



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**VARIACIÓN DIURNA DEL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO EN LA  
SUSCEPTIBILIDAD Y NEUROPROTECCIÓN DEL CEREBRO FRENTE A UN  
TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO (TCE)**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**ESTRADA ROJO FRANCISCO**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**DR. JULIO EDUARDO ROQUE MORÁN ANDRADE  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM  
CD. MX., SEPTIEMBRE, 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Lic. Ivonne Ramírez Wazue  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informarle acerca que el Consejo Académico de Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 4 de junio de 2018, aprobó el siguiente punto para la presentación del examen para obtener el grado de DOCTOR EN CIENCIAS en el área de ESTRADA ROJO FRANCISCO, con número de cuenta ESCIBSEET, con el título de "VARIACIÓN DIURNA DEL SISTEMA GLUTAMATERGICO EN LA SUSCEPTIBILIDAD Y NEUROPROTECCION DEL CEREBRO FRENTE A UN TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO (TCEY)", realizada bajo la dirección de la DRA. MARÍA DELILUZ NAVARRO ANGULO

Presidente: LRA. MARÍA TERESA MORALES GUZMAN  
Vocal: DR. ARTURO CARLOS BELLEMER BRACHO  
Secretario: DR. ALFONSO FERRARDO ROQUE MORAN ANDRADE  
Suplente: DR. GABRIEL TOLDÁN RODRÍGUEZ  
Suplente: LRA. ROSALINDA GUEVARA QUEMÁN

Siempre le saludamos y esperamos que esté muy bien.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cd. Universidad Cd. México 22 de agosto de 2018

DR. ALFONSO FERRARDO NAVARRO SIGÜENZA  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS:

AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNAM

Este trabajo fue apoyado por los donativos CONACYT 152510 y DGAPA-PAPIIT  
IN223417

A mi Tutora la Dra. María de la Luz Navarro Angulo

A mi Comité Tutor Dra. Rosalinda Guevara Guzmán  
Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES:

A todos los miembros del Laboratorio de Neuroendocrinología del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina, UNAM, por su invaluable apoyo en el desarrollo de este trabajo.

## INDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. ANTECEDENTES	5
4.1 EL TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO (TCE)	5
4.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL TCE	6
4.3 LA NEUROPROTECCIÓN	8
4.4 MECANISMOS DE DAÑO MOLECULAR EN EL TCE	8
4.5 MODELOS DE TCE	20
4.6 EL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO	22
4.7 EL RECEPTOR NMDA EN EL TCE	27
4.8 VARIACIONES DIURNAS DEL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO	28
5. JUSTIFICACIÓN	32
6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	33
7. HIPÓTESIS	33
8. OBJETIVOS	33
9. METODOLOGÍA	33
9.1 ACONDICIONAMIENTO DE LOS SUJETOS EXPERIMENTALES	33
9.2 INDUCCIÓN DEL TCE	34
9.3 VARIACIÓN DIURNA DEL RECEPTOR NMDA EN RATAS CONTROL	34
9.4 VARIACIÓN DIURNA DEL RECEPTOR NMDA EN RATAS CON TCE	34
9.5 MEDIDAS DE METABOLISMO Y MORTALIDAD	34
9.6 ESCALA NEUROCONDUCTUAL	35
9.7 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL NMDAR	36
9.8 ELECTROFORÉISIS CON GEL DE POLIACRILAMIDA CON SDS(SDS-PAGE)	36
9.9 INMUNOELECTROTRANSFERENCIA	36
9.10 MICRODIÁLISIS	37
9.11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
10. RESULTADOS	38
10.1 RESULTADOS CONDUCTUALES	38
10.2 RESULTADOS SISTEMA GLUTAMATÉRGICO Y AMINOÁCIDOS	40
11. DISCUSIÓN	48
12. CONCLUSIONES	56
13. LITERATURA CITADA	57
14. APÉNDICE	74
1.-ARTÍCULO DE REQUISITO "DIURNAL VARIATION OF NMDA RECEPTOR EXPRESSION IN THE RAT CEREBRAL CORTEX IS ASSOCIATED WITH TRAUMATIC BRAIN INJURY"	74
2.-ARTÍCULO DE REVISIÓN "MODELS USED IN THE STUDY OF TRAUMATIC BRAIN INJURY"	81

## 1. RESUMEN

El cerebro es susceptible de sufrir daño por diversas causas; por ejemplo, en procesos como las enfermedades neurodegenerativas, la epilepsia, el cáncer o en eventos como la isquemia y el traumatismo craneoencefálico (TCE). En estos últimos dos casos, se activan respuestas que inducen muerte neuronal y daño cerebral, pero también respuestas de neuroprotección que intentan mantener la integridad y funcionalidad del cerebro. En este trabajo nos enfocamos en los mecanismos de neuroprotección en el TCE. Se sabe que posterior a un evento de este tipo, y dependiendo de su magnitud, se desencadenan procesos físicos como ruptura y desgarre de cuero cabelludo y fractura del cráneo, asimismo fenómenos bioquímicos como la llamada crisis metabólica asociada a la liberación de neurotransmisores excitadores como el glutamato. Tal aumento de glutamato provoca una entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  en las neuronas, la activación de proteasas, lipasas, la sintasa de óxido nítrico y endonucleasas, la producción de radicales libres y potencialmente necrosis y/o apoptosis. En este proceso, los receptores glutamatérgicos tipo NMDA juegan un papel crítico en el daño, por lo que han sido uno de los blancos terapéuticos para aminorar los efectos del TCE. Se sabe también que en este tipo de daño se activan mecanismos dirigidos a la neuroprotección del tejido.

Nuestro grupo ha demostrado previamente que la recuperación luego de un TCE depende de la hora del día en que se produjo el evento. Para explicar este hallazgo, proponemos que el sistema glutamatérgico posee un comportamiento cíclico, es decir, sigue un ritmo, tanto en la expresión de sus receptores, concretamente el receptor tipo NMDA, como en los niveles de glutamato en el espacio intracelular. La existencia de fluctuaciones a lo largo del día en estos componentes del sistema modularía el proceso de excitotoxicidad que sigue al TCE y por lo tanto actuaría como proceso neuroprotector.

Por lo anterior, en este estudio nos centramos en explorar la expresión del receptor NMDA, así como la liberación de glutamato a lo largo del día. Los resultados presentados muestran que efectivamente, ambos varían a lo largo del día en la corteza cerebral de la rata. Por un lado, el receptor NMDA tiene una mayor expresión durante las horas del día y menor durante la noche, mientras que los niveles de glutamato tienen un comportamiento opuesto; hay más glutamato durante las horas de la noche y menos durante las horas de luz. Lo que podría estar mostrando un comportamiento de regulación a la alta y a la baja del receptor NMDA. Estos resultados explicarían los datos de mortalidad y conducta que muestran que la severidad del daño ante un TCE y su recuperación varían de acuerdo con la hora del día en que se produce el evento.

Por otra parte, nuestros análisis de microdiálisis, arrojaron resultados interesantes con respecto a los niveles de varios aminoácidos, los cuales tienen importancia en la neuroprotección luego de un TCE.

Desde el punto de vista terapéutico, los resultados de este trabajo son importantes para enfocar estrategias que incrementen la neuroprotección, tomando en cuenta la hora del día en que se llevó a cabo el TCE.

## 2. ABSTRACT

The brain is susceptible of damage by several causes, including neurodegenerative diseases, epilepsy, cancer, and events such as ischemia and traumatic brain injury (TBI). Particularly in TBI, the injury induces both, neuronal death and brain damage, but protective responses that tend to maintain the integrity and functionality of the brain are also activated by the injury. It is known that during TBI, and depending on its magnitude, an increase in the release of excitatory neurotransmitters such as glutamate occurs, causing a massive influx of  $\text{Ca}^{2+}$  into neurons, together with activation of proteases, lipases, nitric oxide synthase and endonucleases, free radical production, and potentially necrosis and /or apoptosis.

After a TBI a response known as excitotoxicity, is activated. The cause of this response is by over-activation of NMDA glutamate receptors. The magnitude of this event determines to a large extent the secondary damage after a TBI.

Previous work from our group has documented that the recovery after damage by TBI depends on the time of day of the traumatic event.

This study is focused on the excitotoxicity phase of the lesion analyzing the daytime expression of glutamate receptor NMDA, and the release of glutamate neurotransmitter throughout the day. The results presented here show that both, glutamate release and the expression of NMDA receptor, fluctuate throughout the day. These findings are in agreement with the results on mortality and behavior, which show that damage and recovery from TBI vary according to the time of day when this event occurs. Also, present results suggest that the day time variations in the glutamatergic system, and therefore the excitotoxicity process, cause a differential magnitude of brain damage.

Finally, it is important to mention that important variations during the day in the levels of amino acids, such as GABA, glycine, aspartate, phenylalanine, tyrosine and the so-called branched were detected by microdialysis, which are important in various brain functions and are markers of damage by TBI.

From a therapeutical point of view, these results are important in designing strategies to increase the neuroprotection, regarding the time of day when TBI presents.

### 3. INTRODUCCIÓN

Cuando ocurre una lesión en el cerebro, se activan dos tipos de mecanismos que se contraponen: unos que generan más daño y otros que generan protección. El balance final entre ambos procesos es lo que determinará el grado de la lesión (Leker y Shohami, 2002). Los mecanismos que se oponen al daño se engloban en el concepto de neuroprotección y pueden clasificarse en endógenos, que son los que desencadena el propio organismo (Levin y Peeples, 2008), y los exógenos que se refieren a las estrategias farmacológicas, físicas o quirúrgicas etc. que se aplican para delimitar el daño final (Jain, 2011).

Para estudiar este evento, se han desarrollado diversos modelos los cuales han permitido la recreación en condiciones controladas y estandarizadas (Cernak, 2005). Nuestro grupo estudia los mecanismos de neuroprotección utilizando un modelo experimental de traumatismo craneoencefálico (TCE) del tipo “*closed head injury*” y particularmente del tipo “*weight drop model*” o por caída de peso (Marmarou y cols., 1994; Prieto y cols., 2009).

Actualmente el TCE es un problema de salud relevante, con una afectación de más de un millón de personas al año tanto en Estados Unidos como en Europa (McAllister, 2011). En México, aunque no hay datos precisos, sí se puede ubicar al TCE como una de las cuatro primeras causas de muerte (SINAIS, 2013). Además, en esos países, los costos de rehabilitación para la población que ha sufrido un TCE se estiman en aproximadamente 2000 millones de dólares anuales (Mc Allister, 2011). En México no hay una cifra concreta, pero se puede inferir de datos del SINAIS un gasto aproximado de entre 1000 y 1500 millones de pesos anuales (SINAIS, s f).

En cuanto a la fisiopatología del TCE, inicialmente se genera una cascada de eventos físicos como la ruptura del cuero cabelludo, del cráneo, de la barrera hematoencefálica, de los vasos sanguíneos y de la propia masa encefálica (El Sayed y cols., 2008; Alves, 2014). Esto último provoca disrupción del citoesqueleto neuronal y daño axonal difuso. También hay cambios a nivel molecular, interrupción del transporte axonal, desequilibrio iónico y liberación de neurotransmisores. Dentro de este último evento, la liberación excesiva de glutamato es relevante, ya que activa a sus receptores como los NMDA, que inducen un aumento en la excitabilidad neuronal, así como un incremento en la concentración interna de calcio, lo que a su vez provoca la generación de radicales libres de oxígeno citoplásmicos y mitocondriales (Tewari y cols., 2014). Además se activan proteasas (Rovegno y cols., 2012) y consecuentemente, se presentan necrosis y/o apoptosis (Gamal-Hadam, 2005).

La liberación excesiva de glutamato y los cambios que ésta genera se conocen como excitotoxicidad que junto con la inflamación, son de los más importantes en la generación de daño al cerebro, por lo que su conocimiento es fundamental para desarrollar estrategias que los limiten, y así restringir el daño post-TCE (Dirgnal y cols., 2003).

En nuestro laboratorio, el estudio del TCE nos ha permitido reportar datos relevantes sobre la neuroprotección; por ejemplo, hemos documentado que la

susceptibilidad y, por lo tanto, la recuperación ante un TCE presentan una variación diurna (Martínez-Vargas y cols., 2006; Morales-Gomez y cols., 2010). Parámetros como la mortalidad, el peso corporal a las 24 horas post-TCE y la ejecución de una escala neuroconductual (Bederson y cols., 1986; Desland y cols., 2014) muestran que los sujetos experimentales, cuyo daño se induce en horas de obscuridad, tienen una mejor recuperación en comparación con aquellos en los que el daño se induce en horas de luz (Martínez y cols., 2006; Morales-Gomez y cols., 2010). Estamos interesados en estudiar el mecanismo que subyace a este fenómeno.

Una posible explicación de este fenómeno es que el sistema glutamatérgico, en su conjunto o en alguno de sus componentes, tenga una variación diurna. Existen varios antecedentes en la literatura que muestran que los sistemas de neurotransmisión pueden presentar variaciones diurnas. Un ejemplo clásico de esto es la variación diurna del receptor  $\beta$ -adrenérgico en la glándula pineal (Romero y cols., 1975; Carter, 1993). La glándula pineal es uno de los osciladores internos por excelencia, por lo que no sorprende esta variación; sin embargo, existen antecedentes de variaciones rítmicas de sistemas de neurotransmisores en otros sitios del cerebro. Por ejemplo, se ha descrito que, en estructuras como el puente, el estriado y el núcleo acumbens, existe una variación diurna en la liberación de GABA (Duvilansky y cols., 2003; Castañeda y cols., 2004).

Para el caso específico del sistema glutamatérgico, además de variaciones en el núcleo supraquiasmático, reloj maestro del organismo (Glass y cols., 1993), no hay reportes de variaciones rítmicas en otros sitios del cerebro, salvo una referencia a las variaciones del transportador VGLUT en corteza cerebral (Darna y cols., 2009) y la variación en la expresión del receptor AMPA en bulbo olfatorio, el cual también es considerado un oscilador circadiano (Corthell y cols., 2012; Vilches y cols., 2014).

Por otra parte, el análisis por microdiálisis mostró resultados interesantes en cuanto al nivel de aminoácidos que funcionan como neurotransmisores tales como GABA, aspartato, glicina, alanina y el precursor de glutamato y GABA, la glutamina, que presentan variaciones durante las 24 horas.

Otro resultado obtenido y de importancia, es el perfil en los niveles de fenilalanina y tirosina durante las 24 horas. Estos aminoácidos son importantes para la formación de catecolaminas, las que a su vez cumplen funciones importantes a nivel cerebral (Fernstrom, 1990).

Recientemente se ha documentado que los niveles de leucina, isoleucina y valina, llamados aminoácidos de cadena ramificada (BCAA), se modifican luego de un TCE. Estas mediciones se han llevado a cabo tanto en plasma como en hipocampo en humanos y en modelos animales (Cole y cols., 2010, Jeter y cols., 2013)

Conocer la variación diurna del sistema glutamatérgico y de varios aminoácidos a nivel cerebral, es de utilidad en el desarrollo de terapias más precisas para atender a un paciente con TCE.

## 4. ANTECEDENTES

### 4.1 EL TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO (TCE)

Para poder realizar cualquier investigación es necesario contar con un marco teórico adecuado, el cual debe quedar patente cuando se define de manera precisa y clara el tema de estudio. En este sentido, definir el TCE es fundamental ya que a partir de ahí podemos centrar las investigaciones correspondientes, la fisiopatología, los efectos secundarios y las posibles alternativas de neuroprotección, entre otros.

Más aún, en clínica es fundamental conocer lo que implica un TCE, dado que en los últimos años las causas que provocan un evento de este tipo han aumentado y un mal diagnóstico puede tener consecuencias graves (Ruff y cols., 2009).

El TCE se define como “una alteración en la función cerebral u otra evidencia de patología cerebral causada por una fuerza externa” (Menon y cols., 2010). Es importante hacer algunas precisiones sobre esta definición general; una alteración en la función cerebral se refiere a la disminución o pérdida de la conciencia, que puede acompañarse con pérdida de memoria para eventos inmediatamente anteriores al TCE (amnesia) o después de la lesión (amnesia postraumática).

Otro aspecto a considerar es la aparición de deficiencias neurológicas como debilidad, pérdida de equilibrio, visión, parálisis / parálisis de la dispraxia, afasia sensorial, etc. Además, el TCE también puede inducir alteraciones en el estado mental como confusión, desorientación, retraso en el pensamiento, etc.

Es conveniente resaltar que estas evidencias deben apoyarse en estudios visuales, radiológicos y de laboratorio para confirmar el daño al cerebro, para no confundir el diagnóstico de TCE con los efectos de dolores crónicos, shocks, la ingesta de alcohol o el consumo de drogas (Menon y cols., 2010).

La parte de la definición que refiere a las ‘fuerzas externas’, incluye el golpe en la cabeza por un objeto, así como cuando el cerebro es sometido a aceleración y desaceleración, cuando hay penetración de un objeto o bien cuando hay fuerzas generadas por eventos externos como en una explosión u otras fuerzas aún por definir (Project. NINDS, 2010).

Hay que aclarar que la definición de Menon, es la que se acepta de manera general. Sin embargo, en clínica suele definirse al TCE como la energía aplicada sobre el cráneo y su contenido dando como resultado la lesión de sus estructuras (Bakay y Glauser, 1983).

**Clasificación del TCE.** Actualmente se maneja el TCE en categorías de leve, moderado y severo, desplazando a las definiciones de conmoción o concusión (pérdida de la conciencia de corta duración y sin alteraciones neuroanatómicas y daño neurológico) y a la de contusión (pérdida prolongada de la conciencia con signos neurológicos anormales y lesión anatómica del encéfalo). Esto fue establecido en los trabajos de Strich (1961) y Oppenheimer (1968) en la Universidad de Oxford, quienes fueron pioneros en la investigación a nivel básico del TCE.

Así, la gravedad de la lesión cerebral traumática se clasifica a menudo utilizando la Escala de Coma de Glasgow (ver figura 1) que lo califica grave o severo cuando el paciente obtiene un puntaje de 8 o menor; como moderado si la puntuación está entre 9 y 12; y, como leve cuando la puntuación está entre 13 y 15. Vale la pena señalar que los TCE clasificados como leves pueden asociarse con un deterioro significativo, invalidez y morbilidad a largo plazo. La lesión cerebral traumática que amerita hospitalización se asocia con un aumento del riesgo de epilepsia, depresión, deterioro cognitivo y muerte (ABC del traumatismo craneoencefálico, Colegio ABC de medicina de emergencia y reanimación, 2018).

**A**

AREA EVALUADA	PUNTAJE
<b>APERTURA OCULAR</b>	
Esponánea	4
Al Estímulo Verbal	3
Al Dolor	2
No Hay Apertura Ocular	1
<b>MEJOR RESPUESTA MOTORA</b>	
Obedece Ordenes	6
Localiza el Dolor	5
Flexión Normal (Retina)	4
Flexión Anormal (Descorticación)	3
Extensión (Descerebración)	2
No hay Respuesta Motora	1
<b>RESPUESTA VERBAL</b>	
Orientada, Conversa	5
Desorientada, Confusa	4
Palabras Inapropiadas	3
Sonidos Incomprensibles	2
No hay Respuesta verbal	1

**B**

ESCALA DE GLASGOW (LACTANTES)	
ACTIVIDAD	PUNTOS (mejor respuesta)
<b>Abertura ocular</b>	
Esponánea	4
Al hablarle	3
Al dolor	2
Sin respuesta	1
<b>Respuesta verbal</b>	
Gorjeos, balbuceos	5
Irritable	4
Llanto al dolor	3
Quejido al dolor	2
Sin respuesta	1
<b>Respuesta motora</b>	
Localiza dolor	5
Retirada al dolor	4
Flexión al dolor	3
Extensión al dolor	2
Sin respuesta	1

Figura 1. Escala de Glasgow. En la parte A para adultos; en la parte B para niños de 3 a 36 meses. Tomada de Slideshare.net.

#### 4.2 EPIDEMIOLOGÍA DEL TCE

El TCE representa un importante problema de salud pública en México y en todo el mundo. En Europa hay una incidencia promedio de aproximadamente 235 por cada 100,000 habitantes, con un rango de 150 a 300/100,000 por año (Tanglianferri y cols., 2006). En algunos países las estadísticas al respecto son

muy certeras. Por ejemplo, en Noruega hay un centro de referencia de trauma en donde recientemente se llevó a cabo un estudio multicéntrico que potencialmente puede abarcar a toda la población, para explorar la incidencia de admisiones hospitalarias por TCE severo. El estudio involucra tanto población rural como urbana y concluye con datos muy precisos de incidencia por edad, género y causa de TCE (Andelic y cols., 2012). También en Escocia (Shivaji y cols., 2014), Irlanda (Collins y cols., 2013) y España (Ferrerros y cols., 2012).

Por lo que respecta a Norteamérica, concretamente en Estados Unidos, también existen estadísticas muy precisas acerca de la incidencia de TCE. El Centro de Control de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés) de Atlanta en su reporte de morbilidad y mortalidad semanal de julio del 2013, destacó que durante 2009 hubo alrededor de 2 millones y medio de personas que se hospitalizaron o murieron como consecuencia de un TCE y recientemente reporta que 5 millones sufren secuelas relacionadas a TCE. Otro dato importante son las cifras en cuanto al costo que representa para el sistema de salud estadounidense, la incidencia del TCE. Tan solo para el 2010, el gasto fue de 76.5 mil millones de dólares entre el costo directo e indirecto (Centers for Disease Control and Prevention, 2013).

En el caso de Latinoamérica, son pocas las publicaciones sobre TCE, destacan estudios sobre monitoreo de pacientes con TCE en los que se vigila la presión intracraneal (Chesnut y cols., 2012. Carney y cols., 2012) en Argentina, Colombia y Ecuador. Asimismo existe un estudio en Cuba que abarca 5 años, pero que es muy limitado (Quintanal-Cordero y cols., 2006), por lo que no hay reportes de estudios retrospectivos ni prospectivos del tema.

La prevalencia de la discapacidad después de la hospitalización por TCE es especialmente alta en los distintos países de donde se obtienen datos. Es por esto que una mejor comprensión de la epidemiología del TCE se vuelve importante, sobre todo para países como México en donde, de acuerdo con el Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS) consultado en octubre 2016, el TCE es la tercera causa de muerte en la población, con 35,567 defunciones que incluyen circunstancias violentas y accidentes representando una mortalidad de 38.8 por cada 100 mil habitantes. En relación a la incidencia por género, los datos muestran que son más los casos de TCE en el varón en una proporción de 3:1. También, se reportó que afecta principalmente a la población con edades entre 15 a 45 años. Entre las causas más comunes de TCE se encuentran los accidentes de tráfico con un 75% aproximadamente, afectando más a los jóvenes menores de 25 años, motociclistas y conductores en estado de ebriedad (Epidemiología, Sistema de Vigilancia epidemiológica, SSA 2008). Los datos anteriores muestran que el TCE es un problema grave de salud pública en eso radica la importancia de contar con datos precisos de su incidencia, de manera puedan implementarse acciones preventivas y abordar este problema con tratamientos adecuados, así como planear estrategias de investigación efectivas.

### 4.3 LA NEUROPROTECCIÓN

El término neuroprotección es relativamente reciente. En los años cincuenta del S. XX es cuando se publica por primera vez información que califica a la vitamina E como una sustancia neuroprotectora, (Oggioni, 1953) aunque ya en los treinta y se hablaba de agentes deshidratantes como protectores cerebrales (Fay, 1935) Sin embargo, se sabe que en la antigua Grecia los médicos usaban la hipotermia para los traumatismos en la cabeza como una terapia neuroprotectora (Jain, 2011; Navarro y cols., 2013). El término neuroprotección puede tener un enfoque clínico-terapéutico cuando se refiere al empleo de cualquier modalidad terapéutica que previene, retarda o “revierte” la muerte celular resultado de una lesión neuronal (Barkana y Belkin, 2004). Es decir, la neuroprotección abarcaría un grupo de estrategias terapéuticas como las que se consideran cuando se habla de citoprotección en general o específicamente como en el caso de la cardioprotección o la vasoprotección (Levine y Peebles, 2008).

Cuando surge una lesión en la cabeza, el propio cerebro también despliega procesos para minimizar los efectos deletéreos, es decir también hay una neuroprotección endógena, y en este sentido el término neuroprotección se ha utilizado para referirse a las respuestas que el propio organismo activa posterior a un evento traumático, con el propósito de mantener la integridad y funcionalidad del cerebro (Lecker y Shohami, 2002). En épocas más recientes, el término “neuroprotección” hace énfasis al balance de las respuestas que el cerebro, exhibe frente a un evento de isquemia o ante un TCE. Al final de este balance es lo que determina la gravedad del daño (Dirnagl y cols., 2003).

### 4.4 MECANISMOS DE DAÑO MOLECULAR DEL TCE(FISIOPATOLOGÍA)

**La lesión.** Un TCE ocurre cuando una fuerza externa o un proceso de aceleración impacta al cerebro; dependiendo de la magnitud de la energía aplicada se establecerá el tipo y la magnitud del daño, el cual se debe en gran parte a la tensión a la que el cráneo es sometido. En este sentido actualmente existen varios modelos para estudiar el TCE, la mayoría de ellos se han desarrollado para estudiar qué ocurre después de un evento traumático. Otros modelos, de tipo matemático, pueden predecir el daño dependiendo de la tensión a la que el cráneo es sometido ya sea de manera aguda o repetitiva (figura 2) (Estrada-Rojo y cols., 2018). Esto ha permitido establecer que el impacto a velocidades bajas de 3m/s el causan lesión cerebral. Estos modelos han sido desarrollados con base en criterios como el “head injury criterion” (HIC) que considera varios parámetros sobre magnitudes de lesiones cerebrales, como tensiones de Von Mises, máxima aceleración lineal, presión máxima y criterios de lesión en la cabeza (Meyer y cols., 2010). Otros modelos han demostrado el papel de las meninges y los vasos sanguíneos como amortiguadores de los impactos (Kleiven y Hardy, 2010; Yue y Wang, 2002; Cazon y Suescun, 2009). Recientemente, el modelo de elementos finitos (MEF) ha permitido establecer los cambios en la tensión del cráneo provocados por un TCE, así como la deformación y fuerza que pueden soportar estructuras como el cuero cabelludo, las meninges y los vasos sanguíneos, de manera que se puede predecir cómo algunos eventos sobre todo de tipo repetitivo (como los golpes en deportes como el box y el fútbol) impactan al cerebro (Ponce

y cols., 2011). Técnicas de imagenología aplicadas en modelos como el de fase armónica (HARP) revelan la forma en que el impacto lesiona estructuras como el nervio ocular, ocasiona daño axonal difuso y ocasiona encefalopatía crónica (Bayly y cols., 2006). El daño axonal difuso es resultado de la aplicación de fuerzas de sección sobre los axones, en la mayoría de los casos por aceleración rotacional, lo que provoca el cizallamiento, tensión y fuerzas de compresión que deforman el tejido. Estudios *in vitro*, han evidenciado que los axones sometidos a estiramiento se desalinean, se tornan ondulados y pierden elasticidad, debido al daño del citoesqueleto. Este daño altera los canales de sodio y hay influxo de este catión. Esto permite a su vez, la entrada de calcio por los canales de calcio voltaje-dependientes, lo que provoca el aumento de la actividad proteolítica, deterioro de la función y acúmulo de proteínas axonales de transporte dentro del axón. Se origina edema axonal, provocando la disfunción de sistemas como el activador reticular ascendente, cuya expresión clínica es la desconexión de las aferencias y del paciente con el entorno (Xiao-Sheng y cols., 2000, Smith y cols., 1999, Wolf y cols., 2001).

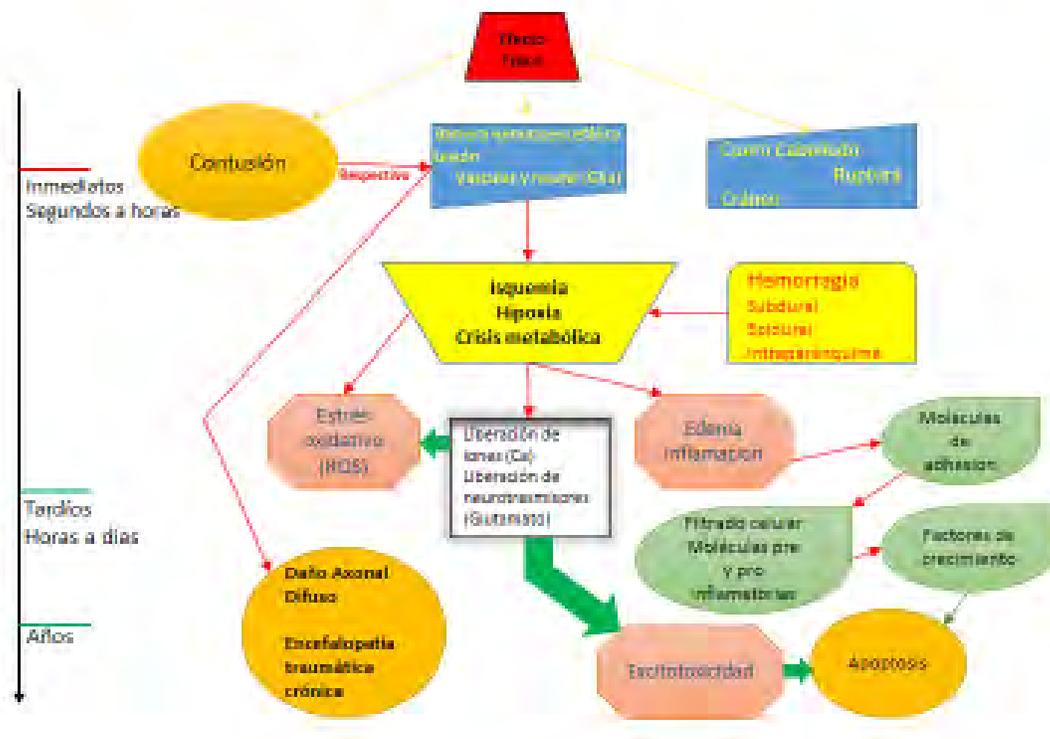


Figura 2. Cronología de los eventos en un traumatismo craneoencefálico.

**La hemorragia y el edema.** Cuando un impacto genera una sobretensión en el cráneo, sobreviene una ruptura y generalmente una hemorragia. El área que presenta la hemorragia se conoce como hematoma y su ubicación anatómica determina el tipo de disfunción que ocasionará.

El hematoma epidural se forma entre el cráneo y la duramadre, es normalmente de forma biconvexa, lo más común es que se forme en la zona temporal, puede producir midriasis y si es expansiva y no se evacúa a tiempo puede causar la muerte por compresión del foramen magnum (Paternitiy y cols., 1994; Gaetani y cols., 1995).

El hematoma subdural es más común que el epidural, en este caso, la acumulación hemorrágica es entre la duramadre y la aracnoides y se distribuye a lo largo de la superficie cerebral. Evaluar su grosor es clínicamente importante, por ejemplo un grosor mayor a 18 mm es mal pronóstico, mientras que un grosor de 5 mm es bueno (Rivas y cols., 1988).

El hematoma subaracnoideo se establece entre la aracnoides y la piamadre, la presencia de este hematoma eleva el mal pronóstico del paciente. La reducción oportuna es importante para la recuperación del paciente (Gaetani y cols., 1995, Bullok y cols., 1989).

Los hematomas intraparenquimatosos, son consecuencia del movimiento brusco del encéfalo en el interior del cráneo que provoca contusión cerebral y ruptura de vasos sanguíneos. Generalmente se localizan en los lóbulos frontal y temporal, pueden producir efecto de masa (Taneda y cols., 1996; Miller y cols., 1981; Bullok y cols., 1989).

La barrera hematoencefálica: es una unidad anatómica microestructural que contiene diversos componentes, los cuales juegan papeles relevantes en el mantenimiento de la regulación fisiológica normal del cerebro (Alves, 2014). La barrera hematoencefálica tiene además mecanismos de transporte diferenciados, lo que la hace una verdadera unidad gliovascular, con células gliales y endoteliales funcionando e interaccionando de manera paracrina (Alves, 2014; Schwarzmaier y cols., 2010).

Durante un TCE las uniones comunicantes de la barrera se pierden y la membrana basal permite un aumento de la permeabilidad. Esto desencadena un proceso proinflamatorio, que a su vez provoca liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS), causando estrés oxidativo y una sobre-expresión de moléculas de adhesión, influjo de células inflamatorias dentro del parénquima cerebral, esto acrecienta la lesión y promueve excitotoxicidad y muerte celular. Las paredes rotas de los microvasos cerebrales activan la cascada de coagulación, lo que origina formación de trombos y oclusión de venas y arteriolas (Schwarzmaier y cols., 2010; Stein y cols., 2002). Además de estos procesos, la barrera hematoencefálica libera factores como la albumina y el fibrinógeno que generan disrupción vascular y/o aumentan la permeabilidad (Chodobsky y cols., 2011). La albumina, al estar en contacto con la microglía, incrementa el calcio intracelular y promueve su proliferación, ya que activa la proteína cinasa asociada a los microtúbulos (MAPK), además induce, por un lado, la producción de óxido nítrico (NO) (Hooper y cols., 2005) por la vía denominada ERK así como la síntesis de interleucina 1(IL-1) (Hooper y cols., 2009).

Los parámetros anteriormente descritos deben considerarse en un paciente con TCE, ya que afectan la presión intracraneal (PIC), la diferencia entre ésta y la

presión arterial promedio (PAM) determinan la presión de perfusión cerebral (PPC), la cual debe estar en un rango de 50 a 150 mmHg para que no se altere el flujo sanguíneo cerebral (FSC). Los cambios de volumen intracerebral afectan la PIC, el aumento del volumen cerebral, producirá reducción del volumen sanguíneo venoso y del líquido cefalorraquídeo (LCR) para mantener la PIC. Inicialmente se reduce el volumen venoso, pero su capacidad de elastancia se agota mucho antes que la del LCR ante el aumento progresivo y sostenido de la PIC, mientras que el volumen arterial es el menos complaciente, e incluso puede generar aumento de la PIC. El aumento de la PIC somete al tallo encefálico a hipoperfusión e isquemia, lo cual activa al sistema nervioso autónomo simpático y al parasimpático que tratan de aumentar el volumen latido y la presión arterial a niveles que superen la presión ejercida sobre el tallo encefálico. Esta respuesta fisiológica ante la elevación de la PIC, trae hipertensión arterial sistémica y bradicardia (figura 3) (Gamal-Hadam, 2005).

### Regulación de la PIC en un TCE

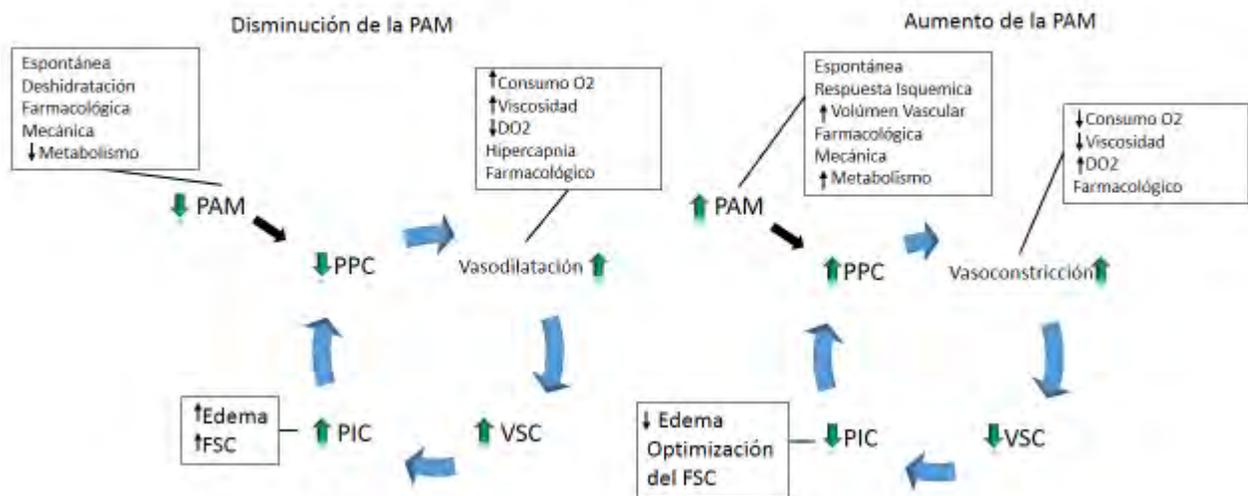


Figura 3. Regulación de la presión intracraneal en un traumatismo craneoencefálico. PIC: presión intracraneal; PAM: presión arterial media; PPC: presión de perfusión cerebral; VSC: FSC: flujo sanguíneo cerebral. Modificado de Gamal-Hadam, 2005.

**Núcleo isquémico y penumbra isquémica.** Durante un TCE, un evento importante es la ruptura y/o oclusión de arterias, venas y vasos, lo que posteriormente desencadenara en otros eventos dañinos, dada la importancia de este evento describiremos brevemente las fases de la isquemia cerebral.

Al obstruirse una de las arterias cerebrales, el flujo sanguíneo en el territorio vascular afectado disminuye por debajo de un nivel crítico (de 55ml/100g/min a menos de 12ml/100g/min). Ello da lugar a una zona central severamente hipoperfundida (núcleo isquémico), donde el flujo sanguíneo cerebral (FSC) disminuye de 15 a 10 ml/100g/min, en tanto que en la periferia se establece una

isquemia menos pronunciada (entre 15 y 35ml/100g/min), llamada penumbra isquémica. En el núcleo isquémico, se produce daño celular irreversible y muerte celular aguda, principalmente por necrosis. En la penumbra isquémica se conserva una actividad metabólica mínima que preserva la integridad estructural neuronal, lo que la hace potencialmente reversible a la isquemia. Si no se toman las medidas terapéuticas adecuadas, se produce la muerte gradual de las neuronas de esta zona por apoptosis mediada por genes (Hernández-Díaz y cols., 2009).

El concepto de la penumbra isquémica se formuló hace 30 años basándose en experimentos en modelos animales que muestran deterioro funcional y alteraciones electrofisiológicas con la disminución del flujo al cerebro por debajo de valores definidos (el umbral para la función) y el daño irreversible del tejido con el suministro de sangre aún más disminuido (el umbral de infarto).

El rango de perfusión entre estos umbrales se denominó 'penumbra', y la restitución del flujo por encima del umbral funcional fue capaz de revertir los déficits sin daño permanente. Sin embargo, en otros experimentos, se observó que la dependencia entre el desarrollo de lesiones irreversibles dependía de la interacción entre la gravedad de la lesión y la duración de la reducción del flujo sanguíneo, esto es crítico ya que se demostró que cuanto menor es el flujo, más corto es el tiempo para la reperfusión eficiente. Por lo tanto, se desarrolla un infarto desde el núcleo de la isquemia a las áreas de hipoperfusión. La propagación de daño irreversible del tejido se caracteriza por una compleja cascada de eventos interconectados, electrofisiológicos, moleculares y alteraciones metabólicas (Heiss, 2011).

**Hipoxia e Isquemia.** La lesión cerebral se acompaña de isquemia, al haber falta de perfusión no hay oxígeno suficiente, lo que conduce a hipoxia. Esto a su vez induce a la producción de energía dependiente del glicólisis anaeróbico, que es un mecanismo poco eficiente de producción de ATP, disminuyendo sus niveles. Los niveles de ATP comienzan a disminuir en forma sustancial en los primeros 3 minutos de hipoxia. Al no haber suficiente ATP las bombas como la sodio-potasio ATPasa se vuelven inoperantes y la carga asociada a la membrana neuronal cambia, lo cual tiene efectos en la excitabilidad de la neurona, que puede volverse hiperexcitable. Además, por un efecto osmótico, ingresa agua, generado edema. Otro efecto causado por el proceso hipoxico es la falla de las ATPasa de Ca, las cuales bombean el calcio al exterior celular, al no funcionar adecuadamente, el calcio aumenta su concentración intracelular, lo cual activa diversas vías metabólicas y promueve la salida de neurotransmisores; como el glutamato lo que a su vez contribuye a aumentar la excitotoxicidad; el propio aumento de calcio intracelular causa la activación de vías apoptoticas (Siesjö, 1992a; 1992b; Budd y Nichols, 1996).

La modificación de los niveles intracelulares de sodio, debido al malfuncionamiento de la ATPasa sodio-potasio, altera el funcionamiento de los intercambiadores calcio-sodio y sodio-hidrogenión. El primero disminuye el calcio intracelular, por lo que al no cumplir su función mantiene elevado este ion con las consecuencias ya señaladas. El segundo mantiene el pH de la neurona, por lo

tanto, al afectarse genera acidosis, en este estado la mitocondria no puede almacenar calcio, aumentando aún más la concentración intracelular de calcio lo que produce activación de proteasas y fosfolipasas, que a su vez conducen a la proteólisis y ruptura de la membrana (Guyton y Hall, 2001; Silver y Erecinska, 1990; Pringle, 2004; Tauskela y Morley, 2004).

Otra consecuencia de la isquemia y la falta de ATP es la acumulación de catabolitos purínicos como xantina e hipoxantina, que tienen como sustrato al oxígeno. Cuando se da el fenómeno de reperfusión y hay disponibilidad de oxígeno, estos catabolitos son metabolizados por la enzima xantino-oxidasa, generando superperóxido, posteriormente la superóxido dismutasa (SOD), en presencia de hierro, los transforma a peróxido de hidrógeno, es decir hay producción de ROS lo que genera peroxidación de lípidos de la membrana, y por lo tanto su destrucción. Este es un proceso que sucede aproximadamente 20 a 24 horas después del daño inicial (Rink y cols., 1995; Wei y cols., 1999; Paolin y cols., 2002.)

**Excitotoxicidad.** Desde las enfermedades neurodegenerativas, hasta los procesos agudos de daño, como el TCE y/o los eventos isquémicos cursan por pérdida neuronal sustancial, incluso el envejecimiento puede ocasionar dicha pérdida.

Numerosos estudios se han publicado acerca de los mecanismos implicados en la inducción de “la muerte neuronal”, las modificaciones celulares y moleculares que conducen a la muerte y el diseño de estrategias terapéuticas para prevenir o disminuir el daño neuronal o incluso para promover la regeneración.

Sin duda el mecanismo de inducción de muerte neuronal más abordado tanto a nivel de investigación básica como clínica es la excitotoxicidad, la cual es inducida por el glutamato el principal neurotransmisor excitatorio del sistema nervioso. Actualmente se conoce otro neurotransmisor de tipo inhibitorio, el GABA que también puede inducir este proceso, además otros neurotransmisores pueden sinergizar el efecto.

¿Qué es la excitotoxicidad? En 1971 se acuña el término excitotoxicidad por J.W. Olney, quien describe que este proceso genera muerte neuronal por sobre-activación de los receptores sensibles a glutamato. En esos años ya se sabía que el glutamato era excitatorio pero aún no se conocía la diversidad funcional de sus receptores (Olney, 1971). Los experimentos que se realizaron consistían en inducir la muerte neuronal, aplicando concentraciones elevadas de glutamato monosódico (Lucas y Newhouse, 1957; Olney 1971, Garattini 1979). Hoy se conoce que no sólo la sobre-activación sino la sobre-expresión de los receptores glutamatérgicos contribuye a la excitotoxicidad (Mishra y cols., 2001). En la actualidad, el término excitotoxicidad se utiliza para referirse de manera más amplia a la muerte neuronal que produce la excitación prolongada de las neuronas, ya sea a través de la activación directa de receptores sensibles a glutamato ó por algún otro mecanismo, incluso por sobre-activación de receptores sensibles a GABA (Nuñez y col, 2003).

¿Cómo se da la excitotoxicidad? Una vez que hay activación de los receptores glutamatérgicos, y por lo tanto ingreso de sodio y calcio a la neurona ocurre una despolarización de la membrana, lo que a su vez la vuelve excitable. Si la despolarización se mantiene, sobreviene la entrada masiva de iones positivos que provocan un desequilibrio osmótico, además al elevarse la concentración del calcio en el citoplasma se activan una serie de vías metabólicas, las cuales se describirán más adelante en detalle (Doble, 1999). La entrada de  $\text{Na}^+$  altera la dirección y funcionalidad de todos los transportadores, bombas y canales iónicos que dependen de su gradiente (Greene y Greenamyre, 1996; Doble, 1999).

Por otra parte, también se presenta el influjo de  $\text{Cl}^-$ , el cual además de alterar diferentes mecanismos de transporte a nivel de la membrana plasmática, estimula la liberación de glutamato y promueve la muerte neuronal por excitotoxicidad (Babot y cols., 2005).

El aumento excesivo de la concentración citoplasmática de calcio, promueve: 1) la síntesis del óxido nítrico, el cual puede difundir a la terminal presináptica glutamatérgica y estimular la liberación de más glutamato, a través de un mecanismo dependiente de GMPc (monofosfato cíclico de guanidina); 2) la generación de radicales libres, peroxinitrito o superóxido, que promueven la lipoperoxidación y desestabilización de las membranas celulares; y 3) la pérdida del potencial electroquímico mitocondrial, que suspende la fosforilación oxidativa y promueve la generación de radicales libres, hasta inhibir completamente el metabolismo energético mitocondrial.

Además, la elevación en la concentración citoplasmática de calcio, activa diversas vías de señalización intracelular dependientes de proteínas cinasas o fosfatasa, desencadenando la proteólisis del contenido citoplasmático (Greene y Greenamyre, 1996; Montal, 1998; Arundine y Tymianski, 2003).

El proceso excitotóxico descrito anteriormente como un continuo, puede ser demasiado agudo en su fase inicial y desencadenar la muerte neuronal por necrosis, o evolucionar más lentamente y producir muerte neuronal por apoptosis. Se ha demostrado, en estudios *in vitro*, que la aplicación de glutamato produce diversos tipos de neurodegeneración, dependiendo del esquema de aplicación (Bonfoco y cols., 1995; Portera-Cailliau y cols., 1997; Almeida y cols., 1998).

Cuando las neuronas se exponen a concentraciones elevadas de glutamato de manera breve hay muerte neuronal aguda, acompañada de procesos inflamatorios, tanto en soma como en dendritas hay aparición de núcleos picnóticos, en un proceso que se caracteriza por ser dependiente de sodio y cloruro.

Por otra parte, la exposición prolongada al glutamato en concentraciones menos elevadas, produce muerte neuronal retardada, la cual depende del influjo de calcio y se presenta después de varias horas (Romano y cols., 1995; Portera-Cailliau y cols., 1997).

Además, también se ha sugerido que el proceso degenerativo estimulado por glutamato depende en gran medida del estado funcional inicial de la mitocondria.

De esta forma, cuando existe una disminución en la tasa metabólica celular, la mitocondria es incapaz de mantener la homeostasis de  $\text{Ca}^{2+}$ , presentándose la muerte neuronal por apoptosis (Portera-Cailliau y cols., 1997; Almeida y cols., 1998).

Los estudios tanto *in vivo* como *in vitro* realizados en diferentes sistemas neuronales, sobre la generación de excitotoxicidad por glutamato y las demostraciones de que la concentración extracelular de glutamato se eleva significativamente en diversas condiciones patológicas, han permitido establecer que este mecanismo participa en la muerte neuronal que se produce por hipoxia-isquemia cerebral (Choi y Rothman, 1990), TCE (Bramlett y Dietrich, 2004; Wagner y cols., 2005), epilepsia (Meldrum, 1993a; Friedman y cols., 2003).

Además, se ha propuesto que la excitotoxicidad tiene ingerencia en diversos padecimientos neurodegenerativos como las enfermedades de Huntington (Beal y cols., 1991; Gardian y Vecsei, 2004), Alzheimer (Ferrarese y cols., 2000; Hynd y cols., 2004) y Parkinson (Lipton y Rosenberg, 1994).

**Excitotoxicidad por GABA.** En el cerebro existen amplias porciones donde coexisten tanto las neuronas glutamatérgicas como las GABAérgicas, estas últimas tienen una concentración intracerebral alta (Tapia, 1983), su función es el control de la excitabilidad neuronal, promoviendo procesos inhibitorios, de hecho, GABA es considerado el neurotransmisor inhibitorio por excelencia (Wu, 1983).

En gran parte del cerebro existe convergencia de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas, de manera tal que el control de la excitabilidad está balanceado (Ureña-Guerrero y cols., 2009).

El GABA tiene dos tipos de receptores: el  $\text{GABA}_A$  que es ionotrópico y permite la difusión del cloruro, mientras que el  $\text{GABA}_B$  es metabotrópico y regula a canales de calcio y potasio, a través de activación de proteínas G y segundos mensajeros, inactivándolos para disminuir la liberación de neurotransmisores (Bormann, 1988).

Desde principios de los años 1990's, se tuvo evidencia de que la activación excesiva de los receptores  $\text{GABA}_A$ , localizados en la región CA1 del hipocampo, generaba una despolarización y no una hiperpolarización, en este proceso se propuso que estaría involucrado el movimiento del bicarbonato (Cherubini y cols., 199. Staley y cols., 1995)

Hoy se sabe que en etapas tempranas del desarrollo la activación del receptor  $\text{GABA}_A$ , provoca despolarización (Ben-Ari, 2001).

Este efecto se debe a la acción de dos transportadores de cloruro: el KCC2 y el NKCC1. El primero se encarga de sacar de la célula al cloruro como cotransportador K/Cl, funciona en condiciones isotónicas y se ha descrito en el hipocampo, expresándose a partir del 6to día postnatal.

Por otra parte, el NKCC1 funciona como triple transportador K/Na/Cl, se expresa en zonas como el hipocampo en la etapa prenatal, disminuye en la postnatal y se activa en procesos inflamatorios (Dhazala y cols., 2005; Khale y cols., 2008).

En la etapa postnatal, la concentración de cloruro es mayor en el interior celular, por lo que la activación de los receptores GABA<sub>A</sub>, da como resultado o resulta en la salida del cloruro generando despolarización en la neurona. En edades posnatales más avanzadas, el gradiente de cloruro ya está invertido, por lo que el cloruro entra a la célula y la hiperpolariza (Ben-Ari, 2001; Kahle y cols., 2008).

Se sabe también que la sobre-activación de los receptores GABA<sub>A</sub>, activa a su vez canales de calcio sensibles a voltaje, lo que puede llevar a apoptosis (Nuñez y cols., 2003). Se ha observado que el transportador NKCC1 aumenta su expresión de manera significativa tanto en isquemia como en epilepsia (Bragin y cols., 2009).

Por lo tanto, es necesario reconocer que la neurotoxicidad es mediada, no solo por glutamato sino también por GABA, además de que en la inflamación, donde las células gliales también participan, tanto astrocitos como microglía tienen receptores a ambos neurotransmisores.

**Producción de ROS.** Las ROS son especies reactivas derivadas del oxígeno e incluyen al superóxido altamente reactivo ( $O_2^{\bullet-}$ ), al hidroxilo ( $\bullet OH$ ) y al peróxido ( $RO_2^{\bullet}$ ), así como al peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y al peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) que no son radicales libres. La cascada de reacciones de las ROS comienza con la producción de  $O_2^{\bullet-}$ , en respuesta a elevaciones rápidas de calcio intracelular inmediatamente después de la lesión mecánica primaria en el TCE. La SOD cataliza rápidamente la dismutación del  $O_2^{\bullet-}$  en  $H_2O_2$  y oxígeno. Un pH bajo, puede dismutar al  $O_2^{\bullet-}$  espontáneamente. La formación de radicales de oxígeno altamente reactivos, que tienen un electrón desapareado en su orbital exterior y la propagación de las reacciones en cadena generan las ROS no radicales, las cuales no tienen electrones desapareados, pero son químicamente reactivas. Por ejemplo, los radicales  $\bullet OH$  se generan en la reacción de Fenton donde el hierro ferroso ( $Fe^{2+}$ ) es oxidado para formar  $\bullet OH$  en presencia de  $H_2O_2$  (Cheng y cols., 2012).

En condiciones fisiológicas, el hierro está estrechamente regulado por su proteína de transporte, la transferrina y de almacenamiento, la ferritina, ambas se unen a la forma férrica ( $Fe^{3+}$ ). Esta unión es reversible cuando hay disminuciones de hierro, por ejemplo, cuando el pH disminuye (por debajo de 7), así como después de un TCE, hay liberación de hierro y se inicia la producción de radicales de oxígeno. Una segunda fuente de hierro proviene de la hemoglobina, cuando se induce una hemorragia por un proceso mecánico. A pesar de que el  $O_2^{\bullet-}$  en sí mismo es menos reactivo que el radical  $\bullet OH$ , su reacción con el óxido nítrico ( $NO\bullet$ ) forma agentes radicales oxidantes altamente reactivos, el peroxinitrito (PN:  $ONOO^-$ ) y el radical hidroxilo como un subproducto. Los radicales PN-derivados inducen daño oxidativo a proteínas, a lípidos de membrana (celulares y mitocondriales) y a ácidos nucleicos. Por ejemplo, derivados PN- $NO_2$  inducen nitración de proteínas que resulta en una modificación postransduccional, como unir a 3-nitrotirosina (3-NT), en lugar de tirosina. Por lo tanto, 3-NT sirve como un marcador biológico de la acción del  $ONOO^-$ . Además, los productos PN pueden inducir la peroxidación lipídica (LP). La propagación del estrés oxidativo y por lo tanto daño celular irreversible (Arnoult y cols., 2003; Arun y cols., 2010).

La LP se define como la degradación oxidativa de los lípidos que se produce cuando los radicales de oxígeno reaccionan con ácidos grasos poliinsaturados tales como el ácido araquidónico, ácido linoleico, el eicosapentaenoico (EPA) o el ácido ácido docosahexaenoico (DHA), resultando en interrupciones en la integridad de la membrana celular. El proceso es una reacción en cadena de los radicales que se caracteriza por tres pasos distintos: iniciación, propagación y terminación.

Brevemente, la iniciación es la extracción de átomos de hidrógeno de los ácidos poliinsaturados inducida por ROS, que produce un radical lípido (L•). En el segundo paso, el de propagación, el L• reacciona con el oxígeno para formar un radical peroxilo – lipídico (LOO•). El LOO• a su vez extrae un átomo de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturados adyacente, produciendo un hidroperóxido de lípidos (LOOH) y un segundo L•, que pone en marcha una serie de reacciones en cadena. Estas reacciones de propagación son terminadas en el tercer paso cuando el radical ya no reacciona porque el sustrato se agota o porque el lípido reacciona con otro radical o con el eliminador de radicales para producir un producto final no radical estable. Dos productos altamente tóxicos de LP son el 4-hydroxynonenal (4-HNE) y la acroleína, ambos han sido bien caracterizados en modelos experimentales de TCE. Estos productos finales de la peroxidación, se unen covalentemente a proteínas y alteran su estructura y propiedades funcionales. Los aminoácidos lisina, histidina y arginina también son el blanco de los radicales de oxígeno que resulta en la formación de restos carbonilo de proteínas (Arun y cols., 2010; Camello-Almaraz y cols., 2006).

**Neuroinflamación.** Desde hace varios años se han descrito alteraciones en la respuesta inmunológica en el paciente con TCE que afectan la evolución y el pronóstico (Miller y cols., 1981; Meert y cols., 1995).

El TCE induce una respuesta inflamatoria mediada por leucocitos y por células de la glía, concretamente microglía y astrocitos. Las células de la microglía actúan como los macrófagos, se encargan de ser el “sistema de vigilancia y limpieza” del cerebro; cuando se produce una lesión, estas células viajan al sitio donde se ésta se produjo y fagocitan desechos y restos celulares, presentan antígenos, secretan citosinas, radicales libres y otros factores solubles, de manera tal que coordinan la respuesta inflamatoria (Ronsonhoff y cols., 2009, Nimmerjahn y cols., 2005).

En el caso de los leucocitos, su reclutamiento e infiltración se debe a la ruptura de la barrera hematoencefálica, que también genera activación endotelial. De manera que en la zona lesionada habrá tanto leucocitos como microglia; las sustancias quimio-atrayentes para esta célula son el ATP y la proteína-1 atrayente de monocitos (MCP-1), además del factor de crecimiento transformante (TGF- $\alpha$ ). Esto provoca la liberación de óxido nítrico, ROS y citosinas proinflamatorias (Platten y cols., 2003).

El otro tipo celular que interviene en la neuroinflamación son los astrocitos; éstos son activados por la interleucina-1  $\beta$  (IL1-B) y el factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$  lo que provoca un cambio fenotípico, en donde hay hipertrofia, hiperplasia y la

expresión del filamento intermedio llamado proteína glial fibrilar ácida (GFAP). Si el trauma es moderado este proceso contendrá al área de lesión y promoverá la remodelación neuroplástica (crecimiento de dendritas y establecimiento de sinapsis nuevas) pero en un TCE severo se produce una cicatriz glial que dificulta estos cambios (Wieloch y Nikolich, 2006; De Simone y cols., 2007; Laird y cols., 2008).

Existen evidencias de que, ante un TCE, la inmunidad celular resulta afectada, concretamente hay reducción de la población circulante de linfocitos T (LT), LT helper, LT supresores y las natural killer (NK). Estas alteraciones en el sistema inmunológico inciden sobre el curso evolutivo del paciente, y se asocian a complicaciones infecciosas en el 75% de los casos durante las dos semanas subsiguientes al trauma (Wolach y cols., 2001).

También hay una disminución importante de los niveles de inmunoglobulinas concretamente IgG e IgM (Quattrocchi y cols., 1992, Sacchetti y cols., 1997).

**Apoptosis.** La apoptosis es la muerte celular programada, y se caracteriza por la reducción del volumen celular debida al eflujo de potasio y fragmentación del ADN del núcleo, con preservación de la membrana celular (Charriaut-Marlangue y cols., 1996). La apoptosis ocurre en la zona de penumbra isquémica donde se alcanza el umbral mínimo necesario para iniciar la cascada de activación de las caspasas; mientras que en el núcleo de la lesión se produce la necrosis celular (Charriaut-Marlangue y cols., 1996; Savitz y Rosenbaum, 1998; Nathoo y cols., 2004).

La apoptosis ha sido observada tanto en modelos animales como en pacientes con TCE, en la última década se ha acumulado bastante evidencia al respecto; en modelos animales se observa apoptosis aún en un TCE leve. Este proceso presenta una distribución particular tanto espacial como temporal, se da en un periodo de entre 12 a 48 horas post-TCE y puede mostrar una fase tardía a las 72 horas. Espacialmente, la apoptosis es más prominente en la sustancia gris y en la blanca adyacentes al trauma, aunque la fase tardía puede aparecer en zonas alejadas a éste, en la zona ipsilateral, incluso a nivel de tálamo (Raghupathi y cols., 2002; Rovegno y cols., 2012).

Son múltiples las causas que pueden desencadenar el proceso apoptótico y básicamente hay dos tipos de estímulos que lo pueden hacer; externos (vía extrínseca), o una serie de eventos intracelulares (vía intrínseca). La vía extrínseca se activa, cuando ciertas proteínas como el factor de necrosis tumoral o el ligando FAS se unen al receptor CD 95/Apo-1 (receptor de la muerte) en la superficie celular (Duckett y cols., 1998; Cernak y cols., 2002).

La vía intrínseca es activada por la ruptura de la membrana de la mitocondria (muerte mitocondrial) (Duckett y cols., 1998), y es mediada por múltiples factores (ROS, señales proapoptóticas del gen Bcl-2, translocación del citocromo C, incremento de calcio intracelular, rayos ultravioleta (Raghupathi y McIntosh, 1996 y cols., 1996. McIntosh y Smith, 1995). El gen Bcl-2 codifica las proteínas de la membrana mitocondrial externa que bloquean la apoptosis celular (McIntosh y cols., 1998. Raghavan y cols., 2004), pero también media la actividad proapoptótica a través del fragmento BAX. De hecho se sabe que alteraciones en

la familia del gen que codifica para Bcl-2 son un factor importante que regula la muerte celular en el TCE, por ejemplo tanto en corteza como en hipocampo se ha demostrado, mediante inmunohistoquímica, la presencia de Bcl-2, dos horas después del trauma en las células que sobrevivirán 24 horas post-TCE . Algunas señales como las caspasas 1 y 8 producen el clivaje (ruptura) de secuencias de aminoácidos de la proteína Bcl-2 transformándola en el fragmento BAX que inicia la apoptosis (Li y cols. 1997).

Cuando en un TCE se libera glutamato, éste, a través de la activación de sus receptores NMDA, facilita el paso de calcio al interior celular. Al aumentar la concentración de calcio, se induce en la mitocondria la liberación del citocromo C, componente mitocondrial de la cadena transportadora de electrones esencial para la producción de ATP, que tiene la capacidad de activar la cascada de las caspasas (Budd y cols., 2000).

Otra vía proapoptótica que establece el citocromo C es que al ingresar al citoplasma, se une a una proteína citoplasmática (Apaf-1) y origina un complejo molecular llamado apoptosoma, que activa la caspasa 9 y está su vez a la caspasa 3 , originando muerte celular (Savitz y Rosenbaum, 1998; Nathoo y cols., 2004).

Existe una molécula apoptogénica liberada desde la mitocondria durante la isquemia/reperfusión es la Smac/DIABLO, la cual tiene la capacidad de inhibir moléculas bloqueadoras de la apoptosis como la proteína ligada a X inhibidora de la apoptosis (XIAP) (Shibata y cols., 1985).

Finalmente hay que destacar 2 eventos proapoptóticos más, uno es que la activación del receptor de NMDA induce cambios de configuración y activación directa de la caspasa 3; y la translocación del citocromo C provoca el eflujo de potasio y cloro, y es responsable de la reducción del pH intracelular conduciendo a la apoptosis (Bonfoco y cols., 1995).

**Algunos esquemas de neuroprotección.** Una vez descritos los principales procesos a nivel morfológico, celular y molecular que ocurren ante un TCE, sólo resta mencionar algunas de las opciones que a partir del conocimiento disponible, favorecen la neuroprotección ante un trauma.

Un proceso importante que se ha tratado de inhibir ha sido la excitotoxicidad. En este aspecto destaca el uso de bloqueadores del receptor NMDA, como la dozocylpina o el MK-801; sin embargo, la ventana de administración es muy corta ya que se tienen que aplicar en las primeras horas posteriores al trauma. Destacan también el dextrometorfan y el cerestat que atraviesan la barrera hemtoencefálica, y previenen la entrada de calcio a las neuronas, pero alteran la percepción temporal e inducen hipotensión (Muir y Grosset, 1999; Fernández-Gómez y cols., 2008).

Otra opción ha sido activar a los receptores GABA<sub>A</sub>, con el fin de generar un efecto inhibitorio en el sistema nervioso, contrarrestando la activación del sistema glutamatérgico. Se han usado el muscimol, derivado del hongo amanita muscaria, el clormetiazol y las benzodiazepinas, todos ellos se siguen probando aún en ensayos clínicos fase III. Finalmente estarían los bloqueadores de canales de

calcio, o los quelantes de calcio, por ejemplo el DP-b99 que se está probando en ensayos clínicos fase II (Hardingham, 2000). Finalmente, podemos destacar los nuevos bloqueadores de los canales denominados TREK, que son canales de doble poro permeables a potasio o en los que responden a ATP, con buenos resultados hasta el momento, sobretodo en procesos isquémicos (Gaspar y cols., 2008, Xiong y cols., 2009).

#### 4.5. MODELOS DE TCE

El uso de modelos experimentales en la investigación científica es sumamente importante. Los modelos son analogías de la realidad que permiten el control de variables específicas, pero que a su vez tienen límites.

En ciencia, el modelo es una versión derivada o representada de algo tomado del original; la nueva entidad se produce al imitar el original. El intento de representación puede ser abstracto, tal es el caso de los modelos matemáticos, puede ser concreto como en el caso de un mapa, o un modelo a escala, o un modelo físico de un órgano o tejido o la estructura de una proteína. Actualmente existen modelos digitales o virtuales, que representan incluso en tercera dimensión el objeto de estudio. Esta acepción del término conduce a su sentido epistemológico el cual resulta ser más útil para el proceso de investigación. En la perspectiva epistemológica el modelo se considera como una descripción o representación de la realidad (hechos, situaciones, fenómenos, procesos, estructuras y sistemas, entre otros), que por lo general, está en función de unos supuestos teóricos o de una teoría. Dicha representación es una construcción racional de un campo de estudio concreto, y suele presentarse en diferentes grados de abstracción.

Para lograr los objetivos de este trabajo se desarrolló un modelo de TCE de tipo caída de peso (weight drop model) en ratas de laboratorio.

Estos modelos provocan la lesión al golpear directamente el cráneo del animal, mediante un sistema que consiste en colocar una pesa cuyo tamaño y peso varía y que normalmente se coloca en la parte superior de un tubo, metálico o plástico cuya altura también se estandariza para calcular la fuerza del impacto, la cual determina la severidad del TCE. La pesa está sujeta a una cuerda y cuando se suelta cae por gravedad y golpea normalmente un casco y otro aditamento ya sea metálico o de un material rígido, colocado sobre la cabeza del animal (Siva Ddos y cols., 2012).

Existen algunas desventajas de estos modelos, la primera sería que existe la posibilidad de que la caída de la pesa que causa la lesión no sea siempre la misma, ya que puede depender de quien manipule el sistema, lo que ocasiona que no sea estandarizado del todo. El otro inconveniente es que la sujeción de la cabeza del animal, si no se tiene un diseño adecuado puede ocasionar otras lesiones, además del golpe, por ejemplo, lesiones en las cervicales, además habrá que tomarse en cuenta que dado el sistema es inercial, la pesa puede dar más de un golpe con lo que se altera el efecto producido.

Actualmente existen modelos que permiten controlar mejor el golpe, destaquemos aquí que el modelo original fue descrito por Marmarou y de ahí se ha variado el diseño (Marmarou y cols., 1994). Por ejemplo, existen modelos que ya tienen dispositivos que permiten controlar mejor la caída del peso, esto se hace mediante un acelerómetro, como el desarrollado por Li (Li y cols., 2011) o como el de Meryland, cuyo impacto puede ser frontal. Aquí lo que se utiliza es una rampa que desciende con cierto ángulo hasta golpear en una base que tiene una pieza de acrílico que está situada justo en la parte anterior de la cabeza, en este caso de una rata. Este modelo no genera compresión coronal del cráneo y ha permitido estudiar algunos parámetros que el modelo de Marmarou no permite, como por ejemplo la sobreexpresión de la proteína Beta amiloide, que ahora se considera un biomarcador de TCE (Kilbourne y cols., 2009) (ver figura 4).

Existe además la opción de causar la lesión mediante el uso de un pistón neumático conectado a un sistema de compresión de aire y a una válvula reguladora, lo que permite graduar el disparo del pistón, esto permite que el sistema sea altamente reproducible y además establecer la intensidad de la lesión; además, dado que el pistón se dispara y no sufre ningún efecto inercial, no existe la posibilidad de dar más de un golpe, como pasa en los modelos por caída de peso. Actualmente en el laboratorio de Neuroendocrinología del departamento de Fisiología de la UNAM, contamos con este diseño que además está hecho de manera similar a un sistema estereotáxico, por lo que permite que el golpe se de en una región muy específica y localizada. Este modelo ha permitido estudiar desde aspectos neuroconductuales hasta moleculares del TCE (Martínez-Vargas y cols., 2012).



Figura 4. Modelos de traumatismo craneoencefálico. Se muestran los diferentes tipos de modelos que actualmente se emplean. Tomado de Estrada-Rojo y cols., 2018.

En los anexos de este trabajo se presenta una revisión de modelos de TCE publicada recientemente por nuestro grupo (Estrada-Rojo y cols., 2018), en la cual se aborda con detalle cada uno de ellos.

#### 4.6 EL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

**Generalidades del glutamato.** El ácido glutámico es el neurotransmisor más abundante del sistema nervioso. El glutamato es el neurotransmisor más importante para la función normal del encéfalo, 50% de las sinapsis excitatorias liberan glutamato. No atraviesa la barrera hematoencefálica.

Las neuronas glutamatérgicas extienden su acción a lo largo del eje encefalomedular.

Dos tercios de las neuronas de la corteza cerebral son glutamatérgicas. Las terminales glutamatérgicas establecen contactos en alta proporción con espinas dendríticas, estructuras sobre las cuales existen mayores indicios de plasticidad morfofuncional y que se asocian a los procesos integrativos más complejos.

El papel del ácido glutámico y su disfunción ha ganado importancia en neurología y en psiquiatría, en la medida en que se ha profundizado en el conocimiento sobre su metabolismo, tipos de receptores, transportadores y mecanismos de homeostasis, cuya disfunción puede llevar a muerte neuronal.

El glutamato es producido en el organismo humano y desempeña una función fundamental en el metabolismo. Se encuentran casi dos kilogramos de glutamato en los músculos, el encéfalo, los riñones, el hígado y otros órganos y tejidos. (Medina Marín y Escobar Betancourth, 2002). Además, el glutamato se encuentra en abundancia en la leche materna, a concentraciones casi diez veces mayor que en la leche de vaca (Fernstrom y Garatini, 2000).

La mayor parte del glutamato de la dieta se metaboliza rápidamente y se utiliza como fuente de energía. Desde una perspectiva nutricional, el glutamato es un aminoácido no esencial, lo que significa que, si es necesario, el organismo puede fabricar su propio glutamato. Así, el organismo produce su propio glutamato para una variedad de funciones esenciales en el aparato digestivo, en la retina, por ejemplo en memoria, etc. (European Food Information Center (EUFIC), [www.EUFIC.org\(sf\)](http://www.EUFIC.org(sf)))

El efecto de añadir el sabor umami (glutamato monosódico) a los alimentos ha sido estudiado por los investigadores desde los años 50 del s. XX. Por lo general, el sabor de los platos con carnes, el pescado, las verduras y legumbres mejoran pero no ocurre lo mismo con los cereales, los productos lácteos y los postres.

El glutamato monosódico se añade a las comidas preparadas y procesadas tales como los alimentos congelados, las mezclas de especias, salsas, o productos cárnicos tales como las salchichas y los jamones (Zhang y cols., 2013; [www.eufic.org\(sf\)](http://www.eufic.org(sf))).

**Síntesis del glutamato.** La glucosa proveniente del plasma sanguíneo es el sillar para la síntesis de ácido glutámico en el sistema nervioso; la captura de glucosa

se realiza por la acción de los transportadores de la familia GLUT, los cuales se expresan tanto en las células endoteliales como en los astrocitos. En los astrocitos la glucosa se convierte en lactato, el cual se libera en el líquido extracelular, posteriormente las neuronas lo captan y se constituye así en una de sus alternativas de sustrato energético. Los astrocitos pueden capturar ácido láctico del plasma, lo que los convierte en un importante reservorio de este metabolito. En concentraciones elevadas, el ácido láctico tiene dos efectos, uno ansiogénico y otro como vasodilatador, este último puede ser un factor importante para correlacionar la actividad glutamatérgica y el incremento del flujo sanguíneo cerebral (Pitts y McClure, 1967; Dager y cols., 1977)

Al contrario de las neuronas, los astrocitos tienen una capacidad limitada para sintetizar ácido láctico. En las neuronas, el lactato pasa a piruvato y éste a acetilCoA, que ingresa al ciclo del ácido tricarboxílico, donde se une con el oxaloacetato para formar citrato. Éste se convierte, sucesivamente, a isocitrato y a alfa-cetoglutarato, el cual puede ser transaminado a glutamato por las transaminasas como la aspartato aminotransferasa y la alanina aminotransferasa, que utilizan donadores de grupos amino como aspartato y alanina (Ottersen y Storm-Mathisen, 2000).

En los astrocitos que rodean los cuerpos de las neuronas y en los oligodendrocitos, el glutamato se convierte en glutamina por acción de la enzima glutamina sintetasa. Con la intervención de transportadores localizados en los astrocitos o en las neuronas (EATT 1 a 5), la glutamina puede ser transferida.

La conversión de glutamina en glutamato se da por acción de la enzima glutaminasa que se localiza en la membrana mitocondrial interna. Cuando hay daño neuronal, la glutaminasa queda en el medio extracelular, pero mantiene su función, lo cual puede ser deletéreo para la célula por los ya mencionados efectos excitotóxicos del glutamato. Ésta puede ser una ruta importante para exacerbar y propagar un proceso de lesión excitotóxico (Pitts y McClure, 1967).

El glutamato que se utiliza como neurotransmisor se almacena en vesículas. Éstas lo capturan con la participación de transportadores de glutamato vesicular (VGLUT). Así, el transportador interioriza el glutamato a las vesículas con ayuda de un mecanismo que requiere intercambio de protones. El citoesqueleto permite su transporte hacia la membrana presináptica, de manera que se encuentren disponibles para la exocitosis.

El proceso de liberación del glutamato es similar al de otros neurotransmisores, éste ocurre cuando la vesícula se fusiona con la membrana presináptica, por medio de la interacción con proteínas presentes en la membrana de las vesículas, en el citoplasma y en la membrana presináptica.

Las proteínas mencionadas tienen la capacidad de formar un sistema de anclaje, que se activa con la entrada de calcio a la terminal presináptica.

Las vesículas que se ligan al citoesqueleto por medio de la proteína sinapsina se liberan por la activación de la enzima calcio-calmodulina-kinasa (CAM-kinasa), en respuesta a ingreso de calcio a la terminal presináptica, a su vez inducido por la llegada de un potencial de acción.

Los iones de calcio facilitan la activación y organización de las proteínas de anclaje vesicular, del citoplasma y de la membrana presináptica.

La interacción de estas proteínas forma un núcleo o eje que permite la fusión de la vesícula con la membrana presináptica (Miller, 1998).

**Los receptores del glutamato.** En 1960 Curtis y cols encontraron que los ácidos glutámico, aspártico y cistéico, excitaban a las motoneuronas espinales. Hoy se conoce que el glutamato es el neurotransmisor excitador por excelencia en el sistema nervioso central (SNC).

Los receptores a glutamato se nombran de acuerdo a sus agonistas, AMPA, kainato y quisqualato (actualmente NMDA) (Monaghan y cols., 1989).

La figura 5 muestra la estructura del glutamato y sus diversos agonistas.

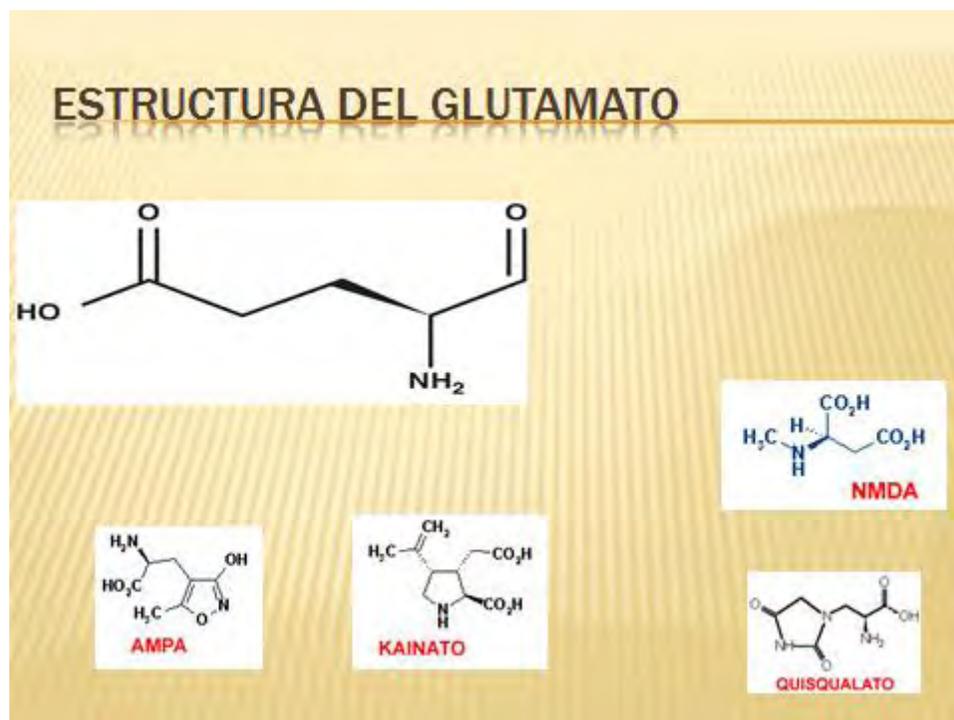


Figura 5. El glutamato y sus agonistas clásicos. Actualmente el quisqualato se conoce como NMDA.

El glutamato además de los receptores del tipo ionotrópico, posee receptores tipo metabotrópico denominados GluR, los cuales se agrupan en tres clases que abarcan un total de ocho tipos de receptores (Purves, 2015) (ver figura 6).

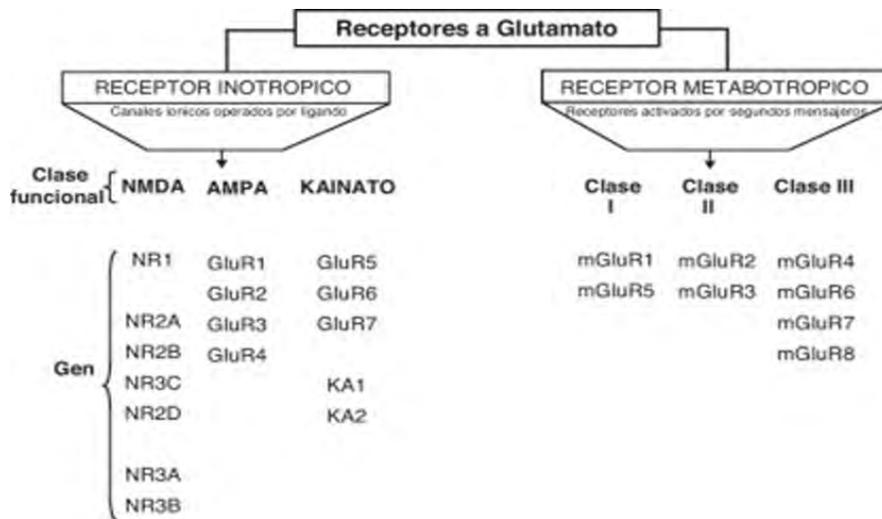


Figura 6.-Tipos de receptores para el glutamato. Tomado de Flores-Soto y cols., 2012

El receptor NMDA, sin duda es el más ampliamente distribuido y estudiado además de que es el directamente involucrado en el proceso de excitotoxicidad por daño neuronal. Se tiene evidencia de que los receptores GluR 4 y 5 intervienen en la excitotoxicidad pero su estudio es todavía incipiente.

**Estructura del receptor NMDA (NMDAR).** El conocimiento de la estructura del NMDAR, es fundamental no sólo como parte del proceso de comunicación neurona-neurona en el cerebro, sino además como blanco terapéutico en el proceso de neurotoxicidad y por lo tanto para brindar neuroprotección en procesos como la isquemia y el TCE.

Para la función del NMDAR se requiere de un voltaje específico así como de la unión de glutamato y la glicina, lo que permite desbloquear al poro del canal que se halla obturado con magnesio, una vez abierto éste permite el paso de iones tanto mono como divalentes, por ejemplo el  $Ca^{2+}$ , el cual no sólo coadyuva, sino que junto con el sodio, al inicio de una señal eléctrica, el propio calcio proporciona una señal química que inicia diversos procesos, previamente mencionados (Traynelis y cols., 2010).

Cabe destacar que los NMDAR se encuentran ampliamente distribuidos en el SNC y juegan un papel preponderante no sólo en la función del cerebro, sino también en su desarrollo, además, como se mencionó al inicio de esta sección, juegan un papel como objetivos farmacológicos para contrarrestar el deterioro cognitivo leve, la esquizofrenia, la depresión, la epilepsia y por supuesto la excitotoxicidad (Nestler y cols., 2014).

Los NMDAR son heterotetrámeros conformados por diferentes combinaciones de subunidades, distribuidas en diversas regiones cerebrales. Su función depende de las subunidades que los conforman (Monyer y cols., 1992).

Los bloques de construcción de los NMDAR incluyen las subunidades GluN1 y GluN2A a D, las cuales forman el poro del receptor y son fundamentales en su funcionamiento. Estas mismas subunidades forman los sitios de anclaje para la

glicina y el glutamato, además las zonas para la unión de la glicina, concretamente la subunidad GluN3A y la subunidad B (Paoletti, y cols., 2013).

El NMDAR se compone de dos subunidades GluN1 y dos subunidades GluN2, donde las dos GluN2 pueden ser idénticas o diferentes, lo que da lugar a una estructura diheteromérica o triheteromérica (Chazot y Stephenson, 1997).

No obstante que la forma triheteromérica conformada por GluN1 / GluN2A / GluN2B (ver figura 7) tiene una alta prevalencia en el cerebro y es la principal composición del receptor en el hipocampo y en la corteza cerebral, la gran mayoría de los estudios fisiológicos, biofísicos y estructurales, se han hecho en la forma diheteromérica (ver figura 8).

Es interesante notar que los NMDAR triheteroméricos presentan cinética de compuerta y su farmacología es diferente a la del canal diheteromérico, compuesto sólo por GluN2A y GluN2B.

Otra característica importante del receptor triheteromérico es que está modulado de forma única por antagonistas para GluN2A y GluN2B, de manera alostérica específica.

Investigaciones recientes con el microscopio electrónico criogénico de partícula simple y del antagonista alostérico específico de la subunidad GluN2B, Ro 25-6981 (Ro), muestran que la estructura del receptor NMDAR triheteromérico, altera su simetría por las interacciones de las subunidades GluN2 (Lu y cols., 2017).

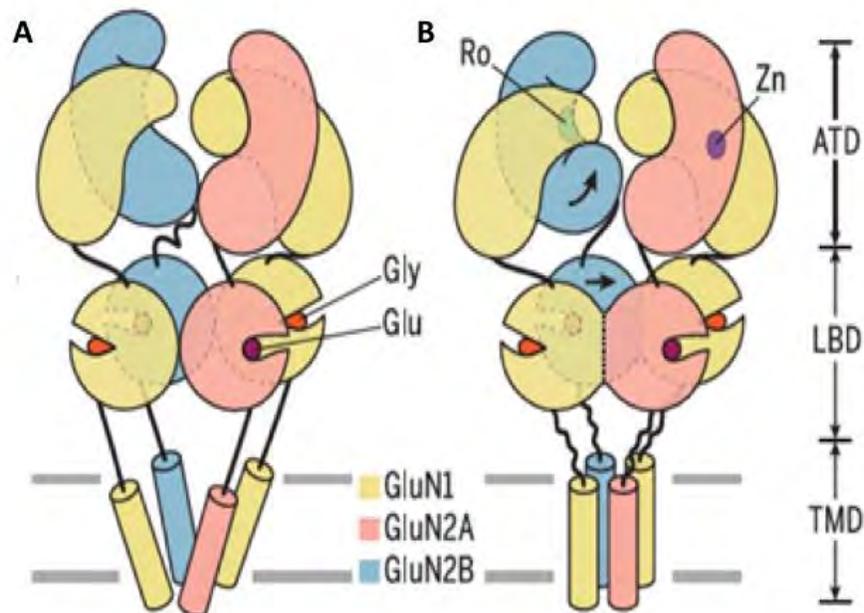


Figura 7. Estructura triheterodimérica del receptor NMDA (NMDAR). Obtenida mediante criomicroscopía electrónica de partícula simple, en A, se indica el sitio de unión de la glicina y en B los sitios de unión para el antagonista alostérico, Ro y para el Zinc. Tomada de Lu y cols., 2017.

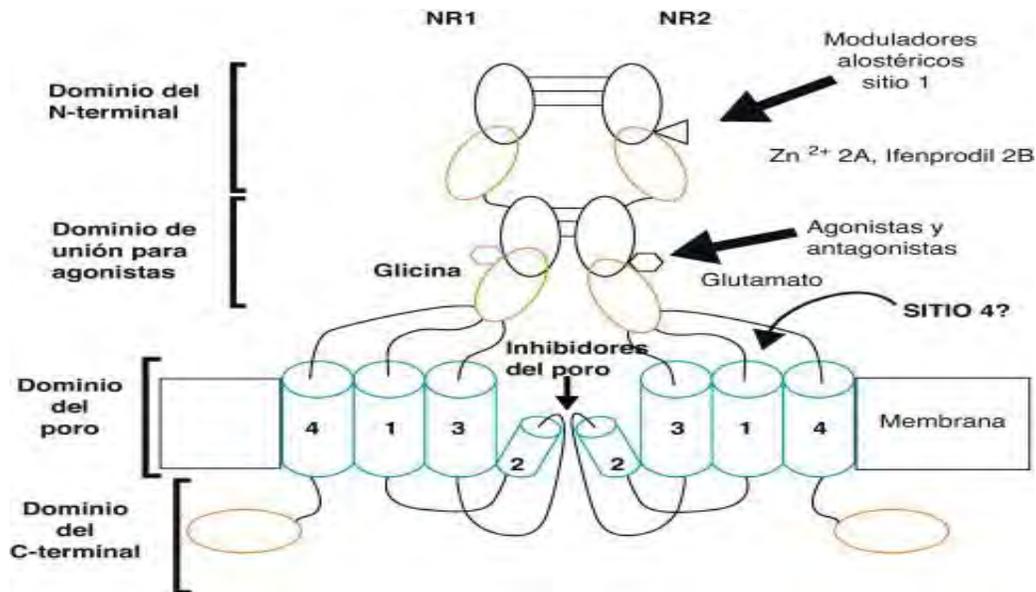


Figura 8. Estructura del NMDAR en la forma diheteromérica. Esta estructura es la más investigada pero no la más abundante, se aprecian los sitios de unión para glicina, zinc y glutamato. Tomada de Nestler y cols., 2014.

#### 4.7 EL RECEPTOR NMDA EN EL TCE

Como se ha descrito en este trabajo, el TCE provoca 2 tipos de daño. El daño primario se desarrolla por el efecto mecánico mientras que el daño secundario corresponde a la respuesta a dicho evento e involucra cambios a nivel celular y molecular. Estos eventos aparecen minutos horas o incluso días posteriores al evento traumático (Levine y cols., 2006).

El daño secundario incluye neuroinflamación, excitotoxicidad glutamatérgica, estrés oxidativo, daño al ADN y muerte neuronal, entre otros (Ikonomou y Turski, 1996; Leinase y cols., 2006; Sullivan y cols., 1999).

Los modelos animales de TCE son útiles para comprender mejor la fisiopatología del daño cerebral después del trauma, así como en la investigación y obtención de tratamientos efectivos para su recuperación (Laurer y McIntosh, 1999).

Está documentado que en diversos modelos animales de TCE, el sistema glutamatérgico es el factor principal en el desarrollo del daño secundario, ya que está directamente implicado en la excitotoxicidad al incrementarse la afluencia de calcio a través del NMDAR (Choi, 1988). Una estrategia neuroprotectora utilizada incluso en pacientes humanos con TCE ha sido el bloqueo de la excitotoxicidad, mediante el uso de antagonistas de los NMDAR (ver revisión: Willis y cols., 2004)

En modelos animales, la neuroprotección mediada por antagonistas al NMDAR ha sido ampliamente estudiada (Figueroa-Guzmán, 2006). Se encontró que una dosis subtóxica de NMDA inducía el pre-condicionamiento ya que evoca un estado de tolerancia celular a una dosis letal (Chuang y cols., 1992, Soriano y cols., 2006). Por otra parte tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, se ha probado la efectividad del preconditionamiento con NMDA cuando sobreviene un TCE (Moolen y cols. 2012)

Cabe mencionar que los ensayos clínicos en los que se han utilizado antagonistas al NMDAR no han demostrado que tengan algún beneficio. Algunos estudios sugieren que la inhibición del NMDAR es inocua o incluso perjudicial para la recuperación de un TCE o de isquemia (Lees, 1997; Maas y cols., 1999).

En algunos de estos ensayos se ha observado que el bloqueo de los NMDAR, interfiere con la recuperación espontánea vía procesos de plasticidad, lo que sugiere que un circuito para ser funcional tiene que activarse y el bloqueo persistente de los NMDAR, no lo permite (Hoyte y cols., 2004; Ikonomidou y Turski, 2002). Estos fármacos, incluso pueden obstaculizar la supervivencia neuronal y la neuro-regeneración ya que inhiben la función del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), esencial para procesos como el neurodesarrollo y la remodelación del SNC, así como para la formación de los procesos de memoria (Narayan y cols., 2002).

En la literatura existe un debate considerable sobre las causas de los fracasos de estos ensayos clínicos con seres humanos. Después de los aparentemente muy positivos resultados en los modelos animales, varios autores han señalado que en los ensayos clínicos con pacientes humanos no se consideraron factores como la heterogeneidad de la población, la magnitud y localización anatómica de la lesión y la ventana temporal de la administración (Morris y cols., 1998; Shohami y Biegon, 2012). De hecho, hay ensayos en modelos animales, en donde la aplicación de antagonistas de los NMDAR parece tener eficacia si se aplican en periodos inmediatos al insulto. Se ha observado que pierden eficacia cuando la aplicación va más allá de los 30 a 60 min, aunque esto parece depender del grado del insulto y en general de si la administración es 8 horas después del TCE.

En algunos de los ensayos clínicos en que el fármaco se administró dentro de la ventana terapéutica de 4-6 horas, mostrando un efecto neuroprotector eficaz y alcanzable (Ginsberg, 2008), y solo en algunos ensayos preclínicos se han usado fármacos antagonistas de los NMDA dentro de las 24 horas a los 5 días post-lesión (Shohami y Biegon, 2012).

El estudio de estas diferencias entre los modelos animales y los ensayos clínicos ha permitido conocer que posterior a un evento isquémico o un TCE existen cambios temporales tanto en la activación de los receptores como en la liberación de glutamato, además de que existen procesos de desensibilización del receptor NMDA en tiempos cortos, lo que lleva a una pérdida de su funcionalidad que puede durar semanas (Ogawa y cols., 1991).

A estas observaciones se agregan los resultados de este trabajo, que señalan que tanto la expresión del receptor NMDA, como la liberación del glutamato, dependen de la hora del día logrando aminorar o exacerbar los fenómenos de excitotoxicidad, arriba descritos.

#### 4.8. VARIACIONES DIURNAS DEL SISTEMA GLUTAMATÉRGICO

Los principales procesos biológicos son periódicos. Se observan oscilaciones periódicas a todos los niveles de organización de los organismos, desde las

células aisladas hasta los organismos completos. Esta periodicidad representa un fenómeno básico en los sistemas biológicos que les confiere ventajas funcionales ante un ambiente externo que es cíclico (Wirz-Justice, 1971; Aguilar-Roblero y cols., 1982).

Existe una gran gama en la periodicidad de estas oscilaciones, en algunos procesos el periodo las oscilaciones sólo abarcan fracciones de segundo, como puede ser el disparo de una neurona, o bien pueden presentarse ciclos de uno a varios días y hasta de un año, como en el caso de la hibernación o la reproducción estacional que presentan algunos animales.

En muchos casos, estas oscilaciones se sincronizan con fenómenos ambientales, como el ciclo luz-obscuridad, que es el resultado de la rotación terrestre, y de las estaciones del año, resultantes de la traslación de la Tierra; éstos últimos se conocen como ritmos circadianos, ya que su periodo se ajusta a una duración aproximada de 24 horas, es decir los organismos tienen relojes internos que marcan estos ritmos. En los organismos complejos, como en el ser humano, dichos relojes no sólo son centrales (están en el cerebro), existen además relojes periféricos por ejemplo en el hígado, los riñones o el páncreas (Summa y Turek, 2015).

Los ritmos circadianos centrales, en mamíferos, son generados por el sistema circadiano, conjunto de tejidos con capacidad de oscilar y dirigidos por un reloj circadiano conocido como núcleo supraquiasmático del hipotálamo (NSQ). El reloj circadiano induce en todos los procesos valores máximos y mínimos en un periodo a lo largo de las 24 horas. Sin embargo, las auto-oscilaciones en distintos tejidos, los ritmos locales y los ritmos circadianos a nivel celular, muestran que aún en células aisladas, existe la capacidad de oscilar y expresar cambios periódicos en su función.

Como ya se mencionó, las estructuras, externas al NSQ, con ritmos propios se han denominado osciladores periféricos y existen en prácticamente todos los tejidos estudiados, incluyendo el hígado y los pulmones (Maywood y cols., 2007; Cuninkova y Brown, 2008).

**Los ritmos circadianos en la salud y la patología.** El reloj circadiano permite que ciertos procesos alcancen valores máximos y mínimos en un periodo de 24 horas y se ha descrito un reloj de intervalos que puede medir lapsos hasta de una hora, el primero regula todos los procesos que cuantifican las variaciones de luz a lo largo del día y básicamente responde a los comandos y secreciones que emite el eje retina - NSQ - glándula pineal (Wright, 2002).

En el ser humano, el mantenimiento de los ritmos es necesario para generar respuestas adecuadas a un ambiente cíclico, si esta ritmicidad se pierde o se altera se producen trastornos y alteraciones que incrementan la vulnerabilidad a diversos padecimientos y eventos dañinos (Arent, 1997). Por lo que si se corrige la alteración cronobiológica, el padecimiento o el daño disminuyen (Arechiga, 1996).

Desde la década de los 60's del s. XX, se conoce que la respuesta inmune de ratones expuestos a agentes patógenos depende de la hora en que esto ocurra, lo

evidencia de una ritmicidad circádica en la capacidad de infección de los microorganismos y la respuesta inmune del hospedero (Yoshida y cols., 2014).

Otro claro ejemplo de la importancia de los ritmos circadianos en la salud y la enfermedad, lo hallamos al analizar la hora de inicio de un evento vascular cerebral (EVC), que de manera similar al ataque al miocardio, tiene un marcado ritmo diurno. Numerosos estudios han mostrado que la hora de inicio de los EVC, así como de los ataques isquémicos transitorios ocurren preferentemente entre las 6:00 y las 12:00 de la mañana, es decir después de que el sujeto se levanta y empieza a presentar actividad (Marler, 1993). Incluso se ha reportado que la hora en la que se induce isquemia cerebral en un modelo animal determina el tamaño de la lesión (Vinall y cols., 2000).

Utilizando a la rata como modelo, nuestro grupo observó una mejor recuperación cuando el traumatismo ocurre en las horas de oscuridad respecto a las horas de luz lo que muestra que la recuperación por TCE presenta variaciones diurnas, (Martinez-Vargas y cols., 2006; 2013).

**Variación temporal del sistema glutamatérgico.** El glutamato es considerado el principal neurotransmisor excitatorio, ya que prácticamente todas las células excitatorias son glutamatérgicas y se estima que más del 50% de las sinapsis del encéfalo liberan este neurotransmisor. El precursor del glutamato es la glutamina, la cual es liberada por la glía, capturada en las terminales presinápticas y metabolizada a glutamato por la enzima glutaminasa. La glucosa también puede ser convertida en glutamato, por transaminación del 2-oxoglutarato, intermediario del ciclo de los ácidos tricarbónicos. El glutamato es empaquetado en vesículas mediante transportadores denominados VGLUT, en donde se almacena hasta su liberación. Una vez liberado en el espacio sináptico, el glutamato es recapturado por transportadores de aminoácidos excitadores (EAAT) y posteriormente metabolizado (Nestler y cols., 2014).

Como ya señalamos anteriormente, el glutamato liberado activa receptores específicos de dos tipos, ionotrópicos o metabotrópicos. De los primeros, hay tres descritos, NMDA, AMPA y kainato, estos receptores son canales selectivos a calcio, sodio y potasio. En cuanto a los metabotrópicos se han descrito 3 clases que abarcan desde mGlu 1 hasta mGlu 8 (Rea y cols., 1993)

Hay pocos datos en la literatura que abordan el estudio de la variabilidad diurna del sistema glutamatérgico y la mayoría sólo analiza el NSQ. Algunos reportes señalan una variación diurna en la liberación de glutamato en el NSQ de hámsteres, con una mayor concentración durante la última parte de la noche (Glass y cols., 1993), patrón que se preserva en condiciones de oscuridad continua (Huhman y cols., 1996). Además se ha observado que el RNAm para GAD65, una de las isoformas de la glutamato descarboxilasa, enzima que cataliza la descarboxilación de glutamato para formar GABA, presenta variaciones diurnas en el NSQ que desaparecen cuando los animales se someten a oscuridad continua (Huhman y cols., 1996; Wang y cols., 2008).

También, en el NSQ se presenta una variación diurna en la expresión de las subunidades NR2B (Nestler, 2014), NR1 y NR3 del receptor a NMDA, siendo la menor a las 0 horas y la mayor a las 20 horas (Bendová y cols., 2009).

Mientras que las corrientes de  $Ca^{2+}$  evocadas por AMPA presentan una amplia distribución en el NSQ, y un ritmo diurno con un pico durante la noche (Michel y cols., 2002; 2013), se establece que la comunicación entre el NSQ derecho e izquierdo, así como el grado de sincronización de las neuronas de este núcleo dependen del receptor AMPA, ya que se pierden cuando éste es bloqueado (Eyigor y Jennes, 1997).

Fuera del NSQ, hay también ejemplos de variaciones diurnas en el sistema glutamatérgico. El RNAm para el receptor a kainato (KA2), presenta variaciones diurnas en neuronas GnRHérgicas en hembras, cuyo máximo nivel de expresión depende de la edad de la rata (Yelamanchili y cols., 2006).

También se ha descrito que el transportador vesicular VGLUT1 de glutamato que principalmente se expresa en corteza cerebral, presenta variaciones diurnas en vesículas sinápticas obtenidas de cerebro de ratón (Darna y cols., 2009); este ritmo no parece depender de la síntesis de VGLUT1, sino más bien del recambio vesicular (Corthell y cols., 2012).

A nivel del bulbo olfatorio, identificado recientemente como un oscilador circadiano, se ha reportado que la función del NMDAR, dependiente de la aplicación de orexina presenta variaciones diurnas; su actividad se inhibe por aplicación de la orexina en el Zeitgeber (ZT) 23 con respecto a ZT 4 y ZT 8. Este hecho da bases para entender a profundidad la codificación olfativa, al permitir entender si los potenciales de acción del bulbo, y por lo tanto las modificaciones sinápticas que genera, tienen una sincronización dependiente de la hora de día (Perin y cols., 2014).

Los receptores NMDA, clásicamente, se han considerado fundamentales en los procesos de memoria y de plasticidad cerebral, en los que el factor energético juega un papel importante. Se ha reportado recientemente que la funcionalidad de estos receptores, en el hipocampo de la rata, se relaciona con la liberación de orexinas, reguladoras de la homeostasis energética, y que dependen de la hora del día y del ciclo sueño-vigilia (Perin y cols 2014).

Aunque es poca la evidencia de cómo el sistema glutamatérgico varía de manera diurna, este conocimiento es importante pues permitirá entender mejor cómo funciona en distintas áreas del cerebro, para inducir procesos neuroprotectores ante eventos que lesionen al cerebro, de manera que se puedan crear herramientas terapéuticas oportunas y más efectivas.

Los datos obtenidos por nuestro grupo de trabajo muestran que hay áreas cerebrales donde la expresión de receptores a glutamato como los NMDA varía dependiendo de la hora del día. Dada esta variación diurna, puede proponerse que en la corteza motora, área analizada en nuestros estudios, hay una mayor actividad glutamatérgica en el período de luz.

## 5. JUSTIFICACIÓN

El traumatismo craneoencefálico (TCE) es un problema de salud pública mundial; y cobra mayor importancia al incrementarse la probabilidad de discapacidad después de un ingreso hospitalario por TCE. Además, el costo que se enfrenta por las diversas discapacidades es muy alto, se calcula que al menos en Estados Unidos se gastan 2 mil millones de dólares anuales.

Entender los procesos de daño durante un TCE es útil para establecer objetivos terapéuticos más eficaces y por lo tanto tratamientos oportunos y adecuados, además de mejores y más eficientes procesos de rehabilitación. Todo esto contribuirá a disminuir tiempo de recuperación y costos del padecimiento para los pacientes, sus familiares y al sector salud.

Tratamientos neuroprotectores que limitan los mecanismos de lesiones secundarias y/o mejoran la conducta motora, han sido bien establecidos en múltiples modelos animales de TCE. Sin embargo, la implementación de lo que en su momento fueron prometedores tratamientos neuroprotectores experimentales a lesiones humanas ha sido muy decepcionante, ya que ninguno de los tratamientos farmacológicos ha resultado en mejoras en la clínica. Tanto cuestiones conceptuales como diferencias metodológicas entre la investigación preclínica y la lesión clínica han contribuido indudablemente a estos fracasos.

Los fármacos clínicamente neuroprotectores han llevado a los investigadores a identificar los blancos terapéuticos potenciales, sin embargo todavía hay otros factores que no deben pasarse por alto: (1) una comprensión inadecuada de los mecanismos de lesiones secundarias; (2) pruebas preclínicas insuficientes en modelos de lesiones múltiples, cepas, especies (incluyendo gyrencephalic), géneros y edades; (3) falta de exhaustividad en la investigación de farmacocinética y concentraciones cerebrales terapéuticas; (4) análisis adecuado de la ventana terapéutica y los resultados conductuales clínicamente relevantes; (5) uso de poblaciones de paciente heterogéneas; (6) tamaño de muestra inadecuado; y (7) mediciones inadecuadas de los resultados funcionales y biomarcadores propuestos.

Más aún, existen otros aspectos relevantes que se tienen que tomar en cuenta: el uso de la anestesia en modelos animales, interacciones fármaco-anestésicos; uso de poblaciones genéticamente idénticas y lesiones simplistas, etc.

Este trabajo se basa en el estudio de una etapa de gran importancia en la fisiopatología del TCE que es la excitotoxicidad, provocada por la liberación del neurotransmisor glutamato. Con ello, buscamos entender si en el sistema glutamatérgico existe una variación diurna tanto a nivel del principal receptor involucrado en la neurotoxicidad como es el NMDA, así como en la liberación del propio glutamato, lo que podría estar modulando la respuesta neuroprotectora luego de un daño.

Los resultados obtenidos en este trabajo, plantean que hay una relación entre el momento del daño y la recuperación que está en función de la magnitud del proceso de neurotoxicidad. Esta relación permitiría establecer ventanas

terapéuticas con un enfoque dependiente del momento de aplicación de los fármacos y procesos, haciéndolos más eficaces e incluso retomar aquellas terapias que aparentemente no dieron resultado en principio con mejores expectativas.

## **6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El sistema glutamatérgico, particularmente los receptores NMDA, son los principales responsables del proceso de excitotoxicidad en un TCE.

Podría esperarse que si los receptores NMDA y los niveles de glutamato varían conforme a la hora del día, el proceso de excitotoxicidad se viera modulado por esta variación.

## **7. HIPÓTESIS**

Si existe variación conforme a las horas del día del sistema glutamatérgico, entonces ésto modula la susceptibilidad y por lo tanto la recuperación ante un TCE.

## **8. OBJETIVOS**

Objetivo General: Analizar la participación del sistema glutamatérgico en la susceptibilidad y neuroprotección del cerebro ante un traumatismo craneoencefálico en relación al ciclo luz-obscuridad.

Objetivos Particulares:

1. Analizar la variación durante 24 horas de los niveles de glutamato en corteza cerebral de ratas control.
2. Analizar las variaciones durante 24 horas en la expresión del receptor NMDA en corteza motora de ratas control.
3. Analizar las variaciones diurnas en la expresión del receptor NMDA en corteza motora de ratas sometidas a TCE a diferentes horas del día.

## **9. METODOLOGÍA**

### **9.1 ACONDICIONAMIENTO DE LOS SUJETOS EXPERIMENTALES**

Se utilizaron ratas Wistar adultas de sexo masculino de 250 a 300 gramos, las cuales se mantuvieron en cajas individuales de acrílico (47 x 25 x 21 cm), con alimento y agua medidos, en condiciones controladas de temperatura y bajo ciclos de luz-obscuridad de 12:12 horas, con luces encendidas a las 8:00 horas.

Los experimentos con animales fueron aprobados por el comité de ética local (protocolo 128-2009, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México) y conducidos de acuerdo con sus directrices. Los protocolos experimentales siguieron las pautas de Norma Oficial Mexicana para el uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y la eliminación de residuos biológicos (NOM-087-ECOL-1995).

## 9.2 INDUCCIÓN DEL TCE

Antes de realizar el procedimiento del TCE, los sujetos experimentales fueron anestesiados con hidrato de cloral (350 mg/kg, i.p.) y se les sometió a una cirugía estereotáxica que consistió en abrir la piel del cráneo y exponerlo facilitando la ubicación de las coordenadas para el sitio de la lesión que de acuerdo a lo descrito en el atlas de Paxinos, las coordenadas 2.0 posterior y -1.4 mm lateral a partir de bregma, corresponden a la corteza motora.

Para producir TCE se usó un dispositivo traumatizador diseñado por nuestro grupo de trabajo, consistente en un pistón neumático controlado mediante un manómetro, que mide la presión antes de activar el pistón, y consecuentemente permite controlar la fuerza del golpe. El sistema está construido en acero inoxidable y semeja un equipo estereotáxico, por lo que la caída del pistón se puede realizar con precisión en la zona del cráneo elegida. Para el caso de este trabajo se usó una fuerza de 40 libras sobre pulgada cuadrada, produciendo en el sujeto un TCE de tipo moderado.

## 9.3 VARIACIÓN DIURNA DEL RECEPTOR NMDA EN RATAS CONTROL

Los sujetos experimentales se mantuvieron en las condiciones de bioterio al menos 8 días; posteriormente se dividieron en 5 grupos (n= 6), se les anestesió con pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) y se sacrificaron a las 9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00 o 05:00 horas del día respectivamente. Se disecaron las cortezas cerebrales y se congelaron a -70°C hasta su análisis.

## 9.4 VARIACIÓN DIURNA DEL RECEPTOR NMDA EN RATAS CON TCE

Los sujetos experimentales se mantuvieron en condiciones de bioterio al menos 8 días; posteriormente se dividieron en 5 grupos (n= 6), se les anestesió con hidrato de cloral (350 mg/kg, i.p.) y se les indujo TCE a las 9:00, 13:00, 17:00, 21:00, 01:00 o 05:00 horas del día. Se sacrificaron bajo anestesia con pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) 24 horas después del TCE. Se disecaron las cortezas cerebrales ipsi al TCE y se congelaron a -70°C hasta su análisis.

## 9.5 MEDIDAS DE METABOLISMO MORTALIDAD

Se cuantificaron la ingesta de agua, alimento y pérdida de peso post-TCE de todos los sujetos experimentales, además se contabilizó el número de sujetos fallecidos post TCE. Los datos obtenidos concordaron con lo expuesto en la parte final de los antecedentes de este trabajo.

## 9.6 ESCALA NEUROCONDUCTUAL

Para cuantificar la recuperación de los sujetos experimentales, posterior al TCE, se usó la escala de 21 puntos propuesta por Hunter (Hunter y cols., 2000), la cual a su vez es una modificación de la propuesta por Bederson (Bederson y cols., 1986).

<b>ESCALA CONDUCTUAL. Hunter</b>	<b>PUNTAJE</b>
<b>1 Colocación de la pata</b> El animal se coloca sobre el borde de un banco y cada pata la coloca cruzada sobre el borde del banco cada que coloca correctamente hacia atrás la pata es un punto. 1 punto	4
<b>2 Reflejos correctos</b> El animal se coloca en posición supina sobre la palma de la mano, si el animal regresa espontáneamente a su posición correcta se le da un punto. 1 punto	1
<b>3 Prueba de la barra horizontal</b> Las patas delanteras del animal se colocan sobre una barra, se espera que el animal se suba a la barra o se cuelgue por 3 seg. 3 puntos Si sube ambas extremidades posteriores a la barra. 2 puntos Si sube una sola extremidad posterior a la barra 1 punto Si el animal solo se cuelga (durante 3 seg) 0 puntos Si el animal se cae	3
<b>4 Plataforma Inclinada</b> Se coloca al animal con la cabeza hacia abajo sobre una plataforma inclinada 45° 3 puntos Si el animal se rota máximo en 15 seg. 2 puntos Si le toma rotarse entre 15 y 30 seg. 1 punto Si la toma rotarse más de 30 seg. 0 puntos Si el animal cae o permanece con la cabeza hacia abajo	3
<b>5 Rotación</b> El animal se sostiene de la base de la cola y rota en dirección de las manecillas del reloj, cuando se gira en sentido contrario El animal debe rotar contra lateralmente a la dirección que se le rota 1 punto Para cada lado que rote al contrario	2
<b>6 Alcanzamiento visual de la patas delanteras</b> Capacidad del animal para alcanzar un borde con las patas delanteras cuando se sostiene ligeramente del torso o de la cola 1 punto Por cada colocación exitosa de la patas delanteras sobre el borde.	1
<b>7 Circulación</b> 1 punto No gira en círculos 0 puntos Gira en círculos	1
<b>8 Reflejo contralateral</b> 1 punto Sin reflejo 0 puntos Con reflejo	2
<b>9 Motilidad</b> 2 puntos Motilidad normal 1 punto Balanceo y no fijo 0 puntos Inmóvil	2
<b>10 Condiciones generales</b> 2 puntos Normal (Buena condición de pelaje, alerta) 1 punto Desaliñado (pelaje sucio, postura encorvada y agresivo) 0 puntos Delgado, débil y poco tono muscular	2
<b>PUNTAJE TOTAL</b>	<b>21</b>

Tabla 1. Escala neuroconductual propuesta por Hunter y cols. para evaluar la recuperación post-TCE.

La escala abarca aspectos visio-espaciales, reflejos y procesos motores que pueden ser evaluados mediante 10 maniobras, cada una de ellas tiene un determinado puntaje, en total se obtienen 21 puntos para un sujeto normal.

#### 9.7 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL NMDAR.

Los tejidos fueron homogenizados con un amortiguador de fosfatos (PBS), adicionado con inhibidores de proteasas aprotinina y PMSF, utilizando un sonicador de ultrasonido (ultrasonic homogenizer 4710). Posteriormente se centrifugaron (600 xg, 10', 4°C) y se desechó el primer precipitado. El sobrenadante se sometió a una segunda centrifugación (39,000 xg, 15', 4°C). Del segundo precipitado se tomó una muestra de 2µl para realizar una cuantificación de concentración proteica por el método de Lowry (Lowry y cols., 1951).

#### 9.8 ELECTROFORÉISIS CON GEL DE POLIACRILAMIDA CON SDS (SDS-PAGE).

Se preparó un gel de poliacrilamida al 7% adicionado con SDS. Se mezcló una cantidad correspondiente a 60 µg de proteína, de cada una de las muestras, con amortiguador de proteínas 2x, a una dilución 1:1. Se utilizaron estándares de pesos moleculares (GIBCO BRL), los cuales junto con las muestras se calentaron a 95°C durante 5 min y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min. La electroforesis se corrió en un gel de 0.75 mm, a 150 V, hasta que el frente de corrida llegó a aproximadamente 5 mm del borde inferior del gel, aproximadamente 2 horas.

#### 9.9 INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

El patrón de proteínas obtenido se transfirió a una membrana de PVDF. La transferencia se llevó a cabo a 100 V, durante una hora en una cámara de transferencia húmeda. Posteriormente la membrana fue cortada en 2 fragmentos, el fragmento correspondiente a las proteínas de alto PM se utilizó para la detección de NMDA y el otro para GAPDH como control de carga. Para la detección de NMDA, la membrana se incubó en una solución bloqueadora durante 30 min (PBS, Tween 3%, leche libre de grasas al 20% y suero normal de cabra al 6%) con la finalidad de bloquear sitios inespecíficos. Posteriormente se adicionó el anticuerpo anti-NMDA-R1 de Abcam (1:1000) y se dejó toda la noche a 4°C. Para la detección de GAPDH, la membrana se incubó en una solución bloqueadora durante 30 min (PBS, Tween 3%, leche libre de grasas al 10% y suero normal de cabra al 2%). Posteriormente se adicionó el anticuerpo anti-GAPDH de Santa Cruz (1:2000) y se dejó toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se hicieron tres lavados con PBS-Tween, 5 min cada uno; se hizo una incubación con un segundo anticuerpo (IgG peroxidado anti conejo hecho en cabra) (1:2000) durante una hora, a temperatura ambiente (TA). Se lavó nuevamente con PBS-Tween durante 5 min. La reacción antígeno-antiCB1-antiIgG fue reconocida adicionando el sustrato Diaminobencidina (DBA) (0.5 mg/ml en PBS, más 0.3 µ l/ml de peróxido de hidrógeno, al 30%), la DBA es oxidada por la enzima peroxidasa, permitiéndonos detectar la presencia de NMDA o GAPDH. La densidad de las bandas fue analizada utilizando el software Quantity One de Biorad.

## 9.10 MICRODIÁLISIS

Para los experimentos de microdiálisis se usó una n=6 con los sujetos experimentales en las condiciones descritas anteriormente.

**Cirugía animal.** Las ratas se anestesiaron con una combinación de ketamina (100 mg / kg, i.p.) y xilazina (20 mg / kg, i.m.). Se implantó una cánula guía sobre el ventrículo lateral izquierdo (AP, -0,7; ML, 1,8; DV, 3,8; (Paxinos y Watson, 2013). Se introdujeron tornillos de acero inoxidable en el cráneo sobre la corteza frontal y el conjunto se fijó al cráneo con acrílico dental. Después de la cirugía, los animales pudieron recuperarse durante 3 días.

Estos experimentos se hicieron con los animales en libre movimiento mediante un sistema que tiene una guía de acero inoxidable que se acopla a un eslabón giratorio que a su vez se acopla al sujeto experimental, al cual previamente se le fijó un tornillo en el cráneo con acrílico dental.

Al momento de comenzar la microdiálisis se insertó una cánula guía fijada también con acrílico dental, mediante la cual se perfundió continuamente LCR artificial estéril a un flujo de 2.7  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Las cánulas de microdiálisis consisten en un tubo externo inoxidable de acero y uno interno de fibra de vidrio. La membrana de la cánula es de poliacrilonitrilo de 2.5 mm de largo con un poro de 40,000 D. La perfusión se llevó a cabo mediante una bomba de infusión Harvard, la recolección se llevó a cabo en tubos eppendorf cada 30 min durante 24 horas. Los dializados se conservaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta su análisis (HPLC-detección fluorométrica).

**Medición de los niveles de neurotransmisores extracelulares mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).** El análisis se realizó con un sistema Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) equipado con un detector de fluorescencia operado a una onda de excitación de 360 nm y una onda de emisión de 450 nm, una bomba binaria, un inyector automático para las muestras y un termostato de columna. Las condiciones y características cromatográficas fueron realizadas tal como Henderson y cols. 2001 lo describieron en detalle con ligeras modificaciones (Henderson y cols., 2001). Para llevar a cabo el análisis por HPLC, las muestras de microdiálisis se diluyeron 1:5 con LCR artificial, las mezclas se refrigeraron durante 10 minutos y luego se centrifugaron a 14,000 rpm durante 6 min. Los sobrenadantes se filtraron y 15  $\mu\text{L}$  se transfirieron a viales de color ámbar con tapas de rosca y se almacenaron en la unidad de muestreador refrigerado del sistema de HPLC. El procedimiento de detección de aminoácidos libres fluorométricos requirió de OPA (o-ftalaldehído y ácido 3-mercaptopropiónico en tampón de borato Agilent Technologies) para su derivatización y una columna de 3,0 mm de fase inversa (Zorbax Eclipse AAA, Agilent Technologies) con solución acuosa A (fosfato dibásico 0,1 M, agua Milli-Q disuelta) y solución de disolvente acuoso B (acetonitrilo, metanol, agua Milli-Q 4: 4,5: 1) a un flujo de 0,5 mL / min. Dentro de cada lote de análisis, se incluyeron 1.9  $\mu\text{M}$  de la solución estándar de 18 aminoácidos y un control interno (muestra normal de microdiálisis y estándar 1:1 de 1.9  $\mu\text{M}$ ) como referencia de cuantificación de medición de altura de pico y control cuantitativo.

## 9.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos, tanto de los ensayos de WB como de la microdiálisis se analizaron mediante ANOVA de uno y dos factores y pruebas post-hoc de Tukey ( $p < 0.05$ ) utilizando el programa SPSS. Los datos conductuales se analizaron mediante una prueba de Kruskal-Wallis y Kolmogorov-Smirnov como post hoc.

## 10. RESULTADOS

### 10.1 RESULTADOS CONDUCTUALES

Resultados previos de nuestro laboratorio, muestran que la recuperación conductual, en un modelo de rata, varía dependiendo de la hora en que se efectúe el proceso traumático. Concretamente si el TCE se induce en las horas de oscuridad, es mejor la recuperación conductual.

Los siguientes resultados fueron obtenidos en nuestro laboratorio y también sirvieron de base para la tesis de maestría en Ciencias Biológicas del médico cirujano Julio Morales Gómez; en ellos se muestra el efecto del TCE provocado a diferentes horas, en parámetros como la mortalidad, la pérdida de peso y la evaluación de la recuperación motora mediante una escala neuroconductual.

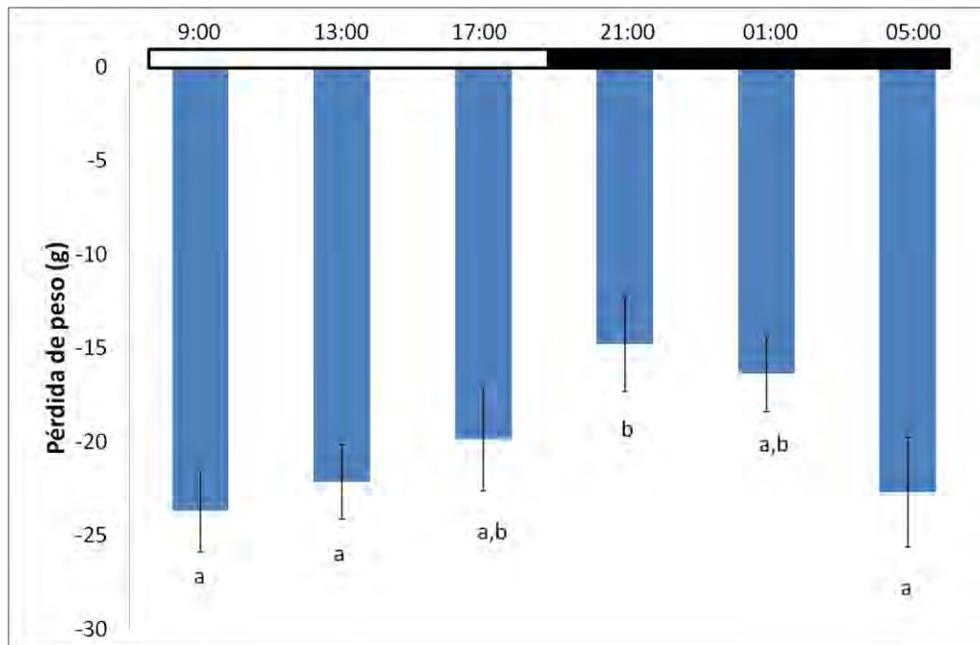


Figura 9. Efecto del ciclo luz-oscuridad sobre la pérdida de peso corporal posterior a un TCE. Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de la disminución de peso corporal a las 24 horas después de un TCE inducido a diferentes horas del día. El tamaño de muestra varía entre 16 y 19. Las barras con letras iguales no son estadísticamente diferentes, análisis de varianza de una vía y Duncan como post hoc.

Estos resultados muestran que la pérdida de peso ocasionada por el TCE varía dependiendo de la hora en que éste se ocasiona, como puede apreciarse en la figura 9; en donde se observa que las ratas sometidas a un TCE a las 21:00 horas

presentan una pérdida de peso significativamente menor que aquellas sometidas a un TCE a las 9:00, 13:00 o 17:00 horas.

Esto es un primer indicio de que la recuperación ante un TCE, es modulada por la hora del día en que produce dicho evento.

Como se describe en la metodología, para evaluar la recuperación a diversos niveles neurológicos, utilizamos una escala que en cierta proporción se asemeja a la escala de Glasgow, utilizada en humanos.

La figura 10 muestra la ejecución de la prueba neuroconductual para evaluar el daño ocasionado por el TCE, como se aprecia depende de la hora en que éste ocurrió; se puede observar que las ratas sometidas a TCE a las 21:00 y 1:00 horas tienen un puntaje significativamente mayor que aquellas en las que el TCE se indujo a las 9:00 o a las 13:00 horas

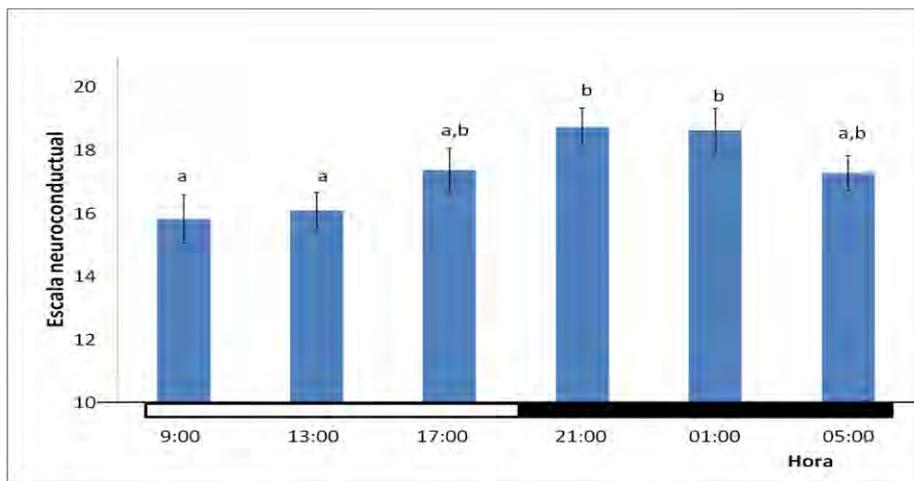


Figura 10. Efecto del ciclo luz-oscuridad sobre el daño neuroconductual ocasionado por TCE. Las barras representan el promedio  $\pm$  ee del puntaje obtenido en la ejecución de una prueba neuroconductual (Hunter y cols, 2000) a las 24 horas después de un TCE inducido a diferentes horas del día. El tamaño de muestra varía entre 16 y 19. Las barras con letras iguales no son estadísticamente diferentes, Kruskal-Wallis y Kolmogorov-Smirnov como post hoc

Finalmente cuando cuantificamos la mortalidad ocasionada por el TCE también observamos que varía dependiendo de la hora en que éste ocurra, como puede apreciarse en la figura 11. No alcanza a ser estadísticamente significativo si consideramos todas las horas analizadas ( $\chi^2_5 = 7.67$ ;  $p = 0.175$ ), ya que esta prueba estadística requiere tamaños de muestra muy grandes. Sin embargo, si juntamos los datos por fase del ciclo luz-oscuridad encontramos una disminución estadísticamente significativa en la mortalidad ocasionada por el TCE cuando éste se induce en las horas de oscuridad ( $\chi^2_1 = 4.42$ ;  $p < 0.035$ ).

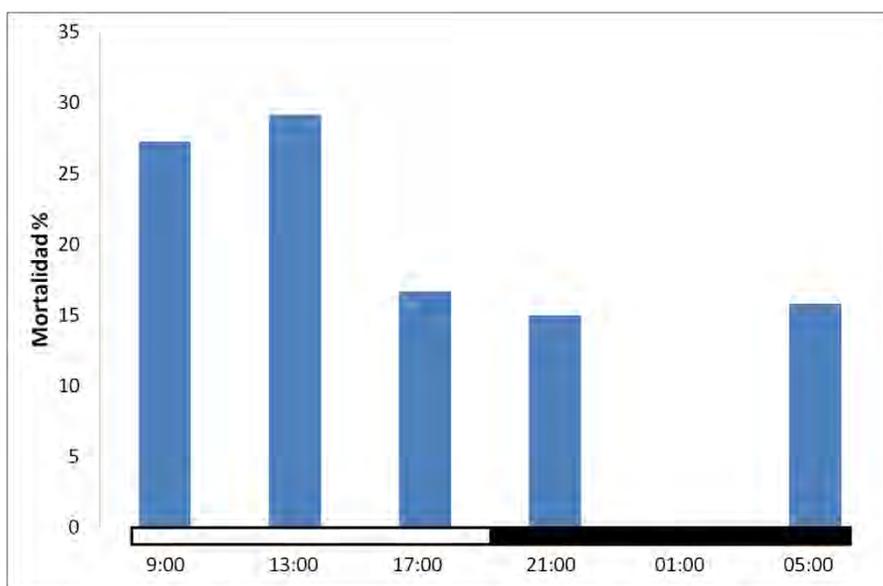


Figura 11. Efecto del ciclo luz-oscuridad sobre la mortalidad ocasionada por un TCE. Las barras representan el porcentaje de mortalidad observado en un periodo de 24 horas ocasionado por un TCE inducido a diferentes horas del día. El tamaño de muestra varía entre 18 y 24. No se observan diferencias estadísticamente significativas,  $\chi^2_5$ .

## 10.2 RESULTADOS SISTEMA GLUTAMATÉRGICO Y AMINOÁCIDOS

Se examinó la expresión de la subunidad NMDAR NR1 en la corteza cerebral de las ratas sacrificadas en seis diferentes horas del día con el fin de analizar si las diferencias en la recuperación post-TCE se correlacionaban con la expresión del receptor NMDA en la corteza cerebral de rata. En ratas control, encontramos que la expresión de la subunidad NMDAR NR1 fue mayor a las 09:00 h y a las 13:00 h en comparación a las 21:00 h (Fig 12a).

Al comparar la expresión de la subunidad NMDAR NR1 en ratas control con ratas sometidas a TCE, observamos que el TCE indujo una reducción significativa de la expresión de NMDAR en la corteza cerebral (Fig 12b). Sin embargo, esta reducción depende del tiempo de inducción del TCE. Utilizando un análisis de varianza de 2 factores, encontramos efectos estadísticamente significativos para el grupo experimental, para el tiempo de inducción del TCE, así como para la interacción de estos factores (Fig 12c). El TCE inducido a la 01:00h y a las 09:00 h redujo la expresión de NR1 respecto a los sujetos control, pero los inducidos en otros momentos no lo hicieron (Fig 12c y d).

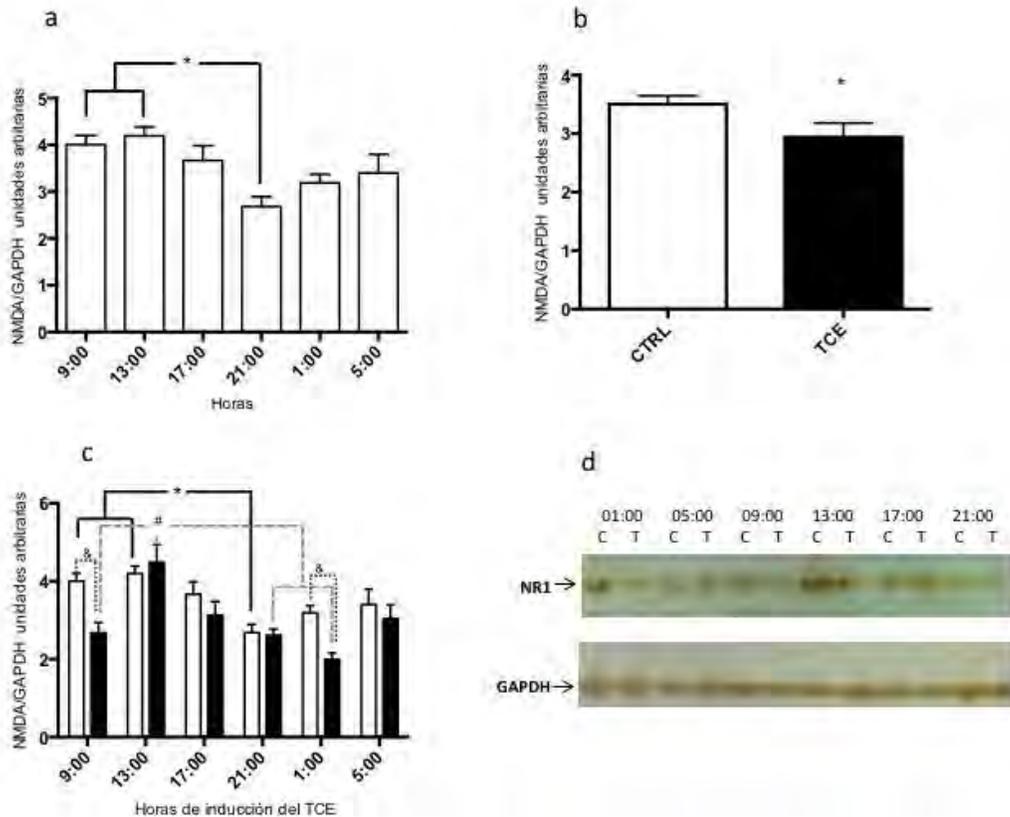


Figura 12. Efecto del ciclo luz-oscuridad sobre la expresión de la subunidad NR1 del NMDAR en corteza cerebral. a) Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de la expresión del receptor de NMDA durante 24 horas al día, para el grupo de control;  $n = 6$ ;  $*P < 0,05$  (ANOVA de dos vías y Tukey como post hoc). b) Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de la expresión del receptor de NMDA para todos los sujetos control (barra blanca) y aquellos sometidos a TCE (barra negra);  $*P < 0,05$  (t de student). c) Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de la expresión del receptor de NMDA durante 24 horas al día, para el grupo de control (barras blancas) y para los sujetos sometidos a TCE (barras negras) a diferentes horas del día;  $*P < 0,05$  para el grupo control;  $\#P < 0,05$  para el grupo con TCE;  $\&P < 0,05$  para el grupo TCE comparado con el control a la misma hora.

Otro aspecto importante en el estudio del sistema glutamatérgico es conocer los niveles del glutamato a lo largo de las 24 horas, para ello se recurrió a la técnica de microdiálisis, los resultados se muestran en la siguiente figura, resaltando que esta técnica permitió además conocer los cursos temporales de liberación de otros neurotransmisores.

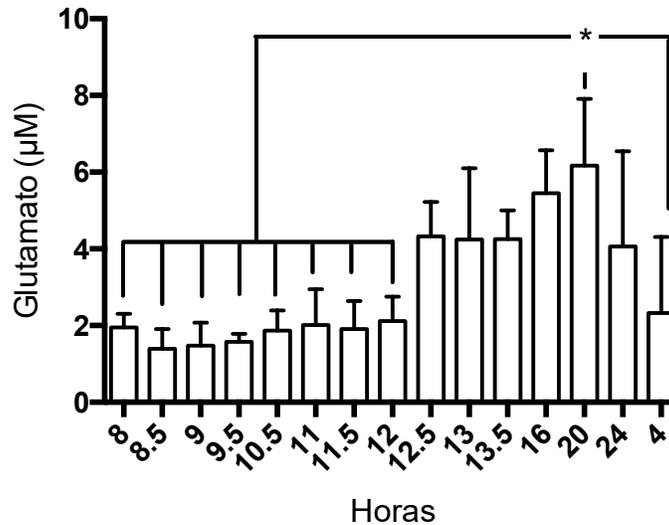


Figura 13. Efecto del ciclo luz-oscuridad sobre los niveles de glutamato en la corteza motora cerebro de rata. Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de los niveles de glutamato. Se puede observar que en las primeras horas del día los niveles son bajos, pero a partir de las 12:30 h comienzan a incrementarse, alcanzado significancia estadística a las 20:00 h con respecto a los datos de las 8:00 h a las 12:00 h. \*P <0,05 (ANOVA de un factor y Tukey como post-hoc).

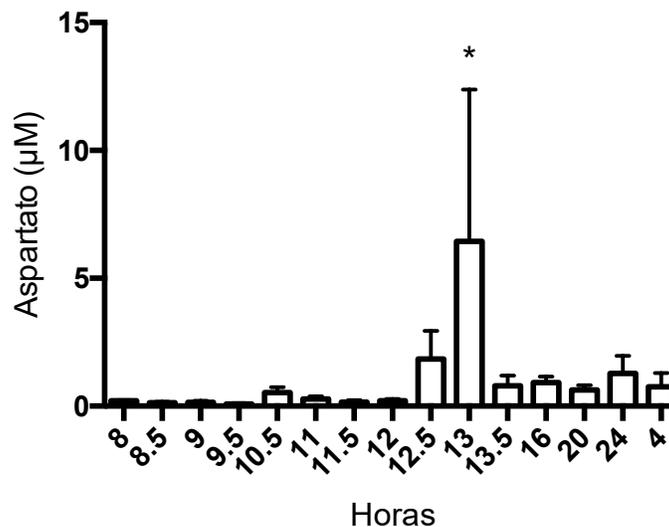


Figura 14. Efecto del ciclo luz-oscuridad sobre los niveles de aspartato. Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de los niveles de aspartato. Se muestra que existe un pico de liberación a las 13:00 h, que es significativamente diferente al resto de las mediciones. \*P <0,05 (ANOVA de un factor y Tukey como post-hoc).

Hay que destacar los cursos temporales de liberación tanto de GABA como de glicina, el primero por ser un neurotransmisor inhibitorio, que se opondría al efecto excitador del glutamato y el segundo por ser parte de la funcionalidad del receptor NMDA.

También es interesante el comportamiento de los niveles de la glutamina, que es sillar importante en la formación tanto de glutamato como de GABA.

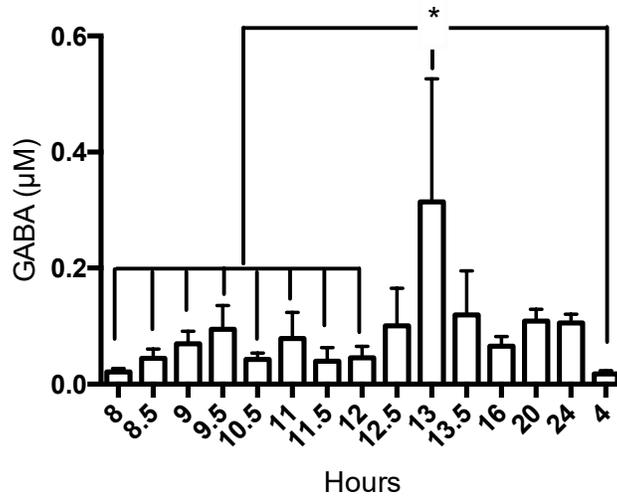


Figura 15. Efecto del ciclo luz-oscuridad sobre los niveles de GABA en el cerebro de rata. Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de los niveles de GABA. Se muestra un incremento estadísticamente significativo a las 13:00 hs, respecto a los datos de las 8:00 a las 12:00 hs. \*P <0,05 (ANOVA de un factor y Tukey como post-hoc).

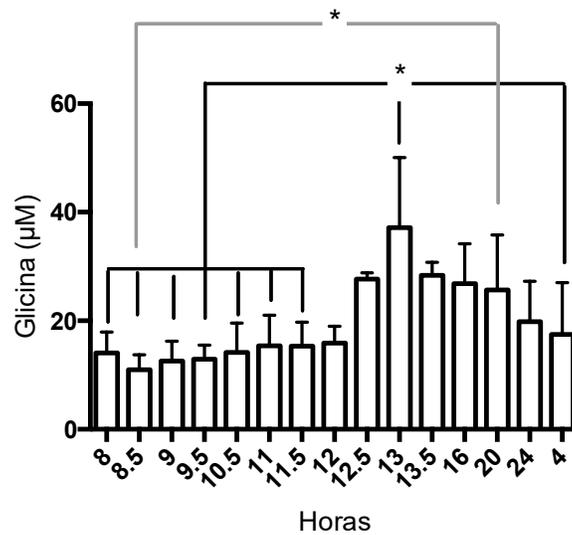


Figura 16. Efecto del ciclo luz-oscuridad sobre los niveles de glicina en cerebro de rata. Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de los niveles de glicina. Se observa un pico de liberación a las 13:00 hs, el cuales significativamente diferente, con respecto a los datos de las 4:00 a las 11:30 hs. \*P <0,05 (ANOVA de un factor y Tukey como post-hoc).

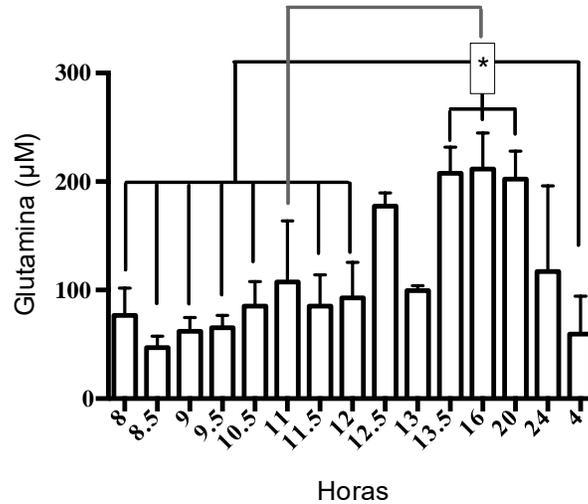


Figura 17. Efecto del ciclo luz-oscuridad sobre los niveles de glutamina en cerebro de rata medidos por microdialisis durante 24 horas. Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de los niveles de glutamina. Se observa un incremento en los niveles entre las 13:30 h y 20:00 h significativamente diferente, con respecto a los datos de las 4:00 a las 12:00 hs. \*P <0,05 (ANOVA de un factor y Tukey como post-hoc).

El resto de nuestros resultados de microdialisis, se presentan agrupados en tres secciones, fenilalanina y tirosina, que como se discutirá tienen implicaciones en la formación de acetilcolina y la conducta motora, los llamados aminoácidos ramificados que se han propuesto como biomarcadores de TCE y finalmente el resto que involucra aminoácidos como citrulina, histidina o triptófano que tienen implicaciones en el metabolismo celular y en la formación de diversas proteínas.

**Fenilalanina y tirosina.** Estos aminoácidos son sillares importantes para la formación de catecolaminas, a continuación se muestran sus niveles durante 24 horas en cerebro de rata.

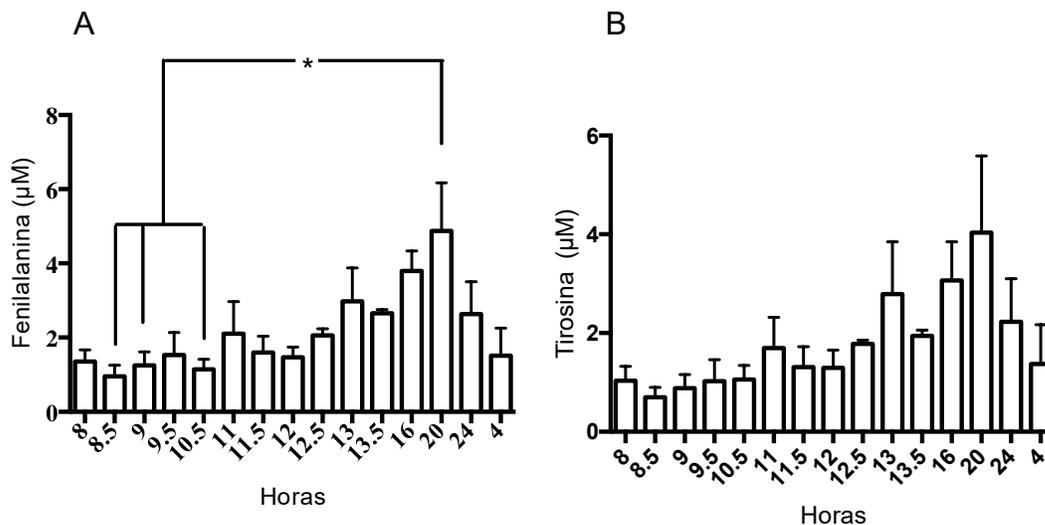


Figura 18.- Efecto del ciclo luz-oscuridad sobre los niveles de fenilalanina y tirosina en cerebro de rata. A) Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de los niveles de fenilalanina. Se observa un pico

en los niveles a las 20 horas, significativamente diferente respecto a las 8:30, 9:00 y 10:30 h. \*P <0,05 (ANOVA de un factor y Tukey como post-hoc). B) Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de los niveles de tirosina.

**Aminoácidos ramificados.** Actualmente los aminoácidos denominados ramificados (isoleucina, leucina y valina) se han examinado tanto en humanos que han sufrido un TCE, como en modelos animales; encontrándose cambios a partir del evento traumático, pero también cierto efecto neuroprotector a partir de suplementarlos en la dieta.

A continuación se presentan los resultados en los niveles de los aminoácidos ramificados, medidos durante las 24 horas del día en cerebro de rata.

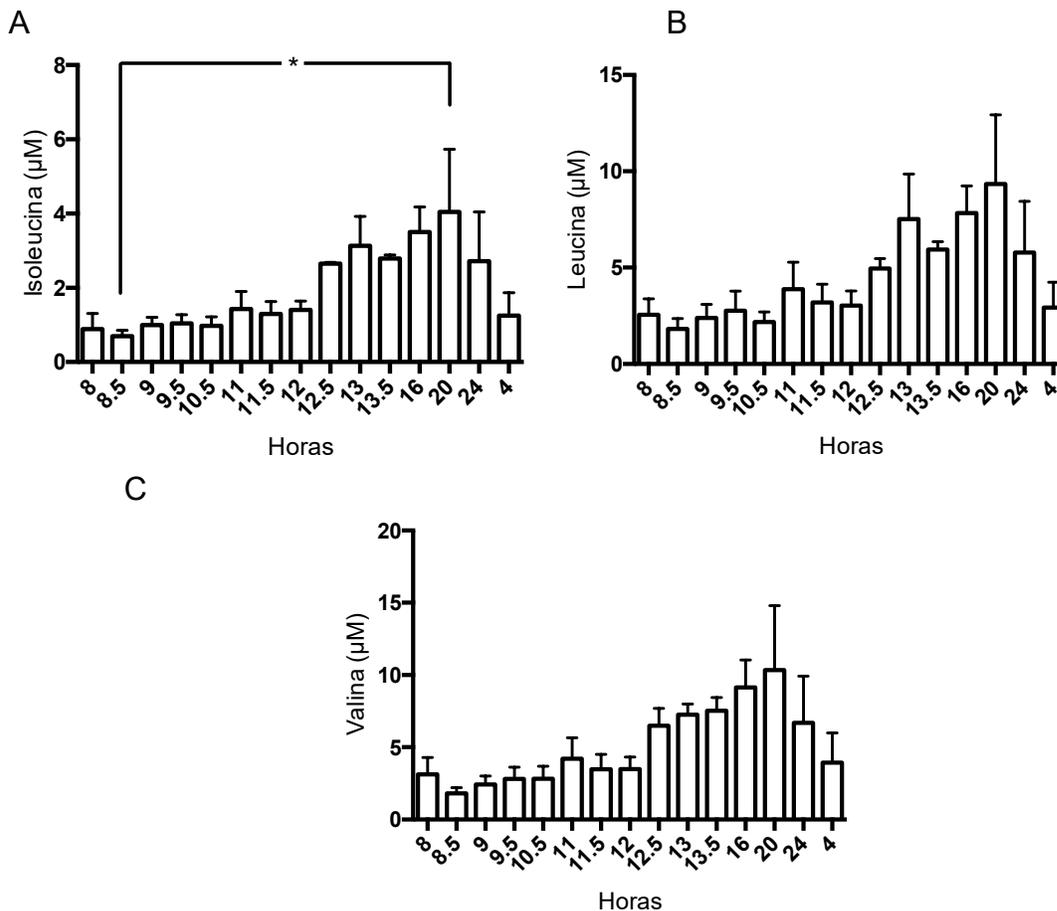
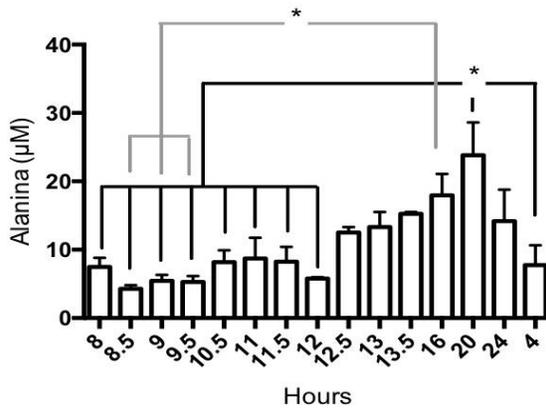


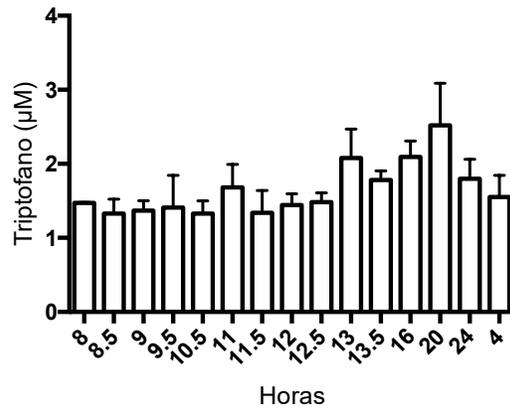
Figura 19. Efecto del ciclo luz-oscuridad sobre los niveles de los aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina y valina), medidos durante 24 horas en cerebro de rata. A) Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de los niveles de isoleucina. Se observa un pico a las 20:00 horas estadísticamente diferente de las 8:30 hs; \*P <0,05 (ANOVA de un factor y Tukey como post-hoc). B) Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de los niveles de leucina. C) Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de los niveles de valina.

**Otros aminoácidos.** El resto de los aminoácidos analizados se presentan en tres grupos el primero son alanina, triptófano, serina e histidina, un segundo grupo muestra los niveles de metionina, arginina y treonina y por último se presentan citrulina y asparagina.

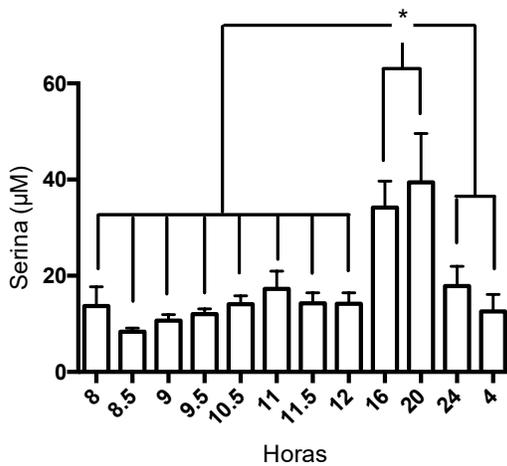
A



B



C



D

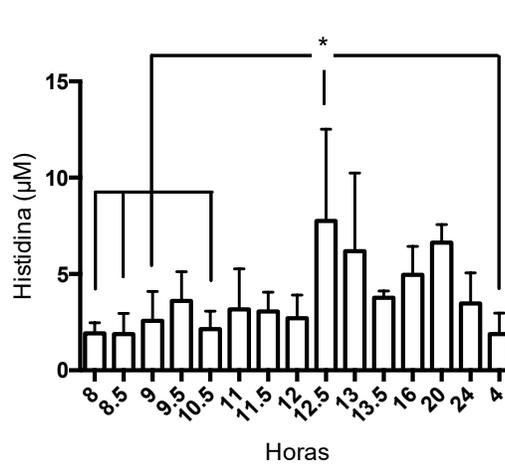


Figura 20. Efecto del ciclo luz-oscuridad sobre los niveles de alanina, triptofano, serina e histidina, medidos durante 24 horas en cerebro de rata mediante microdialisis. A) Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de los niveles de alanina. Se observa un incremento en los niveles entre las 16:00 y 20:00 horas estadísticamente diferente de los valores de las 8:30 a 9:30; \* $P < 0,05$  (ANOVA de un factor y Tukey como post-hoc). B) Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de los niveles de triptofano. C) Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de los niveles de serina. Se observa un incremento en los niveles entre las 16:00 y 20:00 hs estadísticamente diferente del resto de las horas; \* $P < 0,05$  (ANOVA de un factor y Tukey como post-hoc). D) Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de los niveles de histidina. Se observa un incremento en los niveles entre las 12:30 horas estadísticamente diferente de los valores de las 4:00 a 9:00 hs; \* $P < 0,05$  (ANOVA de un factor y Tukey como post-hoc).

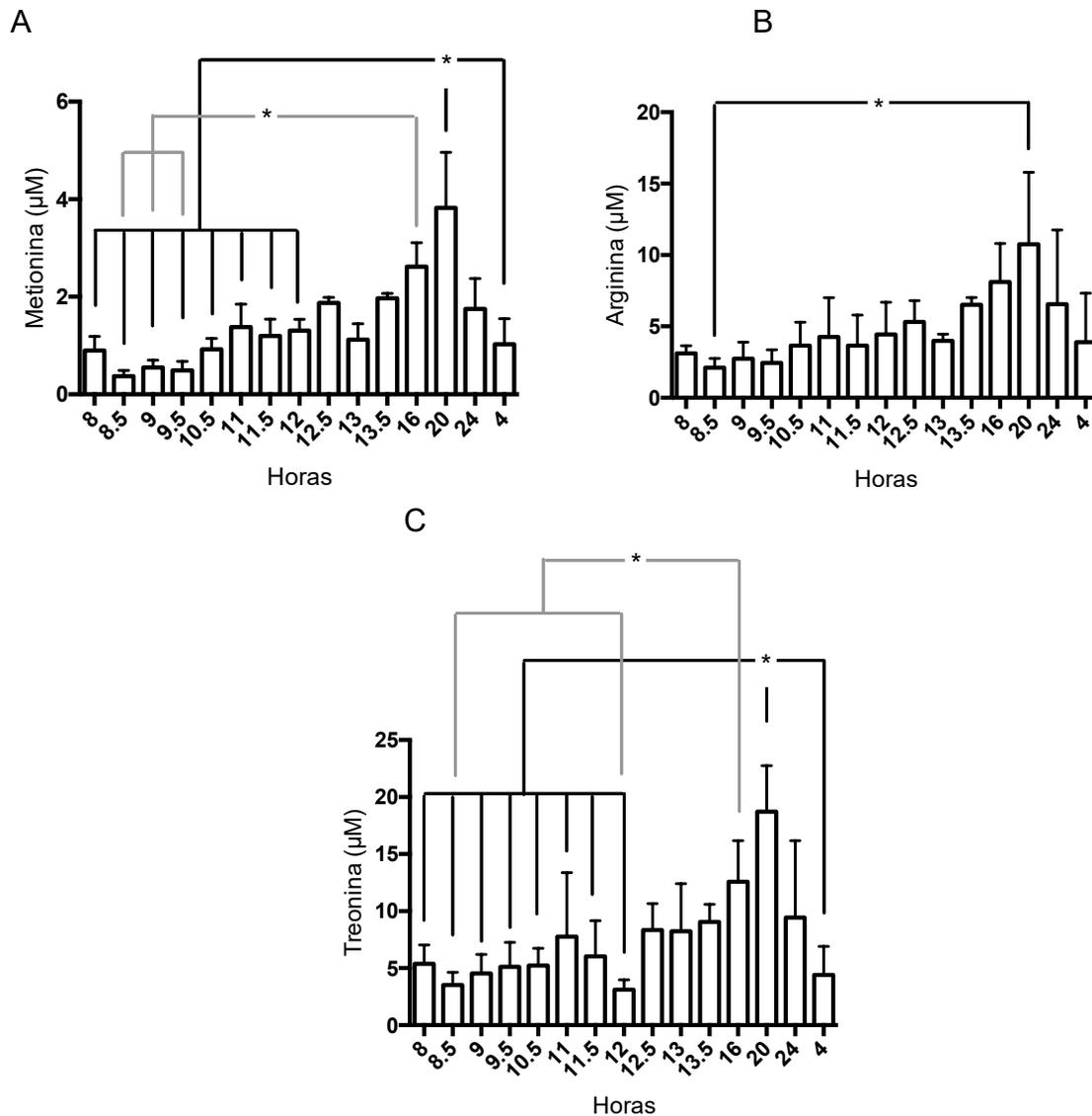


Figura 21. Efecto del ciclo luz-oscuridad sobre los niveles de metionina, arginina y treonina, medidos por microdialisis en cerebro de rata durante 24 horas. A) Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de los niveles de metionina. Se observa un incremento en los niveles entre las 16:00 y 20:00 horas estadísticamente diferente de los valores de las 8:30 a 9:30; \*P <0,05 (ANOVA de un factor y Tukey como post-hoc). B) Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de los niveles de arginina. Se observa un incremento en los niveles a las 16:00 hs estadísticamente diferente de los valores de las 8:30; \*P <0,05 (ANOVA de un factor y Tukey como post-hoc). C) Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de los niveles de treonina. Se observa un incremento en los niveles entre las 16:00 y 20:00 horas estadísticamente diferente de los valores de las 8:00 a 12:00; \*P <0,05 (ANOVA de un factor y Tukey como post-hoc)

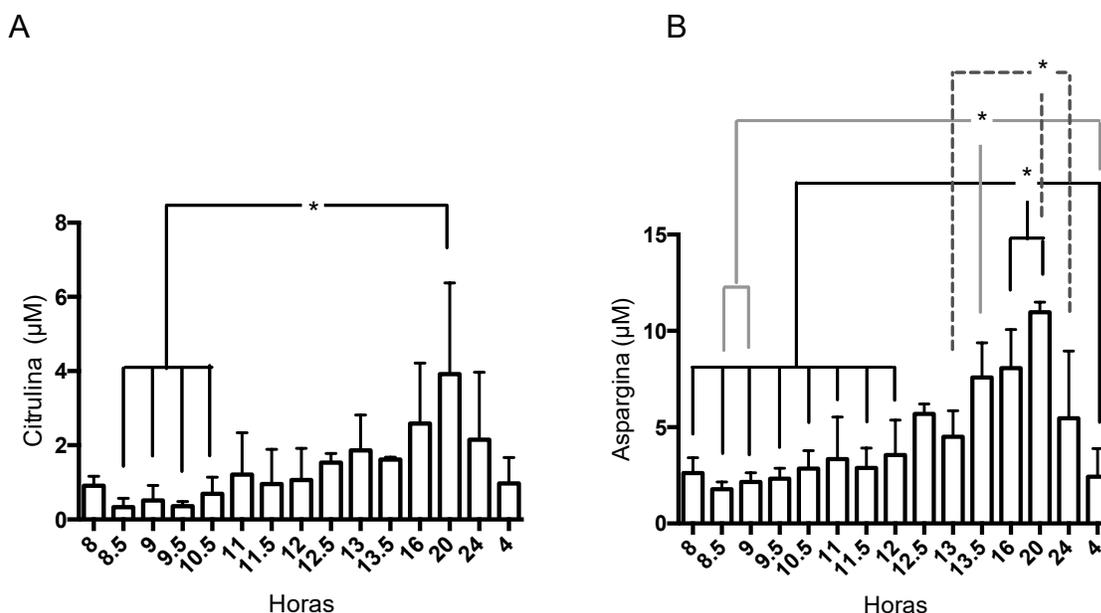


Figura 22. Efecto del ciclo luz-oscuridad sobre los niveles de citrulina y asparagina, medidos por microdialisis en cerebro de rata durante 24 horas. A) Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de los niveles de citrulina. Se observa un incremento en los niveles a las 20:00 horas estadísticamente diferente de los valores de las 8:30 a 10:30; \*P <0,05 (ANOVA de un factor y Tukey como post-hoc). B) Las barras representan el promedio  $\pm$  ee de los niveles de asparagina. Se observa un incremento en los niveles a las 20:00 horas estadísticamente diferente de los valores de las 4:00 a 12:00; \*P <0,05 (ANOVA de un factor y Tukey como post-hoc).

## 11. DISCUSIÓN

La respuesta neuroprotectora del cerebro frente al daño es mayor en las horas de oscuridad. Existen reportes de la literatura en los que se describen que, en humanos, existe un ritmo diurno en el inicio de un accidente vascular cerebral, así como en el ataque al miocardio (Marler, 1993).

Incluso en modelos de isquemia en rata se han descrito diferencias en el daño causado si ésta se induce en las horas de oscuridad en comparación con las horas de luz (Vinall y cols., 2000; Tischkau y cols., 2007).

Estos datos apoyan la teoría de que la respuesta neuroprotectora no es constante si no que tiene fluctuaciones a lo largo de las 24 horas del día, siendo esta una pauta para evaluar que tipo de intervención es más oportuno para disminuir el daño producido por un TCE, dependiendo de la hora en que haya ocurrido.

Nuestros datos muestran que el comportamiento del sistema glutamatérgico, a nivel de corteza cerebral de la rata tiene una variación a lo largo de las 24 horas del día, tanto en la expresión del NMDA como en los niveles de glutamato. Estos hallazgos podrían jugar un papel importante en la neuroprotección y por lo tanto en la recuperación frente a un evento dañino como un TCE.

El efecto excitotóxico del glutamato, mediado básicamente por los receptores NMDA, está plenamente comprobado (Shohami y Biegon, 2012), pero como hemos mencionado a lo largo de este trabajo, la recuperación post-TCE depende

de la hora en que se dio el evento, por ello decidimos analizar el curso temporal de la expresión de este receptor a lo largo del día, lo que estaría modulando el efecto excitotóxico.

La gran mayoría de las investigaciones al respecto se centran en la respuesta del receptor NMDA ante el daño, estableciendo que su sobreexpresión tiene un papel crucial en diversas patologías adicionalmente al TCE, incluyendo isquemia e incluso algunas enfermedades psiquiátricas (Choi y Rothman, 1990; Faden y cols., 1989; Linch y Dawson, 1994). Sin embargo, los estudios previos no analizaron modificaciones en la expresión de este receptor a largo del día y nuestros resultados señalan que existen cambios en su expresión a lo largo de las 24 horas. Este hallazgo es importante porque, como mencionamos la sobreexpresión de este receptor, luego de un daño, está involucrada con el proceso de excitotoxicidad. Si la expresión varía a lo largo de las 24 horas del día, pudiera ser un factor que module ya sea a la alta o a la baja, dicho proceso, y esto nos estaría indicando incluso que existen ventanas en donde las acciones neuroprotectoras ya sean endógenas o exógenas actuarían con mayor eficacia. Por ejemplo, en un momento en donde la expresión del receptor es alta, su sobreexpresión luego de un TCE, ocasionaría un mayor daño, disminuyendo el efecto de las acciones neuroprotectoras. En cambio, si la lesión ocurre en un momento en donde la expresión del NMDA está disminuida, el efecto excitotóxico pudiera ser menor, permitiendo que los mecanismos neuroprotectores sean más eficaces. Por otro lado, esto abre una posibilidad importante para la terapéutica utilizada para un TCE, por ejemplo para los bloqueadores del NMDA, si se considera que existe un curso temporal en la expresión de este receptor, entonces deberían de usarse a diferentes dosis dependiendo de la hora del día; es decir, las ventanas terapéuticas deberían considerar esta variación diurna con lo que se podría mejorar significativamente su eficacia.

Este conocimiento podría explicar en parte, porqué muchas de las estrategias empleadas con éxito en modelos animales, no son eficaces cuando pasan a los estudios clínicos. Shohami y Biegon (2012) postulan que el uso de ciertos fármacos con fines neuroprotectores, pudiera no ser efectivo, debido al tiempo en que se aplique y al momento en que se produce el daño, de acuerdo con nuestros datos, la expresión del receptor NMDA muestra una tendencia a ser mayor en horas de la tarde, lo que implicaría que el ajuste de las dosis de fármacos que por ejemplo intentarían bloquearlo deberían considerar este curso temporal.

Por otra parte, los experimentos de microdiálisis muestran que la liberación de glutamato monitoreada durante las 24 horas del día, exhibe un ritmo diurno, es decir con picos y valles que se presentan dependiendo de la hora del día. Observamos que en las primeras horas de la fase de luz, los niveles son bajos, pero a partir de las 12:30 comienzan a incrementarse, alcanzado un pico a las 20:00 horas, cuando comienza la fase de oscuridad (figura 13).

Esto nuevamente muestra que el sistema glutamatérgico tiene variaciones diurnas, que lo vuelven dinámico y que proporcionan ventanas temporales para conocer más acerca de cómo se da la interacción entre el glutamato y sus receptores.

Si observamos los resultados de la expresión del NMDA y liberación del glutamato, encontramos que existen horas en donde la liberación aumenta pero la expresión del receptor baja, esto pudiera explicarse, por fenómenos de regulación a la alta y a la baja, esto se ha descrito por varios autores y en diversas áreas del cerebro, como la corteza y el hipocampo (Costa, 1989; Ekonomou y Angelatou, 1999; Cercato y cols., 2017).

De tal forma que la liberación del glutamato y la expresión del NMDA, estarían balanceando la acción del sistema glutamatérgico. Como se sabe, la activación del receptor NMDA por glutamato, genera la entrada de calcio, e induce por un lado una despolarización que a su vez favorece la entrada de más calcio a través de los canales voltaje dependientes tipo L y, por otro lado, el aumento de su concentración intracelular, lo que desencadena procesos tanto a nivel citoplasmático como a nivel nuclear, ya que el calcio es capaz de actuar en ambos niveles. La duración y amplitud del incremento intracelular de calcio es una señal para la activación de factores de transcripción (Dolmetsch y cols., 1997), por otra parte la localización a nivel subcelular del incremento de calcio es otro factor que modularía que vía debe ser activada (Bading y cols., 1997).

El incremento de calcio, a nivel nuclear o bien en la vecindad del núcleo induce activación del CREB (cAMP Reponse Element Binding protein), a su vez eso activa al SER (serum response element), ambos activan la transcripción de una serie genes y posteriormente la síntesis de diversas proteínas como los propios receptores NMDA y también las llamadas proteínas reforzadoras de sinapsis; es decir habría una “regulación a la alta” (Bading y cols., 1997; Hardingham y cols., 1997; Fields, 2005)

Por otra parte, un exceso en el nivel del neurotransmisor, generalmente es una señal para disminuir el número de receptores. Normalmente lo que ocurre es la internalización del complejo ligando-receptor, lo cual es una señal que activaría factores represores, los cuales bloquean la acción de la RNA polimerasa, impiden la transcripción y con ello se daría una disminución de la síntesis del receptor (Nelson y Cox, 2009).

Nuestros datos muestran que tanto la expresión del NMDAR como la liberación de glutamato varían a lo largo de las 24 horas del día, lo cual podría mostrar una regulación a la baja o a la alta del sistema, esto porque explicaría los cambios adaptativos del sistema glutamatérgico dependiendo de la temporalidad; lo cual es crítico para la función sistema nervioso.

Dentro de nuestros resultados obtenidos mediante los experimentos de microdiálisis, destacan el curso temporal de la liberación de aspartato, GABA y glicina. En el caso del primero, poco se ha documentado que participe en procesos de excitotoxicidad, de hecho recientemente se ha encontrado que la aplicación de aspartato de potasio por vía intraperitoneal a ratas sometidas a TCE en un modelo de impacto cortical controlado, atenúa el daño causado por el TCE. En estos estudios reportaron que el daño cortical se reduce de manera dosis dependiente, se reduce la actividad de la ATPasa Na-K, lo que disminuye el caos metabólico producido por el TCE; también se atenúa el daño de la barrera

hematoencefálica y se reduce el edema cerebral (Gu y cols., 2016). Sin embargo, nuestros resultados muestran que el aspartato presenta un pico a las 13:00 horas, tiempo en el que observamos o detectamos mayor daño en los individuos con TCE, en este caso pudiera ser que la excesiva liberación del aspartato también contribuya al daño y no a la neuroprotección.

Otro dato importante surgido de la evaluación de la microdiálisis, es el curso temporal de liberación del GABA. Como se sabe, el GABA es el neurotransmisor inhibitorio clásico del sistema nervioso central, y si se observa la gráfica respectiva, se nota un pico de liberación también a las 13:00 horas. Esto podría explicarse considerando que a esa hora se presenta el pico de aspartato y el glutamato empieza a incrementar, por lo que el GABA debiera liberarse justo para no permitir eventos de tipo excitotóxico, es decir como una compensación a la excesiva liberación los neurotransmisores excitatorios, pero dado que esto solo sería para seguir manteniendo un balance, no es suficiente para generar neuroprotección al momento del daño.

Con respecto al perfil de glicina, este aminoácido también presenta elevaciones en sus niveles a las 13:00 horas, lo cual pudiera ser significativo, ya que recordemos que también el receptor NMDA requiere tener glicina para ser funcional, es decir es coagonista del glutamato (Nestler y cols., 2014).

Finalmente, los resultados del presente trabajo de tesis aportan conocimiento para dar una posible explicación al trabajo previo de nuestro laboratorio, donde mostramos que la recuperación ante un TCE es dependiente del momento del día en el que se induce, existiendo una mejor recuperación en sujetos experimentales en los cuales el daño se generó en horas de oscuridad (Martínez-Vargas y cols., 2006). Aquí mostramos que existe una mayor liberación de glutamato en horas de oscuridad, pero se tiene una menor expresión del receptor NMDA y menores niveles de glicina, por lo tanto el proceso de excitotoxicidad puede verse atenuado por este hecho. Además, el aumento en la liberación del glutamato podría modular esta baja expresión del receptor por un proceso de regulación a la baja (down regulation) (Oster y cols., 1993; Resink y cols., 1996), mientras que la disminución en la liberación podría condicionar una regulación a la alta (up regulation) (Ekonomou y Angelatou, 1999).

Nuestros datos sugieren una posible modulación de la excitotoxicidad, por efecto de la variación del sistema glutamatérgico, aunque habría que hacer las determinaciones correspondientes. Faltarían por abordar algunos aspectos, por ejemplo, que una mayor expresión de los NMDAR, a cierta hora del día, implicaría mayor ingreso de calcio y sodio a la célula, lo que a su vez supone que los receptores expresados son funcionales. Sería muy interesante establecer mediante análisis electrofisiológicos, si la función de estos receptores varía a lo largo de las 24 horas del día, lo que nos daría una idea clara de la funcionalidad y no solamente de la expresión del receptor, abriendo así una perspectiva de investigación a partir de nuestros resultados.

La glía también contribuye en modular la función del sistema glutamatérgico, y también sería interesante el conocer cómo se afecta este tipo celular en un TCE y

si esto contribuye a la excitotoxicidad. Al respecto, dentro de los anexos de este trabajo se incluyen dos revisiones que abarcan de manera colateral este tema (Martínez-Tapia y cols., 2018a y Martínez-Tapia y cols., 2018b).

Por otra parte, con estos datos se podrían retomar varias estrategias neuroprotectoras tanto farmacológicas como terapéuticas, pero con la visión de que hay ventanas temporales, las cuales hay que conocer para establecer una mayor efecto neuroprotector. Al respecto nuestro grupo trabaja con minociclina, un antibiótico con propiedades antiinflamatorias, el cual se está usando justo en horas con mayor expresión del receptor NMDA; también nuestro grupo acaba de reportar el uso de estimulación magnética transcraneal, en un modelo de rata, para conocer si se potencia la recuperación ante un TCE (Verdugo-Díaz, y cols., 2017).

**Resultados de microdiálisis.** En cuanto a los datos de microdiálisis, es importante mencionar que se encontraron varios datos interesantes. Además de lo que ya se mencionó con respecto a glutamato, GABA, aspartato y glicina, debemos resaltar nuestros datos de fenilalanina y tirosina, que como se muestra en la figura 18, ambos aminoácidos tienen niveles elevados alrededor de las 20:00 horas, justo la hora en la que por las condiciones en las que están los sujetos experimentales, deben entrar en actividad. Recordemos que tanto la fenilalanina como la tirosina, son coo-sustrato para la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la formación de catecolaminas, no existe ningún reporte de los niveles de estos aminoácidos durante las 24 horas del día, sin embargo si hay concordancia con algunos autores que muestran que hay justo una elevación en las horas de oscuridad (Leyton, 2000).

Fenilalanina y tirosina además de ser sustratos para la síntesis de catecolaminas son ligandos del receptor GPR139, el cual es un receptor huérfano acoplado a proteína G y es expresado en el cerebro, en particular en la habénula, el hipotálamo y el cuerpo estriado, que puede desempeñar un papel en la actividad locomotora. (Dvorak, 2014; Liu y cols., 2015). Este receptor está involucrado además en muchos procesos fisiológicos y fisiopatológicos, que tienen que ver con la visión, la neurotransmisión y la respuesta inmune, además de ser blanco de varias drogas (Lagerstrom y Schioth, 2008).

El perfil de variación diurna de la fenilalanina y la tirosina abre nuevas posibilidades de investigación para conocer mejor las funciones a nivel cerebro de estos aminoácidos, así como para considerar nuevas ventanas terapéuticas en diferentes padecimientos neurológicos en los que estén involucrados como la hiperfenilalaninemia (Nohr y cols., 2017) y posiblemente algunos procesos de neuroprotección.

En cuanto a los aminoácidos ramificados: valina, leucina e isoleucina (BCAA, por su siglas en inglés) es importante mencionar que recientemente se ha reportado que sus niveles en plasma y en hipocampo descienden luego de un TCE (Cole y cols., 2010, Jeter y cols., 2013), y su suplementación en la dieta, ha generado efectos neuroprotectores, tanto en humanos como en modelos animales; por ejemplo se ha observado restablecimiento de sus niveles en hipocampo además de la recuperación de la función cognitiva (Cole y cols., 2010). Mientras que otros

autores han demostrado recuperación del ritmo sueño-vigilia en ratones con TCE luego de 12 días de una dieta rica en estos aminoácidos (Lim y cols., 2013).

Nosotros encontramos que los niveles de estos aminoácidos varían a lo largo de las 24 horas del día y que presentan un nivel mayor a las 20:00 hrs, lo cual podría ofrecer una mejor perspectiva para su uso más preciso en tratamientos post-TCE.

Del resto de aminoácidos cuyo nivel se analizó mediante microdiálisis, se discutirá de manera somera los resultados encontrados.

**Alanina.** La alanina es uno de los aminoácidos que presenta cambios circadianos en diversos tejidos y plasma, además de considerarse una nueva sustancia fisiológicamente activa y / o un biomarcador. Los cambios en las concentraciones de L-alanina durante el día y noche no se han reportado; salvo para D-alanina en plasma de ratas (Morikawa y cols., 2003; 2008), mientras que en ratón fueron descritos en plasma, hipófisis, riñón páncreas y orina. En plasma los cambios medidos presentan un máximo a las 13 horas y un mínimo a la 01:00 horas, mientras que en ratas pasa algo similar. Estos resultados sugieren que los cambios día-noche en los niveles de alanina se observarían ampliamente en los mamíferos (Karakawa y cols., 2013), en nuestro caso efectivamente encontramos una variación a lo largo del día, con un elevaciones también justo a partir de las 13 horas pero con un marcado pico a las 20 horas.

**Triptófano.** En lo que respecta al triptófano, este es un aminoácido esencial que se encuentra en muchos alimentos a base de proteínas (Friedman y Levin, 2012) en general en la dieta con carnes, productos lácteos, frutas y semillas. Comidas con alto índice glucémico aumentan la disponibilidad de triptófano (Herrera y cols., 2011). Los niveles de triptófano en plasma están determinados por un equilibrio entre la ingesta dietética (Young y cols., 1971) y su eliminación del plasma. Posee un papel esencial en la biosíntesis de proteínas (Richard y cols., 2009). Además el triptófano es un precursor de un gran número de los metabolitos, en particular las kinureninas, la melatonina y el neurotransmisor serotonina.

Recientemente se ha observado que la manipulación de las concentraciones de triptófano, precursor de serotonina, influyen en el estado de ánimo y la cognición. Si los niveles de triptófano son bajos hay baja serotonina y esto contribuye a un bajo estado de ánimo. Una manipulación biológica o genética que induce una disminución de la serotonina, disminuye el estado de ánimo (Jenkins y cols., 2014). Además, se sabe que existe una influencia de la microbiota intestinal en el comportamiento. Hay una regulación del triptófano y de la serotonina en el intestino por la microbiota residente y estudios recientes muestran que la microbiota intestinal baja o nula modifica niveles de triptófano y serotonina, lo que a su vez modifica el comportamiento central de orden superior. Los tratamientos para los trastornos cognitivos y del humor son motivo de constante investigación. El hecho de que la microbiota intestinal tenga influencia central abre nuevas posibilidades en el tratamiento de trastornos cerebrales como autismo, ansiedad y depresión (Herrera y cols., 2011; Mayer y cols., 2014).

Aunque nuestros resultados muestran que el triptófano no se modifica de manera significativa, si se aprecia que hacia las horas de la noche los niveles aumentan.

Este hecho podría ser tomado en cuenta, justamente para que las perspectivas antes señaladas puedan dar mejores resultados (ver figura 20).

Serina. La serina es un aminoácido no esencial aunque el cuerpo no produce lo suficiente para los requerimientos diarios, su síntesis a nivel central es importante para la formación de glicina y de cisteína. Fisiológicamente hablando es el componente de las proteínas que tienden que fosforilarse, y actualmente se le asignan papeles neuroprotectores (Metcalf y cols., 2018).

La serina se ha medido en pacientes con algunas enfermedades como neuropatías, Alzheimer y esclerosis amiotrofica lateral (ALS) (Hirano y Zimmerman, 1962). También en pacientes con temblores esenciales; sus concentraciones están disminuidas tanto en suero sanguíneo como en LCR, lo que sugiere anomalías en la vía biosintética (Mally y cols., 1996). La neuropatía sensorial hereditaria tipo 1 (HSN-1) es una enfermedad hereditaria dominante que conduce a la degeneración progresiva de DRG y neuronas motoras (Hirabayashi y Furuya, 2008).

La restitución de este aminoácido vía dieta parece ser una terapia a considerar para tratar estas enfermedades. Pero si además se toma en cuenta el curso temporal que describen nuestros datos durante las 24 horas del día y en donde se puede apreciar la variación en la liberación de este aminoácido (ver figura 20), se podrían hacer ajustes en estos tratamientos para que resulten más eficaces.

Histidina. Nuestros resultados muestran que los niveles de histidina cambian durante las 24 horas (figura 20), presentándose niveles elevados de manera significativa durante el mediodía.

Son escasos los reportes que muestran el análisis de los niveles de este aminoácido en el cerebro. Dentro de disponible, hay que destacar que la histidina es el precursor de la histamina y mediante la acción de la histidina descarboxilasa, recientemente se ha reportado que las células que contienen dicha enzima se presentan en un 34 % más durante la noche en hipotálamo lateral de ratón, lo que pudiera estar asociado a un aumento en la síntesis de histamina, y esto a su vez estar regulado con el sueño, ya que en pacientes con narcolepsia el número de neuronas con histidina descarboxilasa está aumentado (Mc Gregor y cols., 2017). Nuestros datos muestran que existe un nivel mayor de histidina durante las horas del día (ver figura 20), lo que podría deberse a que la tasa de activación de la enzima está cambiando y por lo tanto la formación de histamina y esto de alguna forma ayuda a preservar la relación vigilia-sueño a través de la interacción con las hipocretinas (McGregor y cols., 2017).

El resto de los aminoácidos cuyos niveles también fueron determinados en nuestros experimentos de microdialisis serán discutidos de manera breve, dado que todavía el conocimiento sobre sus funciones a nivel cerebral se sigue investigando.

Sin embargo sus funciones estructurales le confieren importancia a nuestros hallazgos dado que pudieran representar oportunidades de investigación en procesos de síntesis de proteínas cuya función sea importante en el sistema nervioso o bien en procesos de nutrición.

Metionina. Nuestros resultados muestran un perfil de metionina con un pico a las 20 horas y un marcado descenso a partir de las 4 horas el cual se mantiene hasta las 16 horas (ver figura 21), es probable que esto se deba a que en la etapa de actividad sea requerido para formar carnitina o taurina.

Junto a la cisteína, la metionina es uno de los dos aminoácidos proteinogénicos que contienen azufre. (Wray y Abeles, 1995). La metionina es un intermediario en la biosíntesis de la cisteína, la carnitina, la taurina, la lecitina, la fosfatidilcolina y otros fosfolípidos. Fallas en la conversión de metionina pueden desembocar en aterosclerosis (Nelson y Cox, 2009).

Arginina. Este aminoácido se considera esencial aunque sólo se requiere en condiciones especiales; dentro de sus funciones destacan, la inmunológica al aumentar el número de leucocitos. La arginina está involucrada en la síntesis de creatina, poliaminas y en el ADN. Disminuye el colesterol y estimula la liberación de hormona de crecimiento (Alba-Roht y cols., 1988), es un quelante de amoniaco, por lo que funciona en la recuperación de los deportistas ya que éste se incrementa durante el ejercicio anaeróbico. Además se emplea en la síntesis de creatinina, reduce la grasa corporal y potencia los efectos vasodilatadores del óxido nítrico (Palmer y cols., 1988).

Nuestro perfil de este aminoácido muestra también un pico a las 20 horas, cuando inicia la fase de oscuridad y podría ser parte de la adaptación de los sujetos experimentales al periodo de actividad (ver figura 21).

Treonina. Como un aminoácido esencial, la treonina no es sintetizada en suficiente cantidad en humanos, por lo que debe ingerirse en las proteínas que consume. La treonina, junto la metionina y el ácido aspártico metabolizan las grasas que se depositan en órganos como el hígado (Nelson y Cox, 2009). Nuestros resultados muestran una elevación importante a partir de las 16 horas con un pico a las 20 horas (ver figura 21).

Citrulina. La citrulina proviene de la ornitina y se le ha propuesto como relajante de los capilares, lo que contribuye a mejorar el flujo sanguíneo y bajar la presión arterial, en este sentido podría ser un posible blanco terapéutico en procesos de daño cerebral. También se le asocia con activación del sistema inmune y forma parte de las histonas asociadas al DNA.

Durante la muerte celular y la inflamación, las proteínas como la fibrina y la vimentina son susceptibles de ser convertidas a citrulina, este proceso se conoce como citrulación o deiminación, por lo que la formación de citrulina pudiera representar un objetivo en estudios de procesos neuroprotectores.

En artritis reumatoide se han detectado anticuerpos contra proteínas que contienen citrulina, por lo que pudiera ser un marcador de esta enfermedad. Donde sí se considera marcador es en la función intestinal (Citruline Compound Sumary, National Center for Biotechnology Information).

El perfil de los niveles de citrulina que encontramos también es interesante de tomar en cuenta, nosotros encontramos o que está disminuido en las primeras

horas de la tarde y se eleva a partir de la 16 horas, esto pudiera contribuir también a la neuroprotección que observamos en nuestro sujetos con TCE (ver figura 22).

Asparagina. La asparagina posee la capacidad de formar enlaces de hidrógeno en su cadena lateral, por lo que es importante en la formación de las estructuras secundarias de las proteínas tipo alfa hélice y plegamientos beta, también provee sitios clave para la N-glicosilación, una modificación de la cadena de proteína con la adición de cadenas de carbohidratos (Nelson y Cox, 2009). Nuestros datos muestran un perfil con elevación en los niveles de asparagina durante las horas de oscuridad.

## **12. CONCLUSIONES**

Nuestros resultados mostraron que el sistema glutamatérgico en corteza cerebral de rata presenta una variación diurna. En concreto, encontramos que el receptor NMDA presenta una expresión significativamente mayor durante las horas de luz, mientras que los niveles de glutamato exhiben un máximo en el cambio de fase de luz a oscuridad y se mantienen bajos a partir de las 4:00 horas.

El que el sistema glutamatérgico presente esta variación diurna y conociendo su importante papel en el proceso de excitotoxicidad, posterior a un evento dañino; abre una gran oportunidad para el desarrollo de procesos terapéuticos que minimicen dicho daño o dicho de otra manera que incrementen la neuroprotección.

El gran peso económico y social asociado al TCE, pudiera ser disminuido si se desarrollan estrategias que favorezcan el proceso de neuroprotección, una opción es establecer ventanas terapéuticas que permitan usar blancos farmacológicos en tiempos precisos. Para ello es importante conocer cómo se comportan ciertos sistemas involucrados en el proceso de daño, el conocer si dichos sistemas tienen comportamientos rítmicos arroja una nueva luz sobre el desarrollo de estrategias y fármacos ya sea de nueva creación o bien los ya usados, pero que se apliquen bajo esquemas de uso más acotados temporalmente.

Por otra parte nuestros hallazgos encontrados con los análisis mediante mircodialisis abren diversas probabilidades de investigación no sólo en el campo de la neuroprotección, sino además en otras dimensiones de estudio del cerebro.

### 13. LITERATURA CITADA

1. Aguilar-Roblero R, Escobar C, Torner C, Granados D, Salazar A, Caldelas I. Mecanismos generales de regulación fisiológica: acoplamiento de sistemas de oscilación. Curso Internacional Pre-congreso Actualización en Fisiología. SMCF, UNAM PUIS Universidad Michoacana. Pp 241-254, 1982.
2. Alba-Roth J, Muller OA, Schopohl J, von Werder K. Arginine stimulates growth hormone secretion by suppressing endogenous somatostatin secretion. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 67(6):1186-1189, 1988.
3. Almeida A, Heales SJR, Bolaños JP, Medina JM. Glutamate neurotoxicity is associated with mitochondria nitric oxide-mediated mitochondrial dysfunction and glutathione depletion. *Brain Res.* 790:209-216, 1998.
4. Alves JL. Blood-Brain Barrier and Traumatic Brain Injury. *Journal of Neuroscience Research* 92:141-147, 2014.
5. Alves JL. Blood-Brain Barrier and Traumatic Brain Injury. *Journal of Neuroscience Research* 92:141-147, 2014.
6. Andelic NA, Anke T, Skandsen S, Sigurdardottir S, Sandhaug M, Ader T, Roe C. Incidence of Hospital-Admitted Severe Traumatic Brain Injury and In-Hospital Fatality in Norway: A National Cohort Study. *Neuroepidemiology* 38:259-267, 2012.
7. Aréchiga H. Los ritmos biológicos en la salud y la enfermedad. *Gac Med Mex.* 132:409-423, 1996.
8. Arent J. Treatment of circadian rhythm disorders- melatonin. *Chronobiol Int.* 14:185-204, 1997.
9. Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, Sharpe JC, Cecconi F, Youle RJ.
10. Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak-mediated permeabilization. *EMBO J.* 22:4385-4399, 2003.
11. Arun P, Ariyannur PS, Moffett JR, Xing G, Hamilton K, Grunberg NE, Ives JA, Namboodiri AM. Metabolic acetate therapy for the treatment of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 27: 293-298, 2010.
12. Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 34:325-337, 2003.
13. Babot Z, Cristofol R, Suñol C. Excitotoxic death induced by released glutamate in GABA A receptors depolarized primary cultures of mouse cerebellar granule cells is dependent on GABAA and niflumic acid-sensitive chloride channels. *Eur J Neurosci.* 21(1):103-112, 2005.
14. Bading H, Hardingham GE, Johnson CM, Chawla S. Gene Regulation by Nuclear and Cytoplasmic Calcium Signals. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236:541-543, 1997.
15. Bakay L, Glauser FE. *Traumatismos craneales*, Ed Doyma. España 1983.
16. Barkana Y, Belkin M. Neuroprotection in ophthalmology: a review. *Brain Res Bull.* 62(6):447-453, 2004.

17. Bayly PV, Black EE, Pedersen RC, Leister EP, Genin GM. In vivo imaging of rapid deformation and strain in an animal model of traumatic brain injury. *J Biomech.* 39(6):1086-1095, 2006.
18. Beal MF, Ferrante RJ, Swartz KJ, Kowall NW. Chronic quinolenic acid lesions in rats closely resemble Huntington's disease. *J Neurosci.* 13:4181-4192, 1991.
19. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat Middle Cerebral Artery Occlusion: Evaluation of the Model and Development of a Neurologic Examination. *Stroke* 17(3):472-476, 1986.
20. Ben-Ari Y. Developing networks play a similar melody. *Trends Neurosci.* 24:353-360, 2001.
21. Bendová Z, Sumová A, Mikkelsen JD. Circadian and developmental regulation of N-methyl-d-aspartate-receptor 1 mRNA splice variants and N-methyl-d-aspartate-receptor 3 subunit expression within the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* 159:599-609, 2009.
22. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(16):7162-7166, 1995.
23. Bormann J. Electrophysiology of GABAA and GABAB receptor subtypes. *Trends Neurosci.* 11:112-116, 1988.
24. Bragin DE, Sanderson JL, Peterson S, Connor JA, Müller WS. Development of epileptiform excitability in deep enthorinal cortex after status epilepticus. *Eur J Neurosci.* 30(4):611-24, 2009.
25. Bramlett HM, Dietrich WD. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma similarities and differences. *J Blow Flood Metab.* 24:133-150, 2004.
26. Budd SL, Nicholls DG. Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem.* 67:2282-2289, 1996.
27. Budd SL, Tenneti L, Lishnak T, Lipton SA. Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:6161-6166, 2000.
28. Bullock R, Golek J, Blake G. Traumatic intracerebral hematoma--which patients should undergo surgical evacuation? CT scan features and ICP monitoring as a basis for decision making. *Surg Neurol.* 32 (3):181-187, 1989.
29. Camello-Almaraz C, Gomez-Pinilla PJ, Pozo MJ, Camello PJ. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Am J Physiol Cell Physiol.* 291:C1082-C1088, 2006.
30. Carney N, Lujan S, Dikmen S, Temkin N, Petroni G, Pridgeon J, Barber J, Machamer J, Cherner M, Chaddock K, Hendrix T, Rondina C, Videtta W, Celix JM, Chesnut R. Intracranial pressure monitoring in severe traumatic brain injury in Latinamerica: Process and methods for a multi-center randomized controlled trial. *J Neurotrauma* 29:2022-2029, 2012.
31. Carter DA. Up-regulation of beta 1-adrenoceptor messenger ribonucleic acid in the rat pineal gland: nocturnally, through a beta-adrenoreceptor-linked mechanism, and in

- vitro, through a novel posttranscriptional mechanism activated by specific protein synthesis inhibitors. *Endocrinology* 133(5):2263-2268, 1993).
32. Castañeda TR, de Prado BM, Prieto D, Mora F. Circadian rhythms of dopamine, glutamate and GABA in the striatum and nucleus accumbens of the awake rat: modulation by light. *J. Pineal Res.* 36(3):177-185, 2004.
  33. Cazon A, Suescun A. A head-neck biomechanical model of 6 years old child for frontal crash studies. *Int J of Vehicle Safety* 4:257-270, 2009.
  34. Centers for Disease Control and Prevention. CDC Grand Rounds. Reducing Severe Traumatic Brain Injury in the United States. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 62(27):549-552, 2013.
  35. Cercato MC, Vázquez CA, Kornisiuk E, Aguirre AI, Colettis N, Snitkofsky M, Jerusalinsky DA, Baez MV. GluN1 and GluN2A NMDA Receptor Subunits Increase in the Hippocampus during Memory Consolidation in the Rat. *Front Behav Neurosci.* 10:242, 2017.
  36. Cernak I, Chapman SM, Hamlin GP, Vink R. Temporal characterisation of pro- and anti-apoptotic mechanisms following diffuse traumatic brain injury in rats. *J Clin Neurosci.* 9(5):565-572, 2002.
  37. Cernak, I. Animal Models of Head Trauma. *The American Society for Experimental Neurotherapeutics* 2:410-422, 2005.
  38. Citrulline - Compound Summary. PubChem Compound. USA: National Center for Biotechnology Information.
  39. Cole JT, Mitala CM, Kundu S, Verma A, Elkind JA, Nissim I, Cohen AS. Dietary branched chain amino acids ameliorate injury-induced cognitive impairment. *Proc Natl Acad Sci USA.* 107(1):366-371, 2010.
  40. Colegio ABC de traumatismo craneoencefálico Manual del curso de TCE. Colegio ABC de medicina de emergencia y reanimación, 2018.
  41. Collins NC, Molcho M, Carney P, McEvoy L, Geoghegan L, Phillips JP, Nicholson AJ. Are boys and girls that different? An analysis of traumatic brain injury in children. *Emerg Med J.* 30:675-678, 2013.
  42. Corthell JT, Fadool DA, Trombleya PQ, Connexin and AMPA Receptor Expression Changes Over Time in the Rat Olfactory Bulb. *Neuroscience* 222:38-48, 2012.
  43. Costa E. Allosteric modulatory centers of transmitter amino acid receptors. *Neuropsychopharmacology* 2(3):167-174, 1989.
  44. Cuninkova L, Brown SA. Peripheral circadian oscillators: interesting mechanisms and powerful tools. *Ann NY Acad Sci.* 1129:358-370, 2008.
  45. Charriaut-Marlangue C, Margail I, Represa A, Popovici T, Plotkine M, Ben-Ari Y. Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 16(2):186-94, 1996.
  46. Chazot PL, Stephenson FA. Molecular dissection of native mammalian forebrain NMDA receptors containing the NR1 C2 exon: Direct demonstration of NMDA receptors comprising NR1, NR2A, and NR2B subunits within the same complex. *J. Neurochem.* 69:2138-2144, 1997.

- 47.Cheng G, Kong RH, Zhang LM, Zhang JN. Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. *British Journal of Pharmacology* 167(4):699-719, 2012.
- 48.Cherubini E, Gaiarsa JL, BenAri Y. GABA: An excitatory transmitter in early postnatal life. *Trends Neurosci.* 14:515-519, 1991.
- 49.Chesnut RM, Temkin N, Carney N, Dikmen S, Rondina C, Videtta W, Petroni G, Lujan S, Pridgeon J, Barber J, Machamer J, Chaddock K, Celix JM, Cherner M, Hendrix T; Global Neurotrauma Research Group. A trial of intracranial-pressure monitoring in traumatic brain injury. *N Engl J Med.* 367(26):2471-2481, 2012.
- 50.Chodobski A, Zink BJ, Szmydynger-Chodobska J. Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. *Transl Stroke Res.* 2(4):492-516, 2011.
- 51.Choi CW, Rothman SM. The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci.* 13:171-182, 1990.
- 52.Choi, D.W. Koh, J.Y. Peters, S. Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture attenuation by NMDA antagonists. *J Neurosci.* Jan 8(1) 185-96. 1988
- 53.Chuang, D.M. Gao, X.M. Paul, S.M. N-methyl-D-aspartate exposure blocks glutamate toxicity in cultured cerebellar granule cells. *Mol.Pharmacol.* Aug 42(2): 210-6. 1992.
- 54.Dager SR, Richards T, Strauss W, Artru A. Single-voxel <sup>1</sup>H-MRS investigation on brain metabolic changes during lactate-induced panic. *Psychiatry Res.* 76(2-3):89-99, 1977.
- 55.Darna M, Beckmann JS, Gipson CD, Bardo MT, Dwoskin LP. Effect of environmental enrichment on dopamine and serotonin transporters and glutamate neurotransmission in medial prefrontal and orbitofrontal cortex. *Brain Res.* 1599:115-125, 2015.
- 56.Darna M, Schmutz I, Richter K, Yelamanchili SV, Pendyala G, Höltje M, Albrecht U, Ahnert-Hilger G. Time of day-dependent sorting of the vesicular glutamate transporter to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 284:4300-4307, 2009.
- 57.De Simone R, Ambrosini E, Carnevale D, Ajmone-Cat MA, Minghetti L. NGF promotes microglial migration through the activation of its high affinity receptor: Modulation by TGFβ. *J Neuroimmunol.* 190:53-60, 2007.
- 58.Desland FA, Afzal A, Warraich Z, Mocco J. Manual versus Automated Rodent Behavioral Assessment: Comparing Efficacy and Ease of Bederson and Garcia Neurological Deficit Scores to an Open Field Video-Tracking System. *Journal of Central Nervous System Disease* 6:7-14, 2014.
- 59.Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM. Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci.* 26(5):248-254, 2003.
- 60.Doble A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. *Pharmacol Ther.* 81:163-221, 1999.
- 61.Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. Differential activation of transcription factors induced by Ca<sup>2+</sup> response amplitude and duration. *Nature* 386:855-858, 1997.

62. Duckett CS, Li F, Wang Y, Tomaselli KJ, Thompson CB, Armstrong RC. Human IAP-like protein regulates programmed cell death downstream of Bcl-xL and cytochrome C. *Mol Cell Biol.* 18(1):608-615, 1998.
63. Duvilanski BH, Alvarez MP, Castrillón PO, Cano P, Esquifino AI. Daily changes of GABA and taurine concentrations in various hypothalamic areas are affected by chronic hyperprolactinemia. *Chronobiol Int.* 20(2):271-284, 2003.
64. Dvorak CA, Liu C, Kuei C. Physiological ligands for GPR139. International Patent WO2014/152917 A2, Janssen Pharmaceutica, 2014.
65. Dzhala VI, Talos DM, Sdrulla DA, Brumback AC, Mathews GC, BenkTA, Delpire E, Jensen FE, Staley KJ. NKCC1 transporter facilitates seizures in the developing brain. *Nat Med* 11(11):1205-13. 2005.
66. Ekonomou A, Angelatou F. Upregulation of NMDA receptors in hippocampus and cortex in the pentylene-tetrazol-induced "kindling" model of epilepsy. *Neurochem Res.* 24(12):1515-1522, 1999.
67. El Sayed, T. Mota, A. Fraternali, F. Ortiz. Biomechanics of traumatic brain injury. *Comput Methods Appl Mech Engrg.* 197: 4692-4701, 2008.
68. Epidemiología, Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, Sistema Unicode Información 25(6): Semana 26 Del 22 al 28 de junio de 2008.
69. Estrada-Rojo F, Martínez-Tapia RJ, Estrada-Bernal F, Martínez-Vargas M, Perez-Arredondo A, Flores-Avalos L, Navarro L. Models used in the study of traumatic brain injury. *Rev Neurosci.* 29(2):139-149, 2018.
70. EUROFIC [www.eurofic.org](http://www.eurofic.org) (s f.).
71. Eyigor O, Jennes L. Expression of glutamate receptor subunit mRNAs in gonadotropin-releasing hormone neurons during the sexual maturation of the female rat. *Neuroendocrinology* 66:122-129, 1997.
72. Faden AI, Demediuk P, Panter SS, Vink R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* 244: 798-800. 1989.
73. Fay T. The treatment of acute and chronic cases of cerebral trauma, by methods of dehydration. *Ann Surg.* 101(1):76-132. 1935.
74. Fernández-Gómez FJ, Hernández F, Argandoña-Palacios L, Galindo MF, Segura T, Jordán J. Farmacología de la neuroprotección en el ictus isquémico agudo. *Rev Neurol.* 47:253-260, 2008.
75. Fernstrom JD, Garatini S (eds). International Symposium on Glutamate. Proceedings of the symposium held Oct, 1998 in Bergamo, Italy, 2000.
76. Fernstrom JD. Aromatic amino acids and monoamine synthesis in the central nervous system: influence of the diet. *J Nutr Biochem.* 1: 508-517, 1990
77. Ferrarese C, Begni B, Canevari C, Zoia C, Piolti R, Frigo M, Appollonio I, Frattola L. Glutamate uptake is decreased in platelets from Alzheimer's disease patients. *Ann Neurol.* 47:641-643, 2000.
78. Ferreros I, Peiró S, Chirivella-Garrido J, Duque P, Gagliardo P, Pérez-Vicente R, Librero L. Incidencia de la hospitalización por traumatismo craneoencefálico en la infancia y adolescencia (Comunidad Valenciana, 2002-2009). *Rev Neurol.* 54 (12):719-728, 2012.
79. Fields DR. Fijación de la memoria. *Investigación y ciencia* (343):58-65, 2005.

80. Figueroa Guzmán, Y. Kuo, J.S. Reilly, S. NMDA receptor antagonist MK-801 infused into de insular cortex prevents the attenuation of gustatory neophobia in rats. *Brain Res* Oct. 9 1114(1) 183-6. 2006.
81. Flores-Soto ME, Chaparro-Huerta V, Escoto-Delgadillo M, Vazquez-Valls E, González-Castañeda RE, Beas-Zarate C. Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA. *Neurología* 27(5):301-310, 2012.
82. Friedman LK, Veliskova J, Kaur J, Magrys BW, Liu H. GluR2B knockdown accelerates CA3 injury after kainate seizures. *J Neuropathol Exp Neurol* 62(7):733-750, 2003.
83. Friedman M, Levin CE. Nutritional and medicinal aspects of d-amino acids. *Amino Acids*, 42, 1553-1582. 2012.
84. Gaetani P, Tancioni F, Tartara F, Carnevale L, Brambilla G, Mille T, Rodriguez y Baena R. Prognostic value of the amount of post-traumatic subarachnoid haemorrhage in a six month follow up period. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 59(6):635-637, 1995.
85. Gamal-Hamdan S. Trauma craneoencefálico severo. Parte 1. *Medicrit*. 2(7):107-148, 2005.
86. Garattini S. Evaluation of the neurotoxic effects of glutamic acid. En: *Nutrition and The Brain*. RJ Wurtman, JJ Wurtman eds. Raven Press, New York. 4:79-116, 1979.
87. Gárdián G., Vécsei L. Huntinto's disease phothomechanism and therapeutic perspectives. *J. Neural Transms (Vienna)* 2004 oct 111(10-11)1485-94 Review. 2004.
88. Gaspar T, Snipes JA, Busija AR, Kis B, Domoki F, Bari F, Busija DW. ROS-independent preconditioning in neurons via activation of mitoKATP channels by BMS-191095. *J Cereb Blood Flow Metab*. 28(6):1090-1103, 2008.
89. Ginsberg MD. Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future. *Neuropharmacology* 55:363-389, 2008.
90. Glass JD, Hauser UE, Blank JL, Selim M, Rea, MA. Differential timing of amino acid and 5-HIAA rhythms in suprachiasmatic hypothalamus. *Am J Physiology* 265: R504-511, 1993.
91. Greene JG, Greenamyre JT. Bioenergetics and glutamate excitotoxicity. *Prog Neurobiol*. 48:61-634, 1996.
92. Gu Y, Zhang J, Zhao Y, Su Y, Zhang Y. Potassium Aspartate Attenuates Brain Injury Induced by Controlled Cortical Impact in Rats Through Increasing Adenosine Triphosphate (ATP) Levels, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Activity and Reducing Brain Edema. *Med Sci Monit*. 22:4894-4901, 2016.
93. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiología médica* 10 ed. Capítulo 5: Potenciales de membrana y potenciales de acción: 61-77, ed McGraw-Hill. México, 2001.
94. Hardingham GE, Chawla S, Johnson CM, Bading H. Distinct functions of nuclear and cytoplasmic calcium in the control of gene expression. *Nature* 385(6613):260-265, 1997.
95. Hardingham GE. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc Trans*. 937(Pt 6):1147-60, 2000.
96. Heiss WD. The ischemic penumbra: correlates in imaging and implications for treatment of ischemic stroke. The Johann Jacob Wepfer award 2011. *Cerebrovasc Dis*. 32(4):307-20, 2011.

- 97.Henderson L, Miller JH, Skellern GG. Control of impurities in diphenhydramine hydrochloride by an ion-pairing, reverse liquid chromatography method. *J Pharm Pharmacol.* 53(3):323-331, 2001.
- 98.Hernández-Díaz Z, Reyes-Berazaín A, Buergo Zuaznabar MA, Arteché-Prior M. Neuroimagenología: bases bioquímicas y su aplicación en la enfermedad cerebrovascular isquémica. *Revista Electrónica de las Ciencias Médicas en Cienfuegos. MediSur* 7(3):50-60, 2009.
- 99.Herrera CP, Smith K, Atkinson F, Ruell P, Chow CM, O'Connor H, Brand-Miller J. High-glycaemic index and -glycaemic load meals increase the availability of tryptophan in healthy volunteers. *Br J Nutr.* 105:1601-1606, 2011.
- 100.Hirabayashi Y, Furuya S. Roles of l-serine and sphingolipid synthesis in brain development and neuronal survival. *Prog Lipid Res.* 47(3):188-203, 2008.
- 101.Hirano A, Zimmerman HM. Alzheimer's neurofibrillary changes: a topographic study. *Arch Neurol* 7:227-242, 1962.
- 102.Hooper C, Pinteaux-Jones F, Fry VA, Sevastou IG, Baker D, Heales SJ, Pocock JM. Differential effects of albumin on microglia and macrophages; implications for neurodegeneration following blood-brain barrier damage. *J Neurochem.* 109:694-705, 2009.
- 103.Hooper C, Taylor DL, Pocock JM. Pure albumin is a potent trigger of calcium signalling and proliferation in microglia but not macrophages or astrocytes. *J Neurochem.* 92:1363-1376, 2005.
- 104.Hoyte, L. Barber, P.A. Buchan A.M. Hill, M.D. The rise and fall of NMDA antagonists for ischemic stroke. *Curr Mol Med.* Mar 4(2):131-6 Review. 2004.
- 105.Huhman KL, Hennessey AC, Albers HE. Rhythms of glutamic acid decarboxylase mRNA the suprachiasmatic nucleus. *J Biol Rhythms.* 11:311-316, 1996.
- 106.Hunter AJ, Hatcher J, Virley D, Nelson P, Irving E, Hadingham SJ, Parsons AA. Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology* 39(5):806-81, 2000.
- 107.Hynd MR, Scott HL, Dodd PR. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 45:583-595, 2004.
- 108.Ikonomidou C, Turski L. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol.* 1(6): 383-366, 2002.
- 109.Jain KK. *Handbook of Neuroprotection: Humana Press.* Basel, Switzerland, 2011.
- 110.Jenkins TA, Nguyen JC, Polglaze KE, Bertrand PP. Influence of Tryptophan and Serotonin on Mood and Cognition with a Possible Role of the Gut-Brain Axis. *Nutrients* 8(1):E56, 2016.
- 111.Jeter CB, Hergenroeder GW, Ward NH III, Moore AN, Dash,PK. Human mild traumatic brain injury decreases circulating branched-chain amino acids and their metabolite levels. *J Neurotrauma* 30(8):671-679, 2013..
- 112.Kahle KT, Staley KJ, Nahed BV, Gamba G, Hebert SC, Lifton RP, Mount, DB. Roles of the Cation chloride cotransporters in neurological disease. *Nat Clin Pract Neurol.* 4(9):490-503.2008..
- 113.Karakawa S, Miyoshi Y, Konno R, Koyanagi S, Mita M, Ohdo S, Hamase K. Two-dimensional high-performance liquid chromatographic determination of day-night

- variation of D-alanine in mammals and factors controlling the circadian changes, *Anal Bioanal Chem.* 405:8083-8091, 2013.
114. Kilbourne M, Kuehn R, Tosun C, Caridi J, Keledjian K, Bochicchio G, Scalea T, Gerzanich V, Simard JM. Novel model of frontal impact closed head injury in the rat. *J Neurotrauma* 26:2233-2243, 2009.
115. Kleiven S, Hardy W. Correlation of an FE model of human head with local brain motion-consequences for injury predictions. In: SAE paper. Proceedings 46th Stapp Crash Conference:123-144, 2002.
116. Lagerstrom MC, Schioth HB. Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 7:339-357, 2008.
117. Laird MD, Vender JR, Dhandapani KM. Opposing roles for reactive astrocytes following traumatic brain injury. *Neurosignals* 16:154-164, 2008.
118. Laurer, H.L. McIntosh T.K. Experimental models of brain trauma. *Curr Opin Neurol.* Dec. 12(6):715-21. 1999.
119. Lees KR. Cerestat and other NMDA antagonists in ischemic stroke. *Neurology* 49:S66-69, 1997.
120. Leinhardt, I. Schmidt, O.I. Thurman, T.M. Hossini A.M. Rozanski, M. Taha, M.E. Scheffer A. John, T. Smith, W.R. Holers, V.M. Stahel, P.F. Pharmacological complement inhibition at the C3 convertase level promotes neuronal survival neuroprotective intracerebral gene expression and neurological outcome after traumatic brain. *Exp. Neurol.* Jun 199(2): 454-64 2006.
121. Leker RR, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma-different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Brain Res Rev.* 39 (1):55-73, 2002.
122. Levin AL, Peeples P. History of Neuroprotection and Rationale as a Therapy for Glaucoma. *Am J Manag Care.* 14:S11-S14, 2008.
123. Levine B, Fujiwara E, O'Connor C, Richard N, Kovacevic N, Mandic M, Restagno A, Easdon C, Robertson IH, Graham SJ, Cheung G, Gao F, Schwartz ML, Black SE. In vivo characterization of traumatic brain injury neuropathology with structural and functional neuroimaging. *J Neurotrauma* 23:1396-1411, 2006.
124. Leyton, M Yong, S.N. Pihl, R.D. Etezadi, S. Lauze, C. Blier, P. Baker, G.B. Benkefat, C. Effects of mood of acute phenylalanine/Tyrosine depletion in healthy women. *Neuropsychopharmacology*, Jan 22 (1):52-63. 2000.
125. Li X, von Holts H, Kleiven S. Influence of gravity for optimal head positions in the treatment of head injury patients. *Acta Neurochir (Wien)* 153(10): 2057-2064, 2011.
126. Li, P. Nihawan, D. Buddharjo, I. Srinvasula, S.M. Ahmad, M. Alnemri, E.S. Wang, X. Cytochrome C and dATP-dependent formation of APAF-1 caspase-9 complex incites an apoptotic protease cascade. *Nov.* 14;91(4) 479-9. 1997
127. Lim MM, Elkind J, Xiong G, Galante R, Zhu J, Zhang L, Lian J, Rodin J, Kuzma NN, Pack AI, Cohen AS. Dietary therapy mitigates persistent wake deficits caused by mild traumatic brain injury. *Sci Transl Med.* 5(215):215ra173, 2013
128. Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids a final common pathway for neurologic disorders. *New Eng J Med.* 330:613-622, 1994.

- 129.Liu C, Bonaventure P, Lee G, Nepomuceno D, Kuei C, Wu J, Li Q, Joseph V, Sutton SW, Eckert W, Yao X, Yieh L, Dvorak C, Carruthers N, Coate H, Yun S, Dugovic C, Harrington A, Lovenberg TW. GPR139, an orphan receptor highly enriched in the habenula and septum, is activated by the essential amino acids L-tryptophan and L-phenylalanine. *Mol. Pharmacol.* 88(5):911–925, 2015.
- 130.Lowry, O.H. Rosenbrough, N.J. Farr, A.L.Randal, L.J.protein measurement with the Folin phenol reagent.*J Biol Chem.* Nov 193(1): 265-75. 1951
- 131.Lu,W. Du, J. Goehring, A. Gouaux, E. Cryo-EM structures of the triheteromeric NMDA receptor and its allosteric modulation. *Sciences.* March 24, 355(6331).2017.
- 132.Lucas DR, Newhouse JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *Arch Ophthalmol.* 58:193-204, 1957.
- 133.Lynch DR, Dawson TM. Secondary mechanisms in neuronal trauma. *Curr Opin Neurol.* 7(6): 507-509, 1994.
- 134.Maas AI, Steyerberg EW, Murray GD, Bullock R, Baethmann A, Marshall LF, Teasdale GM. Why have recent trials of neuroprotective agents in head injury failed to show convincing efficacy? A pragmatic analysis and theoretical considerations. *Neurosurgery* 44:1286-1298, 1999.
- 135.Mally J, Baranyi M, Vizi ES. Change in the concentrations of amino acids in CSF and serum of patients with essential tremor. *J Neural Transm.* 103:555-560, 1996.
- 136.Marler J. Circadian variation in stroke onset. In: PC Deedwania (ed). *Circadian Rhythms of Cardiovascular Disorders.* Futura publishing Co Inc. Armonk NY. Pp 163-172, 1993.
- 137.Marmarou A, Montasser A, Abd-Elfattah F, Van den Brink W, Campbell JH, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg.* 80:291-300, 1994.
- 138.Martinez–Tapia R, Estrada-Rojo F, Hernández-Chávez AA, Barajas-Martínez A, Flores-Avalos LA, Chavarría A, Navarro L. Una nueva vía de drenaje cerebral: el sistema glifático. Revisión histórica y conceptual. *Rev Mex Neurosci.* 19(1):104-116, 2018.
- 139.Martinez–Tapia R, Estrada-Rojo F, Hernández-Chávez AA, Barajas-Martínez A, Escoto-Islas S, Navarro L, Chavarría A. Neuroinflamación: el Ying y Yang de la neuroinmunología. *Revista de la Facultad de Medicina (aceptado)*, 2018.
- 140.Martinez-Vargas M, Estrada Rojo F, Tabla-Ramon E, Navarro-Argüelles H, Ortiz-Lailzon N, Hernández-Chávez A, Solís B, Martínez Tapia R, Perez Arredondo A, Morales-Gomez J, Gonzalez-Rivera R, Nava-Talavera K, Navarro L. Sleep deprivation has a neuroprotective role in the rat traumatic brain injury. *Neurosci Lett.* 529(2):118-122, 2012.
- 141.Martinez-Vargas M, González-Rivera R, Soto-Núñez M, Cisneros-Martinez M, Huerta-Saquero A, Morales-Gomez J, Molina-Guarneros J, Navarro L. Recovery after a traumatic brain injury depends on diurnal variations. Effect of cystatin C. *Neuroscience Letters.* 400:21-24, 2006.
- 142.Martinez-Vargas M, Morales-Gomez J, Gonzalez-Rivera R, Hernandez-Enriquez C, Perez-Arredondo A, Estrada-Rojo F, Navarro L. Does the Neuroprotective Role of Anandamide Display Diurnal Variations? *Int. J. Mol. Sci.* 14: 23341-23355, 2013.

- 143.Mayer EA, Knight R, Mazmanian SK, Cryan JF, Tillisch K. Gut microbes and the brain: Paradigm shift in neuroscience. *J. Neurosci.* 34, 15490–15496.2014.
- 144.Maywood ES, O'Neill JS, Reddy AB, Chesham JE, Prosser HM, Kyriacou CP, Godinho SI, Nolan PM, Hastings MH. Genetic and molecular analysis of the central and peripheral circadian clockwork of mice. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 72:85-94, 2007.
- 145.McAllister, WT. Neurobiological consequences of traumatic brain injury. *Dialogues Clin Neurosci.*13(3):287-300, 2011.
- 146.McGregor R, Shan L, Wu MF, Siegel JM. Diurnal fluctuation in the number of hypocretin/orexin and histamine producing: Implication for understanding and treating neuronal loss. *PLoS ONE* 12(6):e0178573, 2017.
- 147.McIntoshTK, Smith DH. Cellular responses to experimental brain injury. *Brain Pathol.* 5(4):437-442, 1995.
- 148.Medina Marín AM, Escobar Betancourth MI. Sistema glutamatérgico, primera parte: Sinaptología, homeostasis y muerte celular. *Revista Colombiana de Psiquiatría,* XXXI (3):187-212, 2002.
- 149.Meert, T.F. Long, M. Kaplan, J. Sarnaik, A.P. Alterations in immune function following head injury in children. *Crit.Care Med.* May 23(5)822-8. 1995
- 150.Meldrum B. Excitotoxicity and selective neuronal loss in epilepsy. *Brain Pat 2. Brain Res Rev.* 18:293-31, 1993.
- 151.Menon DK, Schwab K, Wright DW, Maas AI; Demographics and Clinical Assessment Working Group of the International and Interagency Initiative toward Common Data Elements for Research on Traumatic Brain Injury and Psychological Health. Position statement: definition of traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 91(11):1637-40, 2010.
- 152.Metcalf JS, Dunlop RA, Powell JT, Banack SA, Cox PA. L-Serine: A Naturally-Occurring Amino Acid with Therapeutic Potential. *Neurotox Res* 33:213-221, 2018.
- 153.Meyer F, Roth S, Willinger R. Three years old child head-neck finite element modeling: simulation of the interaction with air bag in frontal and side impact. *Int J of Vehicle Safety* 4 (4): 285-99, 2010.
- 154.Michel S, Itri J, Colwell CS. Excitatory mechanism in the suprachiasmatic nucleus: the role AMPA/KA glutamate receptors. *J Neurophysiol.* 88:817-828, 2002.
- 155.Michel S, Marek R, Vanderleest HT, Vansteensel MJ, Schwartz WJ, Colwell CS, Meijer JH. Mechanism of bilateral communication in the suprachiasmatic nucleus. *Eur J Neurosci* 37(6):964-971, 2013
- 156.Miller JD, Butterworth JF, Gudeman SK, Faulkner JE, Choi SC, Selhorst JB, Harbison JW, Lutz HA, Young HF, Becker DP. Further experience in the management of severe head injury. *J Neurosurg.* 54(3):289-299, 1981
- 157.Miller R. Presynaptic receptors. *Ann Rev of Pharmacand Tox.* 38: 201-27.111. 1998
- 158.Mishra OP, Fritz KI, Delivoria Papadopoulos M. NMDA receptor and neonatal hypoxic brain injury. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 7(4):249-253, 2001.

159. Monaghan, D.T. Bridges, R.J. Cotman, C.W. The excitatory amino acids receptors their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 29:365-402. 1989.
160. Montal M. Mitochondria, glutamate neurotoxicity and death cascade. *Biochim Biophys Acta* 1366:113-126, 1998.
161. Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH. Heteromeric NMDA receptors: Molecular and functional distinction of subtypes. *Science* 256(5060):1217-1221, 1992.
162. Moolen V.K, Damiani-Neves M, Bavaresco D.V., Pescador B.B., Comim C.M., Quevedo J, Boeck CR. NMDA preconditioning prevents object recognition memory impairment and increased brain variability in mice exposed to traumatic brain injury. *Brain Res.* Jul 23; 1466:82-90.2012.
163. Morales-Gómez J, Estrada-Rojo F, Martínez-Vargas M, Pérez A, González R, Tabla E, Solis B, Navarro H, Navarro L. Efecto del fotoperiodo en la recuperación ante un traumatismo craneoencefálico en ratas. Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Septiembre 2010.
164. Morikawa A, Hamase K, Miyoshi Y, Koyanagi S, Ohdo S, Zaitzu, K. Circadian changes of D-alanine and related compounds in rats and the effect of restricted feeding on their amounts. *J. Chromatogr B* 875:168-173, 2008.
165. Morikawa A, Hamase K, Zaitzu K. Determination of D-alanine in the rat central nervous system and periphery using column-switching high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 312(1):66-72, 2003.
166. Morris GF, Juul N, Marshall SB, Benedict B, Marshall LF. Neurological deterioration as a potential alternative endpoint in human clinical trials of experimental pharmacological agents for treatment of severe traumatic brain injuries. Executive Committee of the International Selfotel Trial. *Neurosurgery* 43:1369-1372, 1998
167. Muir KW, Grosset DG. Neuroprotection for acute stroke making clinical trials work. *Stroke* 30:180-182, 1999.
168. Narayan RK, Michel ME, Ansell B, Baethmann A, Biegon A, Bracken MB, Bullock MR, Choi SC, Clifton GL, Contant CF, Coplin WM, Dietrich WD, Ghajar J, Grady SM, Grossman RG, Hall ED, Heetderks W, Hovda DA, Jallo J, Katz RL, Knoller N, Kochanek PM, Maas AI, Majde J, Marion DW, Marmarou A, Marshall LF, McIntosh TK, Miller E, Mohberg N, Muizelaar JP, Pitts LH, Quinn P, Riesenfeld G, Robertson CS, Strauss KI, Teasdale G, Temkin N, Tuma R, Wade C, Walker MD, Weinrich M, Whyte J, Wilberger J, Young AB, Yurkewicz L. Clinical trials in head injury. *J Neurotrauma.* 19(5): 503-557, 2002.
169. Nathoo N, Narotam PK, Agrawal DK, Connolly CA, van Dellen JR, Barnett GH, Chetty R. Influence of apoptosis on neurological outcome following traumatic cerebral contusion. *J Neurosurg.* 101(2):233-240, 2004.
170. Navarro L, Morales-Gómez J, Martínez-Vargas M, Tabla-Ramón E, Solis B, Pérez-Arredondo A, Navarro Arguelles HA, González-Rivera R, Estrada-Rojo F. Neuroprotección, Neuroinflamación y Citocinas. En: "Aspectos no convencionales de las citocinas", Velazquez Moctezuma, Morales Montor y Camacho Arroyo Compiladores. Universidad Autónoma Metropolitana, cap. 12. P. 203-15. 2013.

171. Nelson DL y Cox MM, Lehninger. Principios de Bioquímica. 5ta Edición Omega, 2009.
172. Nelson, DL. and Cox, M.M. Lehninger, Principles of Biochemistry, Seventh edition, Omega. 2014.
173. Nestler E, Hyman S, Malenka R. Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience, McGrawHill. Third Edition, 2014.
174. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-8, 2005.
175. Nøhr, AC, Jespers, W. Shehata, MA. Floryan, L. Isberg, V Bayer Andersen, K. Åqvist, J. Gutiérrez-de-Terán, H. Bräuner-Osborne, H & Gloriam DE. The GPR139 reference agonists 1a and 7c, and tryptophan and phenylalanine share a common binding site. *Sci Rep.* 7(1):1128, 2017.
176. Nuñez JL, Alt JJ, McCarthy MM. A new model for prenatal brain damage. GABAA receptor activation induces cell death in developing rat hippocampus. *Exp Neurol.* 181(2):258-69, 2003.
177. Ogawa N, Haba K, Mizukawa K, y cols. Loss of N-methyl- D-aspartate (NMDA) receptor binding in rat hippocampal areas at the chronic stage after transient forebrain ischemia: Histological and NMDA receptor binding studies. *Neurochem Res.* 16(5): 519-524, 1991.
178. Oggioni G. Experimental research on the neuroprotective action of vitamin E. *Boll Soc Ital Biol Sper.* 29(7):1422-1424, 1953.
179. Olney JW. Glutamate induces neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus. *J Neurophat Exp Neurol.* 30:75-90, 1971.
180. Oppenheimer DR. Microscopic lesions in the brain following head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 31:299-306, 1968.
181. Oster, Y. Schramm, M. Down-regulation of NMDA receptor activity by NMDA. *Neurosci Lett.* Nov 26;163(1):85-8. 1993.
182. Ottersen OP, Storm-Mathisen J. Biochemistry and anatomy of transmitter glutamate. In: *Glutamate Handbook of Chemical Neuroanatomy* 18:1-445, 2000.
183. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333(6174): 664-666, 1988.
184. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. NMDA receptor subunit diversity: Impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci.* 14:383-400, 2013.
185. Paolin A, Nardin L, Gaetani P, Rodriguez Y Baena R, Pansarasa O, Marzatico F. Oxidative damage after severe head injury and its relationship to neurological outcome. *Neurosurgery* 51(4):949-955, 2002.
186. Paterniti S, Fiore P, Macri E, Marra G, Cambria M, Falcone F, Cambria S. Extradural haematoma. Report of 37 consecutive cases with survival. *Acta Neurochir* 1994; 131:207-10. 1994.
187. Paxinos, G. and Watson, Ch. *The rat Brain in stereotaxic coordinates*, 7th Edition. Elsevier. 2013.
188. Perin M, Longordo F, Massonet C, Welker E, Lüthi A. Diurnal variation of NMDA EPSCs at rat hippocampal mossy fibre synapses through orexin-2 receptor. *J Physiol.* 59(Pt 19):4277-4295, 2014.

- 189.Pitts FN, McClure JN. Lactate metabolism in anxiety neurosis. *New Engl J Med.* 277(25):1329-1336, 1967.
- 190.Platten M, Kretz A, Naumann U, Aulwurm S, Egashira K, Isenmann S, Weller M. Monocyte chemoattractant protein-1 increases microglial infiltration and aggressiveness of gliomas. *Ann Neurol.* 54(3): 388-389, 2003.
- 191.Ponce E, Pérez J, Ponce D, Andresen M. Traumas cerebrales en niños secundarios a cabeceo de balones en fútbol. Modelo de simulación matemática. *Rev Med Chile* 139:1089-1096, 2011.
- 192.Portera-Cailliau, C. Price, DL, Martin LJ. Non-NMDA and NMDA Receptor-Mediated Excitotoxic Neuronal Deaths in Adult Brain Are Morphologically Distinct: Further Evidence for an Apoptosis-Necrosis Continuum. *J Comp Neurol.* 378:88-104, 1997b.
- 193.Prieto R, Gutiérrez-González R, Pascual JM, Roda JM, Cerdán S, Matias-Guiu J, Barcia JA. Modelos Experimentales de Traumatismo Craneoencefálico. *Neurocirugía* 20(3):225-244, 2009.
- 194.Pringle AK. In, out, shake it all about: elevation of [Ca<sup>2+</sup>] during acute cerebral ischaemia. *Cell Calcium* 36:235-245, 2004.
- 195.Project. NINDS Common Data Elements. National Institute of Neurological Disorders and Stroke (NINDS) CDE. Disponible en: <http://www.commondataelements.ninds.nih.gov/TBI.aspx>. 2010
- 196.Purves, D. Augustine, Fitzpatrick, Hall, LaMantia, McNamara, Williams. *Neurociencia. 3ra Edición* Editorial Panamericana. 2015.
- 197.Quattrocchi KB, Miller CH, Wagner FC Jr, DeNardo SJ, DeNardo GL, Ovodov K, Frank EH. Cell mediated immunity in severely head-injured patients: the role of suppressor lymphocytes and serum factors. *J Neurosurg.* 77(5):694-699, 1992.
- 198.Quintanal-Cordero N, Morán AF, Tápanes-Domínguez A, Rodríguez de la Paz N, Cañizares Marrero C, Prince-López J. Traumatismo craneoencefálico: Estudio de cinco años. *Rev Cub Med Milit.* 35 (2), 2006.
- 199.Raghavan SC, Swanson PC, Wu X, Hsieh CL, Lieber MR. A non-B-DNA structure at the Bcl-2 major breakpoint region is cleaved by the RAG complex. *Nature.* 428(6978):88-93, 2004.
- 200.Raghupathi R, Conti AC, Graham DI, Krajewski S, Reed JC, Grady MS, Trojanowski JQ, McIntosh TK. Mild traumatic brain injury induces apoptotic cell death in the cortex that is preceded by decreases in cellular Bcl-2 immunoreactivity. *Neuroscience* 110(4): 605-616, 2002.
- 201.Raghupathi R, McIntosh TK. Regionally and temporally distinct patterns of induction of c-fos, c-jun and junB mRNAs following experimental brain injury in the rat. *Mol Brain Res.* 37(1-2):134-144, 1996.
- 202.Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology unique stimuli specialized responses. *Annu Rev Immunol.* 27;119-45.2009
- 203.Rea MA, Ferriera S, Randolph W, Glass JD. Daily profile of the extracellular concentration of glutamate in the suprachiasmatic region of the Siberian hamster. *Proc Soc Exp Biol Med.* 204:104-109, 1993

204. Resink A, Villa M, Benke D, Hidaka H, Molher H, Balazs H. Characterization of agonist-induced down-regulation of NMDA receptors in cerebellar granule cell cultures. *J Neurochem* Jan 66(1):369-77. 1996.
205. Richard DM, Dawes MA, Mathias CW, Acheson A, Hill-Kapturczak N, Dougherty DM. L-tryptophan: Basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications. *Int J Tryptophan Res.* 2:45-60, 2009.
206. Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, Lee VM, Neugebauer E, McIntosh TK. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am. J. Pathol.* 147(6):1575-1583, 1995.
207. Rivas JJ, Lobato RD, Sarabia R, Cordobés F, Cabrera A, Gomez P. Extradural hematoma: analysis of factors influencing the courses of 161 patients. *Neurosurgery* 23(1): 44-51, 1988.
208. Romano C, Rice, MT, Iney JW. Delayed excitotoxic neurodegeneration induced by excitatory amino acid agonists in isolated retina. *J Neurochem.* 65:59-67, 1995.
209. Romero JA, Zatz M, Kebejian JW, Axelrod J. Circadian cycles in binding of [3H]-alprenolol to Beta-adrenergic receptor sites in rat pineal. *Nature* 258:435-436, 1975.
210. Rovegno M, Soto PA, Sáez JC, von Bernhardt R. Mecanismos biológicos involucrados en la propagación del daño en el traumatismo encéfalo craneano. *Med Intensiva* 36(1):37-44, 2012.
211. Ruff RM, Iverson GL, Barth JT, Bush SS, Broshek DK, NAN Policy and Planning Committee. Recommendations for diagnosing a mild traumatic brain injury: a National Academy of Neuropsychology Education paper. *Arch Clin Neuropsychol.* 24(1):3-10, 2009.
212. Sacchetti ML, Toni D, Fiorelli M, Argentino C, Fieschi C. The concept of combination therapy in acute ischemic stroke. *Neurology* 49(5 Suppl 4):S70-74, 1997.
213. Savitz SI, Rosenbaum DM. Apoptosis in neurological disease. *Neurosurgery* 42:555-574, 1998.
214. Schwarzmaier SM, Kim SW, Trabold R, Plesnila N. Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* 27(1):121-130, 2010.
215. Shibata M, Hattori H, Sasaki T, Gotoh J, Hamada J, Fukuuchi Y. Subcellular localization of a promoter and an inhibitor of apoptosis (Smac/DIABLO and XIAP) during brain ischemia/reperfusion. *Neuroreport* 13(15):1985-1988, 2002.
216. Shivaji T, Lee A, Dougall N, McMillan T, Stark C. The epidemiology of hospital treated traumatic brain injury in Scotland. *BMC Neurology*, 14:2, 2014.
217. Shohami E, Biegon A. Controversial findings on the role of NMDA receptors in traumatic brain injury. In: Morganti-Kossmann C, Raghupathi R, & Maas, A. (Eds.) *Traumatic Brain and Spinal Cord Injury: Challenges and Developments.* Cambridge: Cambridge University Press. 169-179, 2012.
218. Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I. Pathophysiology. *J Neurosurg.* 77:169-184, 1992a.
219. Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II. Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg.* 77:337-541, 1992b.

220. Silva Ddos S, Brito JN, Ibiapina JO, Lima MF, Medeiros AR, Queiroz BH, Paiva AL, Guedes VO. Closed head injury in rats. Histopathological aspects in an experimental weight drop model. *Acta Cirúrgica Brasileira* 27(4):290-294, 2012.
221. Silver IA, Erecinska M. Intracellular and extracellular changes of  $[Ca^{2+}]$  in hypoxia and ischemia in rat brain in vivo. *J Gen Physiol.* 95(5):837-866, 1990.
222. Sistema Nacional de Información en Salud. (SINAIS)  
www.dgis.salud.gob.mx/contenidos/sinais/estadistics.html (sf)
223. Smith DH, Wolf JA, Lusardi TA, Lee VM, Meaney DF. High tolerance and delayed elastic response of cultured axons to dynamic stretch injury. *J Neurosci.* 19:4263-4269, 1999.
224. Soriano FX, Papaia S, Hofman F, Hardingham NR, Bading H, Hardingham, GE. Preconditioning doses of NMDA promote neuroprotection by enhancing neuronal excitability. *J Neurosci.* Apr 26:26(17)4509-18. 2006.
225. Staley KJ, Soldo BL, Proctor WR. Ionic mechanisms of neuronal excitation by inhibitory GABA<sub>A</sub> receptors. *Science* 269:977-981, 1995.
226. Stein SC, Chen XH, Sinson GP, Smith DH. Intravascular coagulation: a major secondary insult in nonfatal traumatic brain injury. *J Neurosurg* 97:1373-1377, 2002.
227. Strich SJ, Oxon DM. Shearing of nerve fibers as a cause of brain damage due to head injury. *Lancet* 278(7200):443-448, 1961
228. Sullivan, P.G. Thompson, M.B. Scheff S.W. Cyclosporin A attenuates acute mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury, *Exp Neurol* Nov. 16(1)226-34. 1999.
229. Summa CK, Turek FW. Nuestros relojes internos. *Investigación y Ciencia* 468:71-75, 2015.
230. Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir (Wien)*, 148:255-268, 2006.
231. Taneda M, Kataoka K, Akai F, Asai T, Sakata I. Traumatic subarachnoid hemorrhage as a predictable indicator of delayed ischemic symptoms. *J Neurosurg.* 84:762-768, 1996.
232. Tapia, R. El ácido  $\gamma$  aminobutírico. En: *Aminoácidos y péptidos en la integración de funciones nerviosas*. Pasantes Morales H, Aréchiga H, eds., UNAM, México, 57-70, 1983.
233. Tauskela JS, Morley P. On the role of  $Ca^{2+}$  in cerebral ischemic preconditioning. *Cell Calcium* 36(3-4):313-322, 2004.
234. Tewari A, Mahendru V, Sinha A, Bilotta F. Antioxidants: The new frontier for translational research in cerebroprotection. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology* 30 (2):160-17, 2014.
235. Tischkau SA, Cohen JA, Stark JT, Gross DR, Bottum KM. Time of the day affects expression of hippocampal markers for ischemic damage induced by global ischemia. *Experimental Neurology* 208: 314-322, 2007
236. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: Structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62:405-496, 2010.

237. Ureña-Guerrero ME, Orozco-Suárez S, López-Pérez SJ, Flores-Soto ME, Beas-Zárate C. Excitotoxic neonatal damage induced by monosodium glutamate reduces several GABAergic markers in the cerebral cortex and hippocampus in adulthood. *Int J Dev Neurosci.* 27(8):845-855, 2009.
238. Verdugo-Díaz L, Estrada-Rojo F, García-Espinoza A, Hernández-López E, Hernández-Chavez AA, Gúzman-Urbe C, Martínez-Vargas M, Pérez-Arredondo A, Calvario T, Elías-Viñas D, Navarro L. Effect of intermediated-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation on recovery following traumatic brain injury in rats. *BioMed Research International* 2017:4540291, 2017.
239. Vilches N, Spichiger C, Mendez N, Abarzua-Catalan L, Galdames HA, Hazlerigg DG, Richter HG, Torres-Farfan C. Gestational Chronodisruption Impairs Hippocampal Expression of NMDA Receptor Subunits Grin1b/Grin3a and Spatial Memory in the Adult Offspring. *PLoS ONE* 9(3):e91313, 2014.
240. Vinall PE, Kramer MS, Heinel LA, Rosenwasser RH. Temporal changes in sensitivity of rats to cerebral ischemic insult. *J Neurosurg.* 93:82-89, 2000.
241. Wagner AK, Fabio A, Puccio AM, Hirschberg R, Li W, Zafonte RD, Marion DW. Gender associations with cerebrospinal fluid glutamate and lactate/pyruvate levels after severe traumatic brain injury. *Crit Care Med.* 33:407-413, 2005.
242. Wang LM, Schroeder A, Loh D, Smith D, Lin K, Han JH, Michel S, Hummer DL, Ehlen JC, Albers HE, Colwell CS. Role for the NR2B Subunit of the NMDA Receptor in Mediating Light Input to the Circadian System. *Eur J Neurosci.* 27(7): 1771-1779, 2008.
243. Wei Z, Costa K, Al-Mehdi AB, Dodia C, Muzykantov V, Fisher AB. Simulated ischemia in flow-adapted endothelial cells leads to generation of reactive oxygen species in cell signaling. *Circ Res.* 85(8): 682-689, 1999.
244. Wieloch T, Nikolich K. Mechanisms of neural plasticity following brain injury. *Curr Opin Neurobiol.* 16:258-264, 2006.
245. Willis, C. Lybrand, S. Bellamy, N. Excitatory amino acids inhibitors for traumatic brain injury. *Cochrane Database Syst Rev* (1)CD003986. 2004.
246. Wirz-Justice A. Circadian rhythms in mammalian neurotransmitter receptors. *Progress in Neurobiology.* 29: 219- 259, 1971
247. Wolach B, Sazbon L, Gavrieli R, Broda A, Schlesinger M. Early immunological defects in comatose patients after acute brain injury. *J Neurosurg.* 94(5):706-711, 2001.
248. Wolf JA, Stys PK, Lusardi T, Meaney D, Smith DH. Traumatic axonal injury induces calcium influx modulated tetrodotoxin-sensitive sodium channels. *J Neurosci.* 21(6):1923-1930, 2001.
249. Wray JW, Abeles RH. The Methionine Salvage Pathway in *Klebsiella pneumoniae* and Rat Liver. Identification and characterization of two novel dioxygenases. *The Journal of Biological Chemistry* 270:3147-3153, 1995
250. Wright, K. Los tiempos de nuestra vida. *Sci Ame Mex.* 1(5), 2002.
251. Wu JY. Immunocytochemical identification of GABAergic neurons and pathways. En: *Glutamine, glutamate and GABA in the Central Nervous System.* Hertz, L. Kvamme, E, McGeer. EG. Schousboe, A. eds. Liss. Ney York 161-173, 1983.
252. [www.eufic.org](http://www.eufic.org)

- 253.Xiao-Sheng H, Sheng-Yu Y, Xiang Z, Zhou F, Jian-ning Z. Diffuse axonal injury due to lateral head rotation in a rat model. *J Neurosurg*; 93(4):626-633, 2000.
- 254.Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Emerging treatments for traumatic brain injury. *NIH Public Access Neurotherapeutics* 14:67-84, 2009.
- 255.Yelamanchili SV, Pendyala G, Brunk I, Darna M, Albrecht U, Ahnert-Hilger G. Differential sorting of the vesicular glutamate transporter 1 into a defined vesicular pool is regulated by light signaling involving the clock gene *Period2*. *J Biol Chem*. 281:15671-15679, 2006.
- 256.Yoshida K, Hashimoto T, Sakai Y, Hashiramoto A. Involvement of the circadian rhythm and inflammatory cytokines in the pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *J Immunology Res*. 282:495, 2014.
- 257.Young VR, Hussein MA, Murray E, Scrimshaw NS. Plasma tryptophan response curve and its relation to tryptophan requirements in young adult men. *J Nutr*. 101:45-59, 1971.
- 258.Yue X, Wang L. Viscoelastic finite-element analysis of human skull-dura mater system as intercranial pressure changing. *African J of Biotech* 7(6): 689-695, 2008.
- 259.Zhang, Z. Adelman, A.S. Rai, D. Boettcher, J. Lönnerdal, B. Amino acids profiles in term and preterm human milk trough lactation systematic review. *Nutrients Nov*. 26:5(12) 4800-21. 2013

## 15. APÉNDICE

### 1.- ARTÍCULO DE REQUISITO

Estrada-Rojo et al. *BMC Res Notes* (2018) 11:150  
<https://doi.org/10.1186/s13104-018-3258-0>

BMC Research Notes

#### RESEARCH NOTE

Open Access



# Diurnal variation of NMDA receptor expression in the rat cerebral cortex is associated with traumatic brain injury damage

Francisco Estrada-Rojo<sup>1,2</sup>, Julio Morales-Gomez<sup>1</sup>, Elvia Coballase-Urrutia<sup>3</sup>, Marina Martinez-Vargas<sup>1</sup> and Luz Navarro<sup>1\*</sup>

#### Abstract

**Objective:** Data from our laboratory suggest that recovery from a traumatic brain injury depends on the time of day at which it occurred. In this study, we examined whether traumatic brain injury-induced damage is related to circadian variation in *N*-methyl-D-aspartate receptor expression in rat cortex.

**Results:** We confirmed that traumatic brain injury recovery depended on the time of day at which the damage occurred. We also found that motor cortex *N*-methyl-D-aspartate receptor subunit NR1 expression exhibited diurnal variation in both control and traumatic brain injury-subjected rats. However, this rhythm is more pronounced in traumatic brain injury—subjected rats, with minimum expression in those injured during nighttime hours. These findings suggest that traumatic brain injury occurrence times should be considered in future clinical studies and when designing neuroprotective strategies for patients.

**Keywords:** Excitotoxicity, Circadian rhythm, Glutamate receptor

#### Introduction

Traumatic brain injuries (TBIs) are among the most important contemporary health problems. TBIs are responsible for longer periods of disability than any other cause [1].

The initial damage from a TBI range from contusion to skull fracture, hemorrhage, and diffuse axonal injury. The TBI then triggers secondary injuries that are mainly mediated by excitotoxicity resulting from substantial neuronal  $Ca^{2+}$  entry. This  $Ca^{2+}$  entry in turn results from glutamate binding to *N*-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs), which contribute to several dysfunctions, such as hypoperfusion [2], edema [3, 4], excitotoxicity [5], and cognitive deficits [6].

NMDARs are heteromers composed of two subunits types NR1 and NR2 [7, 8]. The NR1 subunits play the main functional role and are involved in apoptosis following injuries like ischemia or TBI [9].

We previously showed that TBI-induced damage depends on the time of day at which the TBI occurs [10, 11]. This may arise from temporal variation in NMDAR expression. Although several articles describe diurnal variations for numerous receptors [12], very few exist for NMDARs, and most of them in suprachiasmatic nuclei [13, 14], but there are reports in other tissues like hippocampus [15].

We are interested in the motor cortex because it is involved in movement initiation and the suppression of unwanted movements [16]. However, there is no data regarding diurnal variations in NMDAR expression within this structure. If such variations exist, then they might be associated with variations in TBI-triggered excitotoxicity.

\*Correspondence: [inavarr@unam.mx](mailto:inavarr@unam.mx)

<sup>1</sup> Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico  
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2018. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Here, we explore the possible association between diurnal variation in rat cerebral cortex NMDAR expression and behavioral recovery from TBIs induced at different hours.

**Main text**

**Methods**

**Subjects**

Male Wistar rats (250–300 g) were maintained under controlled temperature and dark–light cycle (12:12 h; lights on at 08:00 h) with food and water ad libitum. All animal experiments were approved by the local ethics committee (protocol 128-2009, Facultad de Medicina, UNAM) and conducted according to official guidelines (NOM-062-ZOO-1999).

**TBI**

Rats were anesthetized with chloral hydrate [Riedel–de Haen, Germany] (350 mg/kg, i.p.) and subjected to TBIs with a modified closed-skull weight-drop injury protocol [17, 18]. Severe TBIs were induced on the exposed skull over the motor cortex (L:1.4, A:2) located with a stereotaxic device as previously described [11]. It consists of a pneumatic piston, which can be controlled in terms of the firing pressure and distance, therefore the magnitude of the impact is perfectly controlled. Previous trials in our laboratory allow us to establish with precision that our damage is similar in each subject. This model also reproduces focal damage [19], epidural hematomas and skull fracture (with or without brain damage) [20] and acute post-traumatic hemorrhage associated with severe TBIs in humans [21]. Furthermore, MRI studies have shown that this model accurately represents the clinical

conditions that occur in closed skull lesions in humans, such as those occurring in falls or motor vehicle accidents [22].

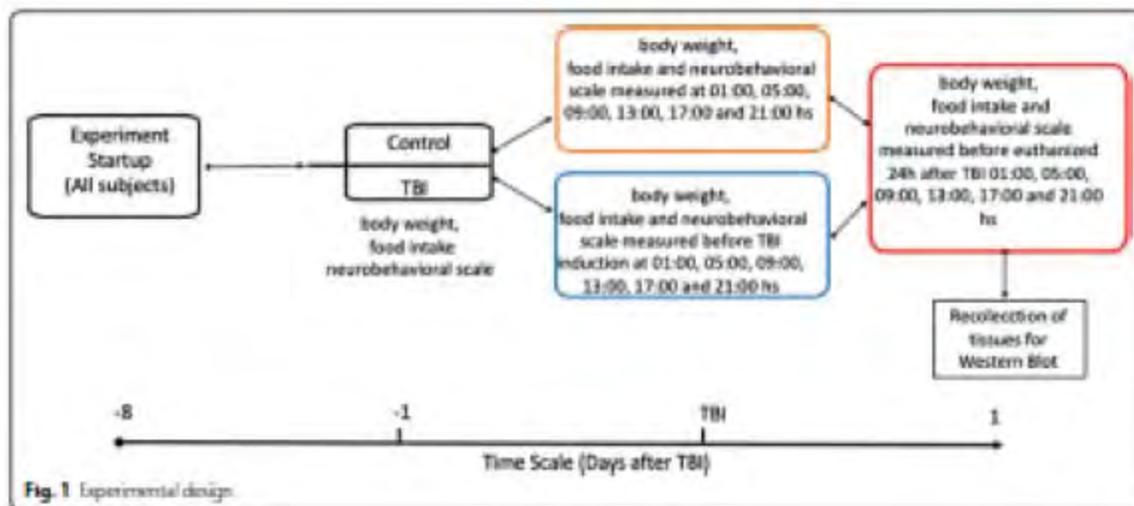
**Neurological behavior**

We used a 21-point behavioral-neurological scale [23] to evaluate neurological status in control rats and TBI-subjected rats 24 h after model induction. Although this scale was designed to evaluate damage caused by cerebral ischemia, many pathophysiological pathways are reportedly activated in both forms of brain damage [24], and we have previously used this scale to investigate TBI-induced neurological damage [10, 11, 25, 26].

**Diurnal variations**

Control rats were subjected to neurobehavioral analysis before being deeply anesthetized with sodium pentobarbital [Pisa, México] (60 mg/kg, i.p.) and euthanized at different hours of the day (01:00, 05:00, 09:00, 13:00, 17:00, or 21:00 h) that we have previously used to analyze the diurnal variations of other receptors [11]. The motor cortex was dissected from each rat and stored at – 70 °C (Fig. 1).

We used another group of rats to analyze the effects of TBI on behavioral variables. These rats were anesthetized with chloral hydrate and subjected to TBI at different times (01:00, 05:00, 09:00, 13:00, 17:00, or 21:00 h). We quantified mortality immediately after TBI induction. After 24 h, we measured bodyweights and used a neurobehavioral scale to assess motor skill behaviors. The rats were deeply anesthetized with sodium pentobarbital and euthanized. The ipsilateral motor cortex was dissected and stored at – 70 °C (Fig. 1).



**Fig. 1** Experimental design

### Western blotting

The motor cortex was homogenized with phosphate-buffered saline (PBS) [JT Baker, México] and protease inhibitors [Sigma-Aldrich, USA], and centrifuged (600g, 10 min, 4 °C). The supernatant was centrifuged again (39,000g, 15 min, 4 °C). Electrophoresis through a 7% analytical sodium dodecyl sulfate [JT Baker, México]-polyacrylamide [Merck, México] gel was performed. The resuspended tissue homogenates (60 µg of protein) were mixed with Laemmli buffer (1:1 ratio), heated (95 °C, 5 min) and loaded into a 0.75-mm-thick gel. The samples were electrophoresed (150 V, 2 h), and electroblotted (100 V, 1 h, 4 °C) onto a nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL). The membrane was stained with Ponceau 5 [Sigma-Aldrich, USA], and cut into two pieces. One piece was used to analyze the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) levels, and the other to analyze NRI levels. The membrane was washed and incubated with 3% PBS-Tween, 10 or 20% nonfat dry milk, and 2 or 6% normal goat serum [Sigma-Aldrich, USA], for 30 min at room temperature. It was then incubated with anti-GAPDH (1:2000; Santa Cruz Biotechnology [sc166545], Dallas, TX) or anti-NRI (1:1000; Abcam [ab17345], Cambridge, UK) antibodies overnight at 4 °C. The blot was thrice washed with PBS-Tween for 5 min, incubated for 1 h at room temperature with goat anti-rabbit immunoglobulin G horseradish peroxidase conjugate [Sigma-Aldrich, USA] (1:2000), and developed with diaminobenzidine [Sigma-Aldrich, USA] (0.5 mg/mL in PBS plus 0.009% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). The band density was analyzed with Quantity One software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

### Statistical analysis

The results are reported as mean values ± standard errors of the mean (SEM). Statistical significance was assessed with two-way analysis of variance and Tukey's multiple comparisons corrections for bodyweights and NRI expression, Kruskal–Wallis and Mann–Whitney U tests for neurological scores, and Chi square tests for survival data. Statistical significance was defined as  $P < 0.05$ .

### Results

Figure 2a shows that 24 h after the induction of the TBI, bodyweight losses significantly varied depending on the TBI induction time ( $F_{1,310} = 287.0$ ,  $P < 0.0001$ ).

Figure 2b shows the neurobehavioral scale findings. The rats with TBIs induced during daytime hours had lower scores than did those with TBIs induced at night (Kruskal–Wallis = 64.52,  $P < 0.0001$ ).

Finally, Fig. 2c shows the survival rates following TBIs induced at different times. The survival rate was 100%

for TBIs induced at 01:00 h but 71% for those induced at 13:00 h ( $\chi^2 = 3.628$ ,  $P = 0.6041$ ). TBIs induced during daytime hours tended to cause greater damage than those induced at night did.

Figure 3 shows the observed expression of NMDAR subunit NR1 in the motor cortex. Figure 3a includes the results for all control and TBI-subjected rats. We found that TBIs induced a significant reduction of NMDAR expression in the motor cortex ( $t_{1,04} = 2.130$ ,  $P = 0.0356$ ). Nevertheless, this reduction depended on the TBI induction time. We found significant effects of experimental group ( $F_{1,94} = 10.88$ ,  $P = 0.0014$ ), TBI induction time ( $F_{5,94} = 10.21$ ,  $P < 0.0001$ ), and the two factors' interaction ( $F_{5,94} = 2.540$ ,  $P = 0.0334$ ) (Fig. 3b, c). In control rats, we found that NR1 expression was greater at 09:00 and 13:00 h than at 21:00 h, whereas in TBI-subjected rats, NR1 expression was greater at 13:00 h than at 01:00, 09:00, and 21:00 h. Notably, TBIs induced at 01:00 h or 09:00 h reduced NR1 expression, but those induced at other times did not.

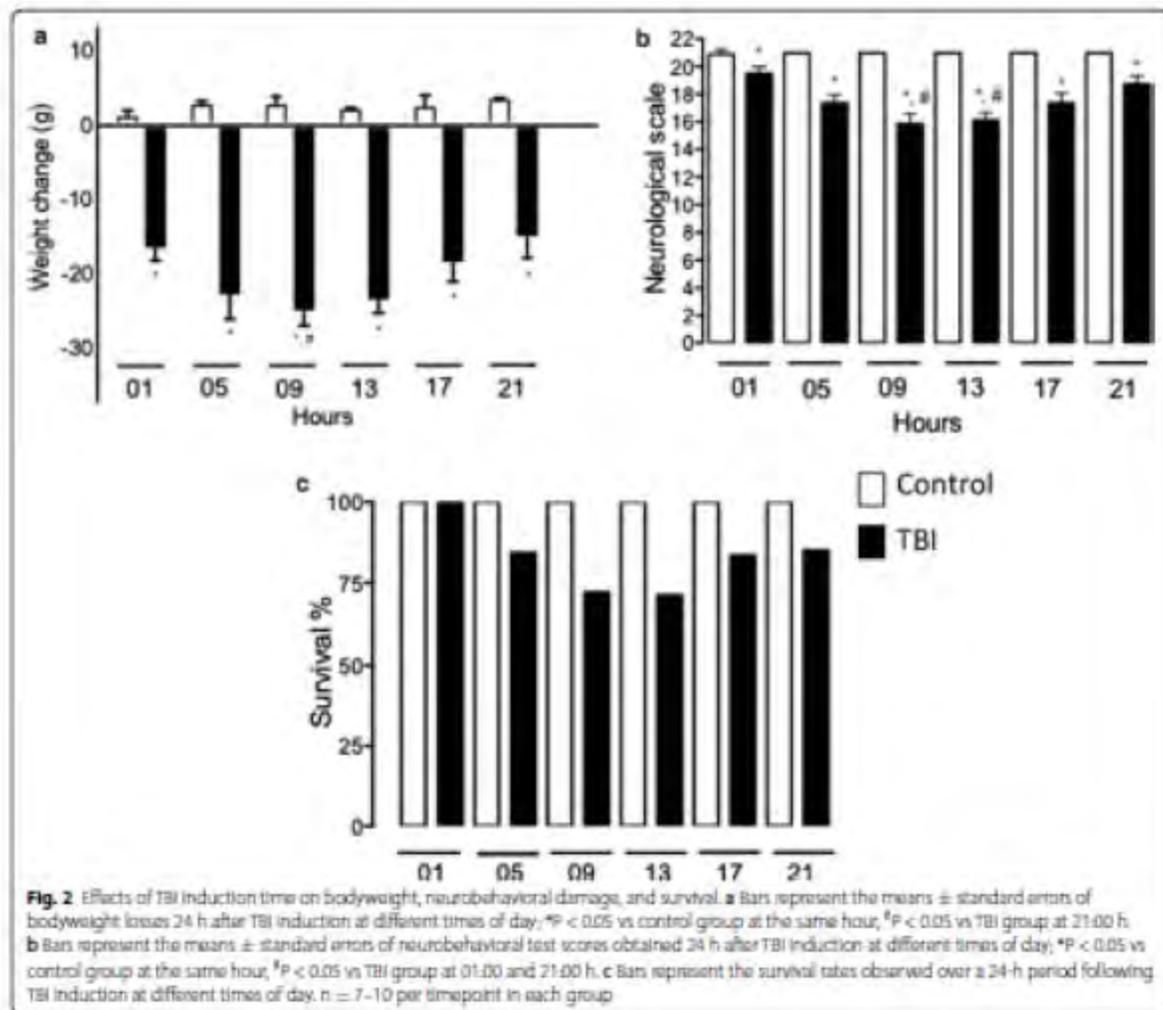
### Discussion

TBIs are a major health problem and affect millions of people worldwide every year. They are associated with short- and long-term damage in several domains, including physical, cognitive, metabolic, and behavioral problems, which depend on the severity of the damage [27, 28].

TBIs induce abnormal homeostasis in areas of secondary damage. The influx of glutamate into the extracellular space is immediate and can last several minutes. This produces excessive NMDAR activation, which in turn produces excessive and uncontrolled entry of Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> into neurons [28–30]. This Ca<sup>2+</sup> influx interferes with mitochondrial oxidative phosphorylation and produces oxidative stress and apoptosis. This effect is amplified by neuronal hyperexcitability, which exacerbates glutamate release and produces a vicious circle involving generalized excitotoxicity [31–36].

The excessive glutamate release causes astrocytes to recapture glutamate via the glutamate transporter GLT-1 [37], but persistently high extracellular glutamate concentrations can cause down-regulated of GLT1 and intracellular Na<sup>+</sup> overload reverses glutamate transport. This causes glutamate efflux from the astrocytes, increasing excitotoxic damage [38, 39].

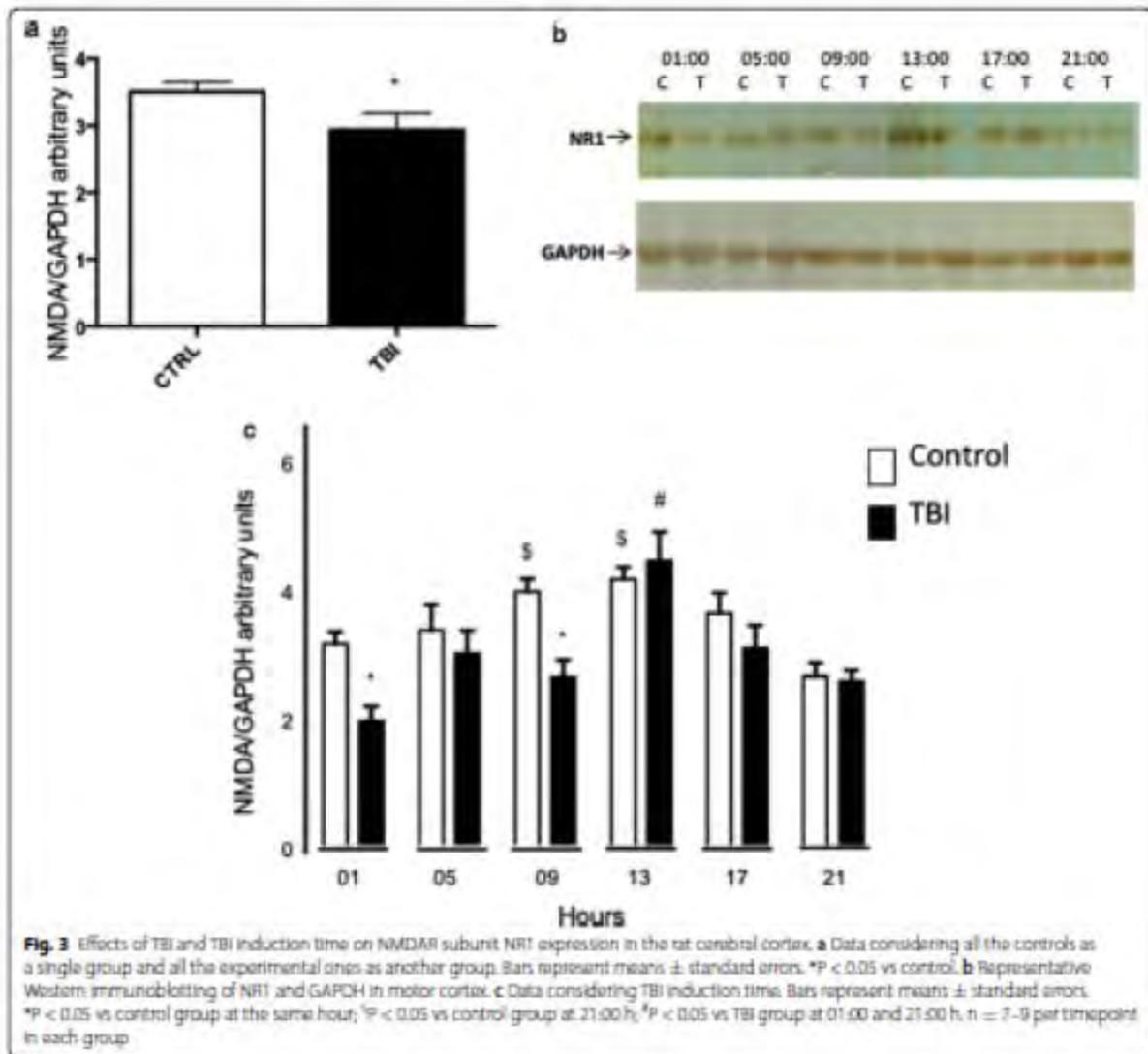
Moreover, NMDAR-mediated Ca<sup>2+</sup> loading is more neurotoxic than equivalent Ca<sup>2+</sup> loading mediated by other mechanisms [40]. Hardingham [41] suggests that neuronal responses by NMDA activation follow a bell-shaped curve in which excessively high and excessively low activity are both potentially harmful.



In this study, we hypothesized that the dependence of post-TBI behavioral recovery on TBI induction time is related to diurnal variation in rat motor cortex NMDAR expression. Our results support our initial hypothesis, we found that a TBI induced deterioration in an animal's general condition. This manifested as decreased bodyweight, as reported by other authors [42, 43]. We also verified that post-TBI deterioration is observable on a neurobehavioral scale. This finding and the survival rates data corroborate our previous findings that showed that post-TBI recovery depends on the time of day at which the TBI occurs. This time-dependent recovery must respond to some rhythmic event that modulates the post-TBI damage. We proposed that this rhythmic event could be diurnal

variations in the glutamatergic system. Given that excitotoxicity depends on NMDAR activation, we evaluated NMDAR expression in the area of damage. We propose that a greater expression of NMDAR produces greater influx of  $\text{Ca}^{2+}$  and therefore greater excitotoxicity, the opposite should happen in the hours with low expression levels and therefore should be less post-TBI damage. We therefore analyzed the expression of the NRI subunit since, as indicated above, it is essential in the functioning of the NMDAR [7, 8, 44].

Several authors have shown that after a traumatic event there are changes in the expression of NMDAR, these effects were manifested from the first minutes until a week later and in various regions such as frontoparietal cortex and hippocampus, the expression also



varies depending on the area of impact (decrease) or penumbra (increase) [45, 46].

With respect to the NR1 subunit, some authors found no variation in cortex and hippocampus between 1 and 7 days post-TBI [7, 8, 47] while others only saw a transient change in the hippocampus [48].

We found that the effect of TBI on NR1 expression depended on the TBI induction time. Moreover, our data show that the extent of TBI-induced damage also depended on the TBI induction time. TBIs caused less damage if they occurred during nighttime hours. Such nighttime TBIs were associated with decreased NMDAR expression and lower extracellular glutamate

levels in the motor cortex as reported by Dash [49], which support Hardingham's [41] proposal.

Numerous animal studies have shown that NMDAR antagonists can mitigate TBI-induced damage. However, clinical trials have found that such drugs have no benefits and even have detrimental effects [50]. Several authors have discussed the causes of these failures in humans and have suggested that they include trial design, human population heterogeneity, and inadequate dose ranges [51, 52]. We believe that another factor worth considering is the TBI occurrence time, since NMDAR expression depends on this variable.

## Limitations

### A TBI induces behavioral damage.

The extent of TBI-induced damage depends on the time of day the TBI is induced.

NMDAR activation-induced excitotoxicity is a primary mechanism of TBI damage.

NMDAR—subunit NR1 expression in cerebral cortex depends on the time of day the TBI is induced.

The minimal expression of NMDA—subunit NR1 is associated with a lesser damage caused by TBI.

The diurnal variation of NMDAR functionality in cerebral cortex has not been analyzed.

## Abbreviations

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; NMDAR: N-methyl-D-aspartate receptor; PBS: phosphate-buffered saline; TBI: traumatic brain injury

## Authors' contributions

FE-R and LN conceived and designed the experiments, FE-R and JM-G performed the in vivo experiments, FE-R and MM-V performed the western blot analysis. EC-U analyzed the data, FE-R and LN wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

## Author details

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico. <sup>2</sup>Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico. <sup>3</sup>Laboratorio de Neurociencias, Instituto Nacional de Pediatría, Mexico City, Mexico.

## Acknowledgements

The data presented herein are part of FE-R's Ph.D. thesis at Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. We thank Francisco Estrada Bernal for editing the manuscript.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Availability of data and materials

Data and further information about methods section are available from the corresponding author.

## Consent to publish

Not applicable.

## Ethics approval and consent to participate

All animal experiments were approved by the local ethics committee (protocol 128-2009, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México) and conducted according to its guidelines. The experimental protocols followed the Norma Oficial Mexicana guidelines for the use and care of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999) and the disposal of biological residues (NOM-087-ECOL-1995).

## Funding

This work was supported by PAPIIT grants IG201014 and IN223417, and CONACYT Grant 152510.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 8 December 2017 Accepted: 14 February 2018

Published online: 21 February 2018

## References

- Mason AIR, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol*. 2008;7:728–41.
- Armstead WV. Age dependent NMDA contribution to impaired hypotensive cerebral hemodynamics following brain injury. *Brain Res Dev Brain Res*. 2002;139:19–28.
- Okuyama K, Smith DH, White WF, Richter K, McIntosh TK. Effects of the novel NMDA antagonists CP-96,113, CP-101,581 and CP-101,506 on cognitive function and regional cerebral edema following experimental brain injury in the rat. *J Neurotrauma*. 1997;14:211–22.
- Bauer R, Walter R, Fritz H, Zetser U. Ontogenetic aspects of traumatic brain edema—facts and suggestions. *Exp Toxicol Pathol*. 1999;51:143–50.
- Obrenovitch TP, Uhenjak J. Is high extracellular glutamate the key to excitotoxicity in traumatic brain injury? *J Neurotrauma*. 1997;14:677–98.
- Smith DH, Okuyama K, Thomas MJ, McIntosh TK. Effects of the excitatory amino acid receptor antagonists kynurenic acid and indole-2-carboxylic acid on behavioral and neurochemical outcome following experimental brain injury. *J Neurosci*. 1993;13:5383–92.
- Olsen CL, Giza CC, Hovda DA. Injury-induced alterations in N-methyl-D-aspartate receptor subunit composition contribute to prolonged 45 calcium accumulation following lateral fluid percussion. *Neuroscience*. 2004;128:305–22.
- Giza CC, Mana NS, Hovda DA. N-methyl-D-aspartate receptor subunit changes after traumatic injury to the developing brain. *J Neurotrauma*. 2006;6:650–61.
- Liu Z, Zhao W, Xu T, Pei D, Peng Y. Alterations of NMDA receptor subunits NR1, NR2A and NR2B mRNA expression and their relationships to apoptosis following transient forebrain ischemia. *Brain Res*. 2010;136:133–9.
- Martínez-Vargas M, González-Rivera R, Soto-Núñez M, Cisneros-Martínez M, Huerta-Saquero A, Morales-Gómez J, Molina-Guarneros J, Navarro L. Recovery after a traumatic brain injury depends on diurnal variations. Effect of cystatin C. *Neurosci Lett*. 2006;400:21–4.
- Martínez-Vargas M, Morales-Gómez J, González-Rivera R, Hernández-Enríquez C, Pérez-Arredondo A, Estrada-Rojo F, Navarro L. Does the neuroprotective role of anandamide display diurnal variations? *Int J Mol Sci*. 2013;14:23041–35.
- Witz-Jedlic A. Circadian rhythms in mammalian neurotransmitter receptors. *Prog Neurobiol*. 1987;29(3):219–39.
- Ishida N, Matsui M, Mizui Y, Mishima M. Circadian expression of NMDA receptor mRNAs, epsilon 3 and zeta 1, in the suprachiasmatic nucleus of rat brain. *Neurosci Lett*. 1994;166(2):211–5.
- Bandov Z, Sumová A, Mikkelsen JD. Circadian and developmental regulation of N-methyl-D-aspartate-receptor 1 mRNA splice variants and N-methyl-D-aspartate-receptor 3 subunit expression within the rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience*. 2000;159(2):593–609.
- Vlches N, Spichiger C, Mendler N, Abaszua-Catalán L, Galatxes HA, et al. Gestational chorodisruption impairs hippocampal expression of NMDA receptor subunits Grn1b/Grn1a and spatial memory in the adult offspring. *PLoS ONE*. 2014;9(2):e91313.
- Ebbesen CL, Becht M. Motor cortex to act or no to act? *Nat Rev*. 2017;18(11):694–705.
- Shapiro Y, Shohami E, Sidf A, Soffer D, Freeman S, Colav S. Experimental closed head injury in rats: mechanical, pathophysiological, and neurologic properties. *Crit Care Med*. 1988;16:258–65.
- Chen Y, Constantin S, Thornbolver V, Wainstock M, Shohami E. An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits. *J Neurotrauma*. 1996;13:557–68.
- Alberl-Weissenberger C, Schön A. Experimental traumatic brain injury. *Exp Transl Stroke Med*. 2010;2:16.
- LaPlaca MC, Simon CM, Prado GR, Cullen DK. CNS injury biomechanics and experimental models. *Prog Brain Res*. 2007;161:13–26.
- Fiket MA, Stahl PF, Beauchamp KM, Morgan SJ, Smith WR, Shohami E. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. *Nat Protoc*. 2009;4:1328–37.
- Xiong Y, Mahmood A, Choppe M. Animal models of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurosci*. 2013;2:128–42.
- Hunter AJ, Hatcher J, Wiley D, Nelson P, Irving E, Hadjigham S, Parsons AA. Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology*. 2000;39:806–16.

24. Luker RR, Shohami E. Cerebral ischemia and trauma different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res Rev*. 2002;39:55–73.
25. Martínez-Vargas M, Estrada-Rojo F, Tabla-Ramón E, Navarro-Argüelles H, Ortiz-Lalzon N, Hernández-Chavez A, Solís B, Martínez-Tapia R, Pérez-Arredondo A, Morales-Gómez J, González-Rivera R, Nava-Talavera K, Navarro L. Sleep deprivation has a neuroprotective role in a traumatic brain injury on the rat. *Neurosci Lett*. 2012;529:118–22.
26. Martínez-Vargas M, Soto-Núñez M, Tabla-Ramón E, Solís B, González-Rivera R, Pérez-Arredondo A, Estrada-Rojo F, Castell A, Molina-Guarners J, Navarro L. Cystatin C has a dual role in post-traumatic brain injury recovery. *Int J Mol Sci*. 2014;15:5807–20.
27. Waxweiler RJ, Thurman D, Sniezick J, Sosin D, O'Neil J. Monitoring the impact of traumatic brain injury: a review and update. *J Neurotrauma*. 1995;12:309–16.
28. Albers BC. Models of brain injury and alterations in synaptic plasticity. *J Neurosci Res*. 2007;65:279–83.
29. Faden AL, Demeduk P, Pantar SS, Vink R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science*. 1989;244:798–800.
30. Graham DC, McIntosh TK, Maxwell WL, Nicoll JA. Recent advances in neurotrauma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000;99(8):641–51.
31. Yakovlev AG, Ota K, Wang C, Movsesyan V, Bao WL, Yoshihara K, Faden AL. Differential expression of apoptotic protease-activating factor-1 and caspase-3 genes and susceptibility to apoptosis during brain development and after traumatic brain injury. *J Neurosci*. 2001;21:7439–46.
32. Weisenberger CA, Sirén AL. Experimental traumatic brain injury. *Exp Transl Stroke Med*. 2010;2:3–16.
33. Palmer AM, Marion DW, Gotschewski ML, Swedlow PE, Styren SD, DeKosky ST. Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model. *J Neurochem*. 1993;61:2075–24.
34. Bullock R, Zauner A, Woodward JJ, Myersos J, Choi SC, Ward JD, Marmarou A, Young HF. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. *J Neurosurg*. 1998;89:507–18.
35. Bonfoco E, Krahn D, Ankarcona M, Nicotora P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:7162–6.
36. Omrinis S, Zhivotovsky B, Nikotera P. Regulation of cell death: the calcium apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4:552–65.
37. Nishizawa Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci*. 2001;69:369–81.
38. Rao VL, Baykaya MK, DeJian A, Rothstein JD, Dempsey RJ. Traumatic brain injury down-regulates glial glutamate transporter (GLT-1 and GLAST) proteins in rat brain. *J Neurochem*. 1998;70:2020–7.
39. Allen NJ, Kiaradottir R, Athwell D. Reversal or reduction of glutamate and GABA transport in CNS pathology and therapy. *Phügen Archiv*. 2004;440:132–42.
40. Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci*. 2004;61:657–68.
41. Hardingham GE. Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochem Soc Trans*. 2009;37:1147–60.
42. Kazanis I, Bozas E, Philippidis H, Stylianopoulos F. Neuroprotective effect of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) following a penetrating brain injury in rats. *Brain Res*. 2003;991:34–45.
43. Sribaran K, Thompson H. Understanding the metabolic response to trauma. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2009;70(M156):8.
44. Van Dongen AM, Editor. *Frontiers in Neurosciences: Biology of NMDA receptor*. Duke University Medical Center, North Carolina, Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2009.
45. Silver S, Marklund N, Håkansson L, Långström B, Watanabe Y, Bergström M. Changes in mGluR, NMDA and GABA(A) receptor binding after lateral fluid-percussion injury. In vitro autoradiography of rat brain frozen sections. *J Neurochem*. 2001;78:417–23.
46. Błogon A, Fry PR, Padin CM, Aleksandrovich A, Twenter J, Shohami E. Dynamic changes in N-methyl-D-aspartate receptors after closed head injury in mice: implications for treatment of neurological and cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:5117–22.
47. Park Y, Luo T, Zhang F, Liu C, Bramlett HM, Dietrich WD, Hu B. Down-regulation of Src-kinase and glutamate-receptor phosphorylation after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013;33:1642–9.
48. Kumar A, Zou L, Yuan X, Long Y, Yang K. N-methyl-D-aspartate receptors: transient loss of NR1/NR2A/NR2B subunits after traumatic brain injury in a rodent model. *J Neurosci Res*. 2002;67:781–6.
49. Dash MB, Douglas CJ, Vyantskiy VV, Chell C, Tononi G. Long-term homeostasis of extracellular glutamate in the rat cerebral cortex across sleep and waking states. *J Neurosci*. 2009;29:620–9.
50. Muir KW. Glutamate-based therapeutic approaches: clinical trials with antagonists. *Curr Opin Pharmacol*. 2006;6:53–60.
51. Loane DJ, Faden AL. Neuroprotection for traumatic brain injury: translational challenges and emerging therapeutic strategies. *Trends Pharmacol Sci*. 2010;31:596–604.
52. Ikonomidou C, Turkli L. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol*. 2002;1:383–6.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)



Francisco Estrada-Rojo\*, Ricardo Jesús Martínez-Tapia, Francisco Estrada-Bernal, Marina Martínez-Vargas, Adán Pérez-Arredondo, Luis Flores-Avalos and Luz Navarro

## Models used in the study of traumatic brain injury

<https://doi.org/10.1515/revneuro-2017-0028>

Received April 20, 2017; accepted July 14, 2017; previously published online September 9, 2017.

**Abstract:** Traumatic brain injury (TBI) is a contemporary health problem and a leading cause of mortality and morbidity worldwide. Survivors of TBI frequently experience disabling long-term changes in cognition, sensorimotor function, and personality. A crucial step in understanding TBI and providing better treatment has been the use of models to mimic the event under controlled conditions. Here, we describe the known head injury models, which can be classified as whole animal (*in vivo*), *in vitro*, and mathematical models. We will also review the ways in which these models have advanced the knowledge of TBI.

**Keywords:** *in vitro* models; *in vivo* models; ischemia; mathematical models; traumatic brain injury (TBI).

### Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is a contemporary global health problem. The risk of head injury has increased, given the new dynamics of activities that societies have recently developed. Car accidents, extreme sports, and armed conflicts have increased the incidence of TBI. In the USA, around 2 million people suffer TBI every year (CDC, 2015). Economically active populations are considered the most likely to suffer TBI, especially in traffic accidents. In addition to affecting the productivity of a region or a country, this also represents a high economic burden, as there are both immediate and long-term consequences involving physiological as well as neuropsychological aspects. If the individual suffering from TBI is young, various kinds of therapies will have to be endured for many years, representing an expense for relatives or

\*Corresponding author: Francisco Estrada-Rojo, Departamento Fisiología Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-250, 04510 Ciudad de México, México, e-mail: fesro@hotmail.com

Ricardo Jesús Martínez-Tapia, Francisco Estrada-Bernal, Marina Martínez-Vargas, Adán Pérez-Arredondo, Luis Flores-Avalos and Luz Navarro: Departamento Fisiología Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70-250, 04510 Ciudad de México, México

institutions for a very long period of time (McAllister, 2011).

To understand the overall context of TBI, it is needed to establish procedures for its study in the laboratory as a field of basic research. Models to mimic the event under controlled conditions are necessary to allow for its manipulation and to understand the overall context of the phenomenon (Cernak, 2005). In this review, we will summarize the known head injury models, and provide an overview as to how these models have advanced the knowledge of TBI.

Traumatic brain injury is defined as ‘an alteration in brain function, or other evidence of brain pathology caused by an external force’ (Menon et al., 2010). These alterations can include altered consciousness, amnesia, neurological or neurophysiological changes, skull fractures, intracranial injury, and even death (Saatman et al., 2008).

Traumatic brain injury represents a very serious health and economic problem. In the USA, 1.7 million people suffer from TBI annually, while in Europe the figure is about 775 million people. In Latin America between 150 and 170 per 100 000 individuals suffer a kind of TBI (Hyder et al., 2007; McAllister, 2011). In Mexico, TBI is the fourth leading cause of death (SIVE, 2008).

A patient who has suffered a TBI may require hemodynamic management to control intracranial pressure, basal temperature maintenance, sedation and analgesia, control of seizures, special nutritional processes for the maintenance of normoglycemia and fluid and electrolyte balance. The rehabilitation process also includes both motor and psychological or psychiatric therapies (Trinidad and Hlatky, 2008).

This treatment imposes a very high economic outlay on the individual, family and health system. Estimates vary, but average around \$10 000 dollars per year per person. A global calculation had established that in the USA the annual cost for management of TBI patients is 52 billion dollars (Risidal and Menon, 2011).

When TBI occurs, it is possible to differentiate two types of damage: the primary one corresponds to the direct consequences of the impact, which can vary from a simple contusion, to skull fracture, hemorrhage, diffuse axonal injury (DAI), diffuse vascular damage and damage to cranial nerves on a macroscopic scale; while on a cellular level there are a series of events that include membrane rupture, neurotransmitter release and rupture of

blood vessels. This type of injury is basically irreversible (Nestler et al., 2000; Estrada-Rojo et al., 2012). The secondary damage results from processes initiated by the primary damage; it includes a decrease in ATP, that occurs due to ischemia and hypoxia which decreases energy supply to the cells. This, in turn, disturbs the function of ion pumps such as the sodium-potassium ATPase and consequently alters ion gradients, causing changes in cellular excitability. For example, an increase of intracellular sodium depolarizes the cell and causes increased calcium influx and the release of neurotransmitters such as glutamate, which is excitotoxic in high concentrations. The high intracellular concentration of calcium causes the activation of certain genes, mitochondrial dysfunction and inflammatory responses. The activation of proteases, lipases, endonucleases and nitric oxide synthase also occurs, leading to necrosis and/or apoptosis (Nestler et al., 2000).

Nevertheless, the insult to the brain activates several neuroprotective processes that try to preserve the functionality of brain tissue, such as the expression of heat shock proteins, anti-inflammatory cytokines and endogenous antioxidants. GABAergic and cannabinergic inhibitory systems are also activated (Lekar and Shohami, 2012). Secondary injury is potentially reversible with appropriate therapy; therefore, it becomes very important to understand the processes that unfold after TBI, as this can enable more rapid and appropriate treatment options and reduce the cost of the treatment.

These mechanisms, both those that cause damage and the neuroprotective responses that are triggered after an insult in the brain, have been elucidated using diverse animal and theoretical models. Currently there are several types of models used to investigate TBI, from *in vivo* to mathematical models, and this article attempts to provide a broad overview of them.

## Classification of TBI

Traumatic brain injury is a heterogeneous disorder. There are different ways to classify it in terms of clinical severity, mechanism of injury, and pathophysiology, each of which may affect the prognosis and treatment (Hemphill and Phan, 2016).

### Classification by clinical severity

This type of classification has been widely used to differentiate the severity of TBI. To this end, various scales

have been devised, the best known and used of which is the Glasgow Coma Scale (GCS) (Teasdale and Jennett, 1974), which classifies TBI severity into three types: mild, moderate and severe. The classification is made by measuring the level of awareness and evaluating the three responses independently: visual, verbal, and motor. The GCS is primarily of prognostic significance. There is a direct relationship between the GCS score at admission of the patient and mortality secondary to trauma along with the probability of subsequent disability (Rimel et al., 1982). Nevertheless, use of this scale is limited by complicating factors such as medical sedation, endotracheal intubation and intoxication that are often present in patients with low GCS scores (Balesirori et al., 2004; Storchetti et al., 2004).

The Full Outline of Unresponsiveness (FOUR) Score has been developed as an alternative scoring system to try to avoid these problems, mainly by the inclusion of a brain stem test (Wijdicks et al., 2005; Stead et al., 2009).

### Pathoanatomical classification

This classification describes the location of the damage or the anatomical structures affected. Injury types include scalp laceration and contusion, skull fracture, epidural hemorrhage, subdural hemorrhage, subarachnoid hemorrhage, brain contusion and laceration, intraparenchymal hemorrhage, intraventricular hemorrhage and focal and diffuse patterns of axonal injury. Two contemporary cranial trauma based grading scales, the Marshall scale and the Rotterdam scale, have been used for this purpose (Marshall et al., 1992; Maus et al., 2008).

### Classification by physical mechanism

Injuries can be classified according to whether the head is struck or strikes an object and/or the brain moves within the skull. It has been stated that the magnitude and direction of each type or combination of loading forces may predict the type and severity of injury (Gennarelli and Thibault, 1985).

Gennarelli et al. found a correlation between the physical mechanism of injury and the type of pathoanatomical injury that could be important for the outcome for severe head injury patients (Gennarelli et al., 1982).

A group of experts met in 2008 to try to define a better TBI classification to select patients for clinical trials more efficiently. They concluded that classification by clinical

**Table 1:** Types of TBI lesions in humans and principal characteristics.

Primary lesion	Secondary lesion
Is established at the moment of trauma	Is established shortly after trauma
Diffuse axonal injury	Secondary injury
Rupture of axons in different areas	Includes, biochemical changes, hypoxia, excitotoxicity, release of ROS, inflammation and apoptosis
Focal lesion	Ischemic injury
Mainly in the cortex, may be single or multiple and unilateral or bilateral	Includes vasospasm and hemorrhage
Injury of the brain stem	Compressive secondary lesions
Includes the medulla oblongata, protuberance and cerebral peduncles	Including hematomas- epidural, upper fossa, subdural acute and chronic, intercerebral, hygroma and post-traumatic edema

severity was insufficient and that a pathoanatomical classification system for TBI is needed if we were to successfully translate targeted therapies from the bench to the bedside (Saatman et al., 2008).

Injuries occurring in human patients present a series of variations that are related with the severity, the nature, and the location of the damage. In addition, several factors could complicate them, such as pre-existing pathologies (diabetes, hypertension, metabolic syndrome, etc.), age, gender, or consumption of drugs or alcohol; Table 1 resumes the different types of lesions when a TBI occurs.

The use of TBI models allows reconstructing some aspects of the TBI but in many cases, does not reproduce with fidelity the causes of the damage. However, by controlling the variables, a model can offer specific and important knowledge about the pathophysiology of TBI and thus offer us therapeutic targets suitable for the treatment.

On the other hand, the models allowed to explore the aspects that could not be addressed in a clinical environment; additionally they allowed to carry out therapeutic trials with different strategies or for introducing new drugs.

## The use of models to investigate TBI

Traditionally, one of the ways in which science has advanced is by generating models to investigate phenomena. Models are representations that establish processes similar to those under investigation, but give them a context that allows for a detailed analysis of each variable involved (Black, 1962).

The development of models in science has enabled an in-depth investigation of the complex phenomena.

**Table 2:** Principal types of TBI models used.

Type or subtype model	Species	Characteristics studied
<i>In vivo</i> models		
Weight drop model	Rat, mouse	Histology, neuroinflammation, excitotoxicity, oxidative stress, necrosis, apoptosis, behavioral
Fluid percussion	Rat, mouse, cat	Histology, neuroinflammation, excitotoxicity, oxidative stress, behavioral
Controlled cortical impact injury	Rat, mouse, sheep	Histology, neuroinflammation, excitotoxicity, oxidative stress, necrosis, apoptosis
Blast injury	Rat, mouse	Multiple lesions in brain, histology, neuroinflammation, excitotoxicity, oxidative stress, behavioral
Penetrating ballistic-like brain injury	Cat, rat, sheep	Lesion size, lesion trajectories, histology, neuroinflammation
Acceleration	Pig (neonatal), dog, rat	Axonal diffuse injury, histology, apoptosis, necrosis
<i>In vitro</i> models		
Immortalized cell lines	Human, mouse, rat	Axonal diffuse injury, oxidative stress
Disassociated primary cultures	Rat, mouse, <i>Drosophila</i>	Apoptosis, excitotoxicity, oxidative stress, electrophysiology
Organotypical cultures	Rat, mouse	Apoptosis, excitotoxicity, oxidative stress, electrophysiology
Mathematical models		
Network analysis	Human brain images	Understanding the brain structure from a perspective of complex process, prediction of lesions to distance, examination of TBI from a general but a complex vision

Models also have the advantage that they can be adapted within certain limitations (Lara and Sandoval, 1986).

When we are facing a complex phenomenon such as TBI, the approach must begin with the development of models to reproduce this phenomenon under controlled conditions. The purpose of these models is to replicate one or more of the phases that happen when a head injury occurs, so that it is possible to study a certain phase and begin to propose therapeutic options.

It is important to note that the development of a model is linked to the goal of the study; a model to study the motor effects of TBI will be different from one that is used to understand its molecular mechanisms or one used in testing drug therapies (Cernak, 2005). The severity of TBI and the anatomical structures to be analyzed will also need to be taken into account; generating a slight concussion is not the same as a severe head injury. The model chosen should also reflect the physical mechanism that caused the damage; it is known that TBI can be caused by a direct impact on the skull, or quick acceleration, or by the penetration of an object, or shock wave deceleration (e.g. an explosion).

Now, there are several models that attempt to reproduce the effects of TBI. These will be described, with comments on the contribution obtained by using them.

Table 2 summarizes the main TBI models described in this article emphasizing on the type of animal used in each one and the characteristics that can be studied.

### Classification of TBI models

Different types of models of TBI are described in the literature, with the most common being *in vivo* animal models of TBI that use the whole animal. There are also *in vitro* models using cultured cells or organotypic tissue preparations and mathematical models (see Figure 1).

Recently, Xiong et al. (2013) published an excellent review of *in vivo* models of TBI, with emphasis on five specific models that have been widely used in research: fluid percussion injury, cortical impact injury, weight-drop impact injury, acceleration and blast injury. We include these models here and expand considering the classification of Cernak, which considers the mechanical process of occurrence of TBI (see Figure 1).

As mentioned earlier most of the models are mechanical, requiring the development of devices that allow the impact, crushing, or the application of shock waves to the skull. The mechanical models can be divided into two large categories: static and dynamic.



Figure 1: Classification of models for the study of TBI. Modified from Cernak (2005).

### Static models

In the static model, the compression of a skull or a specific brain zone is induced. The intensity of the force applied and the duration are important, while velocity and acceleration are almost absent. These models attempt to reproduce similar effects to those that would occur, for example in some accidents where there is a blow and a flattening of the cranial vault (Li et al., 2011a,b).

### Dynamic models

Dynamic models are those in which the head or an object is accelerated to cause an impact either directly on the skull or through shock waves of the burst type. These models are divided into two categories: direct and indirect.

### Indirect models

In this case, the experimental animals are affected by shock waves whose frequency and amplitude are controlled. The model consists of a vertical tube with a system at one end that detonates a small charge near the animal (usually a rat), which is placed in a special box that prevents movement. The blast waves are transmitted through the air contained in the tube, and the pressure that is achieved ranges from 150 to 340 kPa. This model has allowed the study of neuronal inflammation, astrocyte response and myelin sheath destruction. Some immunohistochemical analyses have revealed changes in the cytoskeleton in regions beyond the cerebral cortex and in the hippocampus (Cernak et al., 1996, 2001).

### Direct models

There are two categories for this type of model: acceleration and direct impact. The former model in turn is divided into penetrating impact and nonpenetrating impact models.

### Acceleration models

In this case, the previously anesthetized experimental animals are placed on a device that allows their head to rotate in the horizontal, coronal and sagittal planes. Shifts can be up to 90° in each plane and the angular velocity is measured with an angular velocity sensor, so that it

is always the same. This model has provided information on sub-arachnoid hemorrhage, which occurs with axonal injury on sagittal and horizontal rotations but not on coronal rotation; coronal rotation produces only slight changes in these variables. The limitation of this model is the ability of the species used to move their necks; the model was originally developed for use with neonatal pigs, but has also been used with rats and dogs (Eucker et al., 2011).

### Penetrating impact models

Regarding this category, the aim is to impart impact energy directly on exposed nervous tissue, to provide insight into this form of injury. These models have been used in numerous anatomical, physiological, and/or pharmacological studies. Fluid percussion, controlled cortical impact, focal cortical compression and high-velocity missile injury are examples of penetrating impact models (Alder et al., 2011).

### Fluid percussion model

This is the most widely used model. A lesion is achieved using a pendulum, a piston, or more commonly a pulse delivered by a fluid. The percussion produces brief displacement and consequent deformation of the nerve tissue. The pulse is applied to animals that are previously anesthetized and subjected to a craniotomy, taking care that the dura remains intact, and then the pulse is delivered onto this membrane. The pressure used ranges between 0.9 and 2.1 atm. The impact is monitored using an oscilloscope, enabling standardized impact pressure. Due to its high reproducibility, this model is widely used, especially in histological studies, where it is possible to show the effects of TBI at the cellular level and on the inflammation process (Alder et al., 2011; Xiong et al., 2013).

### Controlled cortical impact model

Another widely used penetrating impact model is the cortical impact injury. In this model, the damage is caused on the intact dura mater of a previously anesthetized animal, after using a trephine to cut a hole in the skull. The impact is produced by a pneumatic piston or controlled freefalling weight. The advantage of this model is that the damage is very accurately localized and can be applied to specific regions of the brain using a stereotaxic system. This model

allows the course of the impact to be studied at a histological level, as well as the process of inflammation and the suppression of cell proliferation (Acosta et al., 2013).

### Injury models using a high-speed missile

These models have been developed to simulate the impact of a bullet. They have been described in models using cats (Carey et al., 1990) and sheep (Finnie, 1993). After being previously anesthetized and placed in a stereotaxic frame, the cat undergoes a surgical procedure to remove the outer wall of the frontal sinus. The injury occurs by firing a steel ball from about 80 cm from the head; the missile is 2 mm in diameter and weighs 31 mg, the impact velocity is between 220 and 280 m/s. The energy released by the missile is between 0.9 and 1.4 J. As the missile remains in the brain tissue, a vasogenic edema is produced, resulting in increased intracranial pressure, decreased cerebral perfusion, increased blood glucose and respiratory arrest. These changes vary with the energy imparted by the missile (Carey et al., 1990).

In the case of the sheep model, a 22-mm-caliber pistol is fired at the animal from a distance of 3 m. The sheep is anesthetized, with its movement restricted in a standing position. This permits the analysis of morphological alterations such as lacerations, hemorrhage, and the dispersion of the injury, which are due to compression by the missile, penetration, and distortion of the blood vessels and nerve fibers of the brain, and tissue displacement. Although the histopathological features of TBI can be characterized using these models, they are poorly suited for analyzing responses at the molecular level (Finnie, 1993).

### Models of nonpenetrating impact

In this type of model the injury is provoked by an impact directly on the skull. In this sense, they are closer to reality than the penetrating impact models, which cannot replicate features such as DAI (Cernak et al., 2001).

These 'closed-head injury' models are commonly used to provoke a TBI. There are several variants used to produce the injury, but basically free-falling weights directly hit the skull or a helmet placed on the head of the animal. Another variant uses an automated system such as a pneumatic piston. In these models, injury is caused by a direct hit to the skull of the animal, achieved through a system in which an object with variable weight is normally positioned at the top of a metal or plastic tube. The height and weight of the falling object control the impact

force, which determines the severity of the TBI. The free-falling object usually hits a helmet or other attachment, either made of metal or a rigid material, placed over the animal's head (Colak et al., 2012; Silva et al., 2012).

However, there are some disadvantages with these models. The first is that the resulting injury is not always the same, and may vary between experimenters/users. The other handicap is the fixation of the animal's head. Without proper design, this model can cause other injuries, such as injury to the cervical region. The experimenter also has to take into account that the object may deliver more than one blow, so the effect is altered.

The original model described by Marmarou was made of a column of brass weights free falling onto a metallic helmet fixed to the skull vertex of a rat (Marmarou et al., 1994). Currently there are models that allow better control of the falling weight, such as those controlled by an accelerometer, as developed by Li et al. (2011a,b), or the Maryland model, where impact may be applied to the frontal region using a sloping ramp to hit an acrylic base located just in front of the animal's head. This model does not generate coronal compression of the skull and the animals exhibit petechial hemorrhages, DAI marked by a bead-like pattern of  $\beta$ -amyloid precursor protein ( $\beta$ -APP) in damaged axons, and widespread upregulation of  $\beta$ -APP in neurons (Kilbourne et al., 2009).

There is also the option of using a pneumatic piston to cause the lesion. The piston is connected to an air compressor and a control valve that allows calibrated piston firing. This makes the system highly reproducible and standardizes the degree of injury; in addition, as the piston suffers no inertial effects, there is no possibility of more than one hit, as it happens in the weight-drop model. Currently, we employ this design, which is also like a stereotaxic system, allowing the blow to be applied to a very specific and localized region. This model has been successfully used to study neurobehavioral, histological, and molecular aspects of TBI (Martinez-Vargas et al., 2012, 2013).

### *In vitro* models of TBI

Compared to *in vivo* models, *in vitro* models are an excellent platform to generate experiments that are easily repeatable, well controlled, isolated from the environment, less expensive, less ethical implications, and are a good complement to describe different aspects of the pathophysiological cascade without having systemic confounders such as inflammation or hypoxia/ischemia; however, it is very difficult to overcome *in vivo* models mainly due to the lack

of attachment to the reality of the complex models of a TBI (Kumaria and Tollas, 2008; Morrison et al., 2011).

Despite this, different culture systems can be used such as: immortalized cell lines, dissociated primary cultures, and organotypic cultures.

### Immortalized cell lines

Although *in vivo* models are an excellent means to observe the interactions of different cell types, *in vitro* models of the immortalized cell lines have been used for several years in different injury models such as shear stress in human SH-SY5Y (a neuroblastoma cell line) (Trfyoso and Good, 1999), or in HT22 cells (an immortalized mouse hippocampal neuronal line) and recently both for a repetitive TBI (Kane et al., 2011), mainly because it presents some advantages like it can be easily obtained, are well characterized, and are an excellent tool to study specific aspects of injury (Kane et al., 2011; Morrison et al., 2011). However, different reports suggest that it can suffer from disruption of contact dependency and poor adhesion (Morrison et al., 2011) and several aspects need to be considered for its appropriate interpretation such as epigenetic changes, telomere shortening, telomerase and gene regulation, etc. (Maqsood et al., 2013).

### Dissociated primary cultures

Primary cultures cells are obtained from a living organism by enzymatic digestion or mechanic dissociation and kept in a culture media for some days, even months (Morrison et al., 2011). The advantages of this *in vitro* model are that it allows a simple study of the effect of TBI and how it modifies the morphology and metabolism of different cellular types (neurons, astrocytes, microglia, oligodendrocytes) or many types in the case of a mixed culture (Silva et al., 2006). Also, it provides an easy access to modify the cell environment with growth factors, neurotransmitters, cytokines and drugs. But being a controlled artificial environment, the lack of the effects of neuroendocrine system, nutritional support, cellular interactions and intercellular components effects rises concerns about the need of *in vitro* models to be confirmed *in vivo* (Harry et al., 1998; Katzenberger et al., 2013).

### Organotypic cultures

These cultures are prepared based on thin slices of CNS, and needs to be maintained with simple requirements

such as: stable stratum, culture medium, sufficient oxygenation, and temperature about 36°C (Gähwiler et al., 1997). Brain slice models offer advantages over the *in vitro* models because they reproduce the *in vivo* environment like cytoarchitecture and the microenvironment of the original tissue, while maintaining key *in vitro* features and because anatomical structures are well preserved, allowing for region-specific analysis like hippocampus the structure is most often cultured. (Adamchik et al., 2000; Yu and Morrison, 2010; Morrison et al., 2011; Davtaud et al., 2013).

With those different types of culture systems, various types of injuries can be studied such as: transection, compression, acceleration/deceleration, barotrauma, hydrodynamic and cell stretch (Kumaria and Tollas, 2008).

### Transection

It can be classified into macroscopic and microscopic. Macrotransection can be used in neural tissues with or without neuroglia. The injury can be performed with a plastic styllet or a rotating scribe that damages cells attached to the culture dish. This model attempts to simulate various aspects of a brain injury such as puncture wounds, penetrating skull fractures as well as various overlapping lesions (Morrison et al., 1998). However, with the aim to reduce external confounding factors (e.g. death due to excitotoxicity of adjacent cells) a more directed model was needed, resulting in the development of microtransection, in which a laser can perform microlesions in a single cell. The great disadvantage of this model is that requires a great sophistication, dependent operator skills, and it is only possible to study cells outside their natural environment without considering the multiple interactions (e.g. neuron-glia) (Kumaria and Tollas, 2008).

### Compression

We can simulate focal wounds that cause laceration in the brain tissue through a weight-drop. Its advantage is that the severity of the lesion can be controlled by force, depth, shape of the impact and duration, however, not all biomechanical lesions generated in this model can be analyzed and therefore is incomplete (Steg et al., 1999; Church and Andrew, 2005).

### Acceleration/deceleration

This model is one of the most important mechanisms of neuronal death in patients who suffered a TBI.

Experiments have been developed in which neurons and glia are subjected to three tangential accelerations of 220 g for 3–5 s intervals (Lucas and Wolf, 1991). The great disadvantage is that the deformation generated by the acceleration cannot be measured.

### Barotrauma

It consists of the application of static or transient pressure in order to cause injury to cell cultures (Church and Andrew, 2005). In models of static pressure, the damage is caused by exposing the culture to a constant pressure for 10 min, however, to generate the cellular injury, a pressure greater than 15 atm is required, and this totally exceeds the pressure produced by a TBI (Kumaria and Tollas, 2008; Morrison et al., 2011). The application of transient pressure, requires the drop of a weight in a sealed chamber, producing pressure waves that pass through the tissue causing the lesion by its deformation; this mode reproduces more faithfully the course in time of the changes of pressure that is believed to occur during trauma (Sleg et al., 1999).

### Hydrodynamics

The model works based on the application of hydrodynamic force, based on a viscometer of parallel plates, where in one of the plates the cells grow and apply hydrodynamic force which is controlled based on the speed of the turntable and the distance of separation of the plates. The major advantage of the model is the precise calculation of the cell deformation after the injury, either by light microscopy or by micropipettes attached to the plates, although as mentioned in the barotrauma lesion it is difficult to contract with what happened *in vivo* (Kumaria and Tollas, 2008).

### Cell stretch

As previously mentioned, it is complex to reproduce the events occurring *in vivo* models. In relation to the *in vitro* injury models, cell stretch is considered the gold standard (Kumaria and Tollas, 2008); developed with the objective to understand the biomechanical effects of TBI, using as a principle the stretching deformation of the cell. Among one of the better results is the one developed under the premise of the equibiaxial systems, for both cell culture and organotypic cultures that are cultivated on deformable substrates, which can be stretched (Morrison et al., 1998; Kane et al., 2011). These have the advantage of not modifying the applied deformation by the heterogeneity

of the tissue. These models have a potential limitation, which is the need for the tissue to be adhered to the substrate (Morrison et al., 2006).

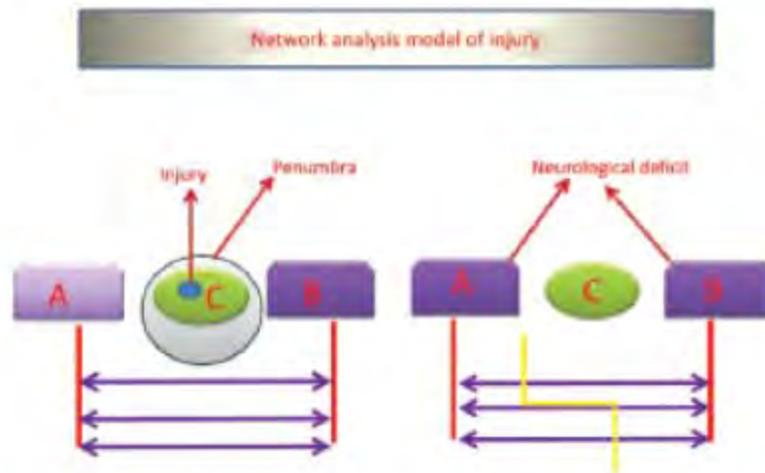
### Mathematical models

It has been obtained by the knowledge of brain function by exploring the substrate of a specific function or functions. One of the most commonly used ways has been to cause an injury to the putative area responsible for a particular function, so the resulting injuries allow investigating dysfunctions such as aphasia, for example, in Broca's or Wernicke's areas, or the corticocortical pathway, the integrity of which is required for speech (Catani and Mesulam, 2008).

The brain is a complex network of neuronal circuits, as was shown by Ramón y Cajal in the early 20th century and then later unraveled by Wiener and Rosenblueth, who said that information flows between the circuits. It is possible to infer that mental disorders and other pathologies such as an insult to the brain can be interpreted as interruptions in the flow of information by damage to the circuits (Sporns, 2011).

### Network models

Recent developments in noninvasive neuroimaging technology have provided new opportunities for studying the human brain, and in combination with network modeling tools, are being used to understand the structure and function of the brain from a complex systems perspective. This approach has provided a comprehensive description of the brain's structural connectivity or connectome, which comprises a complete map of the brain's structural connections (Sporns, 2013). These connectomes include highly connected hubs or nodes, which support integrative processing and adaptive behavior. These hubs are thought to have high metabolic demands and involve connections over longer distances than other regions of the brain that are not so critical. Hubs could be considered costly in terms of biology, as well as having a topologically central role in normal network function. Crossley et al. (2014) predicted that hub regions would be the predominant sites of pathological brain lesions. They identified the hubs of brain anatomical networks in healthy volunteers and showed that computational attacks that target hubs degrade the efficiency of brain networks to a greater extent than random attacks. They also prepared grey matter lesion maps, and found that lesions in all



**Figure 2:** Representation of a lesion in a network analysis model. The lesion is located in region C, shown on the left side with a penumbra generated. On the right side is shown the interruption to the connections between regions A and B adjacent to the injured area, producing a neurological disorder due to secondary damage. Modified from Spoms (2011).

the brain disorders they examined were more likely to be located in hubs of the normal brain connectome. Based on these data they predict that disease processes such as TBI that damage long-distance axonal projections would disconnect hubs and disrupt long-range communication between network modules, and suggest that TBI could be reexamined within this framework. Figure 2 is a simple interpretation of how a lesion in one area can affect the adjacent area.

## Discussion

Traumatic brain injury is a highly complex clinical entity, encompassing morphological, biochemical, molecular, physiological and behavioral changes. It interferes with the quality of life of individuals, apart from the economic and social consequences that it represents (Cernak, 2005; Kane et al., 2011).

Therefore, the priority is to provide physicians and patients with effective and rapid alternatives for restoration of brain function. However, identifying options for therapeutic targets is such a complex problem that it cannot be based on the use of only one type of model. It is necessary to use one or more models designed to deal with the various consequences of TBI. Fortunately, as we have explained in this article, there are several options and each has advantages and limitations.

What is clear is that the study of TBI requires the further development of models that incorporate processes such as hypoxia, ischemia and reperfusion. Models should also involve factors such as age, gender and comorbidities because the resulting schemes would then be more complete and closer to a patient's reality. Models are needed that establish an overall vision of how the injury may affect cognitive, motor and behavioral functions in the future; therefore, the new models based on brain networks are an interesting alternative.

In an ideal scenario, network models would help us to anticipate the consequences of TBI, and together with the information provided by the other models described here, could provide valuable information to offer patients an appropriate therapy in a timely manner.

**Acknowledgments:** Supported by grants PAPIIT IG201014 and CONACYT 152510. We thank Rocío Sibaja Pastrana for editing of the Tables, and Antonio Barajas Martínez for his comments and revision.

## References

- Acosta, S.A., Tajiri, N., Shinzuka, K., Ishikawa, H., Grimmig, B., Diamond, D.M., Sanberg, P.R., Bickford, P.C., Kaneko, Y., and Borlongan, C.V. (2013). Long-term upregulation of inflammation and suppression of cell proliferation in the brain of adult rats

- exposed to traumatic brain injury using the controlled cortical impact model. *PLoS One* 8, e53376.
- Adamchik, Y., Frantseva, M.V., Weisspapir, M., Carlen, P.L., and Perez Velazquez, J.L. (2000). Methods to induce primary and secondary traumatic damage in organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 5, 153–158.
- Alder, J., Fujjoka, W., Lifshitz, I., Crockett, D.P., and Thakker-Varta, S. (2011). Lateral fluid percussion: model of traumatic brain injury in mice. *J. Vis. Exp.* 54, e3063.
- Balestrairi, M., Czosnyka, M., Chatfield, D.A., Stainer, L.A., Schmidt, E.A., Smielewski, P., Matta, B., and Pickard, J.D. (2004). Predictive value of Glasgow Coma Scale after brain trauma: change in trend over the past ten years. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 75, 161–162.
- Black, M. (1962). *Models and Metaphors, Studies in Language and Philosophy*, 1st ed. (Ithaca, NY: Cornell University Press), pp. 278.
- Carey, M.E., Sama, G.S., and Farrell, J.B. (1990). Brain edema after an experimental missile wound. *Adv. Neurol.* 52, 301–305.
- Catani, M. and Masalam, M. (2008). What is a disconnection syndrome? *Cortex* 44, 911–913.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2015). National Center for Injury Prevention and Control. *Guide to Writing about Traumatic Brain Injury in News and Social Media*. (Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention), pp. 12.
- Cernak, I. (2005). Animal models of head trauma. *NeuroRx* 2, 410–422.
- Cernak, I., Savic, I., Malicevic, Z., Zunic, G., Radosevic, P., Ivanovic, I., and Davidovic, I. (1996). Involvement of the central nervous system in the general response to pulmonary blast injury. *J. Trauma* 40, S100–S104.
- Cernak, I., Wang, Z., Tang, J., Bran, X., and Savic, I. (2001). Ultrastructural and functional characteristics of blast injury-induced neurotrauma. *J. Trauma* 50, 695–706.
- Church, A.J. and Andrew, R.D. (2005). Spreading depression expands traumatic injury in neocortical brain slices. *J. Neurotrauma* 22, 277–290.
- Colak, T., Cinc, N., Bamac, B., Kurtas, O., Ozbek, A., Bicer, U., Sunnetci, D., and Savic, I. (2012). Microarray-based gene expression analysis of an animal model for closed head injury. *Injury* 43, 1264–1270.
- Crossley, N.A., Mitchell, A., Scott, J., Carletti, F., Fox, P.T., McGuire, P., and Bullmore, E.T. (2014). The hubs of the human connectome area generally implicated in the anatomy of brain disorders. *Brain* 137, 2382–2395.
- Davlaud, N., Garbayo, E., Schillier, P.C., Perez-Pinzon, M., Montoro-Manet, C.N., and Thompson S. (2013). Organotypic cultures as tools for optimizing central nervous system cell therapies. *Exp. Neurol.* 248, 429–440.
- Estrada-Rojo, F., Morales-Gómez, I., Tabla-Ramón, E., Solís-Luna, B., Navarro-Argüelles, H.A., Martínez-Vargas, M., Pérez-Arredondo, A., González-Rivera, R., Rodríguez-Salazar, I.E., and Navarro, L. (2012). Neuroprotección y traumatismo craneoencefálico. *Rev. Facul. Med.* 55, 16–29.
- Ecker, S.A., Smith, C., Ralston, J., Ffress, S.H., and Margulies, S.S. (2011). Physiological and histopathological responses following closed rotational head injury depend on direction of head motion. *Exp. Neurol.* 227, 79–88.
- Finnis, J.W. (1993). Pathology of experimental traumatic cranio-cerebral missile injury. *J. Comp. Pathol.* 108, 93–101.
- Gähwiler, B., Capogna, M., Debanne, D., and McKinney, R. (1997). Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends Neurosci.* 20, 471–477.
- Gennarelli, T.A. and Thibault, L.E. (1985). *Biomechanics of Head Injury*. Neurosurgery. R.H. Wilkins and S.S. Rengachary, eds. (New York: McGraw-Hill), pp. 1531–1536.
- Gennarelli, T.A., Spielman, G.M., Langfitt, T.W., Gildenberg, P.L., Harrington, T., Jane, J.A., Marshall, L.F., Millar, J.D., and Pitts, L.H. (1982). Influence of the type of intracranial lesion on outcome from severe head injury. *J. Neurosurg.* 56, 26–32.
- Harry, G.J., Billingsley, M., Brulink, A., Campbell, I.L., Classen, W., Darman, D.C., Gall, C., Ray, D., Smith, R.A., and Tilson, H.A. (1998). In vitro techniques for the assessment of neurotoxicity. *Environ. Health Perspect.* 106, 131–138.
- Hemphill, I.C. and Phan, N. (2016). Traumatic brain injury: epidemiology, classification, and pathophysiology. Available at: <http://www.uptodate.com/contents/traumatic-brain-injury-epidemiology-classification-and-pathophysiology>.
- Hyder, A.A., Wunderlich, C.A., Puvanachandra, P., Gururaj, G., and Kobusingya, O.C. (2007). The impact of traumatic brain injuries: a global perspective. *NeuroRehabilitation* 22, 341–353.
- Kane, M.J., Hatic, H., Delic, V., Dennis, J.S., Butler, C.J., Saykally, J.N., and Citron, B.A. (2011). Modeling the pathobiology of repetitive traumatic brain injury in immortalized neuronal cell lines. *Brain Res.* 1425, 123–131.
- Katzenberger, R.J., Loewen, C.A., Wassarman, D.R., Petersen, A.J., Ganetzky, B., and Wassarman, D.A. (2013). A *Drosophila* model of closed head traumatic brain injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, E4152–E4159.
- Kilbourne, M., Kuehn, R., Tosun, C., Caridi, I., Kelodjtan, K., Bochtichio, G., Scaloa, T., Garzantch, V., and Simard, J.M. (2009). Novel model of frontal impact closed head injury in the rat. *J. Neurotrauma* 26, 2233–2243.
- Kumara, A. and Tolia, C.M. (2008). In vitro models of neurotrauma. *Br. J. Neurosurg.* 22, 200–206.
- Lara, R. and Sandoval, H. (1986). *Cerebro, metáforas y modelos. Hacia un enfoque de sistemas biológicos*. Ed. CONACYT Mex. Vol. 3, pp. 3–157.
- Lokar, R.R. and Shohami, E. (2002). Cerebral ischemia and trauma—different etiologies and similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 39, 55–73.
- Li, X., von-Holtz, H., and Klavén, S. (2011a). Influence of gravity for optimal head positions in the treatment of head injury patients. *Acta. Neurochir. (Vienna)* 153, 2057–2064.
- Li, Y., Zhang, L., Kallakuri, S., Zhou, R., and Cavanaugh, J.M. (2011b). Quantitative relationship between axonal injury and mechanical response in a rodent head impact acceleration model. *J. Neurotrauma* 28, 1767–1782.
- Lucas, J.H. and Wolf, A. (1991). In vitro studies of multiple impact injury to mammalian CNS neurons: prevention of perikaryal damage and death by ketamine. *Brain Res.* 543, 181–193.
- Maas, A.I., Stocchetti, N., and Bullock, R. (2008). Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol.* 7, 728–741.
- Maqsood, M.I., Mattin, M.M., Bahrami, A.R., and Ghasrolidasht, M.M. (2013). Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment. *Cell. Biol. Int.* 37, 1038–1045.
- Marmarou, A., Foda, M.A., van den Brink, W., Campbell, J., Kita, H., and Demetriadou, K. (1994). A new model of diffuse brain injury

- In rats. Part I: pathophysiology and biomechanics. *J. Neurosurg.* 80, 291–300.
- Marshall, L.F., Marshall, S.B., Kizuber, M.R., van Berkum-Clark, M., Eisenberg, H., Jane, J.A., Luerssen, T.G., Marmarou, A., and Foulkes, M.A. (1992). The diagnosis of head injury requires a classification based on computed axial tomography. *J. Neurotrauma* 9, 5287–5292.
- Martínez-Vargas, M., Estrada-Rojo, F., Tabla-Ramón, E., Navarro-Arquelles, H., Ortiz-Lailson, N., Hernández-Chávez, A., Solís, B., Martínez-Tapia, R., Pérez-Arredondo, A., Morales-Gómez, J., et al. (2012). Sleep deprivation has a neuroprotective role in a traumatic brain injury of the rat. *Neurosci. Lett.* 529, 118–122.
- Martínez-Vargas, M., Morales-Gómez, J., González-Rivera, R., Hernández-Enriquez, C., Pérez-Arredondo, A., Estrada-Rojo, F., and Navarro, L. (2013). Does the neuroprotective role of anandamide display diurnal variations? *Int. J. Mol. Sci.* 14, 23341–23355.
- McAllister, T.W. (2011). Neurobiological consequences of traumatic brain injury. *Dialog. Clin. Neurosci.* 13, 287–300.
- Menon, D.K., Schwab, K., Wright, D.W., and Maas, A.I.; Demographics and Clinical Assessment Working Group of the International and Interagency Initiative toward Common Data Elements for Research on Traumatic Brain Injury and Psychological Health (2010). Position statement: definition of traumatic brain injury. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 91, 1637–1640.
- Morrison, B. 3rd., Mearns, D.F., and McIntosh, T.K. (1998). Mechanical characterization of an in vitro device designed to quantitatively injure living brain tissue. *Ann. Biomed. Eng.* 26, 381–390.
- Morrison, B. 3rd., Ceter, H.L., Banham, C.D., and Sundstrom, L.E. (2006). An in vitro model of traumatic brain injury utilizing two-dimensional stretch of organotypic hippocampal slice cultures. *J. Neurosci. Meth.* 150, 192–201.
- Morrison, B., Elkin, B.S., Dollé, J.P., and Yarmush, M.L. (2011). In vitro models of traumatic brain injury. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 12, 91–126.
- Nestler, E.J., Hyman, S.E., and Malenka, R.C. (2000). Seizures and Stroke. *Molecular Neuropharmacology. A Foundation for Clinical Neuroscience* (New York: McGraw-Hill), pp. 479–503.
- Rimez, R.W., Glordani, B., Barth, J.T., and Jane, J.A. (1982). Moderate head injury: completing the clinical spectrum of brain trauma. *Neurosurgery* 11, 344–351.
- Risdal, J.E. and Menon, D.K. (2011). Traumatic brain injury. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 366, 241–250.
- Saatman, K.E., Duhaime, A.C., Bullock, R., Maas, A.I., Valadka, A., Manley, G.T.; Workshop Scientific Team and Advisory Panel Members (2008). Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *J. Neurotrauma* 25, 719–738.
- Steg, F., Wahle, P., and Pape, H.C. (1999). Cellular reactivity to mechanical axonal injury in an organotypic in vitro model of neurotrauma. *J. Neurotrauma* 16, 1197–1213.
- Silva, R.F.M., Falcão, A.S., Fernandes, A., Gordo, A.C., Brito, M.A., and Brites, D. (2006). Dissociated primary nerve cell cultures as models for assessment of neurotoxicity. *Toxicol. Lett.* 167, 1–9.
- Silva, D.S., Brito, J.N., Ibiapina, I.D., Lima, M.F., Medeiros, A.R., Quilroz, B.H., Paiva, A.L., and Gódes, V.O. (2012). Closed head injury in rats: histopathological aspects in an experimental weight drop model. *Acta Cir. Bras.* 27, 290–294Q.
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SIVE) (2008). (Accessed: July, 5th 2017 in: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/data/file/13606/2008\\_sem26.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/data/file/13606/2008_sem26.pdf)).
- Sorns, O. (2011). *Networks of the Brain* (Cambridge, MA: MIT Press).
- Sorns, O. (2013). Structure and function of complex brain networks. *Dialog. Clin. Neurosci.* 15, 247–262.
- Stead, L.G., Wijdicks, E.F., Bhargava, A., Kashyap, R., Bellolo, M.F., Nash, D.L., Enduri, S., Scheers, R., and William, B. (2009). Validation of a new coma scale, the FOUR score, in the emergency department. *Neurocrit. Care* 10, 50–54.
- Stocchetti, N., Pagan, F., Calappi, E., Canavese, K., Baratta, L., Citaristi, G., Cormio, M., and Colombo, A. (2004). Inaccurate early assessment of neurological severity in head injury. *J. Neurotrauma* 21, 1133–1140.
- Teasdale, G. and Jennett, B. (1974). Assessment of coma and impaired consciousness: a practical scale. *Lancet* 2, 81–84.
- Trinidad, E.M. and Hlatky, R. (2008). Critical care of patient with traumatic brain and spine injury. *Irwin and Rippe's Intensive Care Medicine*, 6th ed. R.S. Irwin and J.M. Rippe, eds. (Philadelphia, PA: Lippincott, Williams & Wilkins), pp. 1878–1900.
- Trygona, D.H. and Good, T. (1999). Pulsatile shear stress leads to DNA fragmentation in human SH-SY5Y neuroblastoma cell line. *J. Physiol.* 515, 355–365.
- Wijdicks, E.F., Bamlet, W.R., Maramattam, B.V., Mannix, E.M., and McClelland, R.L. (2005). Validation of a new coma scale: the FOUR score. *Ann. Neurol.* 58, 585–593.
- Xiong, Y., Mahmood, A., and Chopp, M. (2013). Animal models of traumatic brain injury. *Nat. Rev. Neurosci.* 14, 128–142.
- Yu, Z. and Morrison, B. 3rd. (2010). Experimental mild traumatic brain injury induces functional alteration of the developing hippocampus. *J. Neurophysiol.* 103, 499–510.