hamm *et al.*, 1991; Lowenstein *et al.*, 1992; Werner *et al.*, 2007). Estos datos concuerdan con lo encontrado post-mortem en sujetos con TCE donde existió hasta un 86% de pérdida bilateral de neuronas hipocámpales (Graham *et al.*, 1994). Desde 1989 existen reportes como los llevados a cabo por Cortez y colaboradores quienes encontraron en ratas con 4 semanas post-TCE moderado, muerte neuronal en todas las áreas de hipocampo, siendo más evidente en GD, CA1 y CA3 (Cortez *et al.*, 1989); datos similares se reportaron por otros autores (Hicks *et al.*, 1996; Graham *et al.*, 2000; Thompson *et al.*, 2005; Xiong *et al.*, 2013). En conjunto, todos estos datos coinciden con nuestros resultados experimentales en los cuales se observó un decremento significativo en la preservación neuronal en hipocampo de manera bilateral al día 30 post-TCE.

Este daño neuronal, se ha asociado a procesos de lesión primaria por la disrupción física inmediata de membranas celulares, así como a procesos subsecuentes de lesión secundaria. Entre estos últimos, se incluye la isquemia (Bouma *et al.*, 1991) y mecanismos de muerte celular (Rink *et al.*, 1995; Stoica y Faden, 2010; Sutton *et al.*, 1993). Respecto a este último, se sabe que la necrosis puede persistir a través del tiempo y que lleva a procesos neuroinflamatorios progresivos (Wallach *et al.*, 2016; Chan *et al.*, 2015), fragmentación del ADN (Fujikawa, 2015) y al aumento de radicales libres (Itoh *et al.*, 2012), lo que resulta en una exacerbación del daño.

Por otro lado, como consecuencia inmediata post-TCE diversos autores concuerdan que existe un aumento en la liberación de glutamato en la hendidura sináptica. El glutamato participa en la generación de edema post-traumático, así como en los déficits cognitivo motores observados post-TCE (McIntosh *et al.*, 1990; Guerriero *et al.*, 2015). Se ha sugerido que un aumento en los niveles de glutamato puede mediar los efectos excitotóxicos post-traumáticos por la sobreactivación del receptor NMDA y canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje, generando así un círculo excitotóxico que exagera el daño neuronal (Hinzman *et al.*, 2016; Okiyama *et al.*, 1995; Strijbos *et al.*, 1996).



En estudios reportados por Lara-Valderrabano y col. (2016), se demostró que el PPB es un bloqueador de canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje de neuronas piramidales de CA1. El bloqueo de estos canales disminuye la liberación de glutamato y la muerte neuronal en SE (Santana-Gómez *et al.*, 2017) así como una atenuación del daño neuronal producido por isquemia (Calabresi *et al.*, 2003). Como ya se mencionó anteriormente, el glutamato (principal neurotransmisor excitador en el cerebro) se libera inmediatamente a la lesión primaria y este puede permanecer elevado hasta por 6 horas post-TCE (Faden *et al.*, 1989).

En conjunto, los datos anteriores podrían sugerir que el efecto del PPB sobre los canales de Na<sup>+</sup> puede participar en los efectos neuroprotectores observados en el presente estudio mediante la disminución de la liberación de glutamato y por consiguiente la disminución de la excitotoxicidad.

### 6.3.3. TCE e hiperexcitabilidad

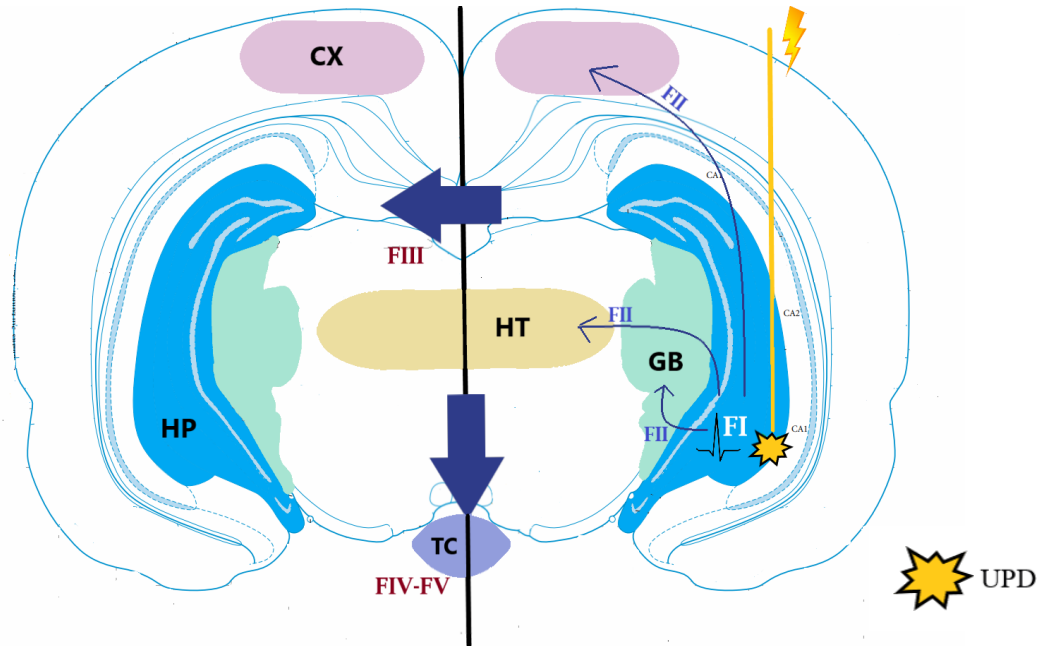
Esta muerte neuronal hipocampal subsecuente a un TCE que se abordó anteriormente podría estar relacionada también con interrupciones de las conexiones hipocampales entre sus propias áreas (vía perforante, vía de fibras musgosas; colaterales de Schaffer; vía temporoamónica), así como a otras regiones cerebrales (Olivares *et al.*, 2015; Orbán *et al.*, 2015). El modelo de LLFP induce una lesión por percusión del fluido cerebral (líquido cefalorraquídeo) lo que genera un desplazamiento del cerebro y un daño progresivo. Este daño, como ya se mencionó en la sección anterior, incluye al hipocampo. La muerte neuronal hipocampal no es selectiva y afecta a una población importante de neuronas que controlan la excitabilidad neuronal como lo son las neuronas del hilus (interneuronas de canasta) y de GD (Grady *et al.*, 2003; McIntosh *et al.*, 1989; Sloviter, 1991; Xiong *et al.*, 2013).

Lowenstein en 1992 determinó *in vivo*, que después de generar una lesión en corteza cerebral, el daño producía muerte neuronal bilateral en la región del hilus (interneuronas inhibitorias) y cambios persistentes de la excitabilidad de las neuronas granulares de GD. Este daño fue asociado a la susceptibilidad de estas neuronas a periodos de isquemia presentes en el TCE (Lowenstein *et al.*, 1992). Estudios recientes *in vitro* mediante estimulación de la vía perforante demostraron hiperexcitabilidad de la región de CA3, ya que se observó una mayor frecuencia de espigas y su correspondiente amplitud. Con estos datos, la conclusión fue que esta hiperexcitabilidad no es única de GD si no que genera una propagación aberrante

de excitación a CA3 posiblemente a través de las rutas de las fibras musgosas (Webster, 2017). En este contexto, en el 2000 se estableció una hipótesis respecto a la hiperexcitabilidad de GD como consecuencia de una mayor irritabilidad de las células musgosas (las cuales reciben entradas mono y polisinápticas de la vía perforante), por lo que una disrupción por la muerte neuronal implica cambios en el circuito normal de excitabilidad (Santhakumar, *et al.*, 2000).

La prueba de UPD permitió evaluar la excitabilidad de un área específica cerebral, en nuestro caso hipocampo. El valor obtenido de  $\mu\text{A}$  para generar el umbral en hipocampo, nos indica la excitabilidad de nuestro foco de estimulación (a mayor umbral menor hiperexcitabilidad). Por otro lado, la post-descarga de la prueba UPD puede propagarse a estructuras adyacentes a nuestro foco de estimulación (Figura 22). Nuestros datos revelaron que al día 31 post-TCE se necesita un menor estímulo ( $\mu\text{A}$ ) para generar una respuesta en los animales con TCE, lo que se interpreta como mayor excitabilidad hipocampal. Es importante destacar que los cambios conductuales evocados por la estimulación incluyeron crisis generalizadas de fase IV (Racine, 1972b). Estas crisis se relacionan con un mayor daño a estructuras cerebrales adyacentes a hipocampo como tálamo, corteza, ganglios basales y tallo cerebral (Velíšková y Velíšek, 2017). Estas últimas estructuras se saben están dañadas post-TCE. Por otro lado, la excitabilidad hipocampal no se modifica en nuestro grupo TCE con tratamiento de PPB respecto nuestro grupo SHAM, mientras que los cambios conductuales evocados por el UPD se aislaron a crisis parciales. Concluyendo que el PPB no solo protege a hipocampo de la hiperexcitabilidad, sino que también tiene efectos neuroprotectores sobre estructuras adyacentes como tálamo, corteza y tallo cerebral.

La limitante de nuestro estudio es que pese a saber que existe esta hiperexcitabilidad hipocampal subsecuente a TCE, no se puede discriminar de que región hipocampal se está generando. Sin embargo, podemos correlacionarlo con la hipótesis de Santhakumar y colaboradores en el 2001, quienes al mes de la inducción de un TCE moderado y mediante técnicas electrofisiológicas *in-vitro* observaron cambios persistentes (estructurales y funcionales) en los circuitos inhibición-excitación que controlan el desarrollo de focos hiperexcitables a nivel límbico (Santhakumar *et al.*, 2001).



**Figura. 22** Estructuras cerebrales involucradas en la propagación de la post-descarga (Prueba de UPD)

Con la estimulación y generación de la post-descarga, esta puede o no propagarse a diferentes estructuras cerebrales como hipotálamo, ganglios basales, amígdala y corteza, la fase I y II son crisis parciales unilaterales. Las crisis generalizadas de fase III involucra áreas bilaterales del cerebro, si el animal evoca una fase IV o IV la propagación llega hasta estructuras como tallo cerebral. **Cx:** Corteza cerebral, **HT:** Hipotálamo, **HP:** Hipocampo, **TC:** Tallo cerebral, **GB:** Ganglios basales. **FI:** Fase I, **FII:** Fase II, **FIII:** Fase III, **FIV:** Fase IV, **FV:** Fase V.

Respecto a estos focos hiperexcitables, se ha demostrado en pacientes (con antecedentes de TCE) descargas mayores a 10 minutos de actividad epileptiforme hipocampal (Vespa *et al.*, 2010). La ventaja de nuestros datos obtenidos por UPD es una estimulación focal, observando si existe o no propagación de la post-descarga a otras áreas cerebrales adyacentes. La desventaja de otros estudios es la administración de dosis bajas de proconvulsivantes como es el caso del pentilentetrazol (PTZ), el cual es utilizado para observar las fases conductuales evocadas subsecuentes a un TCE (Golarai *et al.*, 2001). Es importante destacar que el PTZ fue administrado a nivel sistémico y que por lo tanto interactúa con toda el área cerebral y no se puede relacionar con un área cerebral específica.

Respecto al tratamiento subcrónico con PPB y la hiperexcitabilidad post-TCE, Wolf y col. (2001) demostraron que existe una relación directa entre el bloqueo de canales de  $\text{Na}^+$  y la disminución del influjo del  $\text{Ca}^{+2}$  a la célula. La atenuación del  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular pudiese

estar participando en la neuroprotección de la lesión axonal difusa post-traumática. La disminución de la lesión axonal difusa permite que conexiones hacia otras áreas cerebrales como corteza, tálamo, cuerpo calloso e hipotálamo no se vean interrumpidas o degradadas por mecanismos de degeneración walleriana (Meythaler *et al.*, 2001). Estas últimas evidencias, pueden tener relación directa con la disminución de la hiperexcitabilidad.

Por otro lado, se sabe que existe un equilibrio fino entre neurotransmisores inhibitorios como GABA y los excitatorios como Glutamato. Estos últimos, pierden su homeostasis después de un TCE (Giza *et al.*, 2014). Como se mencionó anteriormente, en hipocampo las interneuronas inhibitorias de canasta son las que controlan la inhibición de los circuitos como la vía perforante-fibras musgosas, por lo que un aumento en glutamato con la respectiva disminución de neuronas inhibitorias puede explicar la hiperexcitabilidad hipocampal post-traumática (Meythaler *et al.*, 2001). En este contexto, el PPB podría desempeñar un papel importante en la preservación de estas neuronas hilares, como lo observado en nuestros resultados de preservación neuronal. Por lo tanto, la preservación de estas últimas se relaciona con su participación en el control de la hiperexcitabilidad post-TCE. En otras áreas hipocampales, la reducción de hiperexcitabilidad correlaciona con modelos *in-vitro* como los llevados a cabo por Lara-Valderrabano y col. (2017), en el cual se observó hiperexcitabilidad (actividad epileptiforme) inducida por 4-AP en neuronas de CA1, la cual fue abolida por el PPB (Lara-Valderrabano *et al.*, 2017).

Finalmente, se sabe que una sobre activación de las características excitables del hipocampo predispone al desarrollo de disfunciones cognitivas y de memoria, así como el desarrollo de epilepsia post-traumática, Parkinson y Alzheimer (Gavett *et al.*, 2010; Lucke-Wold *et al.*, 2015; Uryu *et al.*, 2007). Por lo tanto, se requiere la búsqueda exhaustiva de nuevas terapias enfocadas no solo a controlar consecuencias de la lesión primaria sino a detener o atenuar esta hiperexcitabilidad y muerte neuronal relacionada con el desarrollo de patologías a largo plazo. En este contexto, nuestros resultados obtenidos con el PPB pueden ayudar a vislumbrar una nueva estrategia post-TCE, sin embargo, se requiere profundizar más en investigación preclínica.

#### 6.3.4. Otros posibles mecanismos neuroprotectores del PPB

El PPB es una molécula con pocos mecanismos elucidados a la fecha. Adicionalmente al bloqueo de canales de Na<sup>+</sup> dependientes de voltaje, se sabe que tiene efectos estrogénicos débiles (30,000 veces menos potentes que el 17 β-estradiol) (Blair *et al.*, 2000). Por su parte, el 17 β-estradiol demostró neuroprotección neuronal de corteza y CA3 mediante la disminución de la muerte celular apoptótica y reducción de astrogliosis (Day *et al* 2017). Estos mecanismos neuroprotectores, posiblemente se deban a la interacción estradiol-canales de Ca<sup>+2</sup> o mecanismos antioxidantes (Behl *et al.*, 1997; Mermelstein *et al.*, 1999; Peinado *et al.*, 2004).

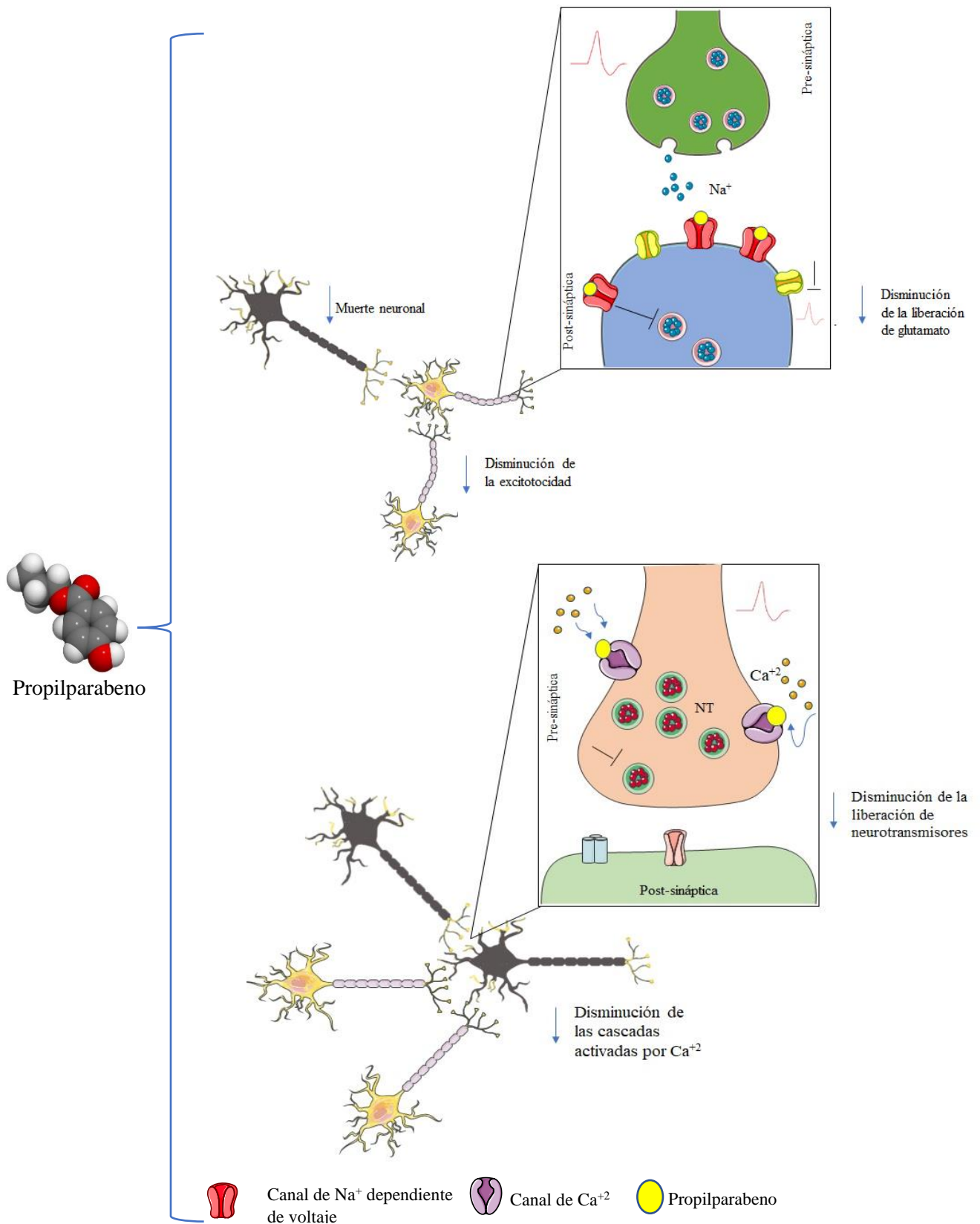
Por otro lado, el 17 β-estradiol demostró una interacción con el receptor GABA<sub>A</sub> incrementando la neurotransmisión inhibitoria en corteza y áreas subcorticales que incluyen a los ganglios basales, hipotálamo, tálamo e hipocampo (Blurton-Jones y Tuszynski, 2007). Este mecanismo se describió como posible neuroprotector al atenuar la activación del receptor NMDA (Salch *et al.*, 2003). Estos mecanismos neuroprotectores pueden mediar no solo el control de la hiperexcitabilidad detallada anteriormente, sino la neuroprotección a otras áreas cerebrales adyacentes a hipocampo (Engel *et al.*, 1978; Velišková y Velišek, 2017). En nuestros resultados un porcentaje de animales no presentaron post-descarga y las fases observadas de los animales fueron crisis parciales aisladas únicamente a hipocampo que era el foco de estimulación. Por lo tanto, podemos sugerir una participación inhibitoria por parte del PPB a regiones adyacentes hipocampales que participan en la propagación de las crisis a otras áreas cerebrales. Esta inhibición posiblemente se deba a la interacción PPB con receptor GABA<sub>A</sub>. Por consiguiente no se puede descartar que el PPB ejerza sus efectos neuroprotectores por más de 1 mecanismo (Figura 23).

#### 6.3.5. Ventajas y desventajas del tratamiento con PPB

En tratamientos subcrónicos con PPB en *status epilepticus* se demostró una esteatosis hepática transitoria (que no afecta la viabilidad celular) y que se revierte al suspender el tratamiento (Santana-Gómez *et al.*, 2017). Por lo tanto, tratamientos subcrónicos deben considerar la relación riesgo-beneficio que se puede obtener con la preservación neuronal y la disminución de la hiperexcitabilidad post-traumática demostrada en este estudio.

El PPB es excipiente de gran cantidad de formas farmacéuticas que incluyen a algunos anticonvulsivantes. En el 2017 Santana-Gómez y col. demostraron que la combinación de PPB y Leviracetam reduce la liberación de glutamato, la hiperexcitabilidad y el daño neuronal en animales con crisis recurrentes. Adicionalmente esta combinación tiene mínimos efectos hepatotóxicos por lo cual, otras alternativas futuras para probar al PPB en TCE puede ser en combinaciones con otros fármacos que hayan demostrado neuro protección en modelos con fisiopatología similar al TCE.

Adicionalmente, el PPB demostró tener un amplio margen de seguridad, baja toxicidad y bajo costo (Soni *et al.*, 2001), por lo cual es una molécula con potencial efecto neuroprotector en *status* y ahora en TCE a nivel agudo.



**Figura 23.** Posibles mecanismos neuroprotectores del PPB en las consecuencias post-traumáticas. (Realizado utilizando Servier Medical Art)

## **7. Conclusiones**

De los resultados obtenidos se desprenden las siguientes conclusiones:

- El modelo de LLFP es reproducible con respecto a las características reportadas en la literatura.
- La administración subcrónica con PPB después de la inducción de un TCE severo tiene efectos neuroprotectores en la preservación neuronal al día 30 post-TCE.
- La administración subcrónica con PPB después de la inducción de un TCE severo tiene efectos neuroprotectores en la hiperexcitabilidad post-traumática al día 30.



## 8. Perspectivas

El presente estudio es el primero en demostrar un efecto neuroprotector por parte del PPB en un modelo de TCE. Con base en lo anterior, es necesario continuar con la investigación del PPB en las consecuencias post-traumáticas. En este contexto se derivan las siguientes perspectivas.

- Determinar si la administración de PPB es eficaz en otras consecuencias post-traumáticas donde el hipocampo esté involucrado, como lo son aprendizaje y memoria.
- Evaluar si los efectos adversos del PPB se reducen con la administración de una dosis menor mediante liberación sostenida, haciendo uso de microbombas implantadas de manera subcutánea.
- Determinar el efecto del PPB en la muerte neuronal e hiperexcitabilidad a largo plazo que pudiese estar presente subsecuente a un TCE.
- Determinar el efecto del PPB en otras áreas cerebrales, como tálamo, hipotálamo y corteza neuronal, barrera hematoencefálica, de las que se sabe, tienen daño post-traumático.
- Evaluar el efecto del PPB en la gliosis, estrés oxidativo, lesión axonal difusa que son factores que exacerbaban la lesión neuronal post-TCE.
- Determinar si el efecto del PPB en un TCE severo es igual o mayor en diferentes grados de severidad de lesión
- Evaluar el papel del PPB en diversos sistemas neuronales implicados en el control de la hiperexcitabilidad (GABA, Glutamato)
- Evaluar el efecto del PPB en distintos trastornos post-traumáticos como Ansiedad y Depresión, Alzheimer, Parkinson y Epilepsia post-traumática.

---

## 9. Referencias

- Alted, L., Bermejo, S., & Chico, M. (2009). Actualizaciones en el manejo del traumatismo craneoencefálico grave. *Medicina Intensiva*, 33(1), 16–30.
- Amaral, D. G., & Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. *Neuroscience*, 31(3), 571–591.
- Andrew, J., Richard, J., Macmillan, V. H., & Peter, M. (1993). Excitatory amino acids in cerebrospinal fluid following traumatic brain injury in humans. *Journal of neurosurgery*, 79(C), 369–372.
- Ariza, M., Serra-Grabulosa, J.M., Junque, C., Ramirez, B., Martaro, M., Poca, A., Bargallo, N., and Sahuquillo, J. (2006). Hippocampal head atrophy after traumatic brain injury. *Neuropsychologia* 44, 1956–1961.
- Ates, O., Cayli, S., Altinoz, E., Gurses, I., Yucel, N., Sener, M. & Yologlu, S. (2007). Neuroprotection by resveratrol against traumatic brain injury in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 294(1–2), 137–144.
- Başkaya, M. K., Rao, A. M., Doğan, A., Donaldson, D., & Dempsey, R. J. (1997). The biphasic opening of the blood–brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Neuroscience letters*, 226(1), 33–36.
- Beauchamp, K., Mutlak, H., Smith, W. R., Shohami, E., & Stahel, P. F. (2008). Pharmacology of Traumatic Brain Injury: Where Is the “Golden Bullet”? *Molecular Medicine*, 14(December), 731–740.
- Behl, C., Skutella, T., Lezoualc’h, F., Post, A., Widmann, M., Newton, C.J., Holsboer, F., 1997. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: Structure-activity relationship. *Molecular Pharmacology*. 51, 535–541.
- Benardo, L. S. (2003). Prevention of Epilepsy After Head Trauma: Do We Need New Drugs or a New Approach?, 44(13), 27–33.
- Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A., & Diemer, N. H. (1984). Elevation of the Extracellular Concentrations of Glutamate and Aspartate in Rat Hippocampus During Transient Cerebral Ischemia Monitored by Intracerebral Microdialysis. *Journal of Neurochemistry*, 1369–1374.
- Berkner, J., Mannix, R. & Qiu, J. (2016). Clinical Traumatic Brain Injury In: Firas, K., Dixon, E., Hayes, R., & Mondello, S. ed., Injury Models of the Central Nervous System. New York: Springer, p.11-16.

- Blair, R.M., Fang, H., Branham, W.S., Hass, B.S., Dial, S.L., Moland, C.L., Tong, W., Shi, L., Perkins, R., Sheehan, D.M., 2000. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: Structural diversity of ligands. *Toxicology. Sci.* 54, 138–153.
- Blurton-Jones, M., & Tuszynski, M. (2007). Estradiol-Induced Modulation of Estrogen Receptor- $\alpha$  and GABA within the Adult Neocortex: A Potential Transsynaptic Mechanism for Estrogen Modulation of BDNF. *Journal of Comparative Neurology*, 502(2), 275–290.
- Bouma, G. J., Muizelaar, J. P., Choi, S. C., Newlon, P. G., & Young, H. F. (1991). Cerebral circulation and metabolism after severe traumatic brain injury: the elusive role of ischemia. *Journal of neurosurgery*, 75(5), 685-693.
- Bredin, J., Davin-Régli, A., Pagès, J. M., (2005). Propyl paraben induces potassium efflux in *Escherichia coli*. *Journal Antimicrobial*. 55, 1013–1015.
- Bruns Jr., J., & Hauser, W. A. (2003). The epidemiology of traumatic brain injury: a review. *Epilepsia*, 44(Suppl 10), 2–10.
- Byrnes, K. & Faden, A. (2007). Role of cell cycle proteins in CNS injury. *Neurochemistry. Res.*, 32, 1799–1807.
- Calabresi, P., Cupini, L.M., Centonze, D., Pisani, F., Bernardi, G., (2003). Antiepileptic drugs as a possible neuroprotective strategy in brain ischemia. *Neurology*. 53, 693–702.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2013). CDC grand rounds: reducing severe traumatic brain injury in the United States. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 62(27), 549.
- Cernak, I., Vink, R., Zapple, D. N., Cruz, M. I., Ahmed, F., Chang, T., & Faden, A. I. (2004). The pathobiology of moderate diffuse traumatic brain injury as identified using a new experimental model of injury in rats. *Neurobiology of disease*, 17(1), 29-43.
- Chan, F. K. M., Luz, N. F., & Moriwaki, K. (2015). Programmed necrosis in the cross talk of cell death and inflammation. *Annual review of immunology*, 33, 79-106.
- Cortez, S. C., McIntosh, T. K., & Noble, L. J. (1989). Experimental fluid percussion brain injury: vascular disruption and neuronal and glial alterations. *Brain Research*, 482(2), 271–282.
- Crenn, P., Hamchaoui, S., Bourget-Massari, A., Hanachi, M., Melchior, J. C., & Azouvi, P. (2014). Changes in weight after traumatic brain injury in adult patients: A longitudinal study. *Clinical Nutrition*, 33(2), 348–353.

- Day, N. L., Floyd, C. L., D'Alessandro, T. L., Hubbard, W. J., & Chaudry, I. H. (2013). 17  $\beta$ -Estradiol Confers Protection after Traumatic Brain Injury in the Rat and Involves Activation of G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1. *Journal of neurotrauma*, 30(17), 1531-1541.
- Dewan, M. C., Rattani, A., Gupta, S., Baticulon, R. E., Hung, Y.-C., Punchak, M., ... Park, K. B. (2018). Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *Journal of Neurosurgery*, 1–18.
- Diaz-Arrastia, R., Kochanek, P. M., Bergold, P., Kenney, K., Marx, C. E., Grimes, C. J. B. & Salzer, C. W. (2014). Pharmacotherapy of traumatic brain injury: state of the science and the road forward: report of the Department of Defense Neurotrauma Pharmacology Workgroup. *Journal of neurotrauma*, 31(2), 135-158.
- DiMasi, J., Hansen, R., & Grabowski, H. (2003). The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of health economics*, 22(2), 151-185.
- Engel, J., Wolfson, L., Brown, L., 1978. Anatomical correlates of electrical and behavioral events related to amygdaloid kindling. *Ann. Neurol.* 3, 538–544.
- Faden A. I., Demediuk P., Panter S. S., and Vink R. (1989) The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* 244, 789-800.
- Fallis, A. (2013). *The Hippocampus as a Cognitive Map. Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53).
- Faure, J., Akimana, G., Carneiro, J., Cosquer, B., Ferrandon, A., Geiger, K., & Nehlig, A. (2013). A comprehensive behavioral evaluation in the lithium–pilocarpine model in rats: effects of carisbamate administration during status epilepticus. *Epilepsia*, 54(7), 1203-1213.
- Finnie, J., & Blumbergs, P. (2002). Traumatic brain injury. *Veterinary pathology*, 39(6), 679-689.
- Freedom, O. I., & Freedom, O. E. (2013). Cognitive Rehabilitation Therapy for Traumatic Brain Injury: Evaluating the Evidence. *FOCUS: The Journal of Lifelong Learning in Psychiatry*, 11(3), 387–395.
- Frieden, T. R., Houry, D., & Baldwin, G. (2015). Traumatic Brain Injury in the United States: Epidemiology and Rehabilitation. *CDC and NIH Report to Congress*, 1–74.
- Friedland, D., & Hutchinson, P. (2013). Classification of traumatic brain injury. *Advances in Clinical Neuroscience & Rehabilitation*, 4, 12-13.

- Fujikawa, D. G. (2015). The role of excitotoxic programmed necrosis in acute brain injury. *Computational and structural biotechnology journal*, 13, 212-221.
- Gavett, B. E., Stern, R. A., Cantu, R. C., Nowinski, C. J., & McKee, A. C. (2010). Mild traumatic brain injury: a risk factor for neurodegeneration. *Alzheimer's research & therapy*, 2(3), 18.
- Ghajar, J. (2000). Traumatic brain injury. *The Lancet*, 356(9233), 923-929.
- Girgis, F., Pace, J., Sweet, J., & Miller, J. P. (2016). Hippocampal Neurophysiologic Changes after Mild Traumatic Brain Injury and Potential Neuromodulation *Treatment Approaches*,1–10.
- Giza C. & Hovda D.A. (2014) The new neurometabolic cascade of concussion. *Neurosurgery* ,75: S24–33.
- Golarai, G., Greenwood, A. C., Feeney, D. M., & Connor, J. A. (2001). Physiological and structural evidence for hippocampal involvement in persistent seizure susceptibility after traumatic brain injury. *Journal of Neuroscience*, 21(21), 8523-8537.
- Gooijers, J., Beets., Albouy, G., Beeckmans, K., Michiels, K., Sunaert, S., & Swinnen, S. P. (2016). Movement preparation and execution: Differential functional activation patterns after traumatic brain injury. *Brain*, 139(9), 2469–2485.
- Grady, M. S., Charleston, J. S., Maris, D., Witgen, B. M., & Lifshitz, J. (2003). Neuronal and glial cell number in the hippocampus after experimental traumatic brain injury: analysis by stereological estimation. *Journal of neurotrauma*, 20(10), 929-941.
- Grady, M. S., Charleston, J. S., Maris, D., Witgen, B. M., & Lifshitz, J. (2003). Neuronal and glial cell number in the hippocampus after experimental traumatic brain injury: Analysis by stereological estimation. *Journal of Neurotrauma*, 20(10), 929–941.
- Graham, D. I., Adams, J. H., & Gennarellf, T. A. (1994). Hippocampal Pathology in Fatal Human Head Injury Without High Intracranial Pressure, *11*(3), 317–324.
- Graham, D. I., McIntosh, T. K., Maxwell, W. L., & Nicoll, J. A. R. (2000). Recent advances in neurotrauma. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 59(8), 641-651.
- Greve, M. & Zink, B. (2009). Pathophysiology of traumatic brain injury. *Mount Sinai Journal of Medicine: A Journal of Translational and Personalized Medicine*, 76(2), 97-104.
- Hakon, J., Ruscher, K., Romner, B., & Tomasevic, G. (2015). Preservation of the blood brain barrier and cortical neuronal tissue by Liraglutide, a long acting glucagon-like-1 analogue, after experimental traumatic brain injury. *PLoS ONE*, 10(3), 1–17.

- Hamm, R.J., Jenkins, L.W., Lyeth, B.G., White-Gbadebo, D.M., Hayes, R.L. (1991) The effect of age on outcome following traumatic brain injury in rats. *Journal Neurosurgery* 75(6):916–921
- Hatton, J. (2001). Pharmacological treatment of traumatic brain injury. *CNS drugs*, 15(7), 553-581.
- Head, J. (1993). Definition of mild traumatic brain. Injury. *Trauma Rehabil*, 8(3), 86-87.
- Hicks, R. R., Smith, D. H., Lowenstein, D. H., Saint, M. R., & McIntosh, T. K. (1993). Mild experimental brain injury in the rat induces cognitive deficits associated with regional neuronal loss in the hippocampus. *Journal of Neurotrauma*, 10, 405–414.
- Hicks, R., Soares, H., Smith, D., & McIntosh, T. (1996). Temporal and spatial characterization of neuronal injury following lateral fluid-percussion brain injury in the rat. *Acta neuropathologica*, 91(3), 236-246.
- Hinzman, J. M., Wilson, J. A., Mazzeo, A. T., Bullock, M. R., & Hartings, J. A. (2016). Excitotoxicity and metabolic crisis are associated with spreading depolarizations in severe traumatic brain injury patients. *Journal of neurotrauma*, 33(19), 1775-1783.
- Ikonomidou, C., & Turski, L. (2002). Personal view Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? Personal view. *The Lancet Neurology*, 1(October), 383–386.
- Irimia, A., & Van Horn, J. D. (2015). Functional neuroimaging of traumatic brain injury: Advances and clinical utility. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 11, 2355–2365.
- Itoh, T., Imano, M., Nishida, S., Tsubaki, M., Mizuguchi, N., Hashimoto, S. Satou, T. (2013). Increased apoptotic neuronal cell death and cognitive impairment at early phase after traumatic brain injury in aged rats. *Brain Structure and Function*, 218(1), 209–220.
- Ji, X., Xu, Z., Criswell, H. E., & Boysen, P. G. (2004). Propyl paraben inhibits voltage-dependent sodium channels and protects cardiomyocytes from ischemia-reperfusion injury. *Life Sciences*, 74(24), 3043–3052.
- Johnson, V. E., Meaney, D. F., Cullen, D. K., & Smith, D. H. (2015). Animal models of traumatic brain injury. *Handbook of clinical neurology*, 127, 115.
- Junqué, C. (1999). Secuelas neuropsicológicas de los traumatismos craneoencefálicos. *Revista de neurología*, 28(4), 423-429.

- Kabadi, S. V., & Faden, A. I. (2014). Neuroprotective strategies for traumatic brain injury: Improving clinical translation. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(1), 1216–1236.
- Kabadi, S. V., Hilton, G. D., Stoica, B. A., Zapple, D. N., & Faden, A. I. (2010). Fluid-percussion-induced traumatic brain injury model in rats. *Nature Protocols*, 5(9), 1552–1563.
- Kasahara, M., Menon, D. K., Salmond, C. H., Outtrim, J. G., Tavares, J. V. T., Carpenter, T. A., Stamatakis, E. A. (2011). Traumatic brain injury alters the functional brain network mediating working memory. *Brain Injury*, 25(12), 1170–1187.
- Katayama, Y., Cheung, M. K., Alves, A., & Becker, D. P. (1989). Ion fluxes and cell swelling in experimental traumatic brain injury: the role of excitatory amino acids. In *Intracranial Pressure VII* (pp. 584-588). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kay, A. D., Day, S. P., Kerr, M., Nicoll, J. A., Packard, C. J., & Caslake, M. J. (2003). Remodeling of cerebrospinal fluid lipoprotein particles after human traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*, 20(8), 717-723.
- Lara-Valderrábano, L., Galván, E. J., & Rocha, L. (2017). Propylparaben suppresses epileptiform activity in hippocampal CA1 pyramidal cells in vitro. *Epilepsy Research*, 136, 126–129.
- Lara-Valderrábano, L., Rocha, L., & Galván, E. J. (2016). Propylparaben reduces the excitability of hippocampal neurons by blocking sodium channels. *NeuroToxicology*, 57, 183–193.
- Leuner, B., & Gould, E. (2010). Structural Plasticity and Hippocampal Function. *Annual Reviews Psychology*, 61(Shors 2008), 111–140.
- Loane, D. J., & Faden, A. I. (2010). Neuroprotection for traumatic brain injury: translational challenges and emerging therapeutic strategies. *Trends in pharmacological sciences*, 31(12), 596-604.
- Löscher, W., Klitgaard, H., Twyman, R. E., & Schmidt, D. (2013). New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nature reviews. Drug discovery*, 12(10), 757.
- Lothman, E.W., Bertram, E.H., Stringer, J.L., 1991. Functional anatomy of hippocampal seizures. *Prog. Neurobiol.* 37, 1–82.
- Lowenstein, D. H., Thomas, M. J., Smith, D. H., & McIntosh, T. K. (1992). Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. *The Journal*

*of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 12(12), 4846–4853.

- Lozano, D., Gonzales-Portillo, G. S., Acosta, S., de la Pena, I., Tajiri, N., Kaneko, Y., & Borlongan, C. V. (2015). Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: Etiology, Clinical consequences, And therapeutic opportunities. *Neuropsychiatric Disease and Treatment*, 11, 97–106.
- Lucke-Wold, B. P., Nguyen, L., Turner, R. C., Logsdon, A. F., Chen, Y. W., Smith, K. E., & Richter, E. (2015). Traumatic brain injury and epilepsy: underlying mechanisms leading to seizure. *Seizure-European Journal of Epilepsy*, 33, 13-23.
- Luna, L.G., (1968). Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. New York.
- Lyeth, B. G., Jenkins, L. W., Hamm, R. J., Dixon, C. E., Phillips, L. L., Clifton, G. L., Hayes, R. L. (1990). Prolonged memory impairment in the absence of hippocampal cell death following traumatic brain injury in the rat. *Brain Research*, 526(2), 249–258
- Ma, Y., Marquis, R.E., (1996). Irreversible paraben inhibition of glycolysis by *Streptococcus mutans* GS-5. *Letter Microbiology*, 23, 329–333.
- Marklund, N. (2016). Rodent Models of Traumatic Brain Injury: Methods and Challenges In: Firas, K., Dixon, E., Hayes, R., & Mondello, S. ed., *Injury Models of the Central Nervous System*. New York: *Springer*, p. 29.
- Masel, B. E., & DeWitt, D. S. (2010). Traumatic brain injury: a disease process, not an event. *Journal of neurotrauma*, 27(8), 1529-1540.
- Mathern, G. W., Babb, T. L., Vickrey, B. G., Melendez, M., & Pretorius, J. K. (1994). Traumatic compared to non-traumatic clinical-pathologic associations in temporal lobe epilepsy, *Epilepsy*. 19, 129–139.
- McIntosh T. K., Soares H., Thomas M., and Cloherty K. (1990) Development of regional cerebral edema after lateral fluid-percussion brain injury in the rat. *Acta Neurochir*. 51, 263- 264.
- McIntosh, T. K., Noble, L., Andrews, B., & Faden, a I. (1987). Traumatic brain injury in the rat: characterization of a midline fluid-percussion model. *Central Nervous System Trauma: Journal of the American Paralysis Association*, 4(2), 119–134.
- McIntosh, T. K., Vink, R., Noble, L., Yamakami, I., Fernyak, S., Soares, H., & Faden, A. L. (1989). Traumatic brain injury in the rat: characterization of a lateral fluid-percussion model. *Neuroscience*, 28(1), 233-244.



- Meaney, D. F., Morrison, B., & Dale Bass, C. (2014). The Mechanics of Traumatic Brain Injury: A Review of What We Know and What We Need to Know for Reducing Its Societal Burden. *Journal of Biomechanical Engineering*, 136(2).
- Mermelstein, P.G., Becker, J.B., Surmeier, James, D., 1996. Estradiol neurons reduces calcium currents via a membrane receptor. *Journal of Neuroscience*. 16, 595– 604.
- Meythaler, J. M., Peduzzi, J. D., Eleftheriou, E., & Novack, T. A. (2001). Current concepts: diffuse axonal injury–associated traumatic brain injury. *Archives of physical medicine and rehabilitation*, 82(10), 1461-1471.
- Miki, T., Harris, S. J., Wilce, P., Takeuchi, Y., & Bedi, K. S. (2000). Neurons in the hilus region of the rat hippocampus are depleted in number by exposure to alcohol during early postnatal life. *Hippocampus*, 10(3), 284–295.
- Moore, D., Jaffe, S., & Ling, G., (2012). Overview of TBI. In: Tsao, J., ed., Traumatic brain injury. New York: Springer, p.17.
- Nguyen, T., Clare, B., Guo, W., Martinac, B., (2005). The effects of parabens on the mechanosensitive channels of E. coli. *European Biophysics Journal*. J. 34, 389–395.
- Okiyama, K., Smith, D. H., Gennarelli, T. A., Simon, R. P., Leach, M., & McIntosh, T. K. (1995). The sodium channel blocker and glutamate release inhibitor BW1003C87 and magnesium attenuate regional cerebral edema following experimental brain injury in the rat. *Journal of neurochemistry*, 64(2), 802-809.
- Olivares, J. D., Juárez, E., & García, F. (2015). El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. *Revista Médica de La Universidad Veracruzana*, 15(June), 20–28.
- Ontiveros, Á., Preciado, A. K., Matute Villaseñor, E., López-Cruz, M., & López-Elizalde, R. (2014). Factores pronósticos de recuperación y reinserción laboral en adultos con traumatismo craneoencefálico. *Revista Mexicana de Neurociencia*, 15(4), 211–217.
- Orbán-Kis, K., Szabadi, T., & Szilágyi, T. (2015). The loss of ivy cells and the hippocampal input modulatory O-LM cells contribute to the emergence of hyperexcitability in the hippocampus. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 56(1), 155–161.
- Paxinos, G., Watson, C., (2007). The rat brain in stereotaxic coordinates, 6th edn. ed. Academic Press/Elsevier, Amsterdam; Boston.
- Peinado, V., González, J. C., & Leret, M. L. (2004). Effect of 17- $\beta$ -estradiol on dopamine, serotonin and GABA striatal levels in 6-hydroxydopamine-treated rats. *Toxicology*, 204(2–3), 155–160.

- Pierce, J. E. S., Smith, D. H., Trojanowski, J. Q., & McIntosh, T. K. (1998). Enduring cognitive, neurobehavioral and histopathological changes persist for up to one year following severe experimental brain injury in rats. *Neuroscience*, 87(2), 359–369.
- Pinheiro, J.L., R. A. & P. J. (2018). Traumatic Brain Injury and Branched-Chain Amino Acids. *Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*, 2–5.
- Pitkänen, A., Kemppainen, S., Nnode-ekane, X. E., Huusko, N., Huttunen, J. K., Gröhn, O., ... Bolkvadze, T. (2014). Epilepsy & Behavior Posttraumatic epilepsy — Disease or comorbidity? *Epilepsy & Behavior*, 38, 19–24.
- Racine, R.J., 1972a. Modification of seizure activity by electrical stimulation: I. after-discharge threshold. *Electroencephalogr. Clinical. Neurophysiology*. 32, 269–279.
- Racine, R.J., 1972b. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clinical. Neurophysiology*. 32, 281–294.
- Raghupathi, R. (2004). Cell Death Mechanisms Following Traumatic Brain Injury. *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, 14(2), 215–222.
- Rao, V., & Lyketsos, C. (2000). Neuropsychiatric sequelae of traumatic brain injury. *Psychosomatics*, 41(2), 95-103.
- Rink, A., Fung, K. M., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., Neugebauer, E., & McIntosh, T. K. (1995). Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *The American Journal of Pathology*, 147(6), 1575–1583.
- Ríos-Romenets, S., Castaño-Monsalve, B., & Bernabeu-Guitart, M. (2007). Farmacoterapia de las secuelas cognitivas secundarias a traumatismo craneoencefálico. *Revista. Neurológica*, 45(9), 563-70.
- Roberts, I., Schierhout G., & Alderson P. (1998). Absence of evidence for the effectiveness of five interventions routinely used in the intensive care management of severe head injury. *Journal Neurology Neurosurgery Psychiatry*; 65: 729-33.
- Rollinger, J. M., Stuppner, H., & Langer, T. (2008). Virtual screening for the discovery of bioactive natural products. *Natural Compounds as Drugs Volume I*, 211-249.
- Ross DT, Graham DI, Adams JH (1993) Selective loss of neurons from the thalamic reticular nucleus following severe human head injury. *Journal of Neurotrauma* 10:151-165.
- Rostami., E. (2016). Traumatic Brain Injury Models in Animals. In: Firas, K., Dixon, E., Hayes, R., & Mondello, S. ed., *Injury Models of the Central Nervous System*, 1° ed. New York, p.47.

- Sandhir, R., Onyszchuk, G., & Berman, N. E. (2008). Exacerbated glial response in the aged mouse hippocampus following controlled cortical impact injury. *Experimental neurology*, 213(2), 372-380.
- Santana-Gómez, C. E., Orozco-Suárez, S. A., Talevi, A., Bruno-Blanch, L., Magdaleno-Madrigal, V. M., Fernández-Mas, R., & Rocha, L. (2017). Propylparaben applied after pilocarpine-induced status epilepticus modifies hippocampal excitability and glutamate release in rats. *NeuroToxicology*.
- Santhakumar, V., Bender, R., Frotscher, M., Ross, S. T., Hollrigel, G. S., Toth, Z., & Soltesz, I. (2000). Granule cell hyperexcitability in the early post-traumatic rat dentate gyrus: The “irritable mossy cell” hypothesis. *Journal of Physiology*, 524(1), 117–134.
- Santhakumar, V., Bender, R., Frotscher, M., Ross, S. T., Hollrigel, G. S., Toth, Z., & Soltesz, I. (2000). Granule cell hyperexcitability in the early post-traumatic rat dentate gyrus: the ‘irritable mossy cell’ hypothesis, 117–134.
- Scharfman, H. E., & Myers, C. E. (2013). Hilar mossy cells of the dentate gyrus: a historical perspective. *Frontiers in Neural Circuits*, 6(January), 1–17.
- Schneider, G. (2010). Virtual screening: an endless staircase?. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(4), 273-276.
- Sleigh, S. H., & Barton, C. L. (2010). Repurposing strategies for therapeutics. *Pharmaceutical Medicine*, 24(3), 151-159.
- Sloviter, R. S. (1991). Permanently altered hippocampal structure, excitability, and inhibition after experimental status epilepticus in the rat: the ‘dormant basket cell’ hypothesis and its possible relevance to temporal lobe epilepsy. *Hippocampus*, 1, 41—66
- Smith, C. (2011). Neuropathology. In: J. Silver, T. McAllister and S. Yudovsky, ed., *Textbook of Traumatic Brain Injury*, 2nd ed. Washington D.C, p.23.
- Soni, M.G., Burdock, G. a., Taylor, S.L., & Greenberg, N. (2001). Safety assessment of propyl paraben: A review of the published literature. *Food Chem. Toxicology*. 39, 513–532.
- Stoica, B. A., & Faden, A. I. (2010). Cell Death Mechanisms and Modulation in Traumatic Brain Injury. *Neurotherapeutics*, 7(1), 3–12.
- Strijbos, P. J., Leach, M. J., & Garthwaite, J. (1996). Vicious Cycle Involving Na Channels , Glutamate Release , and NMDA Receptors Mediates Delayed Neurodegeneration through Nitric Oxide Formation. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(16), 5004–13. Retrieved from

- Sutton RL, Lescaudron L, Stein DG (1993) Unilateral cortical contusion injury in the rat: Vascular disruption and temporal development of cortical necrosis. *Journal of neurotrauma*,10:135-149.
- Talevi, A., Bellera, C. L., Castro, E. A., & Bruno-Blanch, L. E. (2007). A successful virtual screening application: Prediction of anticonvulsant activity in MES test of widely used pharmaceutical and food preservatives methylparaben and propylparaben. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 21(9), 527–538.
- Teasdale, G., & Jennett, B. (1974). Assessment of coma and impaired consciousness: a practical scale. *The Lancet*, 304(7872), 81-84.
- Thompson, H. J., Lifshitz, J., Marklund, N., Grady, M. S., Graham, D. I., Hovda, D. A., & McIntosh, T. K. (2005). Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. *Journal of neurotrauma*, 22(1), 42-75.
- Thurman, D. J. (2016). The epidemiology of traumatic brain injury in children and youths: A review of research since 1990. *Journal of Child Neurology*, 31(1), 20–27.
- Ulmer, S., & Jansen, O. (2013). fMRI: Basics and clinical applications. *fMRI: Basics and Clinical Applications*, 1–325.
- Uryu, K., Chen, X. H., Martinez, D., Browne, K. D., Johnson, V. E., Graham, D. I., & Smith, D. H. (2007). Multiple proteins implicated in neurodegenerative diseases accumulate in axons after brain trauma in humans. *Experimental neurology*, 208(2), 185-192.
- Velíšková, J., & Velíšek, L. (2017). Behavioral Characterization and Scoring of Seizures in Rodents. In *Models of Seizures and Epilepsy (Second Edition)* (pp. 111-123).
- Vespa, P. M., McArthur, D. L., Xu, Y., Eliseo, M., Etchepare, M., Dinov, I., ... & Hovda, D. (2010). Nonconvulsive seizures after traumatic brain injury are associated with hippocampal atrophy. *Neurology*, 75(9), 792-798.
- Vespa, P. M., Xu, Y., & Hovda, D. (2010). Nonconvulsive seizures after traumatic brain injury are associated with hippocampal atrophy.
- Wallach, D., Kang, T. B., Dillon, C. P., & Green, D. R. (2016). Programmed necrosis in inflammation: toward identification of the effector molecules. *Science*, 35 (2),62-81.
- Warden, D. L., Gordon, B., McAllister, T. W., Silver, J. M., Barth, J. T., Bruns, J., & Kraus, J. (2006). Guidelines for the pharmacologic treatment of neurobehavioral sequelae of traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*, 23(10), 1468-1501.

- Webster, K. M., Sun, M., Crack, P., O'Brien, T. J., Shultz, S. R., & Semple, B. D. (2017). Inflammation in epileptogenesis after traumatic brain injury. *Journal of Neuroinflammation*, *14*(1), 1–17.
- Werner C., Engelhard, K. (2007). Pathophysiology of traumatic brain injury. *British Journal of Anaesthesia*, *99* (1): 4-9.
- West, M.J., Slomianka, L., & Gundersen, H., (1991). Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anatomy. Rec.* *231*, 482–497.
- Wolf, J. A., Stys, P. K., Lusardi, T., Meaney, D., & Smith, D. H. (2001). Traumatic axonal injury induces calcium influx modulated by tetrodotoxin-sensitive sodium channels. *Journal of Neuroscience*, *21*(6), 1923-1930.
- Xi, G., Keep, R. F., & Hoff, J. T. (2006). Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. *Lancet Neurology*. *5*(January).
- Xiong, Y., Mahmood, A., & Chopp, M. (2013). Animal models of traumatic brain injury. *Nature Reviews Neuroscience*, *14*(2), 128–142.

10. Anexos



SOCIEDAD MEXICANA DE  
CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C.

Otorga la presente  
**CONSTANCIA**  
a:  
**Cindy Lizbeth Santiago Castañeda**  
Quien asistió al curso Pre-Congreso  
**Homeostasis energética**

En el LX Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas  
del 12 al 13 de agosto en la ciudad de Monterrey, Nuevo León

Atentamente  
Por el Comité Organizador

  
Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza

  
Dr. Jesús Hernández Falcón

  
Dr. Benjamín Florán Garduño

  
Dr. Rodolfo Delgado Lezama

