



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SEDE SUR
DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA

**“Estudio del efecto del cromoglicato de sodio en el daño e
hiperexcitabilidad hipocampal inducidos por el Trauma
Craneoencefálico severo en rata”**

Tesis que presenta

Psic. Marysol Segovia Oropeza

Para obtener el grado de
**Maestra en Ciencias en Neurofarmacología y
Terapéutica Experimental**

Directores de Tesis:

Dra. Luisa Lilia Rocha Arrieta y Dr. Luis Concha Loyola

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, Unidad Coapa) bajo la dirección de la Dra. Luisa L. Rocha Arrieta y Dr. Luis Concha Loyola. 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 458195, proyecto 220365

Dedicatorias

El presente trabajo y todo el esfuerzo se lo dedico a mis padres, hermanos y novio por ser tan comprensivos con mi falta de tiempo, cansancio y mal humor. Gracias por acompañarme y por siempre creer en mí.

Agradecimientos

A la **Dra. Luisa Lilia Rocha** por su apoyo, paciencia y confianza en cada una de las etapas de este proyecto. Gracias por tomarse el tiempo de enseñarme personalmente a hacer las cosas bien y por ser una mentora profesional y de vida, no podría haber tenido un mejor ejemplo.

Al **Dr. Luis Concha Loyola** por recibirme en su laboratorio de investigación, por su amabilidad y atenciones durante mi estancia. Gracias por su disponibilidad para compartir su conocimiento y tiempo conmigo.

A la **Dra. Sandra Orozco Suárez** por abrirme las puertas de su laboratorio de investigación, por su amabilidad y disposición en todo momento. Gracias por su apoyo profesional y personal, sin su ayuda este logro no habría sido posible.

A la **Q.F.I. Francia Carmona** por su apoyo profesional y personal en todo lo necesario para realizar este proyecto.

A **Carmen Baltazar** por su amistad, cariño y apoyo profesional.

Al **Ing. José Rodolfo Fernández Calderón** por su amabilidad y disposición para ayudarme en cualquier momento.

A mi amiga **Paulina Andrea Muñoz** por cada momento compartido, por su paciencia y completa honestidad. Gracias por darme aliento, sonrisas y café en momentos de estrés e incertidumbre.

A mis amigas **Gabriela Castillo, Sofía Hernández, Beatríz López y Daniela Zepeda** por apoyarme siempre con una sonrisa. Gracias por creer en mí con todo y la evidencia en contra.

A **Guadalupe Valle, Ivette Bañuelos, César Santana, Leo Valderrábano, Cindy Santiago, Daniel Pérez y Angélica Vega**, por tenerme paciencia y compartirme su conocimiento y experiencia siempre. Gracias por toda su ayuda, sin ustedes este proyecto no hubiera sido posible.

A mis amigos **Saúl Huerta, Erick Josué Rodríguez, Adriana Alvarez y Alejandra Hernández** por acompañarme durante estos años dandome consejos y presionandome para ser mejor. Gracias por todos esos cafés y platicas compartidas.

A mis compañeros (as) de laboratorio:

Ángeles Lumbreras, Víctor Navarrete, Ana Torres, Daniel Fonseca, Christian Lizete Frías, Alma Pinedo, Christopher Martínez, Jose Luis Castañeda, Jesús Cienfuegos y Adacrid Colunga por las enseñanzas, congresos, seminarios y pasteles compartidos. Agradezco a cada uno de ustedes por compartir las alegrías, tristezas y logros obtenidos durante este tiempo.

I.	Índice General	
I.	Índice general.....	I
II.	Índice de figuras.....	IV
III.	Abreviaturas.....	VI
IV.	Resumen.....	VIII
V.	Abstract.....	IX
1.	Introducción	1
1.1	Epidemiología del TCE	1
1.2	Repercusiones sociales y económicas del TCE.	1
1.3	Fisiopatología del TCE	2
1.3.1	Consecuencias Agudas del TCE	2
1.3.2	Consecuencias Crónicas del TCE	6
1.4	La formación hipocampal.....	7
1.4.1	Generalidades.....	7
1.4.2	El hipocampo en el TCE	11
1.5	Tratamiento farmacológico para las consecuencias del TCE	12
1.6	Cromoglicato de Sodio.....	13
1.6.1	Generalidades.....	13
1.6.2	El Cromoglicato de Sodio como neuroprotector	14
2.	Justificación	15
3.	Hipótesis.....	16
4.	Objetivo General.....	16
4.1	Objetivos particulares	16
5.	Metodología	16
5.1	Animales	16
5.2	Experimento 1.....	17
5.2.1	Grupo TCE + SS + NeuN.....	17

5.2.2	Grupo TCE + SS + RM	18
5.2.3	Grupo Sham + SS + NeuN.....	19
5.2.4	Grupo Sham + SS + RM	19
5.3	Experimento 2.....	20
5.3.1	Grupo TCE + CG + NeuN	19
5.3.2	Grupo TCE + CG + RM.....	20
5.3.3	Grupo Sham + CG + NeuN.....	21
5.3.4	Grupo Sham + CG + RM.....	21
5.4	Neuroscore	22
5.4.1	Prueba de contraflexión.....	22
5.4.2	Prueba de extensión de extremidades posteriores	23
5.4.3	Prueba de pulsión lateral	24
5.4.4	Prueba de plano inclinado.....	25
5.5	Percusión de Fluido Lateral	26
5.6	Colocación del implante hipocampal.....	27
5.7	Evaluación de la excitabilidad hipocampal	28
5.8	Perfusión.....	28
5.8.1	Perfusión para análisis mediante Resonancia Magnética	28
5.8.2	Perfusión para Análisis Morfométrico.....	29
5.9	Resonancia Magnética	30
5.10	Análisis Histológico.....	30
5.10.1	Tinción de Hematoxilina y Eosina.....	30
5.10.2	Inmunohistoquímica.....	31
5.10.3	Cuantificación Neuronal.....	31
5.11	Análisis estadístico.....	32
6.	Resultados.....	32

6.1 Experimento 1.....	32
6.1.1 Grupo Sham+SS.....	32
6.1.2 Grupo TCE+SS.....	33
6.1.3 Discusión del Experimento 1.....	41
6.2 Experimento 2.....	45
6.2.1 Grupo Sham+CG.....	45
6.2.2 Grupo TCE+CG.....	46
6.2.3 Discusión del Experimento 2.....	58
7. Conclusiones.....	62
8. Perspectivas.....	63
9. Bibliografía.....	64

II. Índice de figuras

Figura 1. La formación hipocampal.....	8
Figura 2. Localización de las células musgosas y granulares.....	10
Figura 3. Cromoglicato de Sodio.....	13
Figura 4. Diagrama del grupo TCE + SS + NeuN.....	18
Figura 5. Diagrama del grupo TCE+SS+RM.....	18
Figura 6. Diagrama del grupo Sham + SS + NeuN.....	19
Figura 7. Diagrama del grupo Sham + SS + RM.....	19
Figura 8. Diagrama del grupo TCE + CG + NeuN.....	20
Figura 9. Diagrama del grupo TCE+CG+ RM.....	21
Figura 10. Diagrama del grupo Sham + CG + NeuN.....	21
Figura 11. Diagrama del grupo Sham + CG + RM.....	22
Figura 12. Diagrama de la prueba de contraflexión.....	23
Figura 13. Diagrama de la prueba de extensión de extremidades posteriores.....	24
Figura 14. Diagrama de la prueba de Pulsión Lateral.....	25
Figura 15. Ejemplo de la calificación de Plano inclinado.....	26
Figura 16. Cráneo de la rata.....	29
Figura 17. El TCE induce pérdida de peso.....	35
Figura 18. El TCE induce disminución en la capacidad sensoriomotora.....	36
Figura 19. El TCE induce hiperexcitabilidad en el hipocampo ventral.....	36
Figura 20. El TCE disminuye el volumen hipocampal en ambos hemisferios.....	37
Figura 21. El TCE induce daño neuronal hipocampal en el hemisferio ipsilateral al TCE.....	38
Figura 22. El TCE induce muerte neuronal en el Giro Dentado e hilus.....	39
Figura 23. El TCE induce muerte neuronal en CA1 y CA3.....	40
Figura 24. La administración de CG no recupera la pérdida de peso inducida por el TCE.....	48

Figura 25. El tratamiento con CG mejora la capacidad neuromotora al día 23 y 30 del TCE.	49
Figura 26. El tratamiento con CG induce un mayor valor de UPD a los 30 días posteriores de un TCE.....	50
Figura 27. El tratamiento subcrónico con CG no disminuye la atrofia hipocampal inducida por el TCE.....	51
Figura 28. El tratamiento con CG no evita el daño hipocampal ipsilateral al TCE.....	52
Figura 29. El CG incrementa la sobrevivencia neuronal en el GD ipsilateral al TCE.....	54
Figura 30 El tratamiento con CG incrementa la sobrevivencia neuronal en el hilus después de un TCE.....	55
Figura 31. El tratamiento con CG incrementa la sobrevivencia neuronal en el área de CA1 después de un TCE.....	56
Figura 32. El tratamiento con CG incrementa la sobrevivencia neuronal en el área de CA3 después de un TCE.....	57

III. Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico
asf	Área evaluada
atm	Atmósferas
ATP	Adenosín Trifosfato
BHE	Barrera hematoencefálica
CA1	Cuerno de Ammón área 1
Ca ²⁺	Calcio
CA3	Cuerno de Ammón área 3
CE	Corteza Entorrinal
CG	Cromoglicato de Sodio
Da	Dalton
DAI	Daño Axonal Difuso
EE	Error Estándar
g	Gramos
GABA	Ácido γ -aminobutírico (siglas en inglés)
GD	Giro Dentado
h	Hora/horas
<i>h</i>	Altura del disector
HI	Hemisferio ipsilateral
HC	Hemisferio contralateral
Hz	Hertz
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
K ⁺	Potasio
kDa	Kilodaltones
kg	Kilogramos

mg	Miligramos
min	Minutos
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mm ³	Milímetros cúbicos
ms	Milisegundos
Na ⁺	Sodio
NS	Neuroscore
°C	Grados centígrados
p. ej.	Por ejemplo
PD	Post Descarga
PEPS	Potenciales Excitatorios Postsinápticos
PFA	Paraformaldehído
PLF	Percusión Lateral de Fluido
PTZ	Pentilenotetrazol
Q	Número de células positivas en una fracción de volumen
RM	Resonancia Magnética
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
s	Segundos
s.c.	Subcutánea
<i>SE</i>	<i>Status Epilepticus</i>
SS	Solución Salina
<i>ssf</i>	Fracción de muestreo
T	Teslas
TCE	Trauma Craneoencefálico
UPD	Umbral Post Descarga
μA	Microamperios
μM	Micromolar

IV. Resumen

El cromoglicato de sodio (CG) es un estabilizador de células cebadas que evita su desgranulación y migración. Originalmente utilizado para la profilaxis del asma, el CG bloquea los canales de Ca^{2+} y fosforila una proteína de 78 kDa que regula el paso de la señal entre la membrana y el citoesqueleto de las células cebadas. Se sabe que la administración de CG en modelos de hipoxia, isquemia y *status epilepticus* (SE) disminuye el daño neuronal, la inflamación, el edema y la atrofia del parénquima cerebral. Sin embargo, se desconoce si la administración subcrónica de CG posterior a un trauma craneoencefálico (TCE) severo, es capaz de disminuir el daño e hiperexcitabilidad hipocampal en ratas. Inicialmente los efectos de la administración subcrónica de CG fueron investigados. El grupo de animales tratados con CG (*Sham+CG*) no presentó diferencias significativas en comparación al grupo tratado con solución salina (SS) en ninguna de las evaluaciones realizadas (peso, función sensoriomotora, supervivencia neuronal, hiperexcitabilidad y volumetría hipocampal). En comparación al grupo *Sham+SS*, el grupo sometido a un TCE severo (*TCE+SS*) presentó una menor capacidad sensoriomotora ($p < 0.001$) evaluada mediante el Neuroscore (NS). En las evaluaciones del peso y del volumen hipocampal este grupo también presentó menores valores ($p < 0.05$) respecto al grupo *Sham+SS*. Esto estuvo asociado a un menor número de células vivas en el Giro Dentado (GD), hilus, CA1 y CA3 ($p < 0.001$). Su valor de Umbral Post Descarga (UPD) fue menor que el del grupo *Sham+SS* ($p < 0.01$) y presentó promedios de post descarga (PD) y frecuencia de espigas significativamente mayores ($p < 0.01$). En comparación al grupo *TCE+SS*, el grupo sometido a un TCE y administrado con CG (*TCE+CG*) presentó un mejor estado sensoriomotor durante todas las mediciones realizadas con el NS ($p < 0.001$). Respecto a la medición del volumen hipocampal, este grupo no presentó diferencias significativas en comparación al grupo *TCE+SS* ($p \geq 0.05$). Sin embargo, en comparación al grupo *TCE+SS* este grupo presentó más preservación neuronal en todas las áreas evaluadas ($p < 0.05$) y su valor de UPD fue mayor ($p < 0.001$). Los

resultados indican que la administración subcrónica de CG disminuye la hiperexcitabilidad hipocampal, el daño sensoriomotor y la muerte neuronal hipocampal subsecuente a un TCE severo. Para la clínica esto implica el posible reposicionamiento de un fármaco con efectos neuroprotectores que podría disminuir las consecuencias agudas y crónicas de un TCE severo.

V. Abstract

Sodium cromoglycate (CG) is a mast cell stabilizer that prevents its degranulation and migration. Originally used for the prophylaxis of asthma, CG blocks the Ca^{2+} channels and phosphorylates a 78 kDa protein that regulates the passage of the signal between the membrane and the cytoskeleton of the mast cells. It is known that the administration of CG in models of hypoxia, ischemia and *status epilepticus* (SE) decreases neuronal damage, inflammation, edema and cerebral parenchyma atrophy. However, it is not known whether the subchronic administration of CG after the induction of traumatic brain injury (TBI) is capable of diminishing hippocampal damage and hyperexcitability in rats. Initially the effects of the subchronic administration of CG were investigated. The group of animals treated with CG (*Sham+CG*) did not present significant differences compared to the group treated with saline solution (SS) in any of the evaluations performed (weight, sensorimotor function, neuronal survival, hyperexcitability and hippocampal volumetry). Compared to the *Sham+SS* group, the group subjected to severe TBI (*TBI+SS*) presented a lower sensorimotor capacity ($p < 0.001$) evaluated by the Neuroscore (NS). In the hippocampal weight and volume evaluations, this group also presented lower values ($p < 0.05$) with respect to the *Sham+SS* group. This was associated with a lower number of living cells in the Dentate Gyrus (DG) hilus, CA1 and CA3 ($p < 0.001$). The After-Discharge Threshold (ADT) of the *TBI+SS* group was lower than that of the *Sham+SS* group ($p < 0.01$) and presented significantly higher post discharge (PD) and spike frequency ($p < 0.01$). In comparison to the *TBI+SS* group, the group subjected to a TBI and administered with CG (*TBI+CG*) presented a better sensorimotor state during all measurements made with the NS ($p < 0.001$).

Regarding hippocampal volume measurement, this group did not present significant differences compared to the *TBI+SS* group ($p \geq 0.05$). However, in comparison to the *TBI+SS* group, this group presented more immunopositive cells to NeuN in all the areas evaluated ($p < 0.05$) and its ADT value was higher ($p < 0.001$). The results indicate that subchronic administration of CG decreases hippocampal hyperexcitability, sensorimotor damage and hippocampal neuronal death subsequent to severe TBI. For the clinic this implies the possible repositioning of a drug with neuroprotective effects that could diminish the acute and chronic consequences of a severe TBI.

1. Introducción

El trauma craneoencefálico (TCE) resulta del impacto a la cabeza con un objeto o de las fuerzas de aceleración y/o desaceleración que producen movimiento vigoroso en el cerebro (Finnie, 2013). Las fuerzas que generan el daño inicial toman segundos, sin embargo, los eventos patofisiológicos son mucho más prolongados y progresivos.

EL TCE es un trastorno heterogéneo que puede variar del tipo de lesión, distribución y/o mecanismos de daño (Gennarelli y Graham, 2005). Este se puede clasificar en leve, moderado y severo dependiendo del puntaje obtenido en la Escala de coma de Glasgow. En esta escala clínica los puntajes de 13 a 15 son indicadores de un TCE leve mientras que de 9 a 12 indican un TCE moderado. Los puntajes menores a 8 puntos corresponden a un TCE severo (Teasdale y Jennet, 1974).

1.1 Epidemiología del TCE

El TCE afecta aproximadamente a 10 millones de personas alrededor del mundo (Bondi et al., 2015). En Iberoamérica la incidencia es de 200 – 400 por cada 100,000 habitantes y se observa más frecuentemente en personas entre 15 – 24 años (Peden, 2004; Hamdan, 2005).

De acuerdo con La Secretaría de Salud, el TCE es la tercera causa de muerte en México. Este tiene una mortalidad de 38.8 por cada 100 mil habitantes y se presenta en una proporción de 3:1 con mayor incidencia en hombres (SS, 2008).

1.2 Repercusiones sociales del TCE

El TCE no solo afecta a la vida de la persona que lo padece y a su familia, este también tiene un alto costo social. El costo económico del TCE estimado para

Estados Unidos de América en el 2010 fue de aproximadamente 76.5 billones de dólares (<https://www.cdc.gov/traumaticbraininjury/severe.html>).

En México, el Instituto Nacional de Rehabilitación reporta que el TCE tiene como consecuencia cerca de 20 mil casos de discapacitados al año (INR, 2009). De éstos la mayoría presentarán secuelas neuropsicológicas importantes en funciones ejecutivas como la atención, lenguaje y memoria entre otras (González et al., 2004). De las personas que sobreviven a un TCE, solo el 40% llega a reincorporarse a una actividad productiva (Van-Velzen et al., 2009).

1.3 Fisiopatología del TCE

Las consecuencias del TCE son moleculares, patológicas y clínicas. Estas dependerán del grado y tipo de lesión, paciente y del tratamiento utilizado después del mismo (Pitkänen et al., 2005).

Desde un punto de vista anatómico, el daño ocasionado por el TCE se puede clasificar en focal o difuso dependiendo de la extensión y distribución del daño (Pitkänen et al., 2009). Entre los tipos de lesiones focales se encuentran el daño al cuero cabelludo, fractura de cráneo, contusión, laceración, hemorragia intracraneal y lesiones producidas por el incremento de la presión intracraneal. La lesión difusa incluye isquemia global, daño axonal difuso e inflamación cerebral (Gennarelli y Graham, 2005).

Las consecuencias que induce el TCE también se pueden clasificar desde un punto de vista patofisiológico en agudas y crónicas.

1.3.1 Consecuencias Agudas del TCE

Las consecuencias agudas de un TCE corresponden a las heridas resultantes de una fuerza mecánica (aceleración, desaceleración, rotacional) directa a la cabeza que ocurren en el momento del golpe (Finnie, 2013). Estas se

caracterizan por la destrucción del tejido cerebral y vasos sanguíneos (Namas et al., 2009).

La hemorragia cerebral es una consecuencia aguda del TCE. Esta consiste en la salida de sangre al parénquima cerebral por la ruptura de los vasos sanguíneos (Purves et al., 2004). Después de un TCE la hemorragia se puede presentar entre las meninges y de forma intracerebral en diversas estructuras entre las que se encuentran la corteza, cápsula interna, cuerpo caloso, fimbria, hipocampo, putamen, caudado, cerebelo, tallo cerebral entre otras (Cortez et al., 1989; Sato et al., 2001). Al iniciar la hemorragia la oxihemoglobina de la sangre lleva a la liberación de radicales libres (anión superóxido y de peróxido de hidrógeno) y a la activación de caspasas que llevan a la apoptosis (Meguro et al., 2001; Wang et al., 2002).

La inflamación posterior al TCE es una respuesta fisiológica normal al daño tisular que busca proteger al cuerpo y reparar los tejidos dañados (Kempuraj et al., 2017). No obstante, cuando esta respuesta se vuelve excesiva y crónica promueve el daño al tejido (Cedeberg y Siesjo, 2010). Existen una gran variedad de células que median la inflamación ante una lesión en el parénquima cerebral (*Ver Tabla 1*), sin embargo, las células cebadas son las primeras en responder ante el daño (Jin et al., 2009). Estas células tienen almacenes de TNF- α preformado y una gran cantidad y variedad de sustancias proinflamatorias que inician la cascada inflamatoria (Gordon y Galli, 1991; Mattila et al., 2011). Ante la lesión, la apertura de la barrera hematoencefálica (BHE) inicia la acumulación de leucocitos que liberan citocinas proinflamatorias, proteasas citotóxicas y especies reactivas de oxígeno (Morganti-Kossmann et al., 2007). Estos a su vez inician la activación del sistema inmune, con lo cual se inicia la liberación de sustancias que fomentan y perpetúan el daño.

Tabla 1. Células proinflamatorias participantes en el TCE

Célula	Sustancias liberadas
Neutrófilos	CI, LT, PG, ROS, RNS, EDT
Monocitos	CAI, CI, LT, PG, ROS, RNS
Microglía	CAI, CI, LT, PG, ROS, RNS
Células cebadas	AB, CI, EDT, PG, LT, ATP, FC, ROS, heparina
Astrocitos	CAI, CI

AB, aminas biogénicas; CAI, citocinas antiinflamatorias (p.ej. IL-10, TGF β); CI, citocinas inflamatorias (p.ej. IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8); EDT, enzimas degradantes de tejido; FC, factores de crecimiento; LT, leucotrienos; PG, prostaglandinas; ROS, especies reactivas de oxígeno; RNS, especies reactivas de nitrógeno. *Tabla tomada y modificada de Cederberg y Siesjö (2010).*

El edema cerebral es otra consecuencia aguda del TCE (Kharatishvili et al., 2009). El edema se clasifica en vasogénico y citotóxico (Klatzo, 1987), de los cuales el vasogénico es el resultado del movimiento de agua de la vasculatura al espacio extracelular. Esto ocurre en respuesta a un gradiente osmótico generado por la filtración de componentes vasculares al parénquima (Greve y Zink, 2009). El edema vasogénico se presenta desde la primera hora posterior a un TCE (Marmarou et al., 2000) y está acompañado por la apertura de la BHE, inflamación e incremento de la presión intracraneal (Donkin y Vink, 2010). Respecto al edema citotóxico, este se caracteriza por un incremento en el contenido de agua del compartimiento intracelular en respuesta a un gradiente osmótico (Donkin y Vink, 2010). Este tipo de edema inicia en los primeros días posteriores al TCE y continua hasta dos semanas después (O'Connor et al., 2006). El edema citotóxico se asocia a una falla en las bombas de Na⁺/K⁺ dependientes de adenosín trifosfato (ATP), lo cual altera las concentraciones de metabolitos intracelulares.

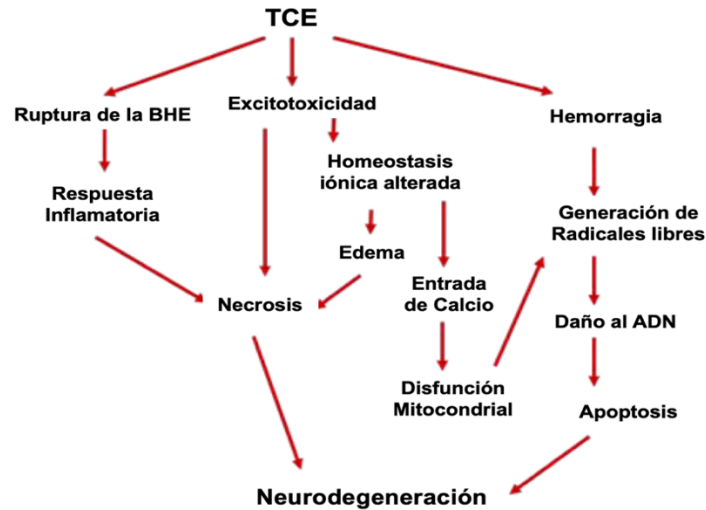
Una de las consecuencias inmediatas después del TCE es la excitotoxicidad. Se sabe que desde los primeros minutos posteriores al daño se presenta un

incremento en la liberación de neurotransmisores excitatorios como el glutamato y el aspartato (Faden et al., 1989). El exceso de glutamato lleva a una sobreactivación de receptores ionotrópicos y metabotrópicos que generan exceso de Ca^{2+} , Na^+ y K^+ (Floyd et al., 2005). El Ca^{2+} activa peroxidasas, proteasas, fosfolipasas y caspasas las cuales incrementan la concentración de ácidos grasos y radicales libres (Lau y Tymiansky, 2010). La excitotoxicidad inducida por el TCE lleva a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que inician la peroxidación de estructuras vasculares, celulares y proteínas. También genera la escisión del ácido desoxirribonucleico (ADN) y la inhibición de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Radi et al., 1991; Vagnozzi et al., 1999; Ansari et al., 2008). Todos estos procesos en conjunto inducen muerte neuronal ya sea por apoptosis y/o necrosis (Werner y Engelhard, 2007).

En relación con la muerte celular que induce el TCE, esta se presenta de forma difusa en el parénquima (Conti et al., 1998; McIntosh et al., 1989; Hallam et al., 2004; Rink et al., 1995; Sato et al., 2001). La muerte celular provocada por el TCE está mediada por diversos mecanismos entre los que se encuentran la respuesta inflamatoria, la excitotoxicidad y el daño mitocondrial (*Ver Esquema 1*).

Las neuronas que sobreviven a los mecanismos de daño inducidos por el TCE pueden presentar hiperexcitabilidad. La hiperexcitabilidad es la susceptibilidad de una neurona a un estímulo excitatorio, por lo que, en lugar de disparar uno o dos potenciales de acción, tiende a disparar ráfagas de potenciales de acción (Stafstrom, 2010). Se sabe que la hiperexcitabilidad se puede presentar en áreas cerebrales como la amígdala y el hipocampo entre otras. Por ejemplo, en la amígdala cerebral se presenta disminución en las corrientes inhibitorias postsinápticas e incremento en las corrientes glutamatérgicas después de un TCE, estos cambios inducen hiperexcitabilidad (Almeida-Suhett et al., 2014). Por su parte, en el hipocampo la hiperexcitabilidad ha sido ampliamente estudiada y se ha encontrado que después de un TCE se presenta incremento en la población de espigas (Lowenstein et al., 1992), disminución en el umbral a crisis inducidas por

agentes químicos (Akasu et al., 2002; Zanier et al., 2003) y disminución de la respuesta inhibitoria de las interneuronas (Griesemer y Mautes., 2007).



Esquema 1. Consecuencias del TCE que llevan a muerte neuronal. BHE, barrera hematoencefálica; ADN, ácido desoxirribonucleico. *Esquema tomado y modificado de Gupta y Sen (2016).*

1.3.2 Consecuencias Crónicas del TCE

Este tipo de consecuencias resultan de complicaciones inducidas por las consecuencias agudas (Finnie, 2013). Las consecuencias crónicas engloban lesiones que se desarrollan desde los primeros minutos a meses después del daño inicial y que progresivamente contribuyen a empeorar el estado neurológico (Morganti-Kossmann et al., 2007).

El TCE incrementa el riesgo de padecer la Enfermedad de Alzheimer (Fleminger et al., 2003). Esta enfermedad es una patología en la que existe una acumulación progresiva de placas β -amiloides. Asimismo, la acumulación de péptidos β -amiloides también se presenta en 38% de las personas que padecieron un TCE (DeKosky et al., 2007).

En cuanto a trastornos del estado del ánimo, las personas que padecieron

un TCE tienen una incidencia de depresión del 6 al 77% (Seel et al., 2003). Algunos otros trastornos que se presentan como consecuencias del TCE son el Trastorno de Ansiedad Generalizada, Trastorno de Pánico, Trastorno Obsesivo Compulsivo, Trastorno por Estrés Postraumático y anhedonia (Silver et al., 2001; Kim et al., 2007).

Dentro de las consecuencias crónicas del TCE se encuentra el daño axonal difuso, en el que el impacto del TCE daña el citoesqueleto de los axones de las áreas focales a la lesión. Esto lleva a una interrupción del transporte axonal, proteólisis e inflamación, lo cual puede llevar a la desconexión y degeneración de los axones (Johnson et al., 2012).

La Epilepsia Post Traumática es una consecuencia grave del TCE. Esta se define como un trastorno de crisis recurrentes inducidas por un daño al cerebro, ocasionado por un TCE (Pitkänen y Bolkvadze, 2012). Se sabe que la severidad del TCE influye en el riesgo de presentar crisis recurrentes (Annegers et al., 1998). En este sentido, TCE severos tienen un mayor riesgo (48.9%) de inducir Epilepsia Post Traumática que TCE moderados (Mahler et al., 2015). Estudios previos reportan que del 35% al 62% de los pacientes con Epilepsia Post Traumática la manifiestan como Epilepsia del Lóbulo Temporal Mesial (Diaz-Arrastia et al., 2000; Gupta et al., 2014; Hudak et al., 2004). En este tipo de epilepsia las crisis se originan en áreas límbicas del lóbulo temporal mesial, particularmente del hipocampo, amígdala, septum, hipotálamo, epítalamo y sus conexiones (Velasco, 2013).

Como la evidencia de esta sección indica, las consecuencias crónicas que induce el TCE afectan de forma difusa al parénquima cerebral. Sin embargo, de las diversas estructuras que se ven afectadas de forma crónica por el TCE, el hipocampo es particularmente vulnerable al daño.

1.4 La formación hipocampal

1.4.1 Generalidades

La formación hipocampal es un conjunto de áreas cerebrales que comprenden al hipocampo con sus tres regiones conocidas como CA1, CA2 y CA3. También incluye al Giro Dentado (GD), subículo, presubículo, parasubículo y corteza entorrinal (CE). Las áreas de la formación hipocampal se comunican entre sí mediante la vía trisináptica. La entrada de esta vía es la CE la cual se conecta a través de la vía perforante con el GD, CA3, CA1 y subículo. La vía trisináptica continúa con las fibras musgosas, las cuales son los axones de las células granulares del GD los cuales proyectan hacia el área CA3 (Andersen et al., 2007). Finalmente, la vía se completa por las colaterales de Schaffer, las cuales son los axones de las células piramidales de CA3 que proyectan hacia el área CA1 (Anand y Dhikav, 2012).

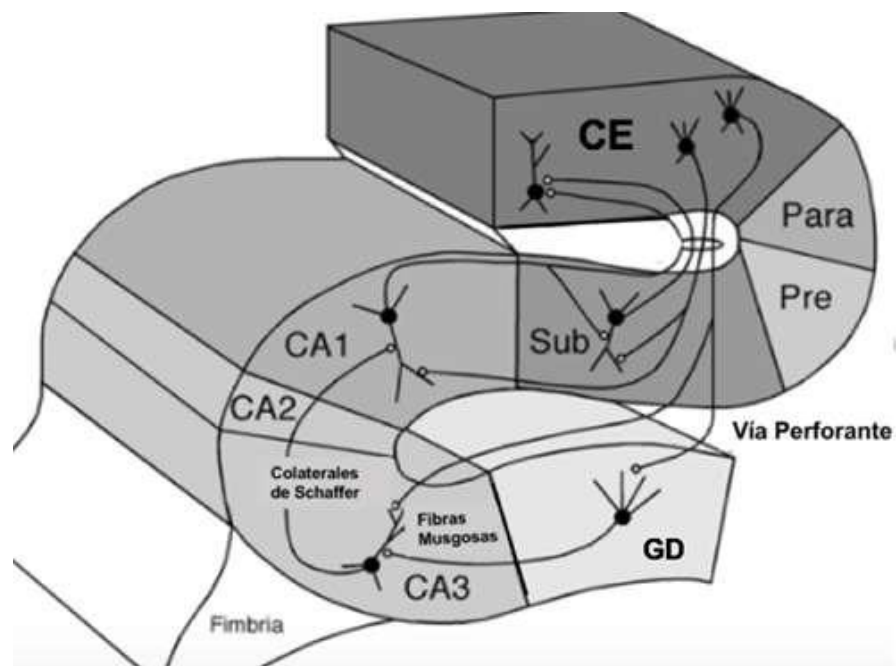


Figura 1. La formación hipocampal. Las neuronas de la segunda capa de la CE proyectan al GD y a CA3 a través de la vía perforante. Las células granulares del GD proyectan a CA3 mediante las proyecciones de las fibras musgosas. Por su parte, las células piramidales de CA3 proyectan a CA1 a través de las colaterales de Schaffer. También existen proyecciones de CA1 al subículo. Tanto CA1 como el subículo proyectan de regreso a la CE. CE: corteza entorrinal; Para: parasubículo; Pre: presubículo; Sub: subículo; GD:

giro dentado. *Tomado y modificado de Andersen y cols. (2007).*

La organización citoarquitectónica del hipocampo se tiene bien caracterizada. La primera capa hipocampal es la piramidal, esta está conformada por células piramidales cuya densidad y diámetro dependen del área. En CA1 la capa celular es más densa y el diámetro de sus células es más pequeño (15 μm) en comparación a CA3. Por su parte, en CA3 la capa piramidal es menos densa y sus células tienen de 20 a 30 μm de diámetro. Por debajo de esta primera capa se encuentra la capa *stratum oriens* la cual contiene dendritas de las células piramidales y varios tipos de interneuronas. La tercera capa (*stratum lucidum*) sólo se encuentra en CA3, no tiene células, pero contiene a las fibras musgosas. La cuarta capa se conoce como *stratum radiatum* y esta contiene las conexiones de CA3 que van a las colaterales de Schaffer. Finalmente, la capa más superficial del hipocampo y donde terminan las fibras de la CE se conoce como *stratum lacunosum-moleculare*. Respecto a las interneuronas, el hipocampo tiene varios tipos de interneuronas entre las que se encuentran las células piramidales en canasto y las células candelabro (Purves et al., 2004).

Por su parte, el GD está conformado por tres capas y la más superficial se llama capa molecular. Esta capa tiene un grosor de 250 μm y contiene diversos tipos de interneuronas. Dentro de la capa molecular se encuentra la capa granular que contiene células granulares cuyos cuerpos celulares tienen un diámetro aproximado de 10 μm . También en esta capa se encuentran células piramidales en canasta (interneuronas) cuyo diámetro es de 25-35 μm . La capa granular envuelve a la tercera capa del GD que se conoce como capa polimórfica. Esta capa también conocida como hilus, se encuentra entre las células granulares del GD y las piramidales de CA3. En esta capa existen células piramidales en canasta y células musgosas glutamatérgicas cuyos cuerpos celulares tienen un diámetro de 25-35 μm (Andersen et al., 2007).

Las células musgosas son altamente excitables y se ha demostrado en

estudios *in vitro* que responden a niveles bajos de estimulación provenientes de diversas regiones (vía perforante, *stratum moleculare*, *stratum oriens*, *stratum lucidum*, *stratum pyramidale*, CA3 y fimbria). Funcionalmente, las células musgosas presentan actividad espontánea y responden principalmente con potenciales despolarizantes en ráfaga. Además, estas células parecen tener una capacidad limitada para generar potenciales inhibitorios postsinápticos (Scharfman y Schwartzkroin, 1988). Algo importante a considerar es el circuito de retroalimentación positivo que forman las células musgosas con las células granulares. Las primeras dan y reciben sinapsis excitatorias hacia y de las células granulares (Ribak et al., 1985; Wenzel et al., 1997). Esto conecta a las células musgosas a cientos de células granulares en un circuito excitatorio, el cual se continúa a través de las fibras musgosas (axones de células granulares) al área CA3 (Andersen et al., 2007) y por las colaterales de Schaffer (axones de las células piramidales de CA3) hacia el área CA1 (Anand y Dhikav, 2012).

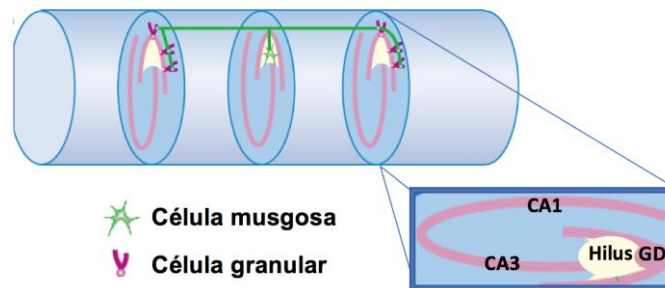


Figura 2. Localización de las células musgosas y granulares. Las células musgosas se encuentran en el hilus y mandan su axón a lo largo del hipocampo para hacer sinapsis con las células granulares del GD. GD, giro dentado. Tomado y modificado de Ratzliff y cols. (2002).

Existen dos hipótesis acerca de la participación de las células hilares en la hiperexcitabilidad. La hipótesis de las células en canasta silentes (Sloviter, 1994) propone que las células musgosas ejercen un efecto inhibitorio en las células granulares, por lo que su muerte induce la hiperexcitabilidad en el GD. Por otra parte, la hipótesis de las células musgosas irritables (*irritable mossy cell hypothesis*) refiere que las células musgosas sobrevivientes en patologías como la epilepsia,

incrementan su actividad causando la excitabilidad granular (Santhakumar et al., 2000).

En relación con las funciones del hipocampo, esta estructura está involucrada en la formación de nuevas asociaciones, en especial entre estímulos, contexto espacial y temporal. En específico, el hipocampo dorsal es fundamental para el proceso de formación y recuperación de la memoria declarativa, la cual corresponde a experiencias y hechos (Squire et al., 2004). Evidencia de esto se ha obtenido de ratas con lesiones hipocampales. En estos animales se presentan deficiencias en la realización de tareas de memoria, de reconocimiento de olores, de tiempo y de discriminación (Squire, 1992; Pothuizen et al., 2004). En otra serie de investigaciones se encontró que el hipocampo también se encuentra involucrado en la navegación espacial (O'Keefe y Dostrovsky, 1971; Stella et al., 2012). Esta función del hipocampo dorsal se ha explorado mediante modelos como el laberinto acuático de Morris, en el cual los animales con lesiones hipocampales presentan deficiencias para ubicarse en el laberinto (Morris et al., 1982; Bannerman et al., 2002a; Hock y Bunsey 1998).

El hipocampo ventral tiene funciones distintas a las del hipocampo dorsal. Existen evidencias que indican que las lesiones en esta región reducen la conducta de inmovilidad o *freezing*, la cual es un indicador de conducta tipo ansiosa en roedores (McNish et al., 1997; Richmond et al., 1999). La posibilidad de que el hipocampo ventral tenga un rol en la ansiedad se ha evaluado mediante pruebas de ansiedad incondicionada. En estos estudios se encontró que las lesiones hipocampales ventrales incrementaron la interacción social y disminuyeron el tiempo para cruzar a áreas normalmente ansiogénicas para los roedores (Kjelstrup et al., 2002; Bannerman et al., 2002b; McHugh et al., 2004).

1.4.2 El hipocampo en el TCE

En la actualidad se sabe que el hipocampo es particularmente vulnerable al TCE. En un estudio retrospectivo se encontró que el 94% de los pacientes que padecieron un TCE presentaron pérdida neuronal hipocampal (Swartz, et al., 2006).

La muerte neuronal en regiones como el hilus, GD, CA1 y CA3 se reproduce en modelos murinos de TCE en los que, a partir de dos semanas se presenta pérdida del tejido hipocampal (Albensi et al., 2000; Immonen et al., 2009).

Evidencias señalan que las células del GD son particularmente vulnerables al daño inducido por el TCE. Las células granulares glutamatérgicas e interneuronas que se encuentran en el GD, se dañan desde los primeros minutos después de un TCE (Santhakumar et al., 2000; Grady et al.; 2003; Hicks et al., 1996; Bao et al., 2011; Tran et al., 2006; Golarai et al., 2001). En el caso particular de las células hilares (GABAérgicas y glutamatérgicas), su pérdida por la inducción de un TCE se ha propuesto como una posible causa de la hiperexcitabilidad hipocampal postraumática (Santhakumar et al., 2000; Bao et al., 2011; Akasu et al., 2002; Zanier et al., 2003). Sin embargo, también la sobrevivencia y reorganización aberrante de estas células induce el incremento de la señal excitatoria hacia células granulares e interneuronas (Santhakumar et al., 2000; 2001).

Como conclusión, el TCE induce daño neuronal en diferentes regiones del hipocampo. Este daño neuronal y la reorganización estructural de las células sobrevivientes parecen hacer al hipocampo una estructura particularmente susceptible a presentar hiperexcitabilidad después de un TCE.

1.5 Tratamiento farmacológico para las consecuencias del TCE

El tratamiento actual del TCE se basa en la prevención de las consecuencias agudas, la atención en el lugar del incidente, durante el transporte y del control de los mecanismos de lesión secundaria. Al momento del ingreso a la unidad de cuidados intensivos se busca controlar la posición, temperatura, agitación, dolor y hemodinámica. La sedación del paciente con TCE moderado y severo es importante, por lo que se utilizan fármacos de rápida acción y recuperación. Se busca utilizar sedantes que además controlen la presión intracraneal y el consumo metabólico. En la clínica se utilizan propofol, remifentanilo y benzodiazepinas (Alted

et al., 2009). La disminución de la presión intracraneal también es prioritaria, por lo que se utilizan fármacos como el manitol (IMSS, 2013).

Los tratamientos para las consecuencias crónicas se enfocan en la neuroprotección. Esta aproximación intenta bloquear las cascadas fisiopatológicas que desembocan en las consecuencias a largo plazo, así como contribuir a la reparación del sistema nervioso central (Schouten, 2007). Hasta la fecha se han realizado ensayos clínicos de fármacos con diferentes mecanismos de acción como bloqueadores de receptores excitotóxicos, antiinflamatorios, antioxidantes, estabilizadores mitocondriales, bloqueadores de calcio y de magnesio, entre otros. Sin embargo, ninguna de estas aproximaciones ha mostrado ser suficientemente efectiva para disminuir y/o evitar las consecuencias crónicas del TCE (Chew y Zafonte, 2009).

1.6 Cromoglicato de sodio

1.6.1 Generalidades

El cromoglicato de sodio (disodio; 5- [3- (2-carboxilato-4-oxochromen-5-il) oxi-2- hidroxipropoxi] -4-oxocromen-2-carboxilato) es la forma de sal sódica del ácido cromoglicico. Su fórmula molecular es $C_{23}H_{14}Na_2O_{11}$ y su peso molecular es de 512.334 g/mol (Ashton et al., 1973).

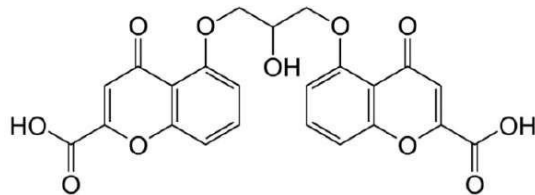


Figura 3. Cromoglicato de Sodio

El cromoglicato de sodio (CG) es un estabilizador de células cebadas que evita su desgranulación y migración (Howell y Altounyan, 1967; Kusner et al; 1973). Originalmente utilizado para la profilaxis del asma (Altounyan, 1967), el CG bloquea los canales de Ca^{2+} (Ashmole y Bradding, 2012). Además, fosforila a la proteína moesina de 78 kDa que regula el paso de la señal entre la membrana y el citoesqueleto de las células cebadas (Wang et al., 1999; Theoharides et al., 2000). La absorción del CG en la rata es rápida y completa por las vías subcutánea (s.c.)

y respiratoria (Moss y Ritchie, 1970). Después de 6 horas de su administración s.c. sólo se encuentra del 1.0 al 0.4% del fármaco en el sitio de inyección (Smith y Fisher, 1980). Por su parte, en seres humanos se ha encontrado que después de la administración de CG (80 mg; vía oral) el porcentaje de la excreción del fármaco durante un periodo de 8 h fue del 8.4% (Moss et al., 1971).

Después de su administración por vía intravenosa (i.v.) en ratas, el 99% del CG se depura rápidamente del plasma, por lo que su vida media es de 8 minutos. El restante 1% tiene una vida media aproximada de 9 horas (Brogden et al., 1974). Su pico de concentración en sangre es a los 15 minutos de su administración y se excreta sin metabolizar a través de la orina y en la bilis (Moss et al., 1970). En el ser humano, la excreción después de su administración i.v. es en proporciones iguales en la orina y heces (Walker et al, 1971).

Respecto a su toxicidad, administraciones crónicas de dosis altas de CG (200 mg/kg; s.c.) indujeron una mortalidad del 4% en ratas. Dosis de 80 mg/kg (s.c.) indujeron daño renal, mientras que con las dosis de 50 mg/kg (i.v.) no se encontró evidencia de toxicidad renal o de otro tipo (Cox et al., 1970). En seres humanos, el CG puede generar irritación local en la garganta y tráquea, efectos secundarios poco frecuentes y transitorios. Respecto a su administración crónica en seres humanos, no existe evidencia de que el tratamiento produzca anomalías pulmonares, renales, hepáticas ni hematológicas (McLean et al., 1973).

1.6.2 El cromoglicato de sodio como neuroprotector

El CG, al evitar la desgranulación de las células cebadas, disminuye la liberación de sustancias que fomentan y perpetúan el daño. Por esto se ha explorado su efecto en diversos eventos patológicos agudos. Por ejemplo, en modelos de isquemia, la administración de CG reduce el daño neuronal, la atrofia y la actividad astrogliar en el hipocampo, tálamo y corteza (Jin et al., 2007 y 2009). Su administración también disminuye la inflamación cerebral, la entrada de neutrófilos, el volumen de hematomas y la mortalidad (Strbian et al., 2006 y 2007).

En modelos de hipoxia se ha encontrado que la estabilización de las células cebadas con CG limita el daño cerebral, reduce el edema y la muerte neuronal (Tóosaki et al., 1994; Malagelada et al., 2004). Asimismo, la administración de CG conservó la morfología de las células piramidales del hipocampo en modelos de estrés oxidativo y daño nigroestriatal por rotenona (Abdel-Salam et al., 2016).

En un modelo de *status epilepticus* (SE) también se ha encontrado que la administración de CG (50mg/kg; s.c.) 30 minutos antes de la inducción del SE con pilocarpina, incrementa la latencia al establecimiento del mismo, elimina las sacudidas de perro mojado, disminuye la liberación de histamina y reduce el daño neuronal hipocampal en GD, CA1 y CA3 (Valle-Dorado et al., 2015).

En relación con los efectos agudos del CG, se sabe que la administración de CG (50mg/kg; s.c.) después de tres horas de la inducción de SE incrementa la sobrevivencia neuronal en el GD, CA1, CA3 e hilus del hipocampo dorsal. Este efecto no se encontró en el núcleo lateral posterior del tálamo ni en las capas V y VI de la corteza somato motora (Valle-Dorado et al., 2018). En el mismo estudio se evaluó el efecto de la administración crónica de CG (24 mg/kg; s.c.) en ratas a las que se les indujo SE. En este experimento las ratas con CG, en comparación al grupo control, presentaron un menor número de crisis convulsivas. Además, se encontró un mayor número de células viables en el núcleo lateral posterior del tálamo, efecto que no se presentó en el hipocampo dorsal ni en las capas V y VI de la corteza somatomotora.

La evidencia anterior sugiere que la administración de CG podría representar una estrategia terapéutica apropiada para reducir el daño y la hiperexcitabilidad hipocampal inducidos por el TCE severo.

2. Justificación

El TCE es un problema de salud que trae consigo consecuencias agudas y

crónicas importantes para los afectados por TCE. De estas consecuencias, la hiperexcitabilidad y la muerte neuronal hipocampal no tienen un tratamiento eficaz. Dado que se requieren nuevos tratamientos y crearlos tiene altos costos económicos, una alternativa es encontrar nuevas aplicaciones a fármacos ya utilizados en la clínica. En este sentido, una buena opción es utilizar fármacos con perfiles farmacológicos conocidos y con propiedades neuroprotectoras como posibles tratamientos. Este es el caso del CG, un estabilizador de células cebadas con un perfil farmacológico bien conocido que ha demostrado tener efectos neuroprotectores en modelos de isquemia, hemorragia cerebral y SE. Por lo tanto, se considera que el CG es un buen candidato para disminuir el daño y la hiperexcitabilidad hipocampal inducidos por el TCE severo.

3. Hipótesis

La administración de CG posterior a un TCE severo disminuye el daño y la hiperexcitabilidad hipocampal inducidos por el mismo.

4. Objetivo general

Evaluar los cambios en la excitabilidad, población neuronal y volumen hipocampal, en ratas a las que se les indujo un TCE severo y que después fueron administradas con un tratamiento subcrónico de CG.

4.1 Objetivos particulares

4.1.1 Evaluar la excitabilidad, población neuronal y volumen hipocampal en ratas a las que se les indujo un TCE severo.

4.1.2 Evaluar la excitabilidad, población neuronal y volumen hipocampal en ratas a las que se les indujo un TCE severo y que después fueron administradas con un tratamiento subcrónico de CG.

5. Metodología

5.1 Animales

Se utilizaron ratas machos de la cepa Wistar con un peso de entre 250-300 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).

5.2 Experimento 1

Con el objetivo de evaluar la excitabilidad, población neuronal y volumen hipocampal en ratas a las que se les indujo un TCE severo, se diseñaron cuatro experimentos. Estos se dividen en dos brazos iniciales que corresponden a las técnicas utilizadas. En general, los grupos indicados con la palabra “*NeuN*” corresponden a los grupos en los que se evaluó la preservación neuronal mediante inmunohistoquímica (*Ver Sección 5.10.2*) y la excitabilidad hipocampal mediante el umbral post descarga (UPD; *Ver Sección 5.7*). Los grupos nombrados con “*RM*” se refieren a aquellos experimentos en los que se evaluó la volumetría mediante Resonancia Magnética *Ex Vivo* (*Ver sección 5.9*).

5.2.1 Grupo TCE + SS + NeuN (n= 7): El día 0 se evaluó el Neuroscore (NS; *Ver Sección 5.4*), una prueba que mide la función sensoriomotora de los animales. Al día 1 se pesó a los animales y posteriormente se les realizó la cirugía para la inducción del TCE severo (*Ver Sección 5.5*). Después de 90 minutos del TCE, se administró la primera dosis de SS (1 ml/kg; s.c.), la cual se administró cada 24 hrs durante 10 días (Figura 4). El día 2 posterior al TCE, se evaluó nuevamente el NS de los animales, prueba que se repitió los días 23 y 30. El día 23 después del TCE se realizó la cirugía para el implante del electrodo hipocampal (*Ver Sección 5.6*). Al día 30 se realizó la evaluación del Umbral Post Descarga (UPD) con el objetivo de cuantificar la excitabilidad hipocampal ventral (*Ver Sección 5.7*). Finalmente, el día 31 post TCE se perfundió a los animales (*Ver Sección 5.8.2*) para la obtención de los cerebros y la realización de los análisis con NeuN (*Ver Sección 5.10.2*).

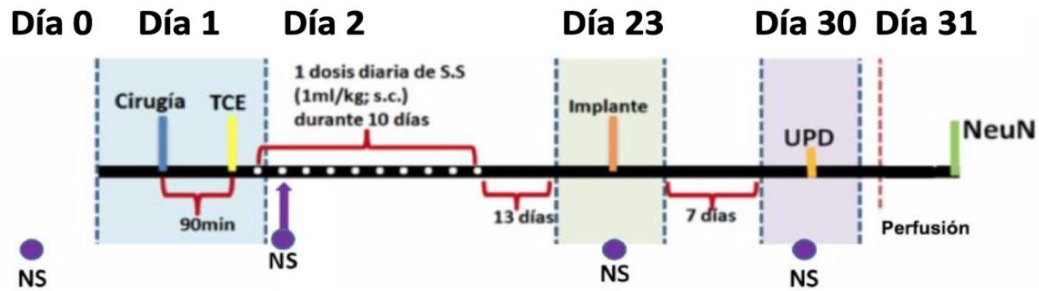


Figura 4. Diagrama del grupo TCE + SS + NeuN. Se indica el día (0) previo y los días 1, 2, 23, 30 y 31 posteriores al TCE. Con un círculo morado se señalan los días que se realizaron evaluaciones del NS. NS: Neuroscore; TCE: trauma cráneo encefálico; S.S: solución salina; ml: mililitro; kg: kilogramo; s.c.: administración subcutánea; min: minutos; UPD: umbral post descarga.

5.2.2 Grupo TCE + SS + RM (n= 8): A este grupo se le realizó el mismo protocolo que al grupo TCE+SS+NeuN, con las diferencias de que no se le realizó la colocación del implante hipocampal, no se hizo el registro del UPD (Figura 5) y que la perfusión se realizó con Gadolinio (Ver Sección 5.8.1). Una vez realizada la perfusión, se obtuvieron las cabezas y se almacenaron a 4°C para su posterior análisis mediante Resonancia Magnética *ex vivo* (Ver sección 5.9).

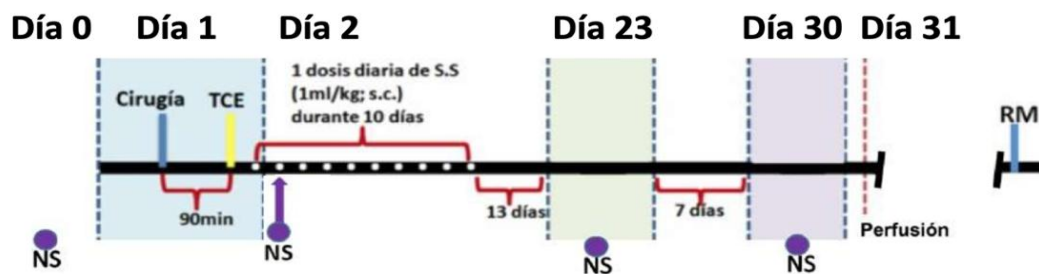


Figura 5. Diagrama del grupo TCE + SS + RM. Se indica el día (0) previo y los días 1, 2, 23, 30 y 31 posteriores al TCE. Con un círculo morado se señalan los días que se realizaron evaluaciones del NS. NS: Neuroscore; TCE: trauma cráneo encefálico; S.S: solución salina; ml: mililitro; kg: kilogramo; s.c.: administración subcutánea; min: minutos; RM: Resonancia Magnética *ex vivo*.

5.2.3 Grupo Sham + SS + NeuN (n=7): Este grupo siguió el mismo protocolo que el grupo *TCE+SS+NeuN* con la diferencia de que a este no se le indujo TCE (Figura 6).

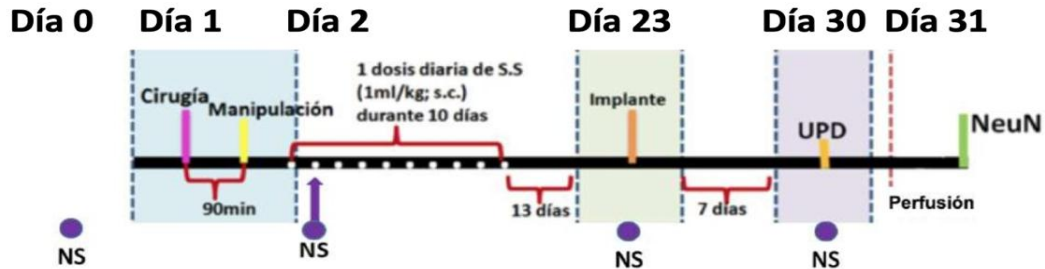


Figura 6. Diagrama del grupo Sham + SS + NeuN. Se indica el día (0) previo y los días 2, 3, 23, 30 y 31 posteriores a la craneotomía. Con un círculo morado se señalan los días que se realizaron evaluaciones del NS. NS: Neuroscore; S.S: solución salina; ml: mililitro; kg: kilogramo; s.c.: administración subcutánea; min: minutos; UPD: umbral post descarga.

5.2.4. Grupo Sham + SS + RM (n=8): A este grupo se les aplicó el mismo protocolo que al grupo *TCE+SS+RM*, con la diferencia de que a este grupo no se le indujo el TCE (Figura 7).



Figura 7. Diagrama del grupo Sham + SS + RM. Se indica el día (0) previo y los días 1, 2, 23, 30 y 31 posteriores a la craneotomía. Con un círculo morado se señalan los días que se realizaron evaluaciones del NS. NS: Neuroscore; S.S: solución salina; ml: mililitro; kg: kilogramo; s.c.: administración subcutánea; min: minutos; RM: Resonancia Magnética *ex vivo*.

5.3 Experimento 2

Se realizaron 4 grupos experimentales con el objetivo de evaluar la excitabilidad, población neuronal y volumen hipocampal en ratas a las que se les indujo un TCE severo y que después fueron administradas con un tratamiento subcrónico de CG. Estos se dividen en dos brazos iniciales que corresponden a las técnicas utilizadas. En general, los grupos indicados con la palabra “*NeuN*” corresponden a los grupos en los que se evaluó la preservación neuronal mediante inmunohistoquímica (Ver Sección 5.10.2) y la excitabilidad hipocampal mediante UPD (Ver Sección 5.7). Los grupos nombrados con “*RM*” se refieren a aquellos experimentos en los que se evaluó la volumetría mediante Resonancia Magnética *Ex Vivo* (Ver sección 5.9).

5.3.1 Grupo TCE + CG + NeuN (n= 7): A este grupo se les realizó el mismo protocolo (Figura 8) que al grupo *TCE+SS+NeuN*, con la diferencia de que en lugar de administrar S.S, se administró CG disuelto en agua destilada (50mg/kg; s.c.) 90 min después de la inducción del TCE severo, cada 24 hrs durante 10 días.

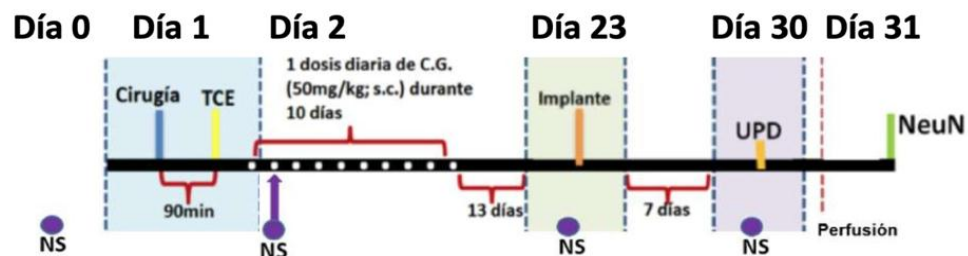


Figura 8. Diagrama del grupo TCE + CG + NeuN. Se indica el día (0) previo y los días 1, 2, 23, 30 y 31 posteriores al TCE. Con un círculo morado se señalan los días que se realizaron evaluaciones del NS. NS: Neuroscore; TCE: trauma craneoencefálico; C.G: cromoglicato de sodio; ml: mililitro; kg: kilogramo; s.c.: administración subcutánea; min: minutos; UPD: umbral post descarga.

5.3.2 Grupo TCE + CG + RM (n= 8): A este grupo se le realizó el mismo protocolo (Figura 9) que al grupo *TCE+SS+RM*, con la diferencia de que en lugar de administrar S.S, se administró CG disuelto en agua destilada (50mg/kg; s.c.) 90 min después de la inducción del TCE severo, cada 24 hrs durante 10 días.

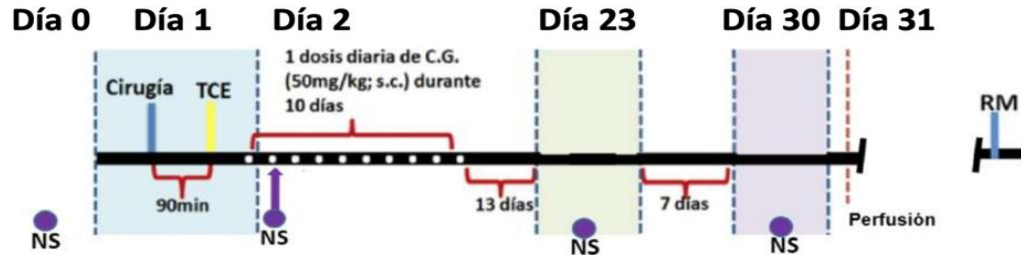


Figura 9. Diagrama del grupo TCE + CG + RM. Se indica el día (0) previo y los días 1, 2, 23, 30 y 31 posteriores al TCE. Con un círculo morado se señalan los días que se realizaron evaluaciones del NS. NS: Neuroscore; TCE: trauma cráneo encefálico; C.G: cromoglicato de sodio; ml: mililitro; kg: kilogramo; s.c.: administración subcutánea; min: minutos; RM: Resonancia Magnética ex vivo.

5.3.3 Grupo Sham + CG + NeuN (n=7): Este grupo siguió el mismo protocolo (Figura 10) que el grupo Sham+SS+NeuN, con la diferencia de que en lugar de administrar S.S, se administró CG disuelto en agua destilada (50mg/kg; s.c.) 90 min después de la inducción del TCE severo, cada 24 hrs durante 10 días.

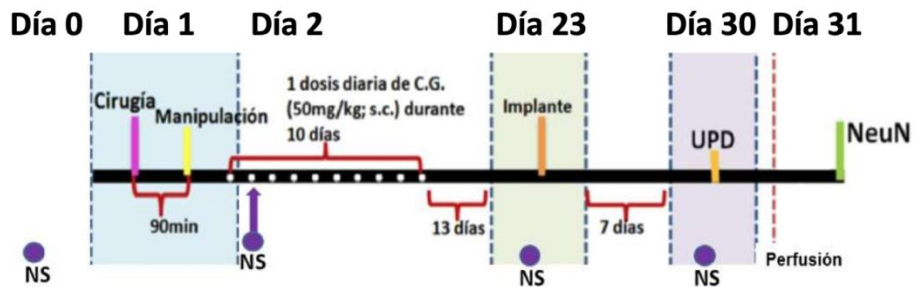


Figura 10. Diagrama del grupo Sham + CG + NeuN. Se indica el día (0) previo y los días 1, 2, 23, 30 y 31 posteriores al TCE. Con un círculo morado se señalan los días que se realizaron evaluaciones del NS. NS: Neuroscore; TCE: trauma cráneo encefálico; C.G: cromoglicato de sodio; ml: mililitro; kg: kilogramo; s.c.: administración subcutánea; min: minutos; UPD: umbral post descarga.

5.3.4. Grupo Sham + CG + RM (n=4): A este grupo se les aplicó el mismo protocolo (Figura 11) que al grupo Sham+SS+RM, con la diferencia de que en lugar de administrar S.S, se administró CG disuelto en agua destilada (50mg/kg; s.c.) 90 min después de la inducción del TCE severo, cada 24 hrs durante 10 días.

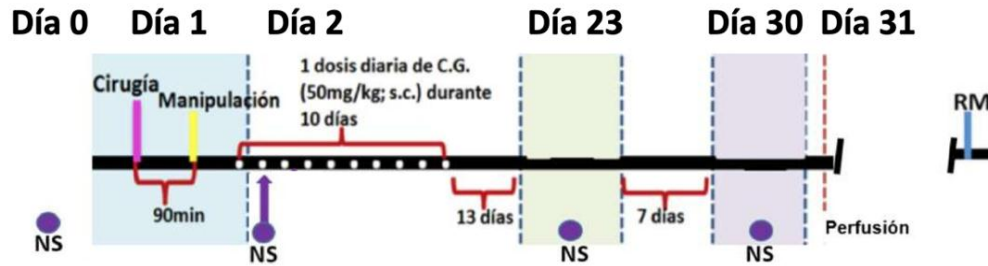


Figura 11. Diagrama del grupo Sham + CG + RM. Se indica el día (0) previo y los días 1, 2, 23, 30 y 31 posteriores al TCE. Con un círculo morado se señalan los días que se realizaron evaluaciones del NS. NS: Neuroscore; C.G: cromoglicato de sodio; ml: mililitro; kg: kilogramo; s.c.: administración subcutánea; min: minutos; RM: Resonancia Magnética ex vivo.

5.4 Neuroscore

La prueba de función sensoriomotora consiste en cuatro pruebas: prueba de extensión de extremidades anteriores (izquierda y derecha por separado), prueba de extensión de extremidades posteriores (izquierda y derecha por separado), pulsión lateral y plano inclinado. El máximo de calificación que se puede obtener en el NS es de 28 puntos, además se calculó la proporción de cambio de la capacidad motora (la diferencia entre el puntaje basal contra las mediciones del día 2, 23 y 30).

5.4.1 Prueba de contraflexión

La prueba de contraflexión consistió en sujetar al animal en la parte media de la cola y elevarlo 10 cm con respecto a la base de un tapete. Posteriormente se fue acercando el animal hacia el tapete para inducir el reflejo de paracaídas (extensión rápida de las extremidades anteriores). Se observó la respuesta de las extremidades anteriores conforme se repitió tres veces la prueba. El movimiento del observador fue lento, suave y uniforme a través de las repeticiones.

Para calificar esta prueba cada extremidad recibió un puntaje de 0 a 4 puntos. En caso de una respuesta instantánea con la extremidad extendida hacia el tapete en un movimiento fluido y suave, y además se formó un espacio entre las

extremidades al extenderse, se otorgaron “4” puntos (Figura 12). Se calificó con “3” puntos si la extremidad estaba extendida por completo hacia enfrente, pero la respuesta careció de fuerza y fluidez. Además, se observó que la respuesta tardó aproximadamente 5 segundos en responder (no fue instantánea). La extremidad recibió “2” puntos si presentó espasmos y si estaba extendida a 45° respecto al plano corporal del animal. Se dio “1” punto si existió alguna respuesta, el brazo estaba extendido y perpendicular al plano del cuerpo del animal cuando estaba suspendido, y si la extremidad mostró espasticidad en flexión o extensión. Se dio “0” puntos si no hubo respuesta (la nariz del animal toca el tapete) y si se observó pérdida del tono muscular de la extremidad anterior.

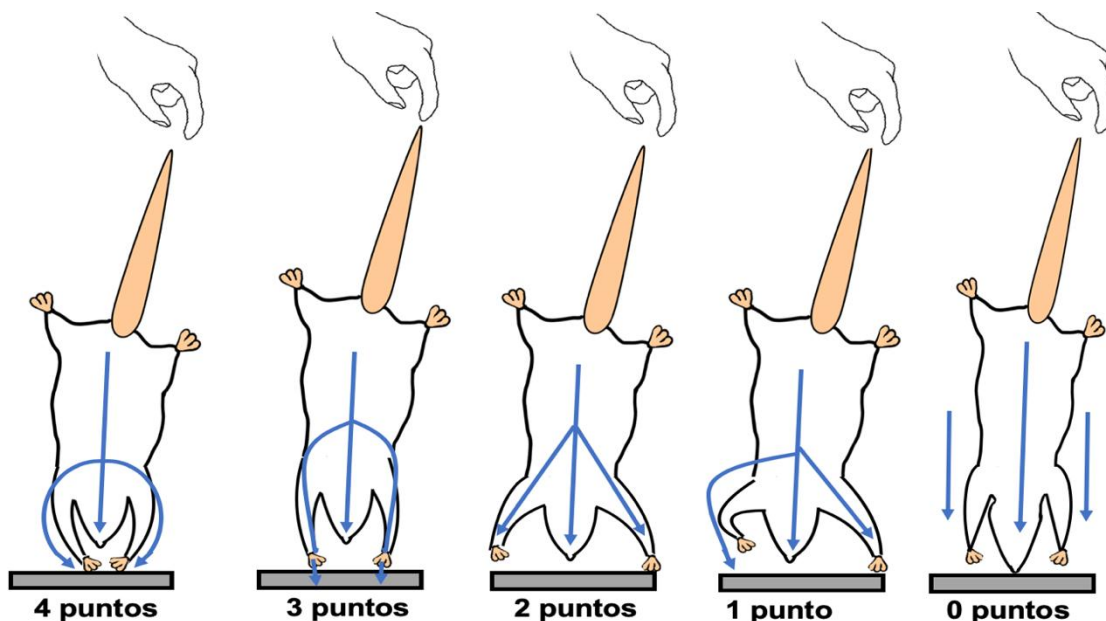


Figura 12. Diagrama de la prueba de contraflexión. Se indican los puntos (0 a 4) que se otorgan a cada extremidad anterior

5.4.2 Prueba de extensión de extremidades posteriores

Los ojos del animal fueron tapados con una mano mientras se realizaba la prueba. Se observaron las extremidades posteriores mientras se jaló al animal por la cola, gentil y rápidamente hacia atrás. Se observó la extensión cuando se levantó al animal para iniciar el movimiento. Un puntaje se dio por cada extremidad.

Se calificó con “4” puntos si la extensión hacia atrás fue completa e instantánea, la palma se movió hacia arriba y los dedos se separaron por completo. El puntaje fue de “3” si la extremidad posterior se extendió por completo, el movimiento no fue instantáneo y tardó aproximadamente 5 segundos en responder. Además, la palma se movió hacia arriba, pero los dedos no se separaron. Se dieron “2” puntos si la extremidad no se extendió por completo y si en su lugar se formó una curva hacia la cola. Además, la palma estaba hacia arriba y el movimiento careció de fuerza. Se dio “1” si la extremidad se voltea hacia atrás, con la palma hacia arriba, pero no hubo extensión. Finalmente, se dio “0” puntos si no hubo respuesta y si la extremidad posterior presentó espasticidad en flexión (Figura 13).

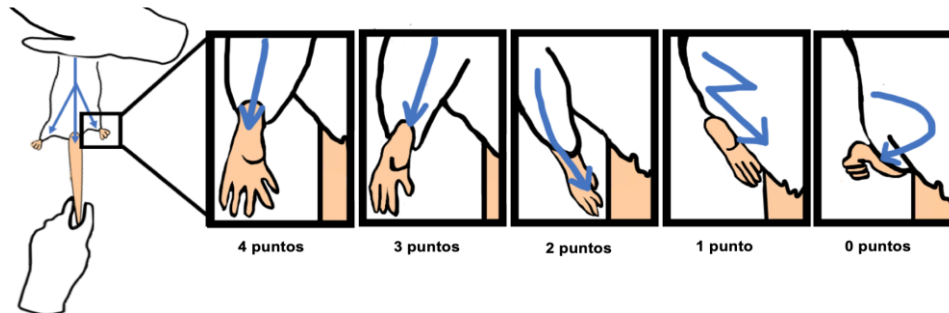


Figura 13. Diagrama de la prueba de extensión de extremidades posteriores. Se indican los puntos (0 a 4) que se otorgan a cada extremidad posterior.

5.4.3 Prueba de pulsión lateral

Se empujó al animal de su parte lateral a lo largo de tapete para probar su fuerza y resistencia. El animal fue colocado longitudinalmente viendo en contra al observador. Se empujó al animal hacia la izquierda primero y luego a la derecha. Después se intentó voltearlo, primero a la izquierda y luego a la derecha.

Se otorgó una puntuación de “4” si el animal ofreció resistencia, se agarró fuerte del tapete, y movió coordinadamente sus extremidades cuando fue empujado a través del tapete. Se dieron “3” puntos si ofreció resistencia, pero el observador aún así pudo empujarlo a través del tapete (no giró sobre sí mismo). Si la rata no se dio vuelta y ofreció poca resistencia se otorgaron “2” puntos. Se dio un puntaje de “1” si el animal ofreció un mínimo de resistencia antes de rodarse o si a pesar

de rodarse recuperó su posición lentamente por sí mismo. Se dio “0” puntos si el animal no ofreció resistencia, se dio la vuelta y no recuperó su posición (Figura 14).

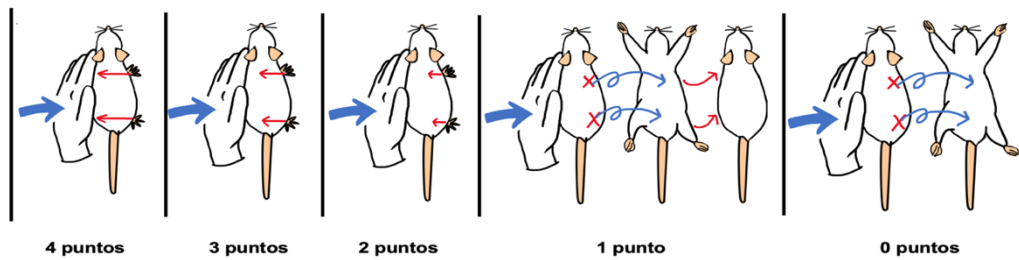
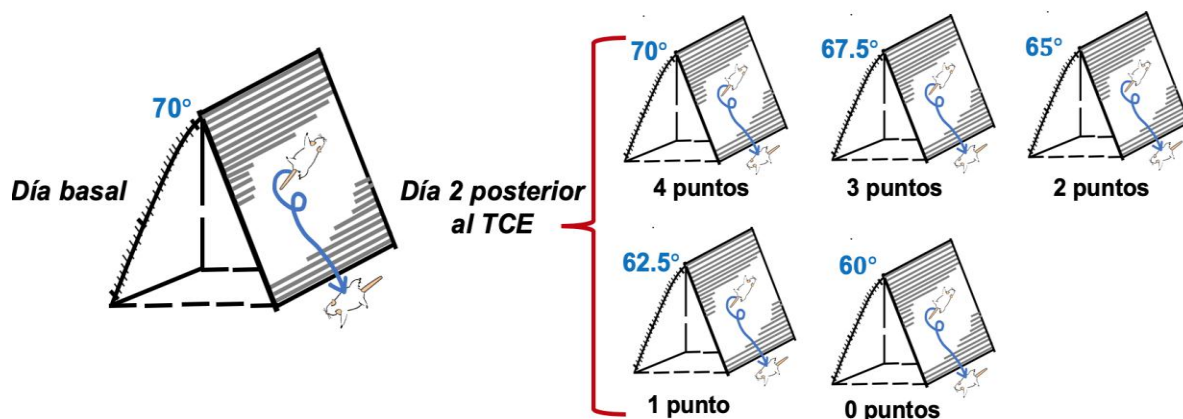


Figura 14. Diagrama de Pulsión Lateral. Se indican los puntos (0 a 4) que se otorgan a cada extremidad.

5.4.4 Prueba de plano inclinado

Se limpió el tapete antes de comenzar. Para obtener la línea base se colocó a 40° el plano inclinado y se fueron agregando 2.5 % de grados hasta que el animal ya no se logró mantener en el tablero. Se tomó el mayor grado al que el animal se sostuvo durante 5 segundos, en cada una de las posiciones (vertical, izquierda y derecha). Para animales ya lesionados se colocó a 10° menos de su línea basal. Se colocó al animal en el tablero en posición vertical, luego hacia la izquierda y luego hacia la derecha. El animal debió sostenerse quieto durante 5 segundos sin sostenerse de la cola (se levantó gentilmente para verificar) para acreditar el ángulo. Se dieron tres intentos al animal en cada dirección antes de incrementar el ángulo. Se anotó el ángulo máximo obtenido.

Un puntaje se otorgó por cada posición, dependiendo el grado obtenido en cada medición respecto al grado basal. Si el animal obtuvo el mismo grado que en su basal se dan “4” puntos, “3” si tuvo 2.5° menos, “2” si tuvo 5° menos, “1” si tuvo 7.5° menos y “0” si tuvo 10° grados o menos. Se presenta un ejemplo de cómo calificar esta prueba en la Figura 15.



Posición	Grado Basal	Día 2 post TCE
Vertical	70°	67.5° (70 - 67.5= 2.5 grados) = 3 puntos
Izquierda	70°	62.5° (70 - 62.5= 7.5 grados) = 1 punto
Derecha	70°	60° (70 - 60= 10 grados) = 0 puntos

Figura 15. Ejemplo de la calificación del plano inclinado. Se indican los puntos (0 a 4) que se otorgan a cada posición: vertical, izquierda y derecha.

5.5 Percusión de Fluido Lateral

La percusión de fluido lateral (PLF) es el modelo más ampliamente utilizado para caracterizar el TCE experimental (Laurer et al., 2002). El modelo de PLF permite transmitir presión hidráulica controlada a través de la duramadre intacta, por lo que simula el TCE inducido por daño no penetrante. Además, reproduce muchos de los aspectos del TCE en humanos como es la contusión focal, hemorragias intraparenquimales y subaracnoideas, ruptura de tejido y el daño axonal difuso (McIntosh et al., 1989; Graham et al., 2000).

El equipo de PLF consiste en un recipiente cilíndrico de Plexiglás lleno de solución salina isotónica a temperatura ambiente (25°C). En uno de sus extremos el equipo tiene un "Leur-Loc" macho metálico al cual está conectado un transductor de presión que registra las atmósferas (atm.) del golpe. En uno de sus extremos, el cilindro tiene un pistón de corcho que recibe el impacto directo de un péndulo de metal. El péndulo se puede mover a diferentes ángulos de altura, por lo que la intensidad del golpe depende del ángulo al que se suelta el péndulo. Para todos los experimentos, el péndulo se colocó a 20 grados para asegurar que la presión hidráulica indujera una lesión severa (2.6 a 3.3 atm.) en los animales (Immonen et al., 2009).

Antes de inducir el TCE, se anestesió al animal con una mezcla de ketamina (80 mg/kg, i.p.) y xilazina (15 mg/kg, i.m.). Posteriormente se rasuró la piel del cráneo y se colocó al animal en un marco esterotáxico. Después se esterilizó el área y se realizó un corte sagital para revelar bregma, lambda y la línea sagital. Se retiró el periostio y se realizó una craneotomía de 4 mm de diámetro con un trefino entre bregma y lambda en el hemisferio izquierdo (borde anterior 3.0 mm posterior a bregma; borde lateral 3.0 mm a la izquierda de la línea sagital y 3.0 mm anterior a lambda). Después se retiró el hueso que cubría el agujero realizado con la craneotomía, se limpiaron los residuos del borde y se verificó que la duramadre estuviera intacta. Siguiendo con el protocolo, con el objetivo de tener un soporte para la preparación, se colocó un tornillo de acero inoxidable sobre la corteza frontal del animal. Después se fijó un “Leur-Loc” hembra (conector de plástico rígido) sobre el agujero con acrílico dental. Una vez seco el acrílico, se colocó solución salina al 0.9% para verificar que no hubiera filtraciones entre el cráneo y el “Leur-Loc”. Para inducir el TCE, 90 minutos después de la anestesia, el animal se conectó al equipo de LFP mediante el “Leur-Loc”. Inmediatamente después se soltó el péndulo del aparato para inducir una presión transitoria (21-23 ms) sobre la duramadre expuesta del animal. Después de inducir el TCE se retiró el “Leur-Loc” y se registraron las atmósferas indicadas en el transductor de presión, la aparición de hematoma y de apnea. Posteriormente se suturó la incisión realizada en el cráneo y se le administró un analgésico al animal (Tramadol, 20mg/kg, s.c.).

5.6 Colocación del implante hipocampal

Para la colocación del implante se anestesió al animal con una mezcla de ketamina (80 mg/kg, i.p.) y xilazina (15 mg/kg, i.m.). Posteriormente se rasuró la piel del cráneo y se colocó al animal en un marco esterotáxico. Después se esterilizó el área y se realizó un corte sagital para revelar bregma, lambda y la línea sagital. Se retiró el periostio y se realizó la implantación de un electrodo bipolar, a nivel del hipocampo ventral izquierdo con referencia a bregma (anteroposterior -5.3 mm; lateral -5.2 mm; profundidad -7.5 mm; Paxinos y Watson, 2007). El electrodo

que estaba acoplado a un conector consistió en dos hebras torcidas de alambre de acero inoxidable aislado excepto en las puntas. Para dar soporte al implante se colocaron 3 tornillos de acero inoxidable en el cráneo sobre la corteza frontal, lateral y cerebelar. La preparación se fijó al cráneo con acrílico dental. Las ratas se dejaron recuperar durante 7 días.

5.7 Evaluación de la excitabilidad hipocampal

La estimación del umbral post-descarga (UPD) es una herramienta que permite evaluar la excitabilidad neuronal de un área específica del cerebro. El UPD se define como la intensidad mínima de corriente necesaria para producir un cambio conductual y/o post-descarga electrográfica mayor a 3 segundos (Racine, 1972).

El procedimiento consiste en la aplicación de un tren de estimulación eléctrico en el hipocampo ventral a través de un protocolo en escalera, esto es, aplicando una serie de pulsos cuadrados de 1 ms de duración a 60 Hz durante 1 s en intervalos de 1 min. Los estímulos iniciaron con una corriente de 10 μ A, la cual se incrementa en escalones de 20% cada minuto con respecto a la corriente previa hasta alcanzar el umbral. El umbral consiste en un cambio conductual (guiño o movimientos de cabeza) o PD con una duración mayor a 3 segundos (Racine, 1972). Los estímulos eléctricos se generaron con un estimulador modelo GRASS S-48.

5.8 Perfusión

5.8.1 Perfusión para análisis mediante Resonancia Magnética

Para el proceso de perfusión el animal se anestesió con una mezcla de ketamina (80 mg/kg, i.p.) y xilazina (20 mg/kg, i.m.). Una vez anestesiado, se colocó en posición supina y se abrió la cavidad torácica. Se insertó una aguja en el ventrículo izquierdo del corazón y se empezó la perfusión de 250 ml de la solución de limpieza (SS + Heparina + 2mM de Prohance) a una velocidad de flujo de 1ml/min. Inmediatamente después, se cortó la aurícula derecha para permitir la

salida de sangre. Posteriormente se inició la perfusión con 250 ml de la solución de fijación (PFA al 4% + 2mM de ProHance) a una velocidad de 1ml/min. Terminada la perfusión, se removió la cabeza del cuerpo del animal y se retiraron la piel y los ojos de la cabeza (Figura 16).

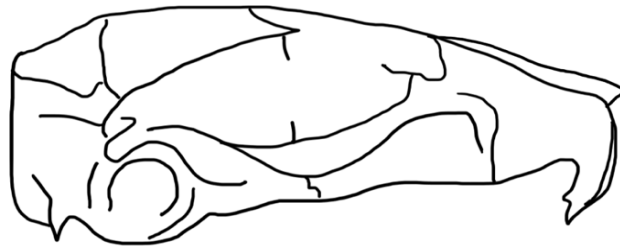


Figura.16 Cráneo de la rata. Se presenta la vista lateral de un ejemplo de como se observa el cráneo de una rata, después de retirar la piel y los ojos para los estudios con Resonancia Magnética.

Inmediatamente después de la disección, se colocó la muestra en un frasco de 50 ml con solución de fijación (PFA al 4% + 2mM de ProHance) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente se transfirió cada muestra a un tubo Falcon con la solución de almacenaje (Buffer de Fosfatos + 0.02% azida de sodio + 2mM de Prohance) y se dejó en refrigeración a 4°C evitando la congelación. Las muestras se dejaron en los tubos Falcón hasta su escaneo (*Ver sección 5.9*).

5.8.2 Perfusión para Análisis Morfométrico

Para el proceso de perfusión el animal se anestesió con una mezcla de ketamina (80 mg/kg, i.p.) y xilazina (20 mg/kg, i.m.). Una vez anestesiado, se colocó en posición supina y se abrió la cavidad torácica. Se insertó una aguja en el ventrículo izquierdo del corazón y se empezó la perfusión de 250 ml de solución salina (0.9%) con heparina (1mg/l) durante 15 min (aproximadamente 200-250 ml). Inmediatamente después, se cortó la aurícula derecha para permitir la salida de sangre. Posteriormente se perfundió con paraformaldehído al 4% + 0.2% de glutaraldehído en una solución amortiguadora de fosfatos. Terminada la perfusión, se extrajo el cerebro del animal para colocarlo en paraformaldehído al 4% a una temperatura de 4°C (Luna, 1968). Pasadas 168 hrs, la muestra se incluyó en parafina para su procesamiento (*Ver sección 5.10*).

5.9 Resonancia Magnética

La resonancia magnética se utilizó para cuantificar el volumen y daño hipocampal en los diversos grupos experimentales. Se utilizó un magneto de 7.0 T para adquirir las imágenes (Laboratorio Nacional enfocado en imagenología por resonancia magnética, Instituto de Neurobiología, UNAM Campus Juriquilla). Los parámetros para los escaneos se optimizaron para contraste de materia blanca-gris, imagen tipo FLASH con adquisición 3D. La resolución fue de 85 micrómetros por lado, TR=30 ms, TE= 8.6 ms, ángulo de desviación=20 grados, tiempo de adquisición por animal=1 h.

El cálculo de los volúmenes totales de los hipocampos se realizó mediante la selección manual de las áreas de interés usando como referencia un atlas del cerebro de rata (Paxinos y Watson, 2007) y el programa ITK-SNAP versión 3.6.0 (Yushkevich et al., 2018). Se delinearon máscaras individuales que contenían los voxeles correspondientes al hipocampo ipsilateral y contralateral al TCE. Los voxeles seleccionados fueron sumados para obtener los volúmenes totales. De forma similar se seleccionaron las áreas correspondientes al daño (voxeles hipointensos) por cada hipocampo y se obtuvieron los volúmenes de daño.

5.10 Análisis histológico

Se obtuvieron cortes coronales seriados de 5 μm de espesor a nivel de hipocampo ventral y dorsal. Los cortes obtenidos se montaron en laminillas previamente cubiertas con adhesivo poli-L-lisina (Sigma Aldrich). Para la evaluación del sitio de implante se utilizó tinción de Hematoxilina y Eosina, mientras que para cuantificar la preservación neuronal se utilizó NeuN.

5.10.1 Tinción de Hematoxilina y Eosina

La tinción de hematoxilina y eosina permite reconocer células en varios tipos de tejidos. La hematoxilina tiñe estructuras ácidas (basófilas) como los ácidos nucleicos y núcleos celulares en tono azul. La eosina tiñe componentes básicos

(acidófilos) como el citoplasma de las células en tonos rosas gracias a su naturaleza aniónica o ácida. El objetivo de usar esta tinción fue ubicar el sitio del implante del electrodo y el del sitio de lesión producida por el TCE.

Las laminillas desparafinadas y rehidratadas se incubaron en una solución de hematoxilina durante 10 minutos. Posteriormente las muestras se lavaron con agua destilada y se sumergieron en alcohol ácido. Después las laminillas fueron colocadas 30 minutos en Eosina para después pasarlas a un tren de deshidratación de alcoholes. Finalmente se colocaron en xilol y fueron montadas con resina sintética Entellan® (Merck Millipore) para ser observadas con un microscopio óptico.

5.10.2 Inmunohistoquímica

Para evaluar la sobrevivencia neuronal, después de hidratar las laminillas se colocaron en una solución de recuperación antigénica (Diva, Biocare Medical) durante 10 min a 120 °C. Después se lavaron en agua destilada y fueron incubadas en 3% H₂O₂ (10 min). Posteriormente se incubaron con suero normal de cabra (1:200, 30 min) y después en anticuerpo primario monoclonal de ratón dirigido a NeuN (1:200; Millipore) durante 72 hrs. Después las muestras fueron lavadas tres veces con un buffer de fosfatos 10X (NaOH + NaH₂PO₄; pH 7.4) e incubadas con anticuerpo secundario peroxidasa anti-ratón (1:200; 2 hrs; Vector Laboratories). Para revelar se utilizó una gota de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloro disuelta en 1 ml del buffer proporcionado en el Kit (Betazoid DAB Chromogen Kit, Biocare Medical). Finalmente, las laminillas fueron montadas en resina sintética Entellan® (Merck Millipore).

5.10.3 Cuantificación Neuronal

La densidad neuronal (mm³) de las regiones del GD, hilus, CA1 y CA3 del área dorsal del hipocampo se determinaron con el método de conteo fraccionario de West (West *et al.*, 1991). El análisis se realizó por cada una de las cuatro

regiones y por hemisferio en un mismo corte. Para este análisis se seleccionaron 3 cortes a intervalos de 5 cortes seriados hipocampales. La fracción de muestreo (*ssf*) correspondió a 1/5. Para la realización del cálculo se tomó la fracción de volumen de cada área del hipocampo evaluada $asf = \text{área (cuadro)} / \text{área (x,y)}$ y que correspondió al área de conteo (0.460 · 0.600 mm). La altura del disector (*h*) se calculó con relación al espesor del corte *t* (*t/h*). El número de células se calculó usando la siguiente fórmula:

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

En esta fórmula, Q- representa el número de células positivas en una fracción de volumen conocido de cada área del hipocampo (West *et al.*, 1991).

5.11 Análisis estadístico

Los datos fueron expresados en medias \pm error estándar (EE), se consideró significancia estadística como un valor de $p < 0.05$. Para la comparación de los valores del peso, capacidad sensoriomotora, UPD y espigas electrográficas, se utilizó la prueba T de Student o Mann Whitney dependiendo si los datos eran paramétricos o no paramétricos. Las comparaciones de los datos de volumetría y cuantificación neuronal fueron realizadas mediante la prueba ANOVA de dos vías seguida de un post-hoc de Tukey. En el caso de que los valores no fueran paramétricos, se utilizó la prueba Kruskal-Wallis seguida de un post-hoc de Dunn. Con el objetivo de comparar los valores de peso, capacidad sensoriomotora, UPD, volumen hipocampal y supervivencia neuronal de los cuatro grupos, se utilizó una prueba ANOVA de una vía seguida de un post-hoc de Tukey

6. Resultados

6.1 Experimento 1

6.1.1 Grupo Sham+SS

El grupo *Sham+SS+NeuN* tuvo un peso basal de 251 ± 3 g y mostró un incremento progresivo a lo largo del procedimiento experimental (Figura 17). Al día 30 de la craneotomía, los animales presentaron un peso de 384.4 ± 5 g. Con la

prueba del NS se identificó que los animales tuvieron un puntaje basal de 28 (Figura 18). Los días 2, 23 y 30 posteriores a la craneotomía sus puntajes no cambiaron (27.6 ± 0.12 , 27.6 ± 0.15 y 27.17 ± 0.34) respectivamente.

Mediante el registro del UPD se cuantificó que el grupo tuvo un promedio de 384.3 ± 18.09 μA (Figura 19). Derivado de la evaluación del UPD, el 100% de los animales desarrollaron crisis fase I en la escala de Racine (Racine, 1972). Bajo nuestras condiciones experimentales no se registraron post descargas. Cabe señalar que mediante la tinción de Nissl se identificó que el área de implante del electrodo fue en el hipocampo ventral en el 100% de los animales.

Los estudios con Resonancia Magnética *ex vivo* del grupo *Sham+SS+RM* permitieron obtener el volumen del hipocampo ipsilateral (51.9 ± 0.9 mm^3) y contralateral (52.6 ± 0.9 mm^3) a la craneotomía (Figura 20). Entre estos no hubo diferencias significativas ($p=0.99$). En el análisis por voxeles no se detectó daño en el hipocampo ipsilateral ni en el contralateral (Figura 21).

El análisis estereológico del grupo *Sham+SS+NeuN* permitió cuantificar el número de células inmunopositivas a NeuN en el hipocampo ipsilateral (HI) y contralateral (HC) a la craneotomía, en las regiones del GD (HI, 3316 ± 292 ; HC, 3659 ± 313), hilus (HI, 513.1 ± 26 ; HC, 421.2 ± 33), CA1 (HI, 1775 ± 133 ; HC, 1659 ± 138) y CA3 (HI, 1132 ± 82 ; HC, 1150 ± 61). Los resultados indicaron que no hubo diferencias significativas entre el hipocampo ipsilateral y contralateral ($p>0.05$), en ninguna de las regiones evaluadas (Figuras 22 y 23).

6.1.2 Grupo TCE+SS

El peso basal del grupo *TCE+SS+NeuN* no fue diferente ($p>0.05$) al del grupo *Sham+SS+NeuN* bajo las mismas condiciones experimentales (Figura 17). Sin embargo, desde el día 1 posterior al TCE hasta el final del protocolo al día 30, los animales presentaron menor peso a comparación del grupo *Sham+SS+NeuN*

($p < 0.05$).

Respecto al NS, el puntaje basal no fue diferente en comparación al del grupo *Sham+SS+NeuN* ($p > 0.05$). Al día 2 posterior al TCE, el grupo presentó una disminución en su puntaje del 55.15% en relación con el grupo *Sham+SS+NeuN* ($p < 0.001$). Los días 23 y 30 las disminuciones fueron del 39.57% ($p < 0.001$) y 38.68% ($p < 0.01$) respectivamente (Figura 18).

En comparación al valor del UPD del grupo *Sham+SS+NeuN* (Figura 19), el grupo presentó una disminución significativa del 63.3% ($p < 0.01$). Al día 30 posterior al TCE, el 57% de los animales presentaron un promedio de post descarga de 195.5 ± 46 s de duración con una frecuencia de 7.17 ± 0.3 espigas por segundo (Tabla 2). El 100% de los animales presentaron crisis fase 1 (Racine, 1972). Cabe señalar que mediante la tinción de Nissl se identificó que el área de implante del electrodo fue en el hipocampo ventral en el 100% de los animales.

En relación con las evaluaciones del volumen hipocampal (Figura 20), el hipocampo ipsilateral al TCE tuvo un volumen 18.72% menor en comparación al del grupo *Sham+SS+RM* ($p < 0.001$). Asimismo, el hipocampo contralateral al TCE tuvo un volumen 9.3% menor ($p < 0.01$). Al comparar los volúmenes del hipocampo ipsilateral y contralateral al TCE, se encontró que el primero presentó un volumen menor ($p < 0.001$).

Mediante los análisis por voxeles del grupo *TCE+SS+RM*, se determinó que a comparación del grupo *Sham+SS+RM*, el hipocampo ipsilateral al TCE presentó daño (0.1716 ± 0.080 mm³). Respecto a los hipocampos contralaterales no se identificó daño en ninguno de los dos grupos (Figura 21). Los promedios se muestran en la Tabla 3.

Los análisis estereológicos indicaron que en comparación al grupo *Sham+SS+NeuN*, el GD ipsilateral al TCE mostró un 33% ($p < 0.05$) menos de preservación neuronal. Por su parte el GD contralateral no mostró diferencias

significativas ($p=0.20$). Respecto al hilus del grupo *Sham+SS+NeuN*, el grupo presentó 77.68% y 51.8% menos células sobrevivientes en el hilus ipsilateral y contralateral al TCE, respectivamente ($p<0.001$). También el área CA1 ipsilateral al TCE mostró un 40% menos de células sobrevivientes ($p<0.01$) en comparación al grupo *Sham+SS+NeuN*, efecto que no se observa en el contralateral ($p=0.92$). En el área CA3 ipsilateral se identificó un 52% menos de preservación neuronal en comparación al grupo *Sham+SS+NeuN* ($p<0.001$). El área CA3 contralateral al TCE presentó 34% ($p<0.01$) menos células (Figuras 22 y 23).

El grupo *TCE+SS+NeuN* no presentó diferencias significativas en el número de células inmunopositivas a NeuN entre ambos hipocampos (Figuras 22 y 23), en ninguna de las estructuras analizadas: GD (HI, 2217 ± 168 ; HC, 2887 ± 268 ; $p=0.31$), hilus (HI, 114 ± 12 ; HC, 202 ± 24 ; $p=0.96$), CA1 (HI, 1062 ± 68 ; HC, 1332 ± 141 ; $p=0.11$), CA3 (HI, 536 ± 76 ; HC, 757 ± 69 ; $p=0.17$).

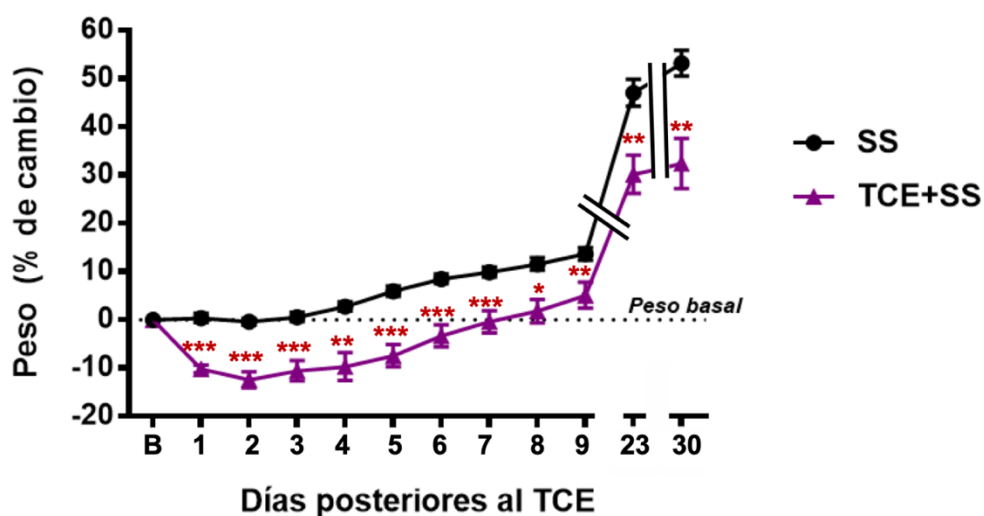


Figura 17. El TCE induce pérdida de peso. Se muestra el porcentaje de cambio en el peso de los animales de los grupos SS ($n=7$; negro) y TCE+SS ($n=7$; morado) en condiciones basales (B) y a lo largo del protocolo. Los valores representan la media \pm EE del porcentaje de cambio en el peso con respecto a su basal, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ (TCE+SS vs SS), T de Student.

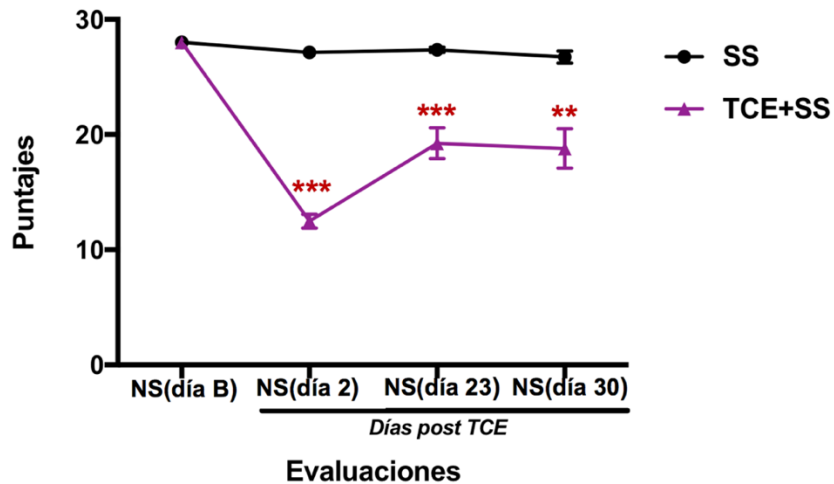


Figura 18. El TCE induce disminución en la capacidad sensoriomotora.

Se muestran los puntajes obtenidos en el NS de los grupos SS (n=7; negro) y TCE+SS (n=7; morado) en condiciones basales (B) y a los días posteriores 2, 23 y 30 del TCE. Los valores representan la media \pm EE del puntaje obtenido en el NS, **p<0.01, ***p<0.001 (TCE+SS vs SS), T de Student.

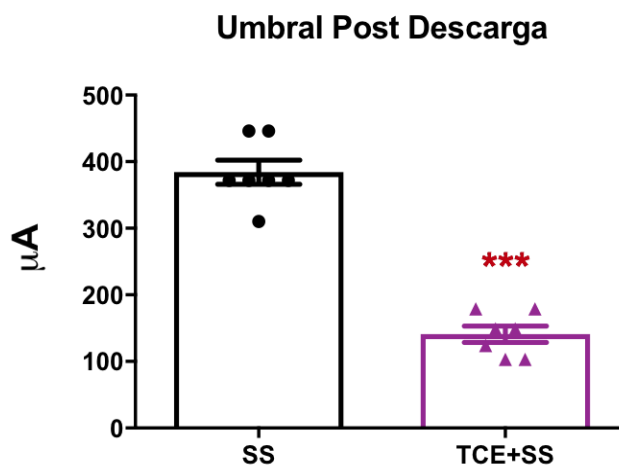


Figura 19. El TCE induce hiperexcitabilidad en el hipocampo ventral.

Se muestran los valores del UPD de los grupos SS (n=7; negro) y TCE+SS (n=7; morado) obtenidos en la medición del UPD a los 30 días del TCE. Los valores son expresados como la media \pm EE de los μ A requeridos para inducir el UPD, ***p<0.001 (TCE+SS vs SS), T de Student.

Tabla 2. Mediciones conductuales y electrográficas durante el registro del UPD

Grupo Experimental	Cambios Conductuales	Duración de PD(s)	Frecuencia de las espigas (Hz)
SS	Fase 1 (n=7)	0	0
TCE+SS	Fase 1 (n=7)	195.5±46.6 (n=4)*	7.17±0.33 (n=4)*

Evaluaciones conductuales y electrográficas realizadas durante la determinación del UPD. Se muestran las medias ± EE en segundos o Hz. Entre paréntesis se muestra el número de animales que presentaron la fase y post descarga (PD), *p<0.01 (TCE+SS vs SS), Mann-Whitney.

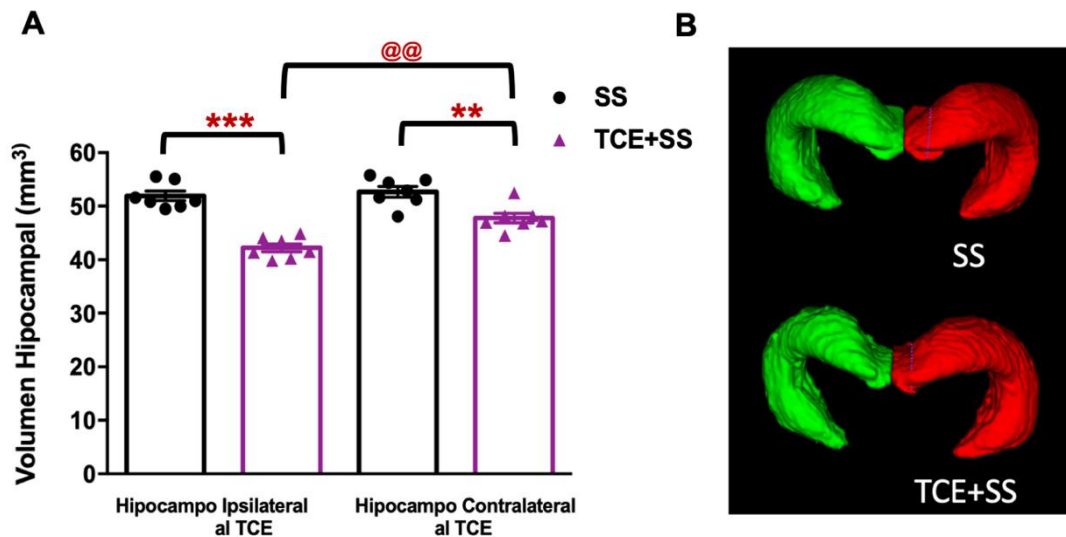


Figura 20. El TCE disminuye el volumen hipocampal en ambos hemisferios.

Se muestran los valores obtenidos en la cuantificación del volumen hipocampal mediante Resonancia Magnética *ex vivo*. La imagen está pesada a T2 y la evaluación se realizó 30 días después de la inducción del TCE. **(A)** Los volúmenes del hipocampo ipsilateral y contralateral al TCE de los grupos SS (n=7; negro) y TCE+SS (n=7; morado) se expresan como la media (mm³) ± EE, **p<0.01, ***p<0.001 con respecto al grupo SS, @@p<0.01 con respecto al hipocampo contralateral, ANOVA de dos vías, Post Hoc de Tukey. **(B)** Se presentan imágenes representativas de la volumetría hipocampal, obtenida de las imágenes de Resonancia Magnética *ex vivo* de un cerebro de un animal del grupo SS y uno del grupo TCE+SS. El hipocampo ipsilateral a la lesión se marca con color verde mientras que el hipocampo contralateral con rojo.

Tabla 3. Datos cualitativos del análisis por voxeles

Grupo Experimental	Promedios del daño hipocampal (mm ³)	
	Hipocampo Ipsilateral al TCE (n)	Hipocampo Contralateral al TCE (n)
SS	0 (0/5)	0 (0/5)
TCE+SS	0.1716 ± 0.08 (4/6) = 66.6%	0 (0/6)

Análisis por voxeles en imágenes de Resonancia Magnética *ex vivo* pesada a T2. Los valores se expresan como medias (mm³) ± EE. Entre paréntesis se muestran los animales que presentaron daño entre la n total por grupo.

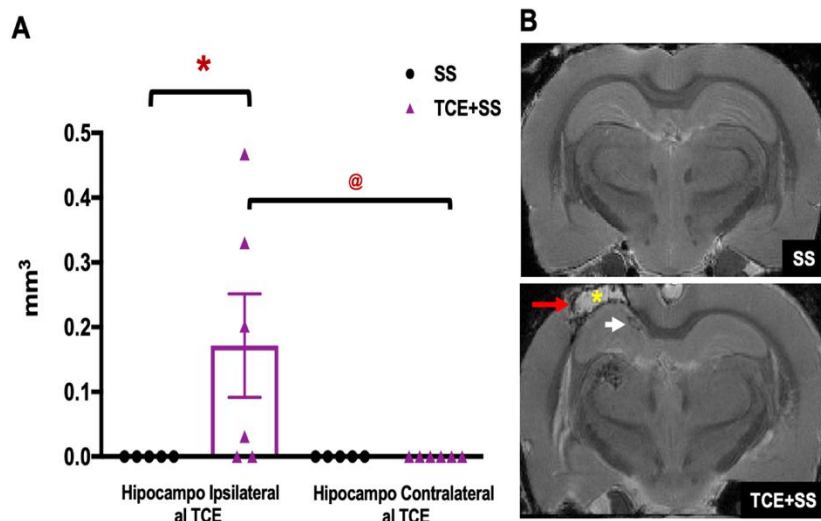


Figura 21. El TCE induce daño neuronal hipocampal en el hemisferio ipsilateral al TCE. Se muestran los valores obtenidos en la cuantificación por voxeles del daño hipocampal en imágenes de Resonancia Magnética *ex vivo*. La imagen está pesada a T2 y la evaluación se realizó 30 días después de la inducción del TCE. El daño en el hipocampo ipsilateral y contralateral al TCE de los grupos SS (n=5; negro) y TCE+SS (n=6; morado), se expresan como la media (mm³) ± EE, *p<0.05 (TCE+SS vs SS), @p<0.05 con respecto al hipocampo contralateral, Kruskal-Wallis, Post Hoc de Dunn. **(B)** Se presentan imágenes representativas de Resonancia Magnética *ex vivo* de un cerebro de un animal del grupo SS y uno del grupo TCE+SS. El hemisferio ipsilateral a la lesión se señala con una flecha roja. El edema en el sitio de lesión se observa como hiperintensidad (asterisco amarillo) y la pérdida de tejido como hipointensidad (flecha blanca).

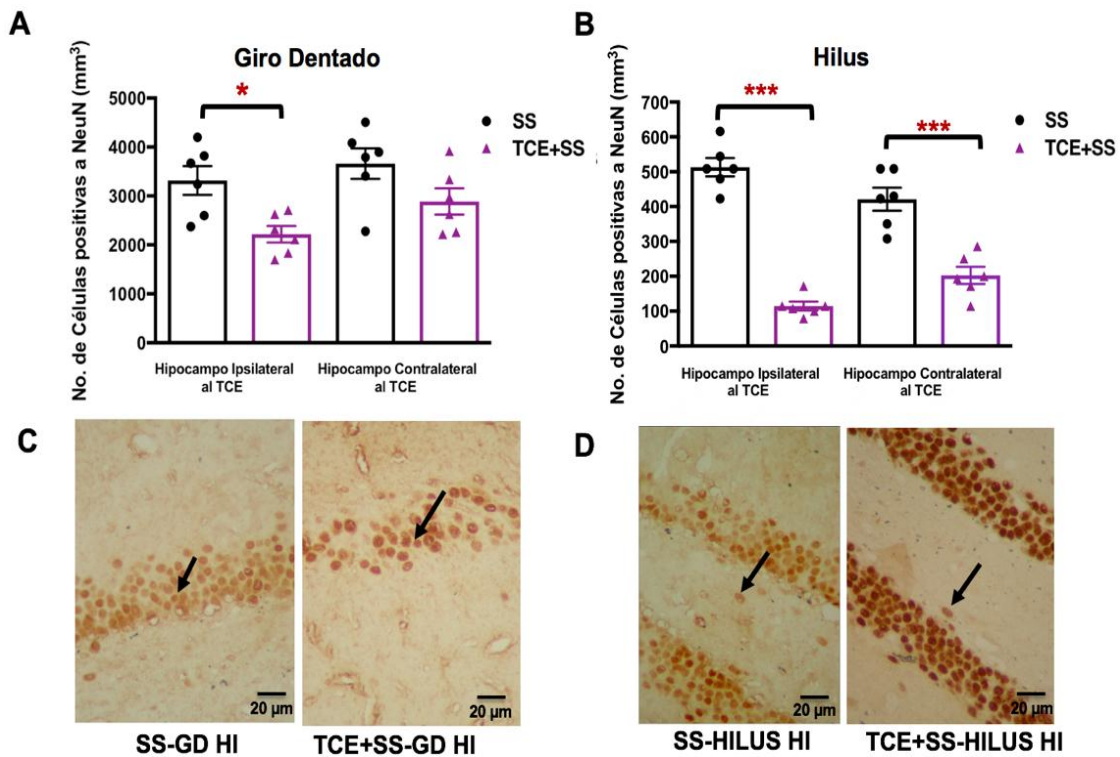


Figura 22. El TCE induce muerte neuronal en el Giro Dentado e hilus.

Se presentan los valores de las células positivas a NeuN en las áreas del GD **(A)** e hilus **(B)** del hipocampo dorsal ipsilateral y contralateral en los grupos SS (n=6; negro) y TCE+SS (n=6; morado). Los valores representan la media \pm EE de la preservación neuronal por mm^3 , * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ (TCE+SS vs SS), ANOVA de dos vías, Post Hoc de Tukey. En el panel inferior se muestran microfotografías representativas del GD **(C)** e hilus **(D)** del hipocampo dorsal ipsilateral al TCE, de los grupos SS y TCE+SS. Se señalan con flechas negras las células inmunopositivas a NeuN.

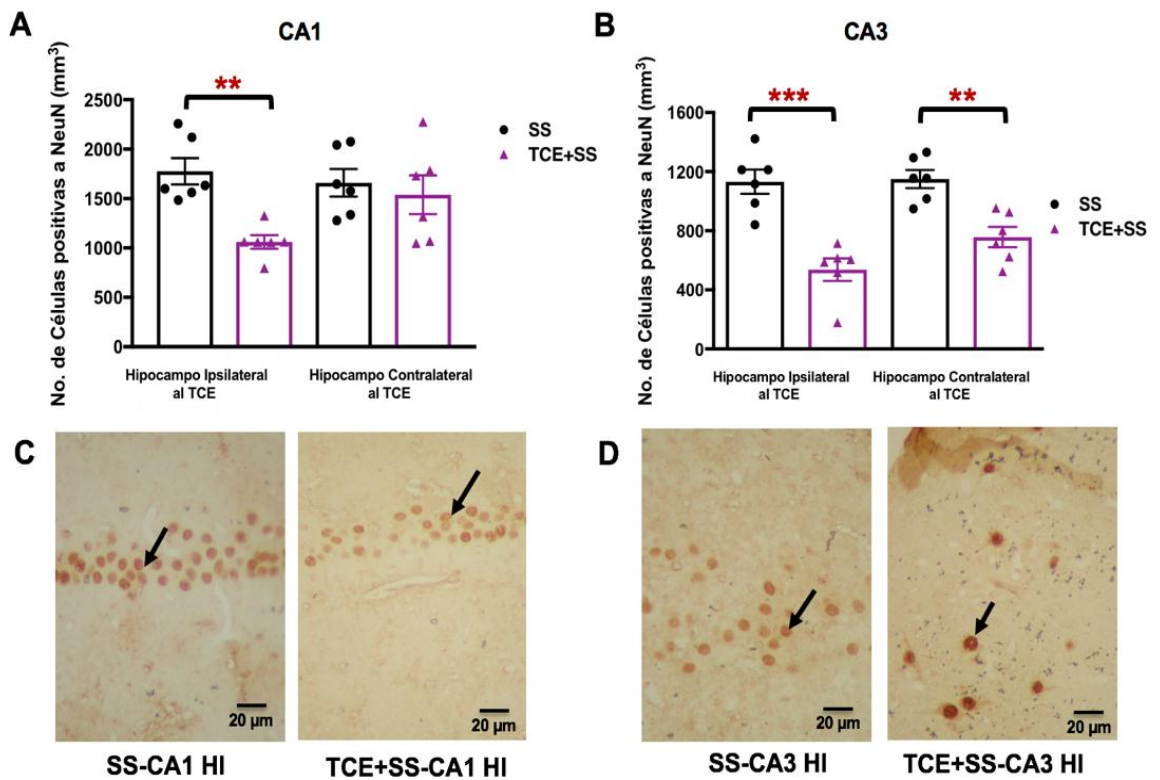


Figura 23. El TCE induce muerte neuronal en CA1 y CA3. Se muestran los valores de las células positivas a NeuN en las áreas CA1 (A) y CA3 (B) del hipocampo dorsal ipsilateral y contralateral al TCE, en los grupos SS (n=6; negro) y TCE+SS (n=6; morado). Los valores representan la media \pm EE de la preservación neuronal por mm^3 , ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (TCE+SS vs SS), ANOVA de dos vías, Post Hoc de Tukey. En el panel inferior se muestran microfotografías representativas de CA1 (C) y CA3 (D) del hipocampo dorsal ipsilateral al TCE, en los grupos SS y TCE+SS. Se señalan con flechas negras las células inmunopositivas a NeuN.

6.1.3 Discusión del Experimento 1

Los resultados del experimento 1 mostraron que la inducción del TCE disminuyó el peso y la capacidad sensoriomotora de los animales durante todo el protocolo. Además, al día 30 posterior al TCE se identificó que los animales presentaron disminución en el volumen, daño, muerte neuronal e hiperexcitabilidad hipocampal.

La disminución en el peso de los animales provocado por el TCE, concuerda con lo reportado en la literatura tanto en estudios en animales (Kharatishvili et al., 2006; Roe y Rothwell., 1997; Lyeth et al., 1990) como en pacientes (Crenn et al., 2014). Una explicación a la pérdida de peso sostenida es el hipermetabolismo que va del 87 al 200% de incremento en el gasto energético y la anorexia asociada que se presenta frecuentemente después de una lesión y/o inflamación (Foley et al., 2008). Con el objetivo de esclarecer la pérdida de peso, Roe y Rothwell (1997) demostraron en un grupo de animales que sufrieron un TCE, que ésta era independiente de la ingesta de comida y que estaba más relacionada con el hipermetabolismo por la activación del sistema simpático periférico. La modificación en la alimentación también puede deberse a alteraciones en el hipotálamo. Esta estructura se relaciona ampliamente con la ingesta de comida, apetito y control del peso corporal (Liangyou, 2013; Minokoshi et al., 2014). Se sabe que después de un TCE el hipotálamo presenta alteraciones en su función. Por ejemplo, después de padecer un TCE los pacientes presentan niveles anormales en hormonas como la testosterona y T₄ entre otras (Rosario et al., 2013), sin embargo, son necesarios más experimentos para apoyar esta hipótesis.

Respecto al NS de los animales, nuestros resultados coinciden con la literatura. En ésta se describe que la capacidad sensoriomotora de los animales disminuye a las 24 h posteriores al TCE, y que no regresa a valores normales hasta el segundo mes posterior a la lesión (McIntosh et al., 1989; Pierce et al., 1998). El daño neuromotor también se observa en la clínica, ya que hasta dos años posteriores del TCE, los pacientes siguen presentado anomalías en la examinación neuromotora (Walker y Pickett, 2007). Una posible explicación de

este resultado es que posterior a un TCE se podría presentar daño en alguna de las conexiones que existen entre la corteza, núcleos subcorticales, cerebelo, tallo cerebral y médula espinal, las cuales coordinan el movimiento del músculo esquelético (Purves et al., 2004). Una alteración de cualquiera de estas áreas y/o conexiones aunado a la atrofia de la corteza neuromotora inducida por el TCE (Smith et al., 1997), podría afectar la capacidad sensoriomotora de los animales.

Mediante el registro del UPD se identificó que el TCE severo indujo hiperexcitabilidad neuronal en el hipocampo ventral al día 30 posterior a la lesión. Esto coincide con estudios previos *in vitro* que encontraron hiperexcitabilidad hipocampal desde una semana hasta 7 meses posteriores al TCE (Neuberger et al., 2014; D'Ambrosio et al., 2005; Santhakumar et al., 2000; 2001). Asociados a estos cambios, nuestros datos indicaron que el TCE induce postdescargas electrográficas que van acompañadas de crisis motoras fase I en la escala de Racine (Racine, 1972). De manera similar, Bao y colaboradores (2011) administraron dosis subumbrales del fármaco proconvulsivante pentilenotetrazol (PTZ) a animales a los que se les indujo un TCE dos semanas antes. Los animales presentaron crisis motoras fase I (80% de los animales), II (10% de los animales) y III (30% de los animales) de la escala de Racine (1978).

Una explicación a esta hiperexcitabilidad se asocia con la hipótesis de las células en canasta silentes (Sloviter, 1994). Esta propone que al morir las células de hilus se induce una denervación excitatoria de las interneuronas. Esto lleva a una inhibición hipoactiva de las células granulares, que a su vez produce la hiperexcitabilidad del GD. Aunado a esto, las células hilares sobrevivientes a un TCE presentan hiperexcitabilidad. Como ejemplo, en un estudio *in vivo* se encontró que al estimular la vía perforante, las células hilares presentaban descargas de trenes de potenciales de acción de mayor duración (Santhakumar et al., 2000).

La reorganización de los circuitos hipocampales también participa en la hiperexcitabilidad postraumática. Se sabe que después de la muerte celular hipocampal, las células granulares proyectan axones colaterales aberrantes hacia el hilus, capa molecular y capa granular del GD (Nadler et al., 1983; Santhakumar

et al., 2001; Wenzel et al., 2000). Estas colaterales aberrantes hacen sinapsis con otras células granulares, lo cual produce un nuevo circuito glutamatérgico que podría volver al hipocampo más hiperexcitable (Wenzel et al., 2000).

En relación con las evaluaciones de las imágenes de Resonancia Magnética *ex vivo*, los resultados indicaron que el TCE induce una disminución en el volumen hipocampal ipsilateral y contralateral al TCE. Por otra lado, la medición del daño mediante voxels indicó que solo el hipocampo ipsilateral al sitio de lesión presentó daño. Esto coincide con lo descrito anteriormente por Bramlett y colaboradores (1997). A diferencia de nuestros datos que indican que la atrofia ocurre de forma bilateral, otros estudios han encontrado que sólo el hipocampo ipsilateral al TCE presenta disminución en el volumen (Immonen et al., 2009). Sin embargo, estudios en pacientes coinciden en que la atrofia es bilateral (Ariza et al., 2006; Tomaiuolo et al., 2004). Entre las posibles explicaciones a la disminución en el volumen hipocampal, está la pérdida neuronal hipocampal progresiva. Esta se presenta desde las primeras horas hasta meses posteriores a un TCE (Smith et al., 1997; Cortez et al., 1989). También existe una pérdida significativa en el número de sinapsis por unidad de volumen de áreas hipocampales como CA1 y GD después de un TCE (Scheff et al., 2005; Gao et al., 2011). Las sinapsis, que forman parte del neuropilo aportan un porcentaje importante del volumen hipocampal. Por lo que no se descarta que daño en el neuropilo (dendritas, axones, procesos gliales, sinapsis) podría contribuir en la disminución del volumen hipocampal (Cobb et al., 2006).

En estudios previos se encontró que el daño a células del GD ipsilateral al TCE inicia desde las primeras 24 h posteriores a la lesión (Cortez et al., 1989; Colicos y Dash, 1996). Por lo que los resultados coinciden en que la disminución en el número de células granulares es exclusiva en el hipocampo ipsilateral (Figura 22). En el caso de esta estructura, se ha encontrado que la pérdida neuronal puede deberse tanto a necrosis como apoptosis (Rink et al., 1995; Colicos y Dash, 1996). En evaluaciones en las primeras 48 h posteriores al TCE, se encontró que células del GD presentaban características morfológicas de apoptosis como son las células encogidas con cromatina condensada y

segmentación nuclear (Colicos y Dash, 1996). También se observaron mitocondrias hinchadas, una morfología típica de la necrosis (Rink et al., 1995).

Respecto al hilus, los datos coinciden con diversos estudios en los que se ha encontrado que la muerte neuronal se presenta en el hipocampo ipsilateral y/o en el contralateral (Bramlett et al., 1997; Smith et al., 1997; Cortez et al., 1989; Grady et al., 2003). Es importante señalar que estas células son las más vulnerables después de un TCE. Mediante análisis histológicos realizados 1 minuto después de la inducción del TCE, se ha cuantificado que las células hilares son las primeras en morir (Toth et al., 1997). Por lo que se considera que los procesos de muerte iniciales son dependientes de la presión hidráulica causada por el impacto. Aunado a esto, se sabe que la pérdida celular en el hilus está asociada a la hiperexcitabilidad hipocampal (Lowenstein et al., 1992). Por ejemplo, animales que desarrollan epilepsia post traumática presentan una menor población de células hilares en comparación a animales que no la presentan (Kharatishvili et al., 2006). Esto coincide con los datos de hiperexcitabilidad hipocampal, en donde se observó una disminución en el UPD.

En relación con el área CA1 del hipocampo, los resultados coinciden con la literatura. Se sabe que desde la primera semana después de un TCE, la pérdida de células piramidales es ipsilateral y progresiva hasta 6 meses después del TCE (Cortez et al., 1989; Bigler y Maxwell, 2011; Maxwell et al., 2003). Estudios han encontrado que estas células piramidales son especialmente sensibles a la isquemia (Bonnekoh et al., 1997), pero mucho más resistentes al daño mecánico inicial inducido por el TCE (Toth et al., 1997). Por lo que la disminución en el número de estas células después de un TCE, podría estar más relacionado con los procesos isquémicos que se presentan asociados al TCE.

En el área CA3 encontramos que el daño se presenta en el hipocampo ipsilateral y contralateral al TCE. En la literatura se reporta que la pérdida neuronal en CA3 se presenta solamente en el hipocampo ipsilateral al TCE (Bramlett et al., 1997; Smith et al., 1997; Cortez et al., 1989). Sin embargo, en los estudios reportados la intensidad del TCE es de leve a moderada. Solo en un estudio realizado por Grady y colaboradores (2003) se utilizó un TCE de intensidad

severo. En este estudio se observó que a dos semanas posteriores al TCE, se presentó una tendencia en el área CA3 contralateral a presentar muerte neuronal. Por lo que es posible considerar que en nuestro trabajo, el daño bilateral se debe a que el TCE fue severo y a que los estudios histológicos se realizaron 4 semanas después de la lesión. Respecto a los posibles mecanismos involucrados con la muerte celular en esta área, se sabe que en el primer minuto después del TCE las células de CA3 más distantes entre sí mueren por necrosis (Toth et al., 1997). Minutos después el primer impacto, las células mueren por un proceso apoptótico (Rink et al., 1995).

Respecto a estos resultados podemos concluir que la inducción del TCE disminuye el peso y la capacidad sensoriomotora de los animales durante todo el protocolo. Además, que al día 30 posterior al TCE se presenta disminución en el volumen, daño, muerte neuronal e hiperexcitabilidad hipocampal.

6.2 Experimento 2

6.2.1 Grupo Sham+CG

El peso basal del grupo *Sham+CG+NeuN* no fue diferente al del grupo *Sham+SS+NeuN* ($p>0.05$) bajo las mismas condiciones experimentales (Figura 24). Durante el resto de las evaluaciones el peso fue similar entre ambos grupos ($p>0.05$).

El análisis del NS mostró que no existieron diferencias significativas ($p>0.05$) en la capacidad sensoriomotora en comparación al grupo *Sham+SS+NeuN*, en ninguna de las evaluaciones realizadas (Figura 25). En el valor del UPD no se encontraron diferencias ($p=0.93$) entre estos grupos (Figura 26). Derivado de la evaluación del UPD, el 100% de los animales desarrollaron crisis fase I en la escala de Racine (Racine, 1972) y bajo nuestras condiciones experimentales no presentaron post descargas (Ver Tabla 4). Es importante indicar que en el 100% de los animales, el electrodo se ubicó en el hipocampo ventral.

En relación con las evaluaciones del volumen hipocampal, no hubo diferencias entre los hipocampos ipsilateral y contralateral a la craneotomía ($p>0.05$), respecto al grupo *Sham+SS+RM* (Figura 27). Mediante los análisis de

daño hipocampal por voxeles, se determinó que no hubo daño en el hipocampo ipsilateral ni contralateral (Figura 28). Los promedios se muestran en la Tabla 5. Los análisis estereológicos indicaron que en comparación al grupo *Sham+SS+NeuN*, las regiones del GD, hilus, CA1 y CA3 no mostraron diferencias ($p>0.05$) respecto a la cantidad de células inmunopositivas a NeuN (Figuras 29-32).

6.2.2 Grupo TCE+CG

En las mismas condiciones experimentales no se encontraron diferencias en el peso basal a comparación de los grupos *Sham+SS+NeuN* y *TCE+SS+NeuN* ($p>0.05$). Desde el primer día hasta el día 7 posterior al TCE, se observó una disminución de peso significativa con relación al grupo *Sham+SS+NeuN* ($p<0.01$). A partir del día 8 posterior al TCE ya no se observó esta diferencia ($p>0.05$). Respecto al grupo *TCE+SS+NeuN*, el peso fue similar durante todo el protocolo (Figura 24).

Respecto al NS, el puntaje basal no fue diferente en comparación al del grupo *Sham+SS+NeuN* ni al del grupo *TCE+SS+NeuN* ($p>0.05$). Al día 2 posterior al TCE, en relación con el grupo *Sham+SS+NeuN*, hubo 35% menos ($p<0.001$) capacidad sensoriomotora de los animales. Sin embargo, en los días 23 y 30 posteriores al TCE, los puntajes de los grupos fueron similares ($p>0.05$). En comparación al grupo *TCE+SS+NeuN*, se cuantificaron puntajes más elevados desde el día 2 posterior al TCE ($p<0.001$) y durante el resto de las evaluaciones (Figura 25).

En la evaluación del UPD, no se encontraron diferencias ($p=0.21$) respecto al grupo *Sham+SS+NeuN* (Figura 26). En relación al análisis electrográfico (Ver Tabla 4), se cuantificó que el 71% de los animales presentaron una post descarga de 243 ± 43 s de duración, con una frecuencia de espigas de 7.38 ± 01 por segundo. Durante la estimación del UPD, 71% de los animales presentaron crisis fase I, mientras que 28% tuvieron crisis fase IV en la escala de Racine (Racine., 1972). Respecto al grupo *TCE+SS+NeuN*, se encontró que el UPD fue 54.7% mayor ($p<0.001$). Por otro lado, la duración de la post descarga y la frecuencia de las

espigas presentaron características similares a las del grupo *TCE+SS+NeuN* ($p>0.05$). Es importante indicar que en el 100% de los animales, el electrodo se ubicó en el hipocampo ventral.

En relación con las evaluaciones del volumen por Resonancia Magnética, el hipocampo ipsilateral al TCE presentó 14.13% menos volumen respecto al grupo *Sham+SS+RM* ($p<0.001$). Este efecto no se presentó en el hipocampo contralateral ($p=0.38$). Respecto al grupo *TCE+SS+RM*, no se encontraron diferencias significativas en el volumen del hipocampo ipsilateral ($p=0.47$) ni contralateral ($p=0.38$) al TCE (Figura 27). En la evaluación por voxeles se encontró daño en el hipocampo ipsilateral al TCE, el cual no fue diferente al del grupo *Sham+SS+RM* ($p=0.15$). En el hipocampo contralateral al TCE no se identificó daño (Ver Tabla 5). Respecto al grupo *TCE+SS+RM*, no se encontraron diferencias ($p>0.05$) en el daño del hipocampo ipsilateral ni contralateral al TCE (Figura 28).

En relación con los análisis estereológicos, no se encontraron diferencias ($p>0.05$) en ninguna de las áreas hipocámpales evaluadas respecto al grupo *Sham+SS+NeuN*. En comparación al grupo *TCE+SS+NeuN*, el número de células inmunopositivas a NeuN en el GD ipsilateral y contralateral al TCE (Figura 29) no fue diferente ($p>0.05$). Respecto al hilus del grupo *TCE+SS+NeuN*, se encontró una mayor ($p<0.001$) preservación neuronal tanto en el hipocampo ipsilateral como en el contralateral al TCE (Figura 30). En el área CA1 ipsilateral al TCE, se encontraron 39% ($p<0.01$) más células que en la del grupo *TCE+SS+NeuN* (Figura 31), efecto que no se encuentra en CA1 contralateral ($p=0.17$). En el área CA3 ipsilateral al TCE (Figura 32), se cuantificó un 49.5% más de preservación neuronal comparación al grupo *TCE+SS+NeuN* ($p<0.001$). En el CA3 contralateral al TCE, el número de células fue 32.2% mayor ($p<0.05$).

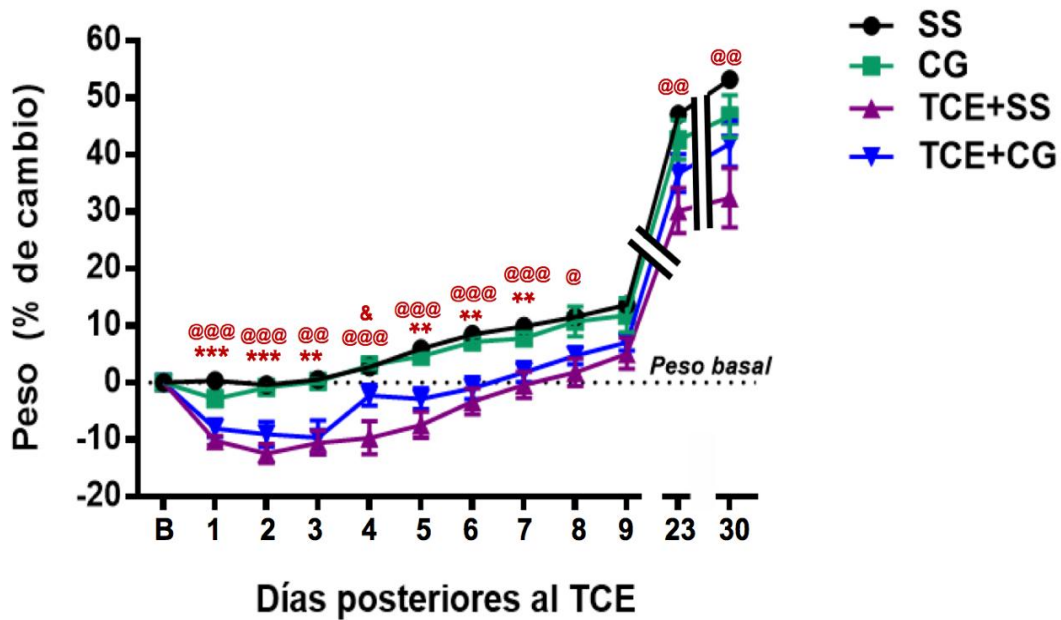


Figura 24. La administración de CG no recupera la pérdida de peso inducida por el TCE. Se muestra el peso de los animales en los grupos SS (n=7; negro), TCE+SS (n=7; morado), CG (n=7; verde) y TCE+CG (n=7; azul) en condiciones basales (B) y a lo largo del protocolo. Los valores representan la media \pm EE del porcentaje de cambio de peso con respecto a su basal, @p<0.05, @@p<0.01, @@@p<0.001 (TCE+SS vs SS); **p<0.01, ***p<0.001 (TCE+CG vs SS); &p<0.05 (TCE+CG vs TCE+SS), ANOVA de una vía, Post Hoc de Tukey.

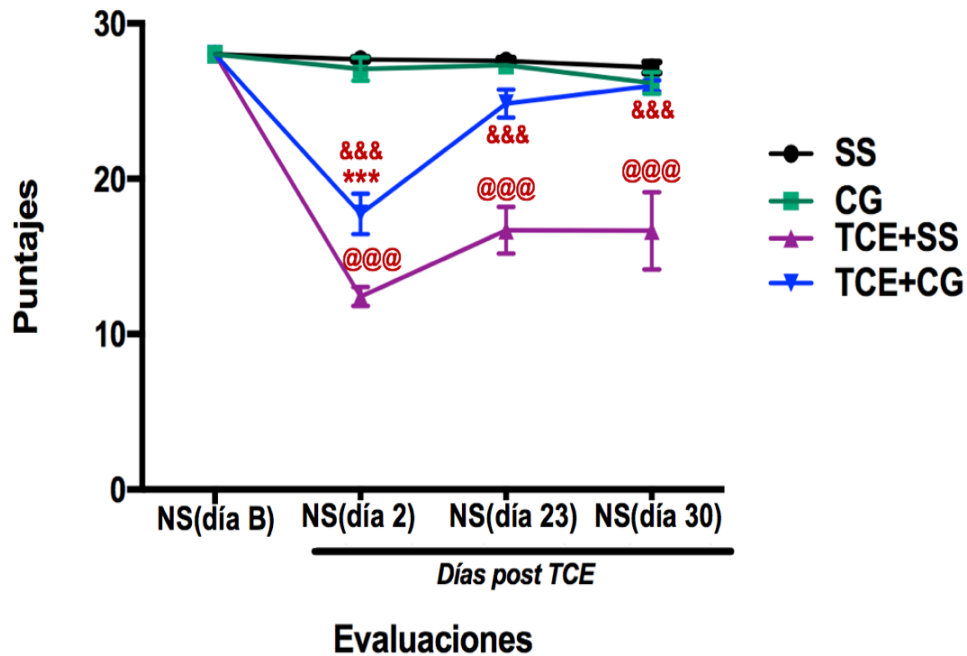


Figura 25. El tratamiento con CG mejora la capacidad sensoriomotora al día 23 y 30 del TCE. Se muestran los puntajes obtenidos en el NS de los grupos SS (n=7; negro), TCE+SS (n=7; morado), CG (n=7; verde) y TCE+CG (n=7; azul) en condiciones basales (B) y a los días posteriores 2, 23 y 30 del TCE. Los valores representan la media \pm EE del puntaje obtenido en el NS, @@@p<0.001 (TCE+SS vs SS), ***p<0.001 (TCE+CG vs SS), &&&p<0.001 (TCE+CG vs TCE+SS), ANOVA de una vía, Post Hoc de Tukey.

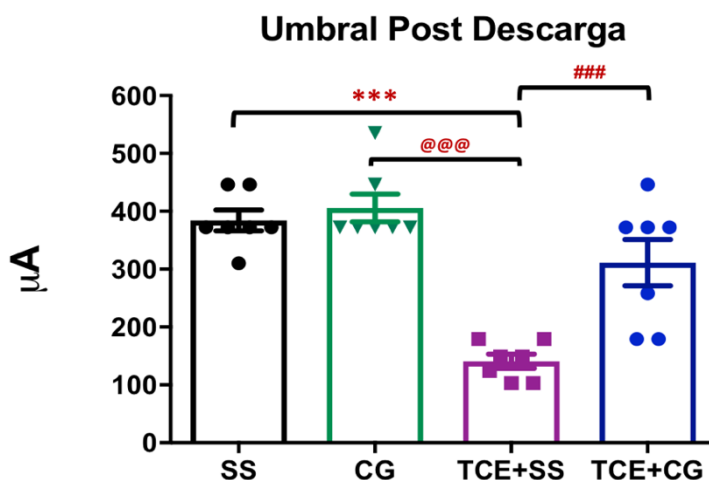


Figura 26. El tratamiento con CG induce un mayor valor de UPD a los 30 días posteriores de un TCE. Se presentan los valores del UPD de los grupos SS (n=7; negro), TCE+SS (n=7; morado), CG (n=7; verde) y TCE+CG (n=7; azul) obtenidos en la medición del UPD a los 30 días del TCE. Los valores son expresados como la media \pm EE de los μ A requeridos para inducir el UPD, ***p<0.001 con respecto al grupo SS; @@@p<0.001 con respecto al grupo CG; ###p<0.001 con respecto al grupo TCE+SS, ANOVA de una vía, Post Hoc de Tukey.

Tabla 4. Mediciones conductuales y electrográficas durante registro del UPD

Grupo Experimental	Cambios Conductuales	Duración de PD (s)	Frecuencia de espigas (Hz)
SS	Fase 1 (n=7)	0	0
CG	Fase 1 (n=7)	0	0
TCE+SS	Fase 1 (n=7)	195.5 \pm 46.6 (n=4)*	7.17 \pm 0.33 (n=4)*
TCE+CG	Fase 1 (n=5) 4(n=2)	243 \pm 43 (n=5)	7.38 \pm 01 (n=5)

Evaluaciones conductuales y electrográficas realizadas durante la determinación del UPD. Se muestran las medias \pm EE en segundos o Hz. Entre paréntesis se indican el número de animales que presentaron la fase y post descarga (PD), *p<0.01 (TCE+SS vs SS), Mann Whitney; p>0.05 (PD: TCE+CG vs TCE+SS), Mann Whitney; p>0.05 (Espigas: TCE+CG vs TCE+SS), T Student.

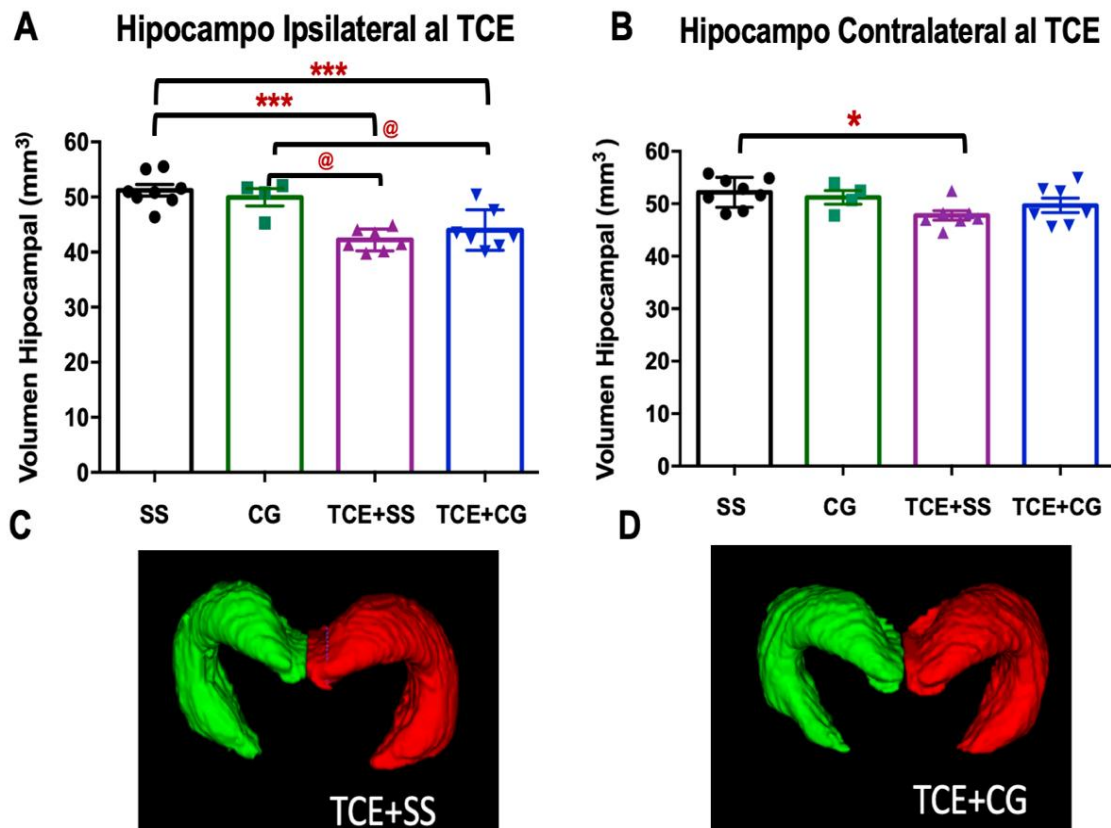


Figura 27. El tratamiento subcrónico con CG no disminuye la atrofia hipocampal inducida por el TCE. Se muestran los valores obtenidos en la cuantificación del volumen hipocampal mediante Resonancia Magnética *ex vivo*. La imagen está pesada a T2 y la evaluación se realizó 30 días después de la inducción del TCE. Los volúmenes del hipocampo ipsilateral (**A**) y contralateral (**B**) al TCE de los grupos SS (n=8; negro), CG (n=4; verde), TCE+SS (n=7; morado) y TCE+CG (n=7; azul) se expresan como la media (mm³) ± EE, *p<0.05, ***p<0.001 con respecto al grupo SS; @p<0.05 con respecto al grupo CG, ANOVA de una vía, Post Hoc de Tukey. En el panel inferior se presentan imágenes representativas de la volumetría hipocampal, obtenida de las imágenes de Resonancia Magnética *ex vivo* de un cerebro de un animal del grupo TCE+SS (**C**) y uno del grupo TCE+CG (**D**). El hipocampo ipsilateral a la lesión se marca con color verde mientras que el hipocampo contralateral con rojo.

A Daño en el Hipocampo Ipsilateral al TCE **B** Daño en el Hipocampo Contralateral al TCE

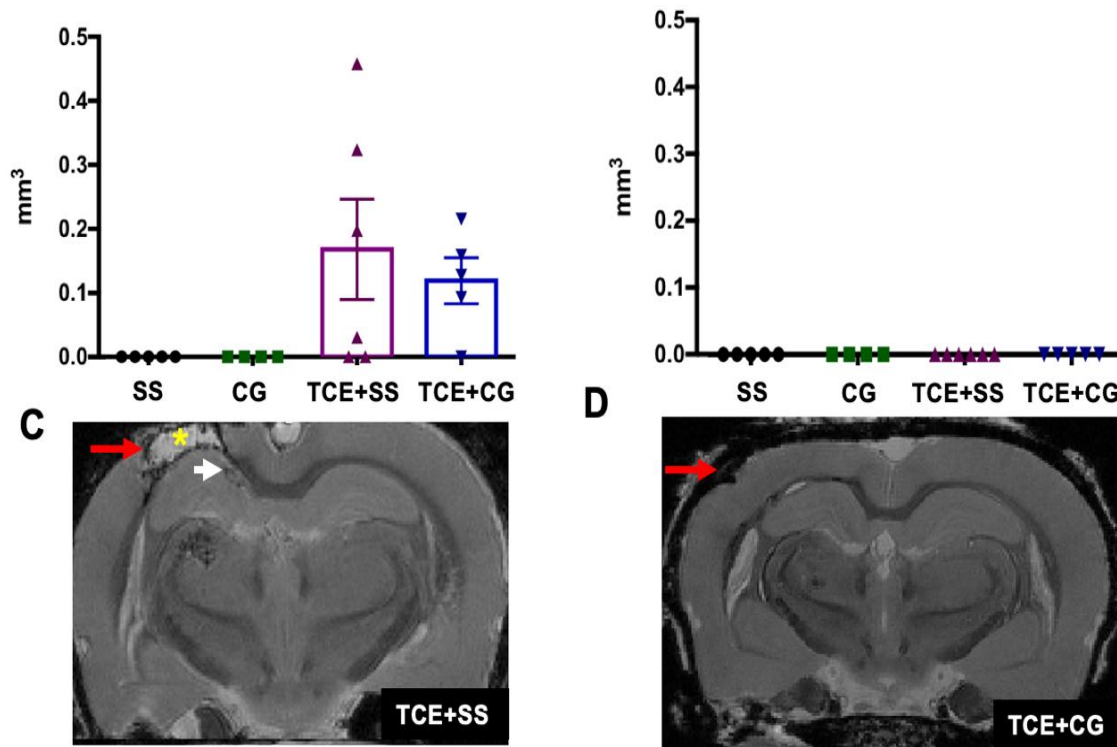


Figura 28. El tratamiento con CG no evita el daño hipocampal ipsilateral al TCE. Se muestran los valores obtenidos en la cuantificación por voxeles del daño hipocampal en imágenes de Resonancia Magnética *ex vivo*. La imagen está pesada a T2 y la evaluación se realizó 30 días después de la inducción del TCE. El daño en los hipocampos ipsilateral **(A)** y contralateral **(B)** de los grupos SS (n=5; negro), CG (n=4; verde), TCE+SS (n=6; morado) y TCE+CG (n=5; azul) se expresan como la media (mm³) ± EE. Kruskal-Wallis, Post Hoc de Dunn. En el panel inferior se presentan imágenes representativas de Resonancia Magnética *ex vivo* de un cerebro de un animal del grupo TCE+SS **(C)** y uno del grupo TCE+CG **(D)**. El hemisferio ipsilateral a la lesión se señala con una flecha roja. El edema en el sitio de lesión se observa como hiperintensidad (asterisco amarillo) y la pérdida de tejido como hipointensidad (flecha blanca).

Tabla 5. Datos cualitativos del análisis por voxeles

Promedios del daño hipocampal (mm³)		
Grupo Experimental	Hipocampo Ipsilateral (n)	Hipocampo Contralateral (n)
SS	0 (0/5)	0 (0/5)
CG	0 (0/4)	0 (0/4)
TCE+SS	0.1716 ± 0.08 (4/6) = 66.6%	0 (0/6)
TCE+CG	0.1215 ± 0.03 (6/7) = 85.7%	0 (0/5)

Análisis por voxeles en imágenes de Resonancia Magnética *ex vivo* pesada a T2. Los valores se expresan como medias (mm³) ± EE. Entre paréntesis se muestran los animales que presentaron daño entre la n total por grupo.

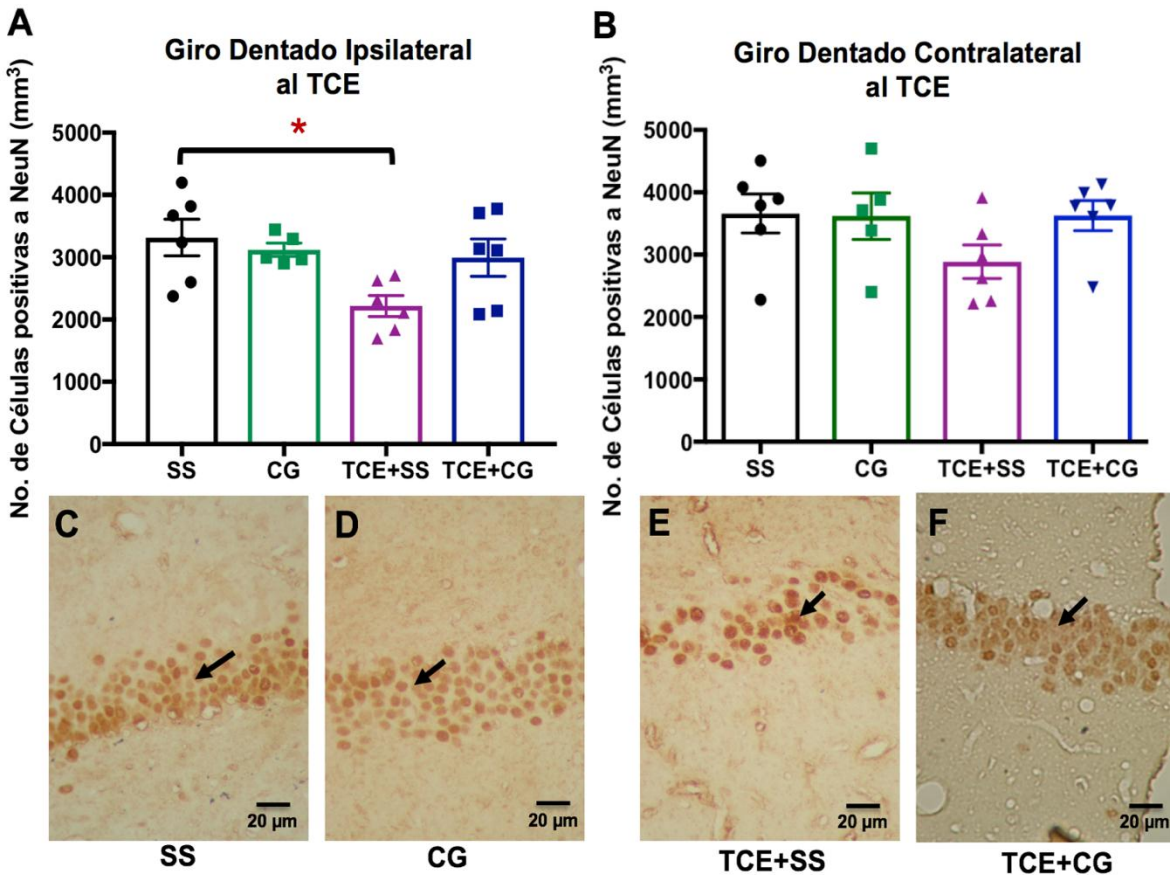


Figura 29. El CG incrementa la sobrevivencia neuronal en el GD ipsilateral al TCE. Se muestran los valores de las células positivas a NeuN en las áreas del GD ipsilateral al TCE (**A**) y contralateral (**B**) del hipocampo dorsal en los grupos SS (n=6; negro), CG (n=5; verde), TCE+SS (n=6; morado) y TCE+CG (n=6; azul). Los valores representan la media ± EE de la preservación neuronal por mm³, *p<0.05 con respecto al grupo SS, ANOVA de una vía, Post Hoc de Tukey. En el panel inferior se muestran microfotografías representativas del GD ipsilateral al TCE del hipocampo dorsal de los grupos SS (**C**), CG (**D**), TCE+SS (**E**) y TCE+CG (**F**). Se señalan con flechas negras las células inmunopositivas a NeuN.

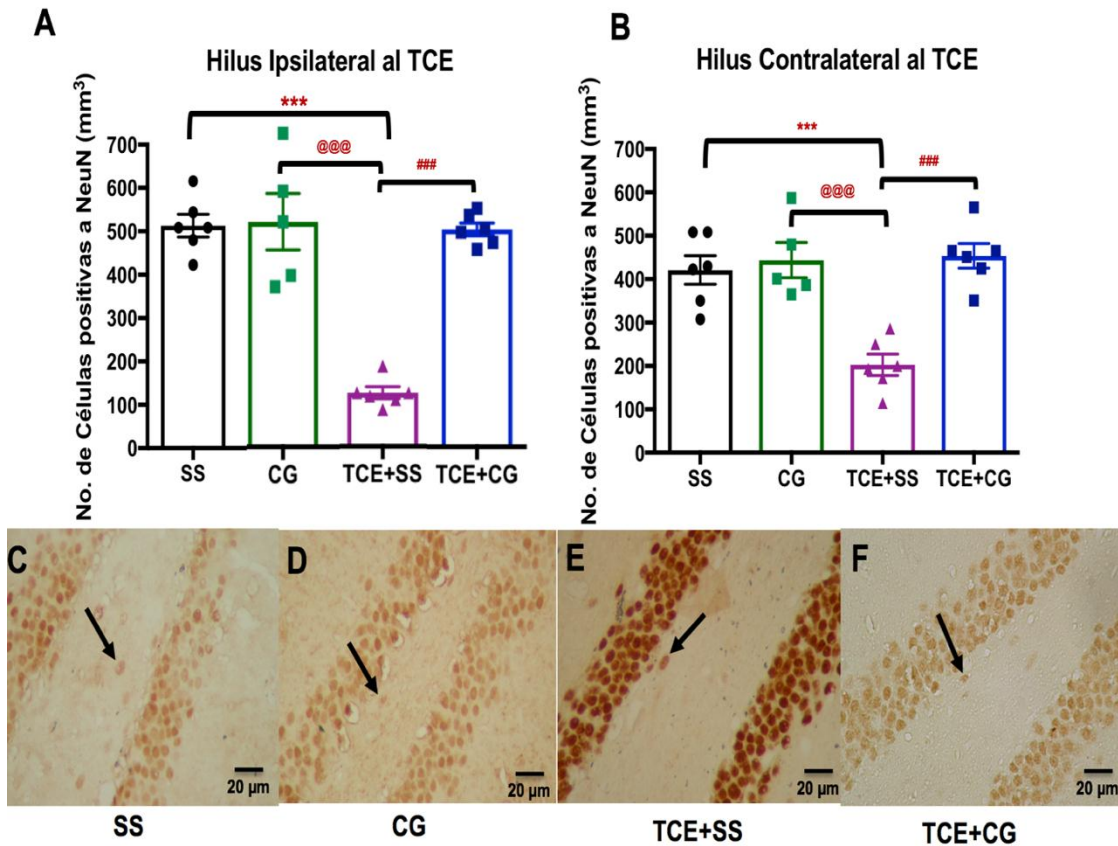


Figura 30. El tratamiento con CG incrementa la sobrevivencia neuronal en el hilus después de un TCE. Se muestran los valores de las células positivas a NeuN en el hilus ipsilateral al TCE (A) y contralateral (B) del hipocampo dorsal en los grupos SS (n=6; negro), CG (n=5; verde), TCE+SS (n=6; morado) y TCE+CG (n=6; azul). Los valores representan la media \pm EE de la preservación neuronal por mm³, ***p<0.001 con respecto al grupo SS; @@@p<0.001 con respecto al grupo CG; ###p<0.001 con respecto al grupo TCE+SS, ANOVA de una vía, Post Hoc de Tukey. En el panel inferior se muestran microfotografías representativas del hilus ipsilateral al TCE del hipocampo dorsal de los grupos SS (C), CG (D), TCE+SS (E) y TCE+CG (F). Se señalan con flechas negras las células inmunopositivas a NeuN.

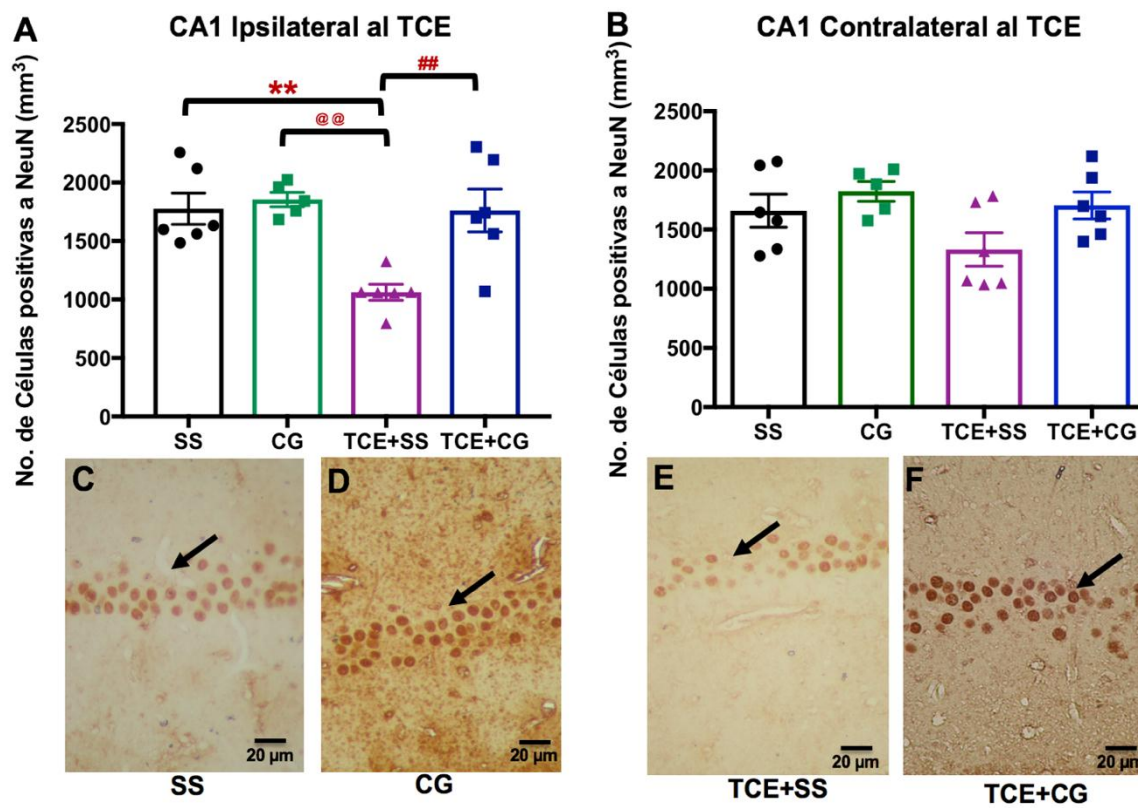


Figura 31. El tratamiento con CG incrementa la sobrevivencia neuronal en el área de CA1 después de un TCE. Se muestran los valores de las células inmunopositivas a NeuN en CA1 ipsilateral al TCE (A) y contralateral (B) del hipocampo dorsal en los grupos SS (n=6; negro), CG (n=5; verde), TCE+SS (n=6; morado) y TCE+CG (n=6; azul). Los valores representan la media \pm EE de la preservación neuronal por mm³, **p<0.01 con respecto al grupo SS; @@p<0.01 con respecto al grupo CG; ##p<0.01 con respecto al grupo TCE+SS, ANOVA de una vía, Post Hoc de Tukey. En el panel inferior se muestran microfotografías representativas del área CA1 ipsilateral al TCE del hipocampo dorsal de los grupos SS (C), CG (D), TCE+SS (E) y TCE+CG (F). Se señalan con flechas negras las células inmunopositivas a NeuN.

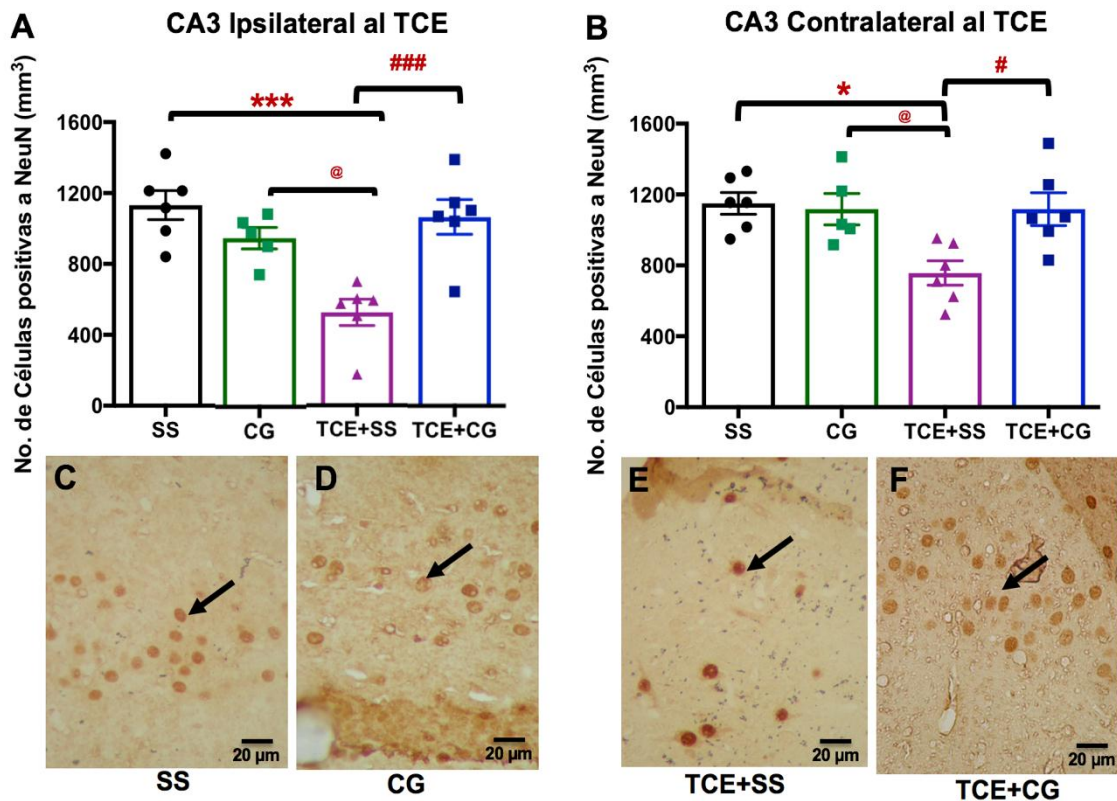


Figura 32. El tratamiento con CG incrementa la sobrevivencia neuronal en el área de CA3 después de un TCE. Se muestran los valores de las células positivas a NeuN en CA3 ipsilateral al TCE (A) y contralateral (B) del hipocampo dorsal en los grupos SS (n=6; negro), CG (n=5; verde), TCE+SS (n=6; morado) y TCE+CG (n=6; azul). Los valores representan la media \pm EE de la preservación neuronal por mm³, *p<0.05, ***p<0.001 con respecto al grupo SS; @p<0.05 con respecto al grupo CG; #p<0.05, ###p<0.001 con respecto al grupo TCE+SS, ANOVA de una vía, Post Hoc de Tukey. En el panel inferior se muestran microfotografías representativas del área CA3 ipsilateral al TCE del hipocampo dorsal de los grupos SS (C), CG (D), TCE+SS (E) y TCE+CG (F). Se señalan con flechas negras las células inmunopositivas a NeuN.

6.2.3 Discusión Experimento 2

Los resultados del experimento 2 mostraron que el grupo CG no fue diferente al grupo SS en ninguna de las evaluaciones realizadas (peso, capacidad sensoriomotora, UPD, atrofia y número de células hipocampales).

En relación con los resultados de la administración de CG en animales control, obtuvimos que el CG no modificó el peso de los animales a lo largo del protocolo en comparación al grupo SS. Estos datos coinciden con estudios previos en donde la administración intraventricular (i.c.v) de CG (200µg) a ratas privadas de comida y agua, no indujo diferencias en la ingesta ni en la actividad locomotora respecto al grupo control (Nava y Caputi, 1999). En contraste, en un modelo de anorexia en el que se administró CG (400 mg/kg, i.p.), éste incrementó la ingesta de comida y agua (Hayashi et al., 2008). Sin embargo, nuestros datos indicaron que la administración de CG no modifica la capacidad neuromotora, el valor del UPD, el volumen hipocampal ni la preservación neuronal en ninguna de las áreas hipocampales evaluadas. Esto sugiere que la administración repetida de CG (50 mg/kg) en un animal sano no tiene ningún efecto en las mediciones realizadas. En este sentido, es importante recordar que la administración diaria durante 6 meses de CG (50 mg/kg; i.v.) en primates Rhesus, no indujo ningún tipo de efecto tóxico (Cox et al., 1970). En humanos su uso crónico no produce anomalías pulmonares, renales, hepáticas ni hematológicas (McLean et al., 1973). Lo que nos sugiere que el CG es un fármaco seguro para su administración crónica.

Respecto al grupo de animales que se les administró CG de forma subcrónica después de la inducción de un TCE severo, los datos indicaron que este fármaco no logró recuperar la pérdida de peso inducida por el TCE. Sin embargo la capacidad sensoriomotora mejoró desde el día 2 posterior a la inducción del TCE. Asimismo, se observó que la administración del CG mantuvo elevado el umbral a la hiperexcitabilidad en el hipocampo ventral. Por otra parte, este trabajo encontró que la administración de CG no logró evitar la disminución del volumen hipocampal inducido por el TCE. Adicionalmente se observó mediante los análisis histológicos, que la administración del fármaco durante 10 días tuvo un efecto neuroprotector en

el GD, hilus, CA1 y CA3.

En este punto es conveniente recordar que el CG es un estabilizador de células cebadas con dos mecanismos de acción conocidos (Howell y Altounyan, 1967; Kusner et al; 1973). Uno consiste en bloqueo de los canales de Ca^{2+} (Ashmole et al., 2012) y el segundo en la fosforilación de la proteína moesina (78 kDa) que evita el paso de la señal entre la membrana y el citoesqueleto (Theoharides et al., 2000). Es por lo anterior que la administración del CG evita que las células cebadas liberen las sustancias que contienen sus gránulos (aminas, citosinas inflamatorias, enzimas degradantes de tejido, prostaglandias, ROS y histamina entre otros) que se saben inducen y perpetúan el daño (Da Silva et al., 2014).

En relación con el CG y su efecto en la ingesta y el peso, dos estudios previos en modelos de hipofagia encontraron que la administración de CG incrementó la ingesta de comida y de agua en los animales (Hayashi et al., 2008; Nava y Caputi, 1999). Una posible explicación a este efecto del CG es que al inhibir la desgranulación de las células cebadas se disminuyen los niveles de histamina. Esto evita la activación del receptor H1 en el núcleo paraventricular y ventromedial, lo cual a su vez disminuye la saciedad e incrementa la ingesta (Sakata et al., 1988). Sin embargo, esto es contrario a nuestros resultados. Los animales a los que se les administró CG de forma subcrónica después de la inducción de un TCE severo no tuvieron una recuperación general de peso. Esto sugiere que la pérdida de peso podría deberse al hipermetabolismo inducido por la lesión y no por disminución en la ingesta (Roe y Rothwell, 1997).

En la evaluación del NS de los animales a los que se les administró CG durante 10 días después del TCE, se cuantificó que el tratamiento mejoró la recuperación sensoriomotora a partir del día 2 posterior a la lesión. Estos datos coinciden con lo reportado por Strbian y colaboradores (2007) en un modelo de hemorragia intracerebral en el que se administró CG (i.c.v: 750 μ g o i.v: 100 mg/kg) 5 minutos antes de la inducción de la hemorragia y se evaluó la capacidad sensoriomotora 24 h después. En este estudio los animales que recibieron el CG mostraron una mejor recuperación neurológica y motora en comparación al grupo

control y al grupo al que se le administró solución salina. Una posible explicación a esta recuperación motora es que la administración de CG podría estar protegiendo a la corteza sensoriomotora y sus conexiones que llegan hasta el músculo esquelético. Se podría suponer que el efecto del CG que evita la liberación de sustancias que fomentan y perpetúan el daño, estaría actuando de forma similar a lo que se ha demostrado en modelos de hemorragia-isquemia (Jin et al., 2009), en los que se encuentra que evita la inflamación cerebral.

En la evaluación del UPD, los datos indicaron que la administración del tratamiento subcrónico de CG posterior a un TCE severo mantiene elevado el umbral para la inducción de la hiperexcitabilidad postraumática en el hipocampo ventral. Sin embargo, dado que la post descarga y el tipo de crisis motoras fueron similares a las del grupo sin tratamiento, se considera que el CG no evita la propagación de la hiperexcitabilidad. Esto quiere decir que aunque el hipocampo presenta menos hiperexcitabilidad después de la lesión, la actividad se propaga de esta primera estructura a otras áreas como el tálamo, neocorteza y ganglios basales (Engel et al., 1978; Ackermann et al., 1986; Handforth y Ackermann., 1988; Browning, 1986). Respecto a esto, consideramos que la menor hiperexcitabilidad identificada en los animales administrados con CG, es consecuencia de la disminución en los niveles de histamina por la inhibición de la desgranulación de las células cebadas. Esta hipótesis se respalda en estudios en los que se encontró que la histamina incrementa la población de espigas hipocampales (Kostopoulos et al., 1988) y la actividad sináptica mediada por receptores NMDA, proceso que lleva a muerte celular excitotóxica en células hipocampales (Skaper et al., 2001). Aunado a esto, en una serie de estudios en el modelo de *status epilepticus* (SE) inducido por pilocarpina, se encontró que la administración de CG antes del SE: 1) mantuvo en niveles control la liberación de histamina, 2) eliminó las sacudidas de perro mojado e 3) indujo neuroprotección hipocampal (Valle-Dorado et al., 2015). Posteriormente se determinó que la administración del CG después de la inducción del SE protegió a las células hipocampales y previno la expresión de crisis generalizadas, mientras que su administración crónica disminuyó el número y duración de las crisis presentadas por día (Valle-Dorado et al., 2018). Con esta

evidencia, se podría considerar que el tratamiento crónico de CG posterior a la inducción de un TCE severo está protegiendo al hipocampo tiempo después de la inducción del TCE de procesos inflamatorios y de la liberación de sustancias que suelen perpetuar el daño e inducir hiperexcitabilidad.

Los resultados de la volumetría y daño hipocampal por Resonancia Magnética *ex vivo* en animales con TCE que recibieron el tratamiento con CG, indicaron que la administración del fármaco no modificó la atrofia. Estos resultados podrían ser reflejo de que la administración de CG sólo incrementa la sobrevivencia neuronal hipocampal, pero no afecta otros componentes como la glía, dendritas, axones y sinapsis, los cuales influyen considerablemente en el grosor volumétrico de las estructuras (Wagstyl y Lerch, 2018).

Los datos histológicos obtenidos en este estudio coinciden con datos de diversos modelos de daño como de hemorragia intracerebral, hipoxia-isquemia, daño por rotenona y *SE* en los que la administración de CG reduce la inflamación cerebral, muerte neuronal, activación astrogliar y protege la morfología de células piramidales (Strbian et al., 2006, Jin et al., 2007, 2009; Abdel-Salam et al., 2016; Valle-Dorado et al., 2015; 2018). En el caso del GD, hilus y CA3, el mayor número de células sobrevivientes por la administración subcrónica de CG podría deberse a que el tratamiento detiene el proceso degenerativo que inician los diversos mediadores almacenados en las células cebadas. Entre estas sustancias se encuentran mediadores vasoactivos que promueven la ruptura de la BHE, extravasación, hemorragia y edema (Strbian et al., 2006, 2007). Lo cual a su vez incrementa la liberación de radicales libres y la activación de caspasas que llevan a apoptosis (Meguro et al., 2001; Wang et al., 2002).

En el caso particular de CA1, esta es un área con una gran densidad de receptores NMDA y AMPA (Meldrum, 1993) cuya neurotransmisión es incrementada por histamina (Viviani et al., 2003). Esta facilita la acumulación intracelular de Ca^{2+} lo cual puede llevar a estrés oxidativo, falla mitocondrial y activación de proteasas dependientes de Ca^{2+} . Éstos a su vez son capaces de inducir daño en el citoesqueleto de las neuronas postsinápticas, lo cual lleva a necrosis (Saatman et al., 2000). Además, es importante recordar que la histamina

es capaz de mantener abierta la BHE, lo cual permite el paso de más células cebadas al parénquima cerebral después de un TCE (Lozada et al., 2005). Esto a su vez podría mantener un continuo flujo de histamina después de un TCE. Lo anterior sugiere que la disminución en la liberación de histamina que induce el CG, podría explicar el mayor porcentaje en la sobrevivencia neuronal observado en los resultados.

Respecto a estos resultados podemos concluir que el CG presenta cualidades neuroprotectoras en el TCE severo. Por lo que podría representar una alternativa farmacológica valiosa, en la búsqueda de nuevas estrategias para el control de la hiperexcitabilidad hipocampal y daño neuronal inducidos por el TCE severo.

7. Conclusiones

De los resultados obtenidos se desprenden las siguientes conclusiones:

La administración subcrónica del CG posterior a la inducción de un TCE severo:

- No modifica el peso en los animales
- Mejora la capacidad sensoriomotora desde el día 2 posterior al TCE
- Disminuye la hiperexcitabilidad hipocampal ventral, pero no evita su propagación a otras estructuras
- No tiene efecto en la disminución del volumen hipocampal
- Disminuye el daño neuronal en las regiones hipocampales del GD, hilus, CA1 y CA3

8. Perspectivas

El presente trabajo demuestra que el CG tiene propiedades neuroprotectoras al ser administrarlo de forma subcrónica después de la inducción de un TCE severo. Este fármaco es seguro y no induce efectos secundarios graves. Es por lo anterior, que se considera necesario continuar con la investigación del CG como fármaco neuroprotector y posible tratamiento para evitar el desarrollo de la hiperexcitabilidad y muerte neuronal postraumática. En este sentido se mencionarán algunas perspectivas que derivan de esta investigación:

- Estudiar el efecto de la administración subcrónica de CG durante el proceso de epileptogénesis inducido por el TCE.
- Evaluar el efecto de la liberación sostenida del CG en la liberación de neurotransmisores excitatorios.
- Analizar el efecto de la coadministración de CG con anticonvulsivantes y bloqueadores de receptores NMDA.

9. Bibliografía

- Abdel-Salam et al., (2016). Neuroprotection by Mast Cell Stabilizers and Histamine H1 Receptor Blockade in Rotenone-Induced Oxidative Stress and Nigrostriatal Damage. *Reactive Oxygen Species*, 3: 228-244.
- Akasu T, Muraoka N & Hasuo H. (2002) Hyperexcitability of hippocampal CA1 neurons after fluid percussion injury of the rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 329:305–308.
- Ackermann, R.F., Engel, J. Jr., and Baxter, L. (1986). Positron emission tomography and autoradiographic studies of glucose utilization following electroconvulsive seizures in humans and rats. *Ann NY Acad Sci* 462: 263–269.
- Albensi, B. C., Knobloch, S. M., Chew, B. G., O'Reilly, M. P., Faden, a I., & Pekar, J. J. (2000). Diffusion and high resolution MRI of traumatic brain injury in rats: time course and correlation with histology. *Experimental Neurology*, 162(1), 61–72.
- Alted, L, Bermejo, A. y Chico F. (2009) Actualizaciones en el manejo del traumatismo craneoencefálico grave. *Med Intensiva*. 2009;33(1):16-30.
- Altounyan, R.E.C., (1967). Inhibition of experimental asthma by a new compound, cromolyn sodium "Intal". *Acta Allergol.* 22, 487–495.
- Almeida-Suhett CP, Prager EM, Pidoplichko V, Figueiredo TH, Marini AM, Li Z, Eiden LE & Braga MF. (2014) Reduced GABAergic inhibition in the basolateral amygdala and the development of anxiety-like behaviors after mild traumatic brain injury. *PLoS One*. 2014 Jul 21;9(7):e102627.
- Anand KS & Dhikav V. (2012) Hippocampus in health and disease: An overview. *Ann Indian Acad Neurol*; 15:239-46.
- Andersen, R. Morris, D. Amaral, T. Bliss, J. O'Keefe (2007), *The Hippocampus Book*, Oxford University Press, pp. 581-713.
- Ansari, M.A., Roberts, K.N. & Scheff, S.W. (2008). A Time Course of Contusion-Induced Oxidative Stress and Synaptic Proteins in Cortex in a Rat Model of TBI. *Journal of Neurotrauma*, 25:513-526.
- Ariza, M., Serra-Grabulosa, J.M., Junqué, C. et al., (2006) Hippocampal head

- atrophy after traumatic brain injur. *Neuropsychologia*, 44:1956-1961.
- Annegers, J.F., Hauser, W.A., Coan, S.P., and Rocca, W.A. (1998). A population-based study of seizures after traumatic brain injuries. *N. Engl. J. Med.* 338, 20–24.
- Ashmole, I. y Bradding, P. (2012). Ion channels regulating mast cell biology. *Clinical et Experimental Allergy*. 43:491-502.
- Ashton, M. J., Clark, b., Jones, K. M., Moss, G. F., Neale, M. G., & Ritchie, J. T. (1973). The absorption, metabolism and excretion of disodium cromoglycate in nine animal species. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 26, 319-328.
- Bannerman, D. M., Deacon, R. M. J., Offen, S., Friswell, J., Grubb, M., & Rawlins, J. N. P. (2002). Double dissociation of function within the hippocampus: Spatial memory and hyponeophagia. *Behavioral Neuroscience*, 116(5), 884-901.
- Bannerman DM,GrubbM,DeaconRMJ,YeeBK,FeldonJ,Rawlins JNP. (2002b) Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. *Behav Brain Res*;139:197–213.
- Bao, Y., Bramlett, H. M., Atkins, C. M., Truettner, J. S., Lotocki, G., Alonso, O. F., & Dietrich, W.D. (2011). Post-Traumatic Seizures Exacerbate Histopathological Damage after Fluid- Percussion Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, 28(1), 35–42.
- Benson, M.K., Curry, S.H., Mills, G. G. & Hughes, D.T.D. (1973). Uptake of disodium ceromoglycate in obstructive airways disease. *Clinical Allergy*.
- Bernal, F., Saura, J., Ojuel, J., & Mahy, N. (2000). Differential vulnerability of hippocampus, basal ganglia, and prefrontal cortex to long-term NMDA excitotoxicity. *Experimental Neurology*, 161
- Bigler, E.D. & Maxwell, W. (2011). Neuroimaging and neuropathology of TBI. *NeuroRehabilitation* 28:63.74.
- Bondi, C. O., Semple, B. D., Noble-Haeusslein, L. J., Osier, N. D., Carlson, S. W., Dixon, C. E., Kline, A. E. (2015). Found in translation: Understanding the biology and behavior of experimental traumatic brain injury.

- Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 58: 123– 146.
- Bonnekoh, o., Oschlies, U. & Hossmann, A. (1992) Changes in hippocampal ultrastructure after ischemia with long survival times. Maturation Phenomeon in Cerebral Isquemia.
- Bramlett, H.M., Dietrich, W.D., Green, E.J. & Busto, R. (1997). Chronic histopathological consequences of fluid-percussion brain injury in rats: effects of post-traumatic hypothermia. *Acta Neuropathol*, 93 : 190–199
- Brogden, R. N., Speight, T. M., And Avery, G. S. (1974). Sodium cromoglycate (cromolyn sodium): A review of its mode of action, pharmacology, therapeutic efficacy and use. I. Asthma. *Drugs* 7,164-282.
- Browning, R.A., and Nelson, D.K. (1986) Modification of electroshock and pentylenetetrazol seizure patterns in rats after precollicular transections. *Exp Neurol* 93: 546–556.
- Bonnekoh, P., Oshlies, U. & Hossmann, K.A. (1992). Changes in hippocampal ultrastructure after ischemia with long survival times. Maturation, Phenomeon in cerebral isquemia. Springer.
- Chew, E.& Zafonte, R.D., (2009). Pharmacological management of neurobehavioral dis-orders following traumatic brain injury-a state-of-the-art review. *J. Rehabil. Res.Dev.* 46, 851– 879.
- Chung, M.K., Worsley, K.J., Paus, T., Cherif, C., Collins, D.L., Giedd, J.N., Rapoport, J.L., Evans, A.C., (2001). A unified statistical approach to deformation-based morphometry. *NeuroImage* 14, 595–606.
- Cedeberg, D. & Siesjo, P. (2010). What has inflammation to do with traumatic brain injury?. *Childs Nerv Syst.* 26(2):221-6.
- Cobb JA, Mahajan G, Lawrence TJ, Miguel-Hidalgo JJ, Dieter L, Herbst N, Matzinger M, Overholser JC, Jurjus GJ, Rajkowska G, Stockmeier CA (2006) Stereological estimation of cell number, cell size, and hippocampal volume in major depressive disorder (MDD). Neuroscience Meeting Planner. Society for Neuroscience, Atlanta, GA, 2006. Online
- Colicos, M.A. & Dash, P.K. (1996). Apoptotic morphology of dentate gyrus granule cells following experimental cortical impact injury in rats: possible

- role in spatial memory deficits. *Brain Research*, 739: 120-131.
- Cortez SC, McIntosh TK, Noble L. (1989) Experimental fluid percussion brain injury: vascular disruption and neuronal and glial alterations. *Brain Res* 482:271–282.
- Conti, A.C., Raghupathi, R., Trojanowski, J.Q. & McIntosh, T.K. (1998) Experimental Brain Injury Induces Regionally Distinct Apoptosis during the Acute and Delayed Post-Traumatic Period. *Journal of Neuroscience*; 18 (15) 5663-5672;
- Cox, J.S.G.; Beach, J.E.; Blakr, A.M.I.N; Clarke, A.I.;King, J.; Lee, T.B.; Loveday, D.E.E.; Moss, G.F.;T.S.C; Ritchie, Jean T. and Sheard, P.:(1970). Disodium cromoglicate (Intal). *Advances in Drug Research* 5: 115.
- Crenn, P., Hamchaoui, S., Bourget-Massari, A., et al., (2014) Changes in weight after traumatic brain injury in adult patients: a longitudinal study. *Clinical Nutrition*, 33:348-353.
- Da Silva EZ, Jamur MC, Oliver C. (2014) Mast cell function: a new vision of an old cell. *J Histochem Cytochem* 62(10):698–738.
- D’Ambrosio, R., Fender, J.S., Fairbanks, J.P. et al (2005). Progression from frontal–parietal to mesial– temporal epilepsy after fluid percussion injury in the rat. *Brain*, 128: 174-188.
- DeKosky, S.T., Abrahamson, E.E., Ciallella, J.R., Paljug, W.R.,Wisniewski, S.R., Clark, R.S., and Ikonovic, M.D. (2007). Association of increased cortical soluble abeta42 levels with diffuse plaques after severe brain injury in humans. *Arch.Neurol.* 64, 541–544.
- Diaz-Arrastia R, Agostini MA, Frol AB, Mickey B, Fleckenstein J, Bigio E, Van Ness PC (2000) Neurophysiologic and neuroradiologic features of intractable epilepsy after traumatic brain injury in adults. *Arch Neurol*, 2000, Nov; 57(11): 1611-6
- Dorr, A.E., Lerch, J.P., Spring, S., Kabani, N., Henkelman, R.M., (2008). High resolution threedimensional brain atlas using an average magnetic resonance image of 40 adult C57Bl/6J mice. *NeuroImage* 42, 60–69.
- Donkin, J.J., & Vink, R. (2010). Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain

- injury: Therapeutic developments. *Curr Opin Neurol*, 23, 293-299.
- Engel, J., Jr., Wolfson, L., and Brown, L.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. & Vink, R., (1989). The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* 244, 798–800.
- Finnie, J.W. (2013). Neuroinflammation: beneficial and detrimental effects after traumatic brain injury. *Inflammopharmacol.* 21:309-320.
- Fleminger, D.L. Oliver, S. Lovestone, S. Rabe-Hesketh & A. Giora (2003) Head injury as a risk factor for Alzheimer's disease: the evidence 10 years on; a partial replication. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 74, pp. 857-862
- Floyd, C.L., Golden, K.M., Black, R.T. et al., (2002). Craniectomy Position Affects Morris Water Maze Performance and Hippocampal Cell Loss after Parasagittal Fluid Percussion. *Journal of Neurotrauma*, 19:3
- Floyd, C.L., Gorin, F.A. & Lyeth, B.G. (2005). Mechanical Strain Injury Increases Intracellular Sodium and Reverses Na⁺/Ca²⁺ Exchange in Cortical Astrocytes. Wiley-Liss, Inc.
- Foley, Marshall. S., Pikul, J., Salter., K. Teasell, R., (2008). Hypermetabolism following Moderate to Severe Traumatic Acute Brain Injury: A Systematic Review. *J. Neurotrauma*, 25
- Gao, X., Deng, P., Xu, Z.C. & Chen, J. (2011). Moderate Traumatic Brain Injury Causes Acute Dendritic and Synaptic Degeneration in the Hippocampal Dentate Gyrus. *PLoS ONE* 6(9): e24566.
- Gennarelli, T.A. & Graham, D. I. (2005) Neuropathology. In Silver JM, McAllister TW, Yudofsky SC (Eds) *Textbook of traumatic brain injury*. American Psychiatric Publishing, Inc., Washington, DC, pp. 27–50
- Graham DI, Raghupathi R, Saatman KE, Meaney DF, McIntosh TK (2000) Tissue tears in the white matter after lateral fluid percussion brain injury in the rat: relevance to human brain injury. *Acta Neuropathol (Berl)* 99:117–124.
- Golarai, G., Greenwood, A. C., Feeney, D. M., and Connor, J.A. (2001).

- Physiological and structural evidence for hippocampal involvement in persistent seizure susceptibility after traumatic brain injury. *J. Neurosci.* 21, 8523–8537.
- González, M. A., Roser, P., B y Serra, G., J. (2004). Secuelas neuropsicológicas de los traumatismos craneoencefálicos. *Anales de psicología.* 20,2: 303-316.
- Gordon JR, Galli SJ. (1991) Release of both preformed and newly synthesized tumor necrosis factor a (TNF-a)/cachectin by mouse mast cells stimulated via the Fc eRI. A mechanism for the sustained action of mast cell-derived TNF-a during IgE-dependent biological responses. *J Exp Med* 174:103–7.
- Grady, M. S., Charleston, J. A. Y. S., Maris, D. O. N., Witgen, B. M., Lifshitz, J., & Al, G. E. T. (2003). Neuronal and Glial Cell Number in the Hippocampus after Experimental Traumatic Brain Injury: Analysis by Stereological Estimation, 20(10), 929–941.
- Granados, J. C. (2012) Trauma craneoencefálico: Estadística y perspectiva. *Accesos Estilo de Vida y Discapacidad* 2012; 3: 12-15.
- Greve M.W & Zink B.J. (2009) Pathophysiology of traumatic brain injury. *Mt Sinai J Med.*;76(2):97–104.
- Griesemer, D., & Mauter, A. M. (2007). Closed head injury causes hyperexcitability in rat hippocampal CA1 but not in CA3 pyramidal cells. *Journal of Neurotrauma*, 24(12), 1823– 32.
- Gupta P, Sayed N, Ding K et al. (2014). Subtype of posttraumatic epilepsy: clinical, electrophysiological, and imaging features. *J Neurotrauma* 31: 1–5.
- Gupta, R. & Sen, N. (2016). Traumatic brain injury: a risk factor for neurodegenerative diseases. *Rev. Neurosci*; 27(1): 93–100
- Hock Jr BJ & Bunsey MD. (1998) Differential effects of dorsal and ventral hippocampal lesions. *J Neurosci*;18:7027 – 32.
- Hudak AM, Trivedi K, Harper CR, Booker K, Caesar RR, Agostini M, Van Ness PC, Diaz-Arrastia R (2004) Evaluation of seizure-like episodes in survivors of moderate and severe traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil* 19:290–295.

- Hallam, T.M., Floyd, C.L., Folkerts, M.M., Lee, L.L., Gong, Q.Z., Lyeth, B.G., Muizelaar, J.P., Berman, R.F. (2004). Comparison of behavioral deficits and acute neuronal degeneration in rat lateral fluid percussion and weight-drop brain injury models. *J. Neurotrauma* 21, 521–539.
- Hamdan, G. (2005) Traumatismo craneoencefálico severo. *Medicrit*;2(7):107-148.
- Handforth, A., and Ackermann, R.F. (1988) Functional [14C]2-deoxyglucose mapping of progressive states of status epilepticus induced by amygdala stimulation in rat. *Brain Res* 460: 94–102.
- Hayashi, T., Cottam, H.B., Chan, M., et al., (2008). Mast cell-dependent anorexia and hypothermia induced by mucosal activation of Toll-like receptor 7, *Am J Phys Integ Comp Physiol*, 295:123-132
- Hicks, R., Soares, H., Smith, D. & McIntosh, (1996). Temporal and spatial characterization of neuronal injury following lateral fluid-percussion brain injury in the rat. *Acta Neuropathol.* 91, 236–246.
- Howell JB & Altounyan RE (1967) A doubleblind trial of disodium cromoglycate in the treatment of allergic bronchial asthma. *Lancet* 2(7515):539–542.
- Immonen, R. J., Kharatishvili, I., Gröhn, H., Pitkänen, A., & Gröhn, O. H. J. (2009). Quantitative MRI predicts long-term structural and functional outcome after experimental traumatic brain injury. *NeuroImage*, 45(1), 1–9.
- Instituto Nacional de Rehabilitación. (2009). Traumatismo craneoencefálico. México. Intervenciones de enfermería en la atención del adulto con traumatismo craneoencefálico grave. México: Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Jin, Y., Silverman, A. J., & Vannucci, S. J. (2007). Mast cell stabilization limits hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Developmental Neuroscience*, 29(4–5), 373–384.
- Jin Y, Silverman AJ, Vannucci SJ. (2009). Mast cells are early responders after hypoxia– ischemia in immature rat brain. *Stroke*; 40:3107–12.
- Joelving FC, Billeskov R, Christensen JR, West M, Pakkenberg (2006) Hippocampal neuron and glial cell numbers in Parkinson's disease a stereological study. *Hippocampus* 16:826–833

- Johnson, V.E., Stewart, W. & Smith, D.H. (2012). Axonal Pathology in traumatic brain injury. *Experimental Neurology*. 35-43.
- Jinde, S., Zsiros, V. & Nakazawa, K. (2013) Hilar mossy cell circuitry controlling dentate granule cell excitability. *Front. Neural Circuits*7, 14.
- Kempuraj D, Selvakumar GP, Thangavel R, Ahmed ME, Zaheer S, Raikwar SP, Iyer SS, Bhagavan SM, Beladakere-Ramaswamy S and Zaheer A (2017) Mast Cell Activation in Brain Injury, Stress, and Post-traumatic Stress Disorder and Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Front. Neurosci.* 11:703.
- Kharatishvili I, Immonen R, Gröhn O, Pitkänen A. (2007). Quantitative diffusion MRI of hippocampus as a surrogate marker for post-traumatic epileptogenesis. *Brain.*;130:3155– 3168. PubMed PMID: 18055492.
- Kharatishvili I, Nissinen JP, McIntosh TK, Pitkänen (2006) A. A model of posttraumatic epilepsy induced by lateral fluid-percussion brain injury in rats. *Neuroscience*;140:685-697.
- Kharatishvili, I., Sierra, A., Immonen, R.J., Grohn, O.H. & Pitkänen, A., (2009). Quantitative T2 mapping as a potential marker for the initial assessment of the severity of damage after traumatic brain injury in rat. *Exp. Neurol.* 217, 154—164.
- Kim E, Lauterbach EC, Reeve A, Arciniegas DB, Coburn KL, Mendez MF, Rummans TA, Coffey EC (2007) Neuropsychiatric complications of traumatic brain injury: a critical review of the literature (a report by the ANPA Committee on Research). *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* Spring;19(2):106-27.
- Kjelstrup KG, Tuvnes FA, Steffenach H-A, Murison R, Moser EI, Moser M-B (2002). Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10825 – 30.
- Klatzo, I. (1987). Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol.* (Berl.) 72, 236– 239.
- Kostopoulos G, Psarropoulou C, Haas HL. (1998) Membrane properties, response to amines and to tetanic stimulation of hippocampal neurons in the genetically epileptic mutant mouse tottering. *Exp Brain Res* 72: 45–50,.

- Kusner, E.J. Dubnick, B. Y Herzing, D.J. (1973). The inhibition by disodium cromoglycate in vitro of anaphylactically induced histamine release from rat peritoneal mast cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 184(1):41.6.
- Lau, A. & Tymianski, M. (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch.* 460(2):525-42
- Laurer HL, Meaney DF, Margulies SS, McIntosh TK (2002) Modelinbrain injury/trauma. In: *Encyclopedia of the human brain* (Ramachandran VS, ed). Academic Press/Elsevier Science
- Liangyou, R. (2013) Brain Regulation of energy balance and body weights. *Rev Endocr Metab Disord.* 14(4).
- Lozada, A., Maegele, M., Stark, H., Neugebauer, E.M.A. & Panula, P. (2005) Traumatic brain injury results in mast cell increase and changes in regulation of central histamine receptors. *Neuropathology and applied neurobiology*, 31, 150-162
- Lowenstein DH, Thomas MJ, Smith DH & McIntosh TK. (1992) Selective vulnerability of dentate hilar neurons following traumatic brain injury: a potential mechanistic link between head trauma and disorders of the hippocampus. *J Neurosci* 12:4846– 4853.
- 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., et al., (1990). Prolonged memory impairment in the absence of hippocampal cell death following traumatic brain injury in the rat. *Brain Research*, 526: 249.258.
- Mahler, Benno, et al. (2015) Unprovoked Seizures after Traumatic Brain Injury: A Population- Based Case–Control Study.” *Epilepsia* 56(9):1438-1444
- Malagelada C, Xifró X, Badiola N, et al. (2004). Histamine H2-receptor antagonist ranitidine protects against neural death induced by oxygen-glucose deprivation. *Stroke*; 35:2396e2401.
- Marmarou, A. et al.(1994) A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: pathophysiology and biomechanics. *J. Neurosurg.* 80, 291–300 .
- Marmarou A, Fatouros PP, Barzo P, Portella G, Yoshihara M, Tsuji O, Yamamoto

- T, Laine F, Signoretti S, Ward JD, Bullock MR & Young HF. (2000) Contribution of edema and cerebral blood volume to traumatic brain swelling in head-injured patients. *J Neurosurg*; 93:183– 193.
- Marmarou A., (2003) Pathophysiology of traumatic brain edema: current concepts. *Acta Neurochir Suppl* 86:7–10.
- Mattila OS, Strbian D, Saksi J, Pikkarainen TO, Rantanen V, Tatlisumak T, Lindsberg PJ. (2011) Cerebral mast cells mediate blood–brain barrier disruption in acute experimental ischemic stroke through perivascular gelatinase activation. *Stroke* 2011; 42:3600–5.
- Maxwell, W.L., Dhillon, K., Harper, L et al., (2003). There Is Differential Loss of Pyramidal Cells from the Human Hippocampus with Survival after Blunt Head Injury. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 62(3): 272-279.
- McHugh SB, Deacon RMJ, Rawlins JNP, Bannerman DM. (2004) Amygdala and ventral hippocampal lesions contribute differentially to mechanisms of fear and anxiety. *Behav Neurosci*;118: 63–78.
- McLean, W.L.; Lozano, J.; Hannaway, Sakowitz, S. and Mueller, H.L: (1973) Cromolyn treatment of asthmatic children_ *American Journal of Diseases of Children* 125: 332.
- 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, 233–244
- McNish KA, Gewirtz JC, Davis M. (1997) Evidence of contextual fear after lesions of the hippocampus: a disruption of freezing but not fear- potentiated startle. *J Neurosci*;17:9353 – 60.
- Meguro T, Chen B, Lancon J and Zhang JH. (2001). Oxyhemoglobin induces caspase-mediated cell death in cerebral endothelial cells. *J Neurochem*.77:1128–1135.
- Meldrum, B.S. (1993), Excitotoxicity and Selective Neuronal Loss in Epilepsy. *Brain pathology*, 3, 405-412
- Minokoshi, Y., Alquier, T., Furukawa, N., et al. (2014) AMP-kinase regulates food

- intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature*, 428:469-478.
- Morganti-Kossmann, M.C., Hans, V.H., Lenzlinger, P.M., Dubs, R., Ludwig, E., Trentz, O., Kossmann, T., (1999). TGF-beta is elevated in the CSF of patients with severe traumatic brain injuries and parallels blood-brain barrier function. *J. Neurotrauma* 16, 617–628.
- Morganti-Kossmann, M.C., Satgunaseelan, L., Bye, N. & Kossmann, T., (2007). Modulation of immune response by head injury. *Injury* 38, 1392–1400.
- Morris, R. G. M., Garrud, P., Rawlins, J. N. P., & O’keefe, J. (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297, 681–683
- Moss, G. F., & Ritchie, J. T. (1970). The absorption and clearance of disodium cromoglycate from the lung in rat, rabbit and monkey. *Toxicol. Appl.Pharmacol.* 17,699-70
- Moss, G. F., Jones, K. M., Ritchie, J. T., & Cox, J. S. G. (1971). Plasma levels and urinary excretion of disodium cromoglycate after inhalation by human volunteers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 20, 147-156.
- Nadler, JV., Tauck, D.L., Evenson, D.A. & Davis, J.N. (1983) Synaptic rearrangement in the kainic acid model of ammon’s horn sclerosis.Ecxitotoxins, Wenner-Gren Center International Symposium Series. Springer, Boston, MA
- Namas, R., Ghuma, A., Hermus, L., Zamora, R., Okonkwo, D., Billiar, T., & Vodovotz, Y. (2009). The Acute Inflammatory Response in Trauma / Hemorrhage and Traumatic Brain Injury: Current State and Emerging Prospects. *The Libyan Journal of Medicine*, 4(3), 97–103.
- Nava, F. & Caputi, A. (1999). Central effects of cromoglycate sodium salt in rats treated with lipopolysaccharide. *European Journal of Pharmacology*, 367, 351-359.
- Neuberger, E.J., Wahab, R.A., Jayakumar, A., et al. (2014) Distinct Effect of Impact Rise Times on Immediate and Early Neuropathology After Brain Injury in Juvenile Rats. *Journal of Neuroscience Research*, 92:1250-1361.
- O’Connor C, Cernak I & Vink R (2006) The temporal profile of oedema formation

- differs between male and female rats following diffuse traumatic brain injury. *Acta Neurochir (Suppl)* 96:121–4
- O’Keefe J & Dostrovsky J. (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res* 34:171–175.
- Paxinos, G.& Watson, C., (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 6th edn. ed. Academic Press/Elsevier, Amsterdam; Boston.
- Peden, M. (2004). *World Report on road traffic injury prevention: summary*. World Health Organization:1-53. 5.
- 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
- Pitkänen, A., & Bolkvadze, T. (2012). Head trauma and epilepsy, in: *Jasper’s Basic Mechanisms of the Epilepsies*. 4th ed. J.L. Noebels, M Avoli, M.A. Rogawski, R.W. Olsen, A.V. Delgado-Escueta (eds). National Center for Biotechnology Information: Bethesda, MD.
- Pitkänen, A., Longhi, L., Marklund, N., Morales, D. & McIntosh, T. (2005). Neurodegeneration and neuroprotective strategies after traumatic brain injury. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. (2) 4:409-418.
- Pitkänen, R.J. Immonen, O.H. Grohn and O.H. Kharatishvili (2009) From traumatic brain injury to posttraumatic epilepsy: what animal models tell us about the process and treatment options, *Epilepsia* 50(Suppl 2) 21–29.
- Pothuizen, H. H., Zhang, W. , Jongen-Rêlo, A. L., Feldon, J. and Yee, B. K. (2004), Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. *European Journal of Neuroscience*, 19: 705-712.
- Purves, D., Augustine, G. J., Fitzpatrick, D., Hall, W. C., LaMantia, A.-S., McNamara, J. O., & Williams, S. M. (Eds.). (2004). *Neuroscience* (3rd ed.). Sunderland, MA, US: Sinauer Associates.
- Racine, R.J., (1972a). Modification of seizure activity by electrical stimulation: I.

- after-discharge threshold. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32, 269–279
- Racine, R.J., (1972b). Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. 103 Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32, 281–294.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, B.K. & Freeman, B.A. (1991). Peroxynitrite-Induced Membrane Lipid Peroxidation: The Cytotoxic Potential of Superoxide and Nitric Oxide. *Archives of biochemistry and biophysics*, 288:1, 481-487.
- Ratzliff, A.H., Santhakumar, V., et al., (2002). Mossy cells in epilepsy: rigor mortis or vigor mortis?. *TRENDS in Neurosciences.* 25:3, 140-144.
- Ribak, C.E., Seress, L. & Amaral, D.G.T (1985) The development, ultrastructure and synaptic connections of mossy cells of the dentate gyrus *J Neurocytol*, 14: 835-57
- Richmond MA, Yee BK, Pouzet B, Veenman L, Rawlins JNP, Feldon J, Bannerman DM.(1999) Dissociating context and space within the hippocampus: effects of complete, dorsal and ventral excitotoxic lesions on conditioned freezing and spatial learning. *Behav Neurosci* 113:1189 – 203.
- 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. *Am. J. Pathol.* 147, 1575–1583.
- Roe, S.Y. & Rothwell, N.J. (1997). Whole body metabolic responses to brain trauma in the rat. *Journal of Neurotrauma.* 14:6, 399-408.
- Rosario, E.R., Aqeel, R., Brown, M.A., et al., (2013). Hypothalamic-Pituitary Dysfunction Following Traumatic Brain Injury Affects Functional Improvement During Acute Inpatient Rehabilitation. *J Head Trauma Rehabil*, 28:5, 390-396.
- Saatman, K.E. et al. (2000) Behavioral efficacy of posttraumatic calpain inhibition is not accompanied by reduced spectrin proteolysis, cortical lesion, or apoptosis. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20, 66–73
- Sakata, T., Ookuma, K., Fukagawa, K., et al. (1988). Blockades of the histamine H1-receptor in the rat ventromedial hypothalamus and feeding elicitation.

Brain Res, 16:441

- Sato, M., Chang, E., Igarashi, T. & Noble, L.J., (2001). Neuronal injury and loss after traumatic brain injury: Time course and regional variability. *Brain Res.* 917, 45–54.
- Santhakumar, V., Ratzliff, A.D., Jeng, J., Toth, Z., Soltesz, I., (2001). Long-term hyperexcitability in the hippocampus after experimental head trauma. *Ann. Neurol.* 50, 708–717.
- Santhakumar V, Bender R, Frotscher M, et al. (2000) Granule cell hyperexcitability in the early posttraumatic rat dentate gyrus: the 'irritable mossy cell' hypothesis. *J Physiol*;524(Pt 1): 117–134.
- Scheff, S.W., Price, Hicks, P.R.R, Baldwin, SA., Robinson ,R. & Brackney, C. (2005). Synaptogenesis in the Hippocampal CA1 Field following Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, 22:7, 719-732.
- Schouten, J.W. (2007). Neuroprotection in traumatic brain injury: a complex struggle against the biology of nature. *Current Opinion in Critical Care.* 13:2,134–142.
- Secretaría de Salud (2008). *Vigilancia Epidemiológica Semana 26, vol 25.*
- Seel, R. T., Kreutzer, J.S., Rosenthal, M., Hammond, F.M., Corrigan, J.D y Black, K. (2003). Depression after traumatic brain injury: a National Institute on Disability and Research Model Systems multicenter investigation, *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*, 84,177-188.
- Scharfman HE & Schwartzkroin PA. (1988) Electrophysiology of morphologically identified mossy cells of the rat dentate hilus. *J Neurosci.* 8:3412–3421.
- Silver, J., Koumaras, B., Chen, M., Mirski, D., Potkin, S.G., Reyes, P., Warden, D., Harvey, P.D., Arciniegas, D., Katz, D.I., and Gunay, I. (2006). Effects of rivastigmine on cognitive function in patients with traumatic brain injury. *Neurology* 67, 748
- Silver, J. M., Kramer, R., Greenwald, S., Weissman, M. (2001) The association between head injuries and psychiatric disorders: findings from the New Haven NIMH Epidemiologic Catchment Area Study. *Brain Inj*;15935- 945
- Skaper, S.D., Facci, L. & Giusti, P. (2014). Mast cells, glia and

- neuroinflammation: partners in crime? *Immunology*, 141, 314-327.
- Skaper SD, Facci L, Kee WJ, Strijbos PJ. (2001) Potentiation by histamine of synaptically mediated excitotoxicity in cultured hippocampal neurones: a possible role for mast cells. *J Neurochem* 76:47–55, 2001.
- Squire, L.R., Stark, C.E.L., Clark, R.E., (2004). The medial temporal lobe. *Annual Review of Neuroscience* 27, 279–306.
- Squire LR. (1992). Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 9:195–231
- Sloviter, R.S. (1994). The functional Organization of the hippocampal Dentate gyrus and its relevance to the pathogenesis of temporal Lobe epilepsy. *Ann. Neurol.* 35, 640–654.
- Smith, D. & Fisher, A. (1989) Age related changes in the clearance and oral absorption of sodium cromoglycate in the developing albino rat. *J. Pharm. Pharmacol.* 32: 823-827,
- Smith, D., Chen, X., Pierce, J., et al., (1997). Progressive Atrophy and Neuron Death for One Year Following Brain Trauma in the Rat. *Journal of Neurotrauma* 14:10
- Stafstrom, C. E. (2010). Pathophysiological mechanisms of seizures and epilepsy: A primer. *Epilepsy: Mechanisms, Models, and Translational Perspectives*.
- Stella, F., Cerasti, E., Bailu, S., Jezek, K. & Treves, A., (2012). Self-organization of multiple spatial and context memories in the hippocampus. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 36:1609–1625
- Strbian, D., Karjalainen-Lindsberg, M. L., Kovanen, P. T., Tatlisumak, T., & Lindsberg, P. J. (2007). Mast cell stabilization reduces hemorrhage formation and mortality after administration of thrombolytics in experimental ischemic stroke. *Circulation*, 116(4), 411–418.
- Strbian D, Karjalainen-Lindsberg ML, Tatlisumak T, et al. (2006). Cerebral mast cells regulate early ischemic brain swelling and neutrophil accumulation. *J Cereb Blood Flow Metab*; 26:605e612.
- Swartz, B.E., Houser, C.R., Tomiyasu, et al., (2006) Hippocampal Cell Loss in

- Posttraumatic Human Epilepsy. *Epilepsia*, 47(8):1373–1382, 2006.
- Teasdale, G. and B. Jennett (1974). Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* 2(7872): 81-4.
- Theoharides TC, Cochrane DE. (2000). Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress. *J Neuroimmunol*; 146:1e12.
- Theoharides TC, Alysandratos KD, Angelidou A, Delivanis DA, Sismanopoulos N, Zhang B, et al. (2010) Mast cells and inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1822(1):21–33.
- Tomaiuolo, F., Carlesimo, G.A., Paola, M.D., et al., (2004). Gross morphology and morphometric sequelae in the hippocampus, fornix, and corpus callosum of patients with severe non-missile traumatic brain injury without macroscopically detectable lesions: a T1 weighted MRI study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75:1314–1322.
- Toth, Z., Hollrigel, G.S. & Soltesz, I. (1997). Instantaneous Perturbation of Dentate Interneuronal Networks by a Pressure Wave-Transient Delivered to the Neocortex. *The journal of Neuroscience*, 17(21): 8106-8117
- Tóosaki A, Szerdahelyi P, Joó F. (1994). Treatment with ranitidine of ischemic brain edema. *Eur J Pharmacol*; 264:455e458. 105.
- Tran, L. D., Lifshitz, J., Witgen, B. M., Schwarzbach, E., Cohen, A. S., & Grady, M. S. (2006). Response of the contralateral hippocampus to lateral fluid percussion brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 23(9), 1330–42.
- Vagnozzi, R., Marmarou, A.M., Tavazzi, B., et al. (1999). Changes of Cerebral Energy Metabolism and Lipid Peroxidation in Rats Leading to Mitochondrial Dysfunction After Diffuse Brain Injury, *Journal of Neurotrauma*, 16:10.
- Valle-Dorado, M. G., Santana-Gómez, C. E, Orozco-Suárez, S.A. & Rocha, L. (2015) The mast cell stabilizer sodium cromoglycate reduces histamine release and status epilepticus- induced neuronal damage in the rat hippocampus. *Neuropharmacology*. 92:49-55.
- Valle-Dorado, M. G., Santana-Gómez, C. E, Orozco-Suárez, S.A. & Rocha, L. (2018) Sodium cromoglycate reduces short- and long-term consequences of status epilepticus in rats. *Epilepsy Behav*. 2018 Aug 13. pii: S1525-

5050(18)30018-0

- Van-Velzen, J.M, Van-Bennekom CA, Edelaar MJ, Sluiter JK, Frings- Dresen MH. (2009). How many people return to work after acquired brain injury?: a systematic review. *Brain Inj*; 23: 473-88
- Velasco, M. (2013) *Epilepsia. Un punto de vista latinoamericano*. Editorial Alfil.
- Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F. et al., (2003). Interleukin-1 α Enhances NMDA Receptor-Mediated Intracellular Calcium Increase through Activation of the Src Family of Kinases. *The Journal of Neuroscience*, 23:25,8692-8700.
- Walker, W.C. & Pickett, T.C. (2007). Motor impairment after severe traumatic brain injury: A longitudinal multicenter study. *JRRD*, 44:7, 975-982
- Walker, S.R.; Richards, A.J. and Paterson, J. W.: (1971) The absorption excretion and metabolism of disodium [14e] cromoglycate in man. *Biochemical Journal* 125: 27
- Wagstyl, K & Lerch, J.P. (2018). *Cortical Thickness, Brain Morphometry*. Edt Spalleta G., Piras F. & Gili T. Human Press.
- Wang, L., Correia, I., Basu, S., and Theoharides, T. C. (1999). Ca²⁺ and phorbol ester effect on the mast cell phosphoprotein induced by cromolyn. *Eur. J. Pharmacol.* 371, 241–249.
- Wang, X., Mori, T., Sumii, T. and Lo, E.H. (2002). Hemoglobin-Induced Cytotoxicity in Rat Cerebral Cortical Neurons: Caspase Activation and Oxidative Stress. *Stroke*; 33: 1882-1888
- Wenzel, H. J., Buckmaster, P. S., Anderson, N. L., Wenzel, M. E. and Schwartzkroin, P. A. (1997), Ultrastructural localization of neurotransmitter immunoreactivity in mossy cell axons and their synaptic targets in the rat dentate gyrus. *Hippocampus*, 7: 559-570.
- Wenzel, H.J., Woolley, C.S., Robbins, C.A., & Schwartzkroin, P.A. (2000). Kainic Acid-Induces Mossy Fiber Sprouting and Synapse Formation in the Dentate Gyrus of Rats. *Hippocampus*, 10:244-260.
- West, M.J., Slomianka, L., Gundersen, H.J.G., 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat

- hippocampus using the optical fractionator. *Anat. Rec.* 231, 482–
- Werner, C. & Engelhard, K. (2007). Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*; 99(1):4-9.
- Yushkevich PA, Pashchinskiy A, Oguz I. et al. (2003). User-Guided Segmentation of Multi-modality Medical Imaging Datasets with ITK-SNAP. *Neuroinformatics*.
- Zanier, E. R., Lee, S. M., Vespa, P. M., Giza, C. C., & Hovda, D. A. (2003). Increased hippocampal CA3 vulnerability to low-level kainic acid following lateral fluid percussion injury. *Journal of Neurotrauma*, 20(5) 409–420.