

Departamento de Ciencias Biomédicas



**“Naltrexona promueve la expresión de
ED-1 en un modelo experimental de
traumatismo cerebral”**

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Dña. Teresa de Jesús Esteban Rojo

Dirigida por: Dra. Dña. María Inmaculada Almansa Frías

Dra. Dña. Rosa María López Pedrajas

VALENCIA

2016

Este trabajo ha sido realizado gracias a las ayudas de:

- Ministerio de Ciencia e Innovación: proyecto SAF 2010/21317.
- Ministerio de Sanidad y Consumo, Plan Nacional sobre Drogas: proyecto 2010/059.
- Beca Santiago Grisóla, de la Generalitat Valenciana.

AGRADECIMIENTOS

Hace ya varios años que hice mi entrada en un mundo completamente nuevo, a la vez que desconocido, y me embarqué en este proceso de “Tesis”. Por supuesto, este viaje no se realiza de forma autónoma ni en soledad, sino que hay muchas personas que acompañan a los doctorandos, y sin duda, ninguna tesis doctoral podría realizarse sin ellos. En mi caso, son tantos que no creo que estas líneas sean suficientes, para poder agradecer de verdad lo mucho que he recibido, pero voy a intentar mencionar a todos aquellos que han aportado su grano y/o sus bolsas de arena para que yo pudiese presentar este trabajo.

Voy a comenzar por mis compañeros de trabajo, que son los que más horas reales han pasado escuchándome, escuchándome y escuchándome, se merecen una mención especial sólo por ello.

Gracias Violeta por tus charlas de café con leche y tostadas con mantequilla, por tus consejos y sonrisas, tu eterna amabilidad y por enseñarme a derivatizar e introducirme en el maravilloso y tóxico mundo del HPLC, te esperaré en el Caribe con un mojito en la mano; a las S&S, las primas más “cracks” que he conocido nunca, gracias por vuestra amabilidad y por las bromas, los intercambios de anticuerpos como cromos, los figurines de papiroflexia, y las conversaciones a decibelios imposibles de escuchar para el oído humano, que han sido objeto de gran diversión (¡¿qué dios, qué dios?!); a Brenda, muchísimas gracias por ayudarme con el tema de la criolesión, las anestias y todo los procedimientos, de verdad he aprendido muchísimo contigo; a Raquel Álvarez gracias por los coros, porque eres la única que continuaba las estrofas de Luis Miguel conmigo cuando todavía dábamos los tratamientos a tus “locuelas”. Gracias también por ese libro tan chulo que todavía leo por las mañanas, me encanta; a Jaime, gracias por toooooodos los artículos que has conseguido para enriquecer mi bibliografía, por los “torneos” de padel, la paciencia sobrehumana con nosotras (vivir en un harén de “mujeres al borde de un ataque de tesis” no es fácil, yo lo sé), y el acompañamiento en silbiditos; a la Sebas, inseparable compañera “Club Disney”, contigo he conseguido no parecer la única que está como “una cafetera” sólo por el hecho de apreciar la infancia Disney (a pesar de todo lo malo que puede ser), gracias por esas charlas, viajes a casa, tardes de cine y resto de momentos de distensión y diversión; gracias a Aracely, por los desayunos amenos y divertidos, y por la fiesta que vamos a montar en Ibiza cuando sea doctora (tengo tu consentimiento, ¿verdad?); muchas gracias tengo que dar a Marivi. Sin tu ayuda nada de esto hubiese sido posible, porque gracias a ti yo fuí a Valencia y me encuentro donde estoy ahora. Gracias a ti, he aprendido a crecer como persona, y como científica, porque tú hiciste que existiese la posibilidad de entrar en la universidad, me ayudaste en los papeleos y, de esta forma, se puede decir que yo seré doctora porque tú has intercedido por mí.

Continuando con mis compañeros del sótano, es necesario que mencione a los vecinos de los laboratorios de al lado. María García, tengo que darte las gracias por instruirme en los vídeos de relajación vía internet, que durante este último tiempo nos han dado (y nos dan) tanto de qué hablar y reír, sobretodo reír, gracias por los viajes vegetativos en metro, las excursiones a la calle, el acompañamiento y traducción valenciano/castellano; María Maroto, gracias por tu amabilidad conmigo y muchas gracias por tu humor chachi, que es muy divertido, especialmente cuando hay de por medio bolas de papel que hacen efecto boomerang en la campana; Bego, gracias por enseñarme a cortar con el microtomo y a usarlo como si fuese sólo mío; Cris Linares, gracias por tus inmejorables bromas, dichos y expresiones, sin duda se trabaja mejor contigo y riendo; Laura Franch, no sé por dónde empezar...gracias por ayudarme con los western, los bloqueos (mentales y de anticuerpos), las diluciones, las vías de señalización, con el trabajo en general del laboratorio y con el día a día, eres una gran persona; gracias Juanjo, por ese humor y esas ensaimadas (la próxima vez que sean rellenas de sobrasada); Mariola, mi querida amiga. Sin duda, no puedo expresar todo lo que me has ayudado y de tantas formas, sólo puedo decirte: ¡Me encantan las torres de Serrano! GRACIAS por todo. Que Dios te lo pague mucho.

Gracias mi querida Ana por todos estos días de laboratorio, de fuera del laboratorio y por todos los días de después. Gracias por los paseos por Valencia, por las noches de cine, las interminables horas de conversaciones, los tomillitos en casa, los helados y tantas cosas que hemos vivido juntas. Vamo' que gracias por to'.

Quiero agradecer a los "jefísimos", sin los cuales yo no podría haber hecho este trabajo. Gracias a Javier, Jorge y María Miranda, por su dedicación y trabajo para con esta doctoranda.

Gracias Cris Rodríguez, porque a pesar de no estar en el labo con nosotros, has estado ahí para mí. Y me lo he pasado en grande contigo.

Obviamente tengo que agradecer a los técnicos de laboratorio Ana, Vanesa y Jose, pero en especial a Cris, porque siempre me ha tratado con mucho cariño y eso se nota.

Gracias también a nuestras ejecutivas de la limpieza y nuestro equipo de catering, porque siempre me han sacado una sonrisa, incluso en los peores días.

Gracias al personal administrativo que tanto me ha ayudado a regularizar mi situación, a presentar las matrículas en tiempo oportuno, y a hacer lo necesario para los "papeleos".

Es obligatorio agradecer a mis directoras Inma y Rosa su inmejorable trabajo en esta (nuestra) tesis. Sin lugar a dudas sois, para mí, las mejores directoras de tesis y gracias a Dios habéis dirigido la mía. Estoy muy agradecida por todas vuestra dedicación, por las correcciones,

por vuestro empeño en ayudarme, por todo, todo y todo. De verdad que espero que Dios os lo pague mucho, porque las tres sabemos cómo soy de desastre y a pesar de eso, seguís aquí conmigo. Me honra teneros como directoras y ser vuestra primera doctoranda. Muchas gracias.

Tengo que dar las gracias también a mi muy querida amiga Ester “La Faraona”. Has aguantado como una campeona todas mis movidas, ralladas, y lamentos durante todo este tiempo de tesis, ya fuera por teléfono, por mail, en persona, por medio de palomas mensajeras de MRW, o por cualquier medio de comunicación a mi alcance, después de todo lo que has visto de mí, aun así sigues a mi lado cuidándome, queriéndome y ayudándome en todo lo que te es posible, quitándole importancia a lo que no la tiene y destacando que siempre se puede hacer algo, siempre se puede mejorar, siempre hay que seguir adelante, y cuando algo parece que no tiene solución “no pasa nada”, se reza mucho y se solucionará cuando tenga que ser; por todo esto y mucho más tengo que darte las gracias, eres una gran amiga.

Gracias Lucia (mi mulata preferida), porque a pesar de tooooooo lo que significa hacer una tesis, que bien lo sabes tú también, me has ayudado soportándome en casa, en la familiaridad del día a día. He aprendido mucho contigo y de ti, y me lo he pasado genial contigo.

No puede faltar mi familia postiza, Santiago y Amparo, muchas gracias por tratarme como si fuese una hija más, ha sido una bendición haber estado con vosotros y estoy segura que Dios os lo pagará (yo así se lo pido). Muchas gracias a Tere y Pablo, mis grandes amigos que han cuidado de mí cuando más lo he necesitado y me han querido a pesar de todo; Paula, muchas gracias por ser tan buena conmigo, por hacerme la vida más fácil en casa sólo con tu presencia y por todo lo haces por mí; me quedan los pequeños Gracia, Juan, Jesús y David, gracias a mis hermanos postizos, nunca había tenido hermanos pequeños como vosotros y ha sido de lo más divertido, me lo he pasado en grande con vosotros y vuestras bromas adolescentes.

Es necesario que esté por escrito, lo muy agradecida que estoy a mi familia. A mis padres Fulgencio y Araceli, mis hermanos Alberto y Sara, Carlos, Francisco e Isabel, Salvador e Isabel, Miriam y Pilar, y los pequeños de la familia, Sofía, Paula, Juan, Elena, Daniel y Andrés, que aunque no tengan conciencia, el mero hecho de su existencia hace yo piense las cosas de otra forma, y así me han ayudado a seguir adelante. Y es estrictamente necesario que desglose estos agradecimientos.

A mis padres tengo que agradecer no sólo la educación que me han dado, sino el infinito amor y cariño que he recibido, y sobre todo estoy muy agradecida por la herencia que me han dejado para disfrutar en vida: la Fe. Muchas gracias Papá, por todo lo que has hecho, y haces,

por mí, eres un gran hombre, estoy muy orgullosa de ser tu hija y mucho más de tenerte como modelo a seguir. No puedo explicar exactamente lo que quiero decir, porque no hay palabras suficientes para describir lo excepcional que eres, lo muchísimo que me ayudas en general y lo mucho que me has ayudado con esta tesis, en particular. Y muchas gracias a ti, Mamá (sé que antes de publicar esta tesis ya estás leyendo este párrafo y por eso espero que lo disfrutes). Muchas gracias por pelear por mí, por darme la vida, por ayudarme a crecer en estatura, inteligencia y sabiduría, por estar siempre a mi lado (especialmente ahora que estás en todos lados), por cuidarme, arroparme, por velar, por rezar e interceder por mí. Muchas gracias por enseñarme a amar de verdad, eres una gran maestra.

Muchísimas gracias a mis hermanos Alberto y Sara. También os habéis llevado buena parte de mis penurias y me habéis ayudado a sobrellevarlas con una actitud de madurez. Gracias Sara por todo lo que me has ayudado con tus consejos filosóficos aplicados a la realidad, y gracias por los tupperes de arroces valencianos. Alber, muchas gracias por todo, eres un gran ejemplo de superación, constancia y paciencia. Muchísimas gracias a mis hermanos Fran e Isa. Por todas esas veces que no he sabido qué hacer y me habéis acogido, me he sentido “como en casa” con vosotros. Muchísimas gracias a mis hermanos Carlos, Isa y Salva, Miriam y Pilar, que a pesar de la distancia, han estado y siguen ahí. Siempre ayudándome con la oración, con perseverancia y todo lo demás.

Quiero agradecer también a todos los que han rezado y rezan por mí, porque sin esa oración me habría rendido hace años. Gracias a todos mis hermanos de Comunidad de Valencia, de Madrid, de Buenos Aires y de San Francisco. Y en especial, gracias a mis Hermanitas y Hermanitos del Cordero, porque son casi santos (aunque ellos digan que no lo son). Me han ayudado (y me ayudan) tanto, tanto, que ojalá Dios les dé el 100x1, porque sé que soy una pesada y aun así, siempre me han tratado con amor, han tenido compasión de mí y me han dado una palabra para seguir adelante.

Por último, pero no por ello menos importante, quiero darle las gracias la Virgen María, Madre de los Desamparados, a quién tantas veces he recurrido y siempre he hallado consuelo. Y gracias a Dios. Sí. Gracias Señor, Dios de misericordia, porque no me has dejado en ningún momento de esta tesis y porque gracias a ti TODO se puede. Esta tesis ha sido posible única y exclusivamente porque Tú así lo has querido, y así has puesto a todas estas personas para que de alguna forma u otra todo se hiciera.

Y gracias a Dios esto se acabará.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS | 1 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 5 |
| I.INTRODUCCIÓN | 9 |
| 1. Corteza frontal | 11 |
| 2. Hipocampo | 12 |
| 3. División microscópica del Sistema Nervioso | 14 |
| 3.1 Las neuronas | 14 |
| 3.2 Células Gliales | 15 |
| 3.2.1 Macroglía | 16 |
| 3.2.1.1 Oligodendroglía | 16 |
| 3.2.1.2 Células de la glía radial | 17 |
| 3.2.1.3 Astroglía | 18 |
| 3.2.2 Microglía | 20 |
| 3.2.3 Células Ependimarias | 21 |
| 4. Traumatismo craneoencefálico | 22 |
| 4.1 Epidemiología del traumatismo craneoencefálico | 22 |
| 4.2 Fisiopatología del traumatismo craneoencefálico | 23 |
| 4.3 Modelo de Criolesión | 24 |
| 5. Estrés oxidativo. Radicales libres | 25 |
| 5.1 Papel fisiológico de los radicales libres | 27 |
| 5.2 Papel patogénico de los radicales libres | 27 |
| 5.3 Generación de radicales libres | 27 |
| 5.4 Peroxidación lipídica | 28 |
| 5.4.1 Productos de la peroxidación de lípidos | 29 |
| 5.4.2 Malondialdehído | 29 |

| | |
|---|-----------|
| 6. Defensas antioxidantes | 30 |
| 6.1 El sistema glutatión | 31 |
| 7. Trauma y estrés oxidativo | 31 |
| 8. Neurogénesis | 33 |
| 8.1 Trauma y neurogénesis | 33 |
| 9. Factores de transcripción y citoquinas | 34 |
| 9.1 Factor Nuclear Kappa B | 34 |
| 9.1.1 Lesión cerebral y NF- κ B | 36 |
| 9.2 Proteína quinasa A | 37 |
| 9.2.1 Lesión cerebral y PKA | 38 |
| 9.3 Proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc | 38 |
| 9.3.1 Lesión cerebral y CREB | 40 |
| 9.4 Quinasa reguladora de señales extracelulares | 41 |
| 9.4.1 Lesión cerebral y ERK | 42 |
| 9.5 Factor Neurotrófico Ciliar | 43 |
| 9.5.1 Lesión cerebral y CNTF | 44 |
| 9.6 Proteína activadora de neutrófilos 2 o quimiocina CXC ligando 7 | 45 |
| 9.6.1 Lesión cerebral y CXCL-7 | 46 |
| 9.7 Molécula soluble de adhesión intercelular tipo 1 | 47 |
| 9.7.1 Lesión cerebral y sICAM-1 | 49 |
| 9.8 Selectina Leucocitaria | 50 |
| 9.8.1 Lesión cerebral y CD62L | 51 |
| 9.9 Fractalquina | 52 |
| 9.9.1 Lesión cerebral y CX3CL-1 | 53 |

| | |
|--|----|
| 10. Naltrexona | 54 |
| 10.1 Naltrexona como tratamiento antioxidante y antiinflamatorio | 56 |
| II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 61 |
| III. MATERIAL Y MÉTODOS | 63 |
| 1. Tratamiento de los animales | 65 |
| 1.1 Condiciones de estabulación | 65 |
| 1.2 Manejo de los animales | 65 |
| 2. Diseño experimental | 66 |
| 3. Administración de bromodeoxiuridina (BrdU) | 67 |
| 4. Obtención de muestras | 68 |
| 4.1 Suero | 68 |
| 4.2 Cerebro | 69 |
| 5. Procedimientos analíticos | 69 |
| 5.1 Determinación de proteínas | 69 |
| 5.2 Determinación de malondialdehído | 70 |
| 5.3 Determinación de glutatión | 72 |
| 5.4 Análisis de proteínas mediante la técnica de Western-Blot | 73 |
| 5.5 Estudios inmunohistoquímicos | 76 |
| 5.5.1 Inmunohistoquímica de BrdU | 76 |
| 5.6 Análisis de citoquinas | 77 |
| 5.7 Estudio estadístico | 79 |
| 5.7.1 Estadística descriptiva | 79 |
| 5.7.2 Pruebas estadísticas | 79 |
| IV. RESULTADOS | 81 |
| 1. Marcador de la actividad fagocítica (ED-1) en cerebro | 83 |

| | |
|---|-----|
| 2. Estrés oxidativo y defensas antioxidantes | 84 |
| 2.1 Determinación de MDA | 84 |
| 2.1.1 Determinación de MDA en suero | 85 |
| 2.1.2 Determinación de MDA en homogenado de cerebro | 85 |
| 2.2 Determinación de glutatión en homogenado de cerebro | 86 |
| 2.3 Determinación de glutamato en homogenado de cerebro | 88 |
| 3. Estudio de supervivencia celular en cerebro: inmunohistoquímica de BrdU | 89 |
| 4. Estudio de los factores de transcripción y de las citoquinas | 91 |
| 4.1 Factor nuclear kappa B (NF- κ B) | 91 |
| 4.2 Proteína quinasa A (PKA) | 92 |
| 4.3 Elemento de respuesta a la unión de AMPc (CREB) | 93 |
| 4.4 Quinasa reguladora de señales extracelulares (ERK) | 94 |
| 4.5 Factor neurotrófico ciliar (CNTF) | 96 |
| 4.6 Proteína activadora de neutrófilos 2 (NAP-2/CXCL-7) | 97 |
| 4.7 Molécula soluble de adhesión intercelular tipo 1 (sICAM-1) | 98 |
| 4.8 Selectina Leucocitaria (CD62L) | 99 |
| 4.9 Fractalquina (CX3CL-1) | 100 |
| V. DISCUSIÓN | 101 |
| 1. Marcador de la actividad fagocítica: ED-1 | 103 |
| 2. Estrés oxidativo: Peroxidación Lipídica y Defensas Antioxidantes | 105 |
| 3. Supervivencia celular | 106 |
| 4. Factores de transcripción y citoquinas | 107 |
| 4.1 Factor Nuclear Kappa B (NF- κ B) | 107 |
| 4.2 Proteína quinasa A (PKA) | 108 |
| 4.3 Proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc (CREB) | 109 |

| | |
|--|------------|
| 4.4 Quinasa reguladora de señales extracelulares (ERK) | 111 |
| 4.5 Factor Neurotrófico Ciliar | 112 |
| 4.6 Proteína activadora de neutrófilos 2 | 113 |
| 4.7 Molécula soluble de adhesión intercelular tipo 1 | 114 |
| 4.8 Selectina Leucocitaria | 115 |
| 4.9 Fractalquina | 116 |
| VI. CONCLUSIONES | 123 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 127 |

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Distribución de las diferentes capas celulares de la corteza frontal | 11 |
| Figura 2: Distribución de las zonas del hipocampo en un hipocampo de rata | 13 |
| Figura 3: Dibujo de la estructura general de una neuronas | 15 |
| Figura 4: Dibujo de las células de la glía rodeando una neurona | 16 |
| Figura 5: Dibujo de un oligodendrocito | 17 |
| Figura 6: Dibujo de las células de la glía radial | 18 |
| Figura 7: Dibujo de los diferentes astrocitos | 19 |
| Figura 8: Dibujo de una célula de la microglía | 20 |
| Figura 9: Estructura química del MDA | 29 |
| Figura 10: Ruta de señales de NF- κ B. Diferentes estímulos pueden inducir la activación de NF- κ B por activación de I κ B quinasa (1), la cual fosforila a I κ B (2), y la marca para su ubiquitinación. El NF- κ B libre se trasloca al núcleo (3) y activa la expresión de genes (4) | 35 |
| Figura 11: Funciones relacionadas con la activación de PKA | 37 |
| Figura 12: Rutas y eventos que intervienen en la activación de CREB | 39 |
| Figura 13: Rutas y eventos que intervienen en la activación de ERK1/2 | 42 |
| Figura 14: Rutas y eventos en los que intervienen la activación de CNTF | 44 |
| Figura 15: Rutas y eventos en los que intervienen la activación de CXCL-7 | 46 |
| Figura 16: Rutas y eventos que intervienen en la activación de sICAM-1 | 49 |
| Figura 17: Reclutamiento y migración leucocitaria promovida por las Selectinas | 51 |
| Figura 18: Unión de Fractalquina con su receptor, intercomunicación neurona-microglía | 53 |
| Figura 19: Estructura molecular de la naltrexona | 55 |
| Figura 20: Imagen del cráneo de una rata Wistar | 66 |
| Figura 21: Lámina de un corte coronal de un cerebro de rata indicando la posición y extensión de la lesión realizada | 67 |

| | |
|---|----|
| Figura 22: Imagen esquemática del experimento por días | 68 |
| Figura 23: Western Blot de la proteína ED-1 en homogenado de cerebro. β Actina como control de carga. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt) | 83 |
| Figura 24: Gráfica de la cuantificación del Western Blot de la expresión de ED-1 en homogenado de cerebro en los grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt) | 84 |
| Figura 25: Concentración de MDA (μ M) en suero. Grupos Trauma (T), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) | 85 |
| Figura 26: Concentración de MDA (nmol/mg prot) en la zona de la lesión y la zona contralateral, en homogenado de cerebro. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt) | 86 |
| Figura 27: Concentración de GSH (nmol/mg prot) en la zona de la lesión y la zona contralateral, en homogenado de cerebro. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt) | 87 |
| Figura 28: Concentración de GSSG (nmol/mg prot) en la zona de la lesión y la zona contralateral, en homogenado de cerebro. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt) | 87 |
| Figura 29: Ratio GSH/GSSG en la zona de la lesión y la zona contralateral, en homogenado de cerebro. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt) | 88 |
| Figura 30: Concentración de Glutamato (nmol/mg prot) en la zona de la lesión y la zona contralateral, en homogenado de cerebro. Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt) | 89 |
| Figura 31: Expresión de células BrdU positivas (n° cel BrdU positivas/ μ m ²). Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx), Trauma + Naltrexona Contralateral. (T+Ntx clt) | 90 |
| Figura 32: Expresión de células BrdU positivas en tejido cerebral (n° cel BrdU positivas/ μ m ²) en las zonas de la lesión y sus lados contralaterales (20x) | 90 |
| Figura 33: Western Blot de la proteína NF- κ B (p65) en homogenado de cerebro. β Actina como control de carga. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt) | 91 |

Figura 34: Gráfica de la cuantificación del western blot de la expresión de NF- κ B (p65) en homogenado de cerebro, en los grupos Trauma (T), Trauma contralateral (T clt), Trauma Naltrexona (T+Ntx) y Trauma Naltrexona contralateral (T+Ntx clt)

92

Figura 35: Western blot de la proteína PKA en homogenado de cerebro. β Actina como control de carga. Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral

92

Figura 36: Gráfica de la cuantificación del western blot de la expresión de PKAc α en homogenado de cerebro, en los grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral

93

Figura 37: Western blot de las proteínas pCREB, CREB en homogenado de cerebro. β Actina como control de carga. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt)

94

Figura 38: Gráfica de la cuantificación del western blot de la expresión de pCREB en homogenado de cerebro, en los grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt)

94

Figura 39: Western Blot de las proteínas pERK, ERK en homogenado de cerebro. β Actina como control de carga. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt)

95

Figura 40: Gráfica de la cuantificación del western blot de la expresión de pERK 42 homogenado de cerebro, en los grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt)

95

Figura 41: Rat Cytokine Array Panel A de la proteína CNTF, en homogenado de cerebro. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt)

96

Figura 42: Gráfica de la cuantificación de la proteína CNTF, en homogenado de cerebro, en los grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt)

96

Figura 43: Rat Cytokine Array Panel A de la proteína CXCL-7 en homogenado de cerebro. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt)

97

Figura 44: Gráfica de la cuantificación de la proteína CXCL-7 en homogenado de cerebro, en los grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt)

97

Figura 45: Rat Cytokine Array Panel A de la proteína sICAM-1 en homogenado de cerebro. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt)_____98

Figura 46: Gráfica de la cuantificación de la proteína sICAM-1 en homogenado de cerebro, en los grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt)_____98

Figura 47: Rat Cytokine Array Panel A de la proteína sICAM-1 en homogenado de cerebro. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt)_____99

Figura 48: Gráfica de la cuantificación de la proteína CD62L en homogenado de cerebro, en los grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt)_____99

Figura 49: Rat Cytokine Array Panel A de la proteína CX3CL-1 en homogenado de cerebro. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt)_____100

Figura 50: Gráfica de la cuantificación de la proteína CX3CL-1 en homogenado de cerebro, en los grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt)_____100

Tabla 1: Lista de anticuerpos empleados en la realización de western blot _____75

Tabla 2: Lista de anticuerpos secundarios empleados en la realización de western blot _____75

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC: Complejo avidina-biotina

ADN: Ácido desoxiribonucleico

AMPc: Adenosin monofosfato ciclico

ATP: Adenosin trifosfato

BrdU: Bromodesoxiuridina

BSA: Albunima serica bovina

CaMIV: Enzima calmodulina dependiente de calcio IV

CD62L: Selectina leucocitaria

CNTF: Factor neutrifico ciliar

CRE: Elemento de respuesta de AMPc

CREB: Proteina de union a CRE (al elemento de respuesta de AMPc)

CX3CL-1: Fractalquina

CXCL-7: Quimiocina CXC ligando 7

ERK: Enzima quinasa dependiente de senales extracelulares

GD: Giro dentado del hipocampo

GFAP: Proteina glial fibrilar acida

GSH: Glutacion (forma reducida)

GSSG: Glutacion (forma oxidada)

HNE: 4-hidoxinonenal

HPLC: Cromatografia liquida de alta resolucion

ICAM-1: Molecula de adhesion intercelular tipo 1

IL-10: Interleuquina 10

IL-11: Interleuquina 11

IL-1 β : Interleuquina 1 β

IL-3: Interleuquina 3

IL-4: Interleuquina 4

IL-6: Interleuquina 6

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógenos

MDA: Malondialdehído

NADPH: Nicotinamida adenine dinucleótido fosfato

NAP-2: Proteína activadora de neutrófilos 2

NFκB: Factor nuclear kappa B

Ntx: Naltrexona

OH: Radical hidroxilo

PB: Tampón fosfato

PBS: Tampón fosfato salino

PFA: Paraformaldehído

PKA: Proteína quinasa A

PSGL-1: Glicoproteína selectina plaquetaria ligando 1

RL: Radicales libres

sICAM-1: Molécula soluble de adhesión intercelular tipo 1

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirido

SN: Sistema nervioso

SNC: Sistema nervioso central

TBARS: Ácido tiobarbitúrico

TCE: Traumatismo craneoencefálico

TLR4: Receptor tipo toll 4

TNF-α: Factor de necrosis tumoral α

*“Nada te turbe, nada te espante;
todo se pasa, Dios no se muda;
la paciencia todo lo alcanza.
Quién a Dios tiene, nada le falta.
Sólo Dios basta.”*

Santa Teresa de Jesús

I. INTRODUCCIÓN

1. Corteza frontal

La corteza frontal es la capa más externa del tejido cerebral, y está formada por seis capas celulares con diferente distribución y funciones específicas (Kwan et al., 2012). De la capa más superficial a la más interna se dividen en: capa molecular, capa granular externa, capa piramidal externa, capa granular interna, capa piramidal interna y capa multiforme (Figura 1). Se forman durante el desarrollo embrionario; las células migran y se establecen en diferentes regiones, formando capas, que contienen un único subconjunto de neuronas (Jones, 1986; DeFelipe & Farinas, 1992), capaces de mediar en las tareas cognitivas y motoras complejas (Kwan et al., 2012).

La corteza frontal está relacionada con la toma de decisiones y con procesos emocionales (Kwan et al., 2012), además de estar implicada en la memoria de trabajo, sensorial y motora (Bechara, et al., 2000; Bisley et al., 2004; Fuster, 2006; Fuster, 2009; Taylor and Ivry, 2012).

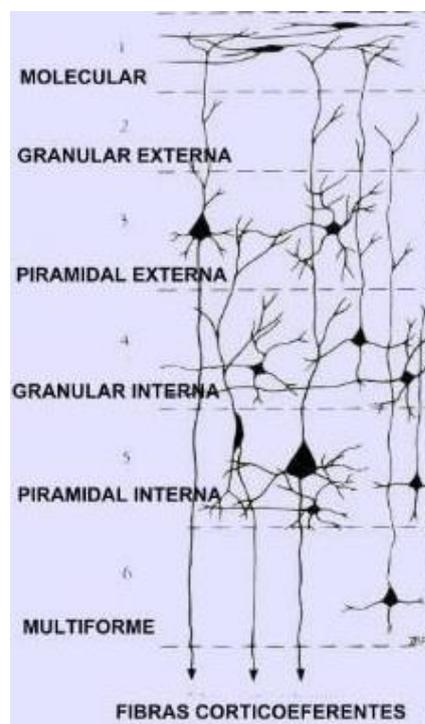


Figura 1. Distribución de las diferentes capas celulares de la corteza frontal. (Adaptado de Kwan et al., 2012).

La corteza prefrontal, incluye casi una cuarta parte de toda la corteza cerebral y está ubicada en las superficies lateral, medial e inferior del lóbulo frontal. Se subdivide funcionalmente en corteza dorsoventral y orbitofrontal, aunque ambas regiones forman parte de un único sistema que, en condiciones normales, trabaja de forma coordinada (Tirapu-Ustarroz & Muñoz-Céspedes, 2005) enviando y recibiendo información de todos los sistemas sensoriales y motores.

Se ha asociado con las funciones cognitivas empleadas en el manejo del conocimiento social, como área asociativa (Vendrell et al., 1995; Brod et al., 2013), la atención selectiva y la formación de conceptos, y también se ha asociado con actividades cognitivas como la memoria de trabajo (Bechara et al., 2000; van Kesteren et al., 2012), donde desempeña un papel fundamental en la organización, búsqueda, selección y verificación del recuerdo de la información almacenada en el hipocampo (Shimamura, 2000; van Kesteren et al., 2012; Brod et al., 2013).

2. Hipocampo

El hipocampo es una región de la corteza cerebral que se curva a lo largo del ventrículo lateral y forma parte del sistema límbico, la parte emocional del cerebro, y participa en la memoria y en la orientación espacial. Anatómicamente, el hipocampo puede dividirse en dos regiones: hipocampo propio (o “Cuerno de Ammon”) y Giro Dentado (GD) (Figura 2).

El GD es una región cortical que consta de tres capas (Insausti & Amaral, 2012), de exterior a interior son:

- Capa molecular: en esta capa se localizan las prolongaciones dendríticas apicales de las neuronas granulares, algunas interneuronas y células gliales.
- Capa granular: formada por los somas de las células granulares empaquetados densamente en columnas.

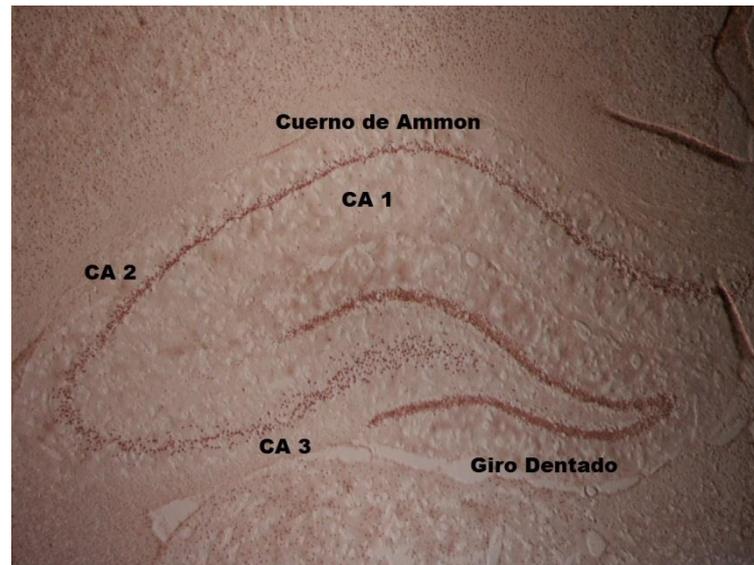


Figura 2. Distribución de las zonas del hipocampo en un hipocampo de rata (Adaptado de Ramon y Cajal, 1909).

- Capa polimorfa o hilus: es la capa más profunda del GD, está compuesta por una gran variedad de tipos celulares, entre las cuales las predominan las células musgosas (Ribak et al. 1985; Amaral & Witer, 1989).

Entre la capa granular y el hilus se puede distinguir una fina capa, la Zona Subgranular, compuesta por precursores neurales que poseen actividad proliferativa durante la vida adulta (Seri et al., 2001; Ming & Song, 2005; Curtis et al., 2007).

El hipocampo propio o Cuerno de Ammon está dividido en tres áreas: CA1 (la zona más distal), CA2 y CA3 (zonas más proximales) (Lorente de No', 1933). El principal tipo celular del Cuerno de Amón son las células piramidales, que tienen un soma voluminoso y fusiforme.

Se ha demostrado que el hipocampo es una región fundamental para la orientación espacial (Zatorre et al. 2013), en los seres vivos, y además también participa en procesos de asociación. Además cumple un papel fundamental en la memoria y el aprendizaje (McKenzie et al., 2013), específicamente, ejerce una función determinante en el almacenamiento de la información nueva antes de que ésta se

consolide (Squire, 1992; Fanselow & Poulos, 2005; Bouton et al., 2006; Albouy et al., 2013).

3. División microscópica del Sistema Nervioso

Las sustancias gris y blanca están compuestas por los cuerpos celulares y axones de las células que forman el tejido del Sistema Nervioso Central (SNC). Existen diferentes tipos de células que forman este tejido nervioso. Estas células, principalmente se dividen en tres tipos, que son: las neuronas, las células gliales y las células endoteliales.

3.1 Las neuronas

Las neuronas son las células encargadas de transmitir el impulso nervioso a través de todo el Sistema Nervioso (SN). Se forman a partir de células madre, a lo largo de toda la vida de los seres vivos. Contribuyen a desarrollar todo tipo de funciones específicas en el cerebro y tienen un papel muy importante en la plasticidad neuronal (van Praag et al., 2002; Pascual-Garvi et al., 2004; Merkle et al., 2007; Toni et al., 2007).

Existen diferentes tipos de neuronas según su morfología y función (Guyton & Hall, 2000 B), pero a pesar de las diferencias de morfología y función que puedan tener, la estructura general es similar en todas (Figura 3). Poseen un cuerpo celular, llamado soma, que contiene el núcleo, y desde este soma se proyectan dos tipos de prolongaciones diferentes llamadas neuritas, y son: las dendritas y los axones (Ramón y Cajal, 1988). Las dendritas son de mayor grosor que los axones, tienen la misma composición que el soma y reciben el impulso nervioso, el cual viaja hasta el soma (Peters et al., 1991). Los axones, por otra parte, son los encargados de transmitir el impulso nervioso desde el soma hasta el cono sináptico, modulado por neurotransmisores (Nieuwenhuys, 1998).

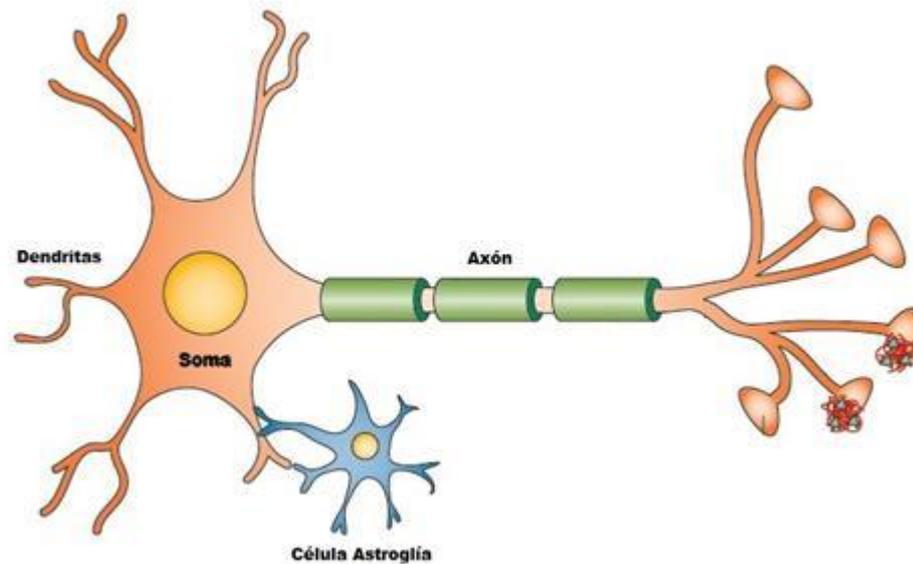


Figura 3. Dibujo de la estructura general de una neurona (Ramón y Cajal, 1988)

3.2 Células Gliales

Las células gliales pueden definirse como las células del tejido nervioso que no son neuronas (Figura 4). Son más pequeñas que las neuronas, y existen una mayor proporción con respecto a estas últimas. Poseen algunos componentes bioquímicos específicos por los cuales se distinguen de otras células (Bradford, 1988).

Según su tamaño se dividen en macroglía (estas células miden entre $5\mu\text{m}$ y $20\mu\text{m}$) y microglía (miden entre $2\mu\text{m}$ y $3\mu\text{m}$).

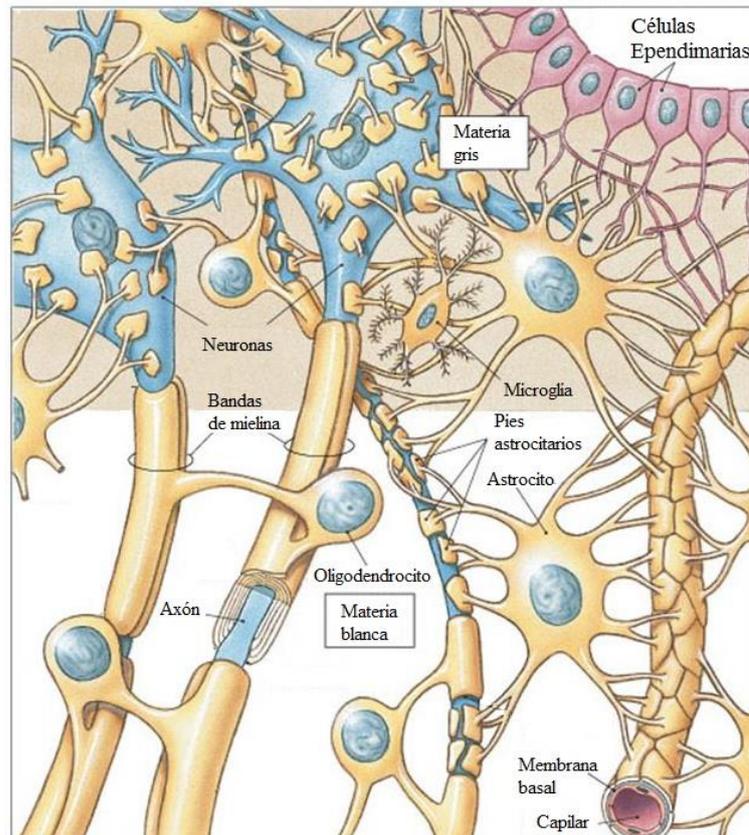


Figura 4. Dibujo de las células de la glía rodeando una neurona. (Adaptado de Marieb & Hoehn, 2003).

3.2.1 Macroglía

Principalmente cumple una función de sostén mecánico de las neuronas y se compone por la oligodendroglía, la glía radial y la astrogía (Bradford, 1988).

3.2.1.1 Oligodendroglía: Son células con un número reducido de prolongaciones finas ramificadas solo en sus extremos (Figura 5), se forman en el ectodermo durante la formación embrionaria (Liu et al., 2000). Se hallan en la sustancia blanca y en la sustancia gris: la oligodendroglía interfascicular (sustancia blanca), y la oligodendroglía satélite (sustancia gris). Forman la vaina de mielina aislante alrededor de los axones del SNC (Zatorre et al., 2013).



Figura 5. Dibujo de un oligodendrocito. (Adaptado de Schünke et al., 2011).

3.2.1.2 Células de la glía radial: Estas células poseen una forma alargada, con largas prolongaciones que se extienden hasta otras células neurales o contactando con los vasos sanguíneos (Figura 6), y sirven de guía para que las neuronas migren a su destino (Rakic, 1988). Estas células aparecen durante el desarrollo encefálico para transformarse después en otros tipos gliales (como por ejemplo astrocitos) a medida que madura el cerebro. Al menos hay dos tipos de glía radial que sobreviven en el cerebro adulto: las células de Müller y la glía de Bergmann (Hartfuss et al, 2003). Las células de Müller se hallan en la retina, son muy alargadas y se extienden entre las membranas limitantes interna y externa de la misma. Los cuerpos celulares de la glía de Bergmann se sitúan en la capa de células de Purkinje del cerebelo adulto y extienden sus prolongaciones a través de la capa molecular hasta la membrana pial, donde forman terminales cónicos (Nieuwenhuys et al, 1998).

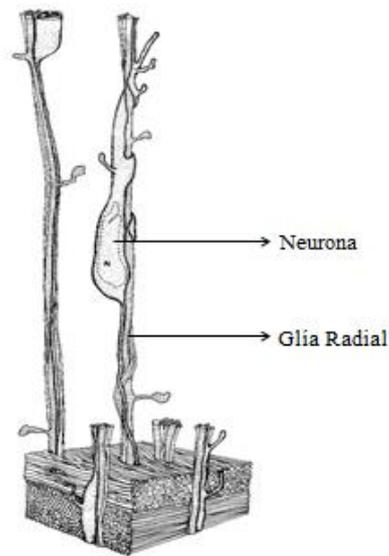


Figura 6. Dibujo de las células de la glía radial. (Adaptado de Schünke et al., 2011).

3.2.1.3 Astroglía: Son células de sostén de la neuroglía, que se caracterizan por tener morfología estrellada muy ramificada. Se encuentran en el cerebro y en la médula espinal (Chaboub & Deneen, 2012). Las células de la astroglía son de origen neuroectodérmico, al igual que las neuronas. Se localizan tanto en la sustancia gris como en la sustancia blanca y forman poblaciones diferentes y características para cada centro nervioso, aunque todas ellas se pueden detectar mediante anticuerpos frente a proteína glial fibrilar ácida (GFAP).

Entre los astrocitos se pueden distinguir dos poblaciones diferenciadas: los astrocitos fibrosos y los protoplasmáticos (Ramon y Cajal, 1909; Sofroniew & Vinters, 2010) (Figura 7):

- Los astrocitos fibrosos o fibrilares se encuentran en la sustancia blanca. Tienen pocas ramificaciones y su cuerpo celular es largo y liso. Presentan un núcleo regular, nucléolo poco patente y carioplasma bastante denso, con la envoltura nuclear dilatada.
- Los astrocitos protoplásmicos se pueden ver en la sustancia gris. Tienen la superficie de su cuerpo celular y sus ramificaciones muy irregulares, debido a que se

encuentran en un medio muy poblado de neuronas y por tanto han tenido que adaptarse morfológicamente a esta carencia de espacio.

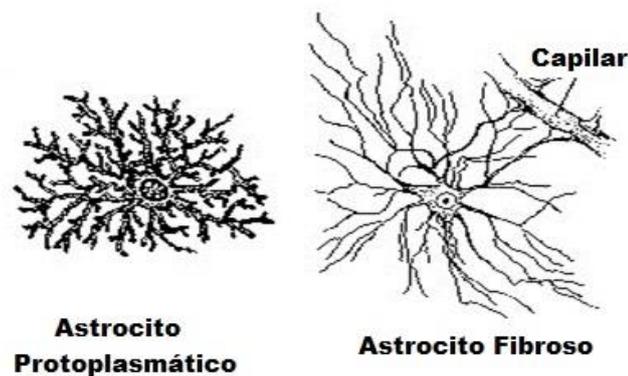


Figura 7. Dibujo de los diferentes astrocitos. (Adaptado de Schünke et al., 2011).

En cuanto a las funciones de estas células hay que destacar:

- Mantienen la barrera hematoencefálica. En la separación del parénquima nervioso del medio sanguíneo intervienen tres elementos estructurales: el endotelio de los capilares, la lámina basal de los capilares y los pies vasculares astrocitarios (Golgi, 1886), y aislamiento del tejido nervioso de los elementos mesodérmicos; separan las meninges del tejido nervioso por la membrana glial limitante externa y recubren los vasos sanguíneos cerebrales.

- Aíslan distintas áreas de la superficie neuronal, especialmente las zonas no implicadas en contactos sinápticos, desarrollan un envoltorio alrededor de determinados contactos sináptico y participan en la eliminación del exceso de neurotransmisores liberados durante la transmisión sináptica.

- Intervienen en la transmisión de información y en la sinapsis (Allen & Barres, 2009; Matyash & Kettenmann, 2010; Sofroniew & Vinters, 2010).

- Acumulan glucógeno como reserva y fuente de glucosa, para utilizar en caso de necesidad, y suministran nutrientes al SN, mantienen el balance iónico extracelular.

- Ayudan en la reparación y cicatrización de heridas traumáticas del SN (Fawcett & Asher, 1999; Nedergaard et al., 2003; Pascual-Garvi et al., 2004; Pellerin

et al., 2007; Barres, 2008), mediante la formación de una cicatriz glial alrededor de la zona lesionada, aislándola del resto de tejido nervioso (Sofroniew, 2005; Sofroniew, 2009).

- Originan diversas sustancias como interleuquinas y neurotrofinas, las cuales a su vez condicionan el desarrollo, funcionamiento y respuesta de los astrocitos a la lesión, y establecen sus relaciones tróficas con las neuronas, tanto en las zonas lesionadas como en las intactas (Sofroniew, 2009).

3.2.2 Microglía

La microglía se encuentra en todas las regiones del SNC. Se caracteriza por poseer un cuerpo pequeño y alargado. El citoplasma extiende largas prolongaciones que se ramifican a su vez, dándole a la célula un aspecto espinoso (Ribak et al., 2009) (Figura 8), aunque, en algunas ocasiones específicas, puede cambiar su morfología, redondearse y transformarse en corpúsculos granulados, que son capaces de fagocitar sustancias de desecho gracias a su movimiento ameboide (Kreutzberg, 1996; Davalos et al., 2005).

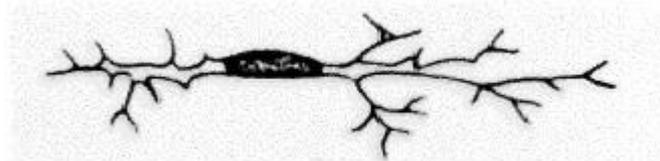


Figura 8. Dibujo de una célula de la microglía. (Adaptado de Schünke et al., 2011).

Participan en procesos inflamatorios y degenerativos, y por ello se las denomina células de arrastre o limpieza (Streit, 1995). En el cerebro en desarrollo aparecen como cuerpos amorfos, que establecen contactos con neuronas y astrocitos (Eyo & Wu, 2013) y ante una lesión o infección, se asemejan a macrófagos, ya que migran a las zonas afectadas, proliferan y se hacen fagocíticos (Del Río-Hortega, 1949; Kreutzberg,

1996; Hanisch & Kettenmann, 2007; Ransohoff & Perry, 2009). Las células de la microglía que no se transforman inmediatamente en fagocíticas, pueden revertir al estado de reposo si la lesión es leve o reversible (Pascual-Garvi, 2004).

Para su identificación en el cerebro se utilizan diversos anticuerpos, entre ellos, CD68 (ED-1), una proteína lisosomal presente en las células de la microglía, en los macrófagos y fagocitos mononucleares (Graeber et al., 1990; Slepko & Levi 1996).

La microglía activada libera factores de crecimiento polipeptídicos y citoquinas que estimulan la proliferación de células endoteliales capilares del cerebro, además libera factores neurotróficos (Kierdorf & Prinz, 2013) iniciando mecanismos de reparación, promoviendo el crecimiento de nuevas neuritas y favoreciendo la neurogénesis en el hipocampo y la zona subventricular (Walton et al., 2006; Ziv et al., 2006; Cunningham et al., 2013). Sin embargo, la actividad de la microglía puede contribuir, paradójicamente, a la muerte de las neuronas. La microglía, además de liberar factores de crecimiento y citoquinas neuroregenerativas, también libera diferentes enzimas y citoquinas durante la inflamación, que resultan tóxicas para la supervivencia de las nuevas neuronas (Ekdahl et al., 2003; Monje et al., 2003; Kierdorf & Prinz, 2013), y consecuentemente, puede dar lugar a muerte celular y por ende contribuir a la aparición de algunas enfermedades neurológicas (Ribak et al., 2009).

3.2.3 Células Ependimarias

Las células ependimarias derivan, en parte, de las células de la glía radial, y se caracterizan por revestir las paredes de los ventrículos y el conducto central de la médula espinal (Del Bigio, 1995; Spassky et al., 2005), formando una única capa de células cúbicas o cilíndricas que poseen microvellosidades y cilios (Doetsch et al., 1997).

Estas células regulan la neurogénesis en la zona subventricular (Chmielnicki et al., 2004) y el movimiento de sus cilios regula el flujo normal del líquido cefalorraquídeo y la migración de los neuroblastos hacia el bulbo olfatorio (Sawamoto et al., 2006). En condiciones normales, las células ependimarias del cerebro se encuentran en un estado de reposo; sin embargo, pueden adquirir características

radiales de neuroglía y dar lugar a neuroblastos y astrocitos en respuesta a un accidente cerebrovascular (Zhang et al., 2007, Carlén et al., 2009).

4. Traumatismo craneoencefálico

4.1 Epidemiología del traumatismo craneoencefálico

El traumatismo craneoencefálico (TCE) se ha convertido en una de las causas más comunes de daño cerebral y en la causa principal de muerte en el mundo (Maegle & Schaefer, 2008). Se estima que la incidencia anual del TCE en España es del orden de 200 nuevos casos/100.000 habitantes (Rosenfeld & Ford, 2010) y en Europa aproximadamente 235 nuevos casos/100.000 habitantes (Tagliaferri et al., 2006; Cornelius et al., 2013). Aproximadamente un 10% de todos los casos de TCE se consideran graves, un 10% moderados y leves el 80% restante. Es tres veces más frecuente en varones que en mujeres, siendo el grupo de edad de mayor incidencia el comprendido entre los 15 y 34 años de edad. El 70% de éstos tienen una buena recuperación, el 9% fallecen antes de llegar al hospital, el 6% lo hacen durante su estancia hospitalaria y el 15% quedan funcionalmente incapacitados en diferentes grados (Jennett & MacMillan, 1981; Prins et al., 2003; Bárcena-Orbe et al., 2006; Baugh et al., 2012), que limitan su vida normal, generalmente por alguna alteración neurológica (Jennett & MacMillan, 1981; de Francisco et al., 2009). Además, a raíz de un TCE, se pueden producir secuelas psicológicas tales como déficit de memoria, inatención, pensamiento desorganizado, desinhibición, irritabilidad, comportamiento agresivo-compulsivo, depresión o impaciencia (Bárcena-Orbe et al., 2006; de Francisco et al., 2009; Arciniegas, 2011; Abdul-Muneer et al., 2013; Roozenbeek et al., 2013), y es un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson o demencia (Fleminger, 2012; McMillan et al., 2012; Wang et al., 2012).

Las lesiones en el SNC resultan prácticamente irreparables, a diferencia del resto de tejidos del organismo, ya que, directa o indirectamente, se produce una activación de diversos mecanismos que dificultan y/o reducen la recuperación eficiente del tejido

perdido, provocando, en el mayor de los casos, la pérdida permanente de las facultades neurológicas del individuo (Gaetz, 2004; Sharp et al., 2011).

4.2 Fisiopatología del traumatismo craneoencefálico

En los TCE se reconocen dos tipos de lesiones: una lesión primaria y otra secundaria. La primaria corresponde a un daño mecánico, que ocurre en el momento del trauma, resultado directo de la lesión inicial, es responsable de la lesión focalizada, como puede ser una contusión, laceración, hemorragia intracraneal, daño axonal difuso (Albert-Weissenberger & Sirén, 2010; Corneluis et al., 2013). Como consecuencia de esta primera lesión, se genera una gran extravasación de sangre por la interrupción de los vasos sanguíneos, que posteriormente activa los mecanismos de defensa, y a su vez, producen una infiltración y activación de las células, especialmente las células gliales, generando la respuesta inflamatoria (Quintana et al., 2007), que desencadenará parte de la lesión secundaria.

Este daño secundario, también llamado daño a largo plazo, produce procesos complejos, cambios fisiológicos y bioquímicos que tienen lugar durante las primeras horas e incluso días posteriores a la lesión (Bramlett & Dietrich, 2004; Gaetz, 2004; Donkin & Vink, 2010; Xia et al., 2010) y luego derivan en cambios patológicos de larga duración, y/o permanentes.

Este proceso se inicia con cambios metabólicos como alteraciones en los niveles de oxigenación, cambios en el metabolismo energético celular, aumento en la actividad inflamatoria, producción de especies reactivas del oxígeno, gliosis, que en conjunto provocan neuroinflamación, daño axonal, anormalidades vasculares (Aloisi, 2001; Aloisi et al., 2001; Lucas et al., 2006; Donkin y Vink, 2010; Cornelius et al., 2013), y como consecuencia producen muerte neuronal y de las células gliales (Minghetti, 2005; Lucas et al., 2006; Cook et al., 2008; Xia et al., 2010; Cornelius et al., 2013).

Asimismo, las neuronas dañadas por la lesión difícilmente pueden ser remplazadas por nuevas neuronas, por lo que la muerte de estas conduce a la pérdida crónica de las funciones que desempeñan. A pesar de que se haya constatado que existe una continua generación de neuronas en el SNC del individuo adulto (Alvarez-

Buylla & García-Verdugo, 2002; Lledo et al., 2006; Kojima et al., 2010), a día de hoy, los datos obtenidos en diversos estudios, afirman que la proliferación y diferenciación celular en el SN no son suficientes para poder reparar las zonas lesionadas de una forma eficaz, así como tampoco llegan a completar el restablecimiento de la estructura y función neuronal (Kokaia & Lindvall, 2003; Whitney et al., 2009; Thau-Zuchman et al., 2010). En este proceso de recuperación, también influye la activación de la glía, que dificulta el crecimiento de los axones dañados interviniendo en los procesos de degeneración tisular. Los axones de las neuronas del SNC, a diferencia de los axones del Sistema Nervioso Periférico (SNP), poseen una escasa capacidad de crecimiento, que agrava el, ya de por sí, pobre soporte regenerativo aportado por las células gliales y que impide la reconexión del circuito cerebral (Zohar et al., 2003).

4.3 Modelo de Criolesión

Existen múltiples estudios y modelos experimentales que intentan reproducir las alteraciones neurológicas, las secuelas cognitivas y comportamentales, que se pueden observar, en las lesiones cerebrales producidas después de haber sufrido un TCE. Entre ellos se encuentran, el modelo de percusión por fluido, que produce una lesión cerebral por la inyección de fluido en la cavidad craneal de forma rápida (Albert-Weissenberger & Sirén, 2010); el modelo de impacto cortical controlado, que por medio de una pistola neumática, realiza una lesión cerebral, mensurable y controlada, de acuerdo a la velocidad y deformación cortical que produce (Dixon et al., 1991); el modelo de caída de peso, por el cual se deja caer un carga de peso específico desde una altura determinada sobre el cráneo, produciendo así una lesión cerebral focal y/o difusa (Feeney et al., 1981; Dail et al., 1981). Estos modelos de lesión produce un tipo mixto de lesión cerebral, que incluye contusión cortical, hemorragia, edema, liberación de productos citotóxicos, que produce astrogliosis, lesión axonal difusa, inflamación, neurodegeneración (Feeney et al., 1981; Yamaki et al., 1997; Cernak, 2005; McNamara, 2010). Sin embargo, es difícil de reproducir la lesión en este tipo de modelos.

El modelo de criolesión o lesión criogénica unilateral descrito por primera vez en 1958 por Klatzo (Klatzo et al., 1958), ampliamente utilizado en estudios realizados con cerdos, ratones y ratas, en modelos de lesión cardíaca y cerebral, es considerablemente

reproducibile en el tamaño y la ubicación, y en los procesos fisiopatológicos de la expansión de la lesión secundaria (Joung et al., 2006; Albert-Weissenberger & Sirén, 2010; Raslan et al., 2012), por ello se considera como el modelo de elección para los estudios experimentales.

El método de la criolesión conduce a una lesión cerebral focal, producida generalmente, mediante la aplicación de una varilla en frío en la duramadre expuesta (Rákos et al., 2007; Raslan et al., 2010). Los diferentes niveles de gravedad de la lesión se pueden lograr mediante la variación del tiempo de contacto de la varilla en el tejido cerebral (Eriskat et al., 2003). En roedores, el resultado de la criolesión es, una lesión cerebral focal y la ruptura de la barrera hematoencefálica (Rákos et al., 2007; Raslan et al., 2010). La lesión primaria se ve rodeada por una zona de penumbra, que conduce a una extensión del tamaño de la lesión acompañada por la muerte de las células neuronales, edema y un aumento de productos citotóxicos (Eriskat et al., 2003; Stoffel et al., 2004), y el proceso secundario incluyen la activación de los astrocitos, de la microglía e inflamación (Bordey et al., 2000; Penkowa et al., 2003; Quintana et al., 2005; Pifarré et al., 2010; Raslan et al., 2010).

Este modelo está en una posición intermedia en la jerarquía de los modelos de lesiones cerebrales (Klementiev et al., 2008), entre el modelo de craneotomía (Prins & Hovda, 2003, Williams et al., 2005) y el modelo de traumatismo craneal menor (Zohar et al., 2003, Henninger et al., 2005), ya que requiere una cirugía poco invasiva y mantiene el estado de asepsia, sin embargo, produce cambios severos en la morfología del cerebro, así como trastornos cognitivos y motores (Rákos et al., 2007; Raslan et al., 2010). Además permite por sí mismo el estudio de la angiogénesis y de los procesos de reparación en la corteza cerebral, estos descubrimientos pueden ser relevantes para las lesiones traumáticas en la corteza cerebral humana (Raslan et al., 2012).

5. Estrés oxidativo. Radicales libres

Se define estrés oxidativo como una situación de desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros (Sies, 1991; Negre-Salvayre et al.,

2010). La vida aerobia se caracteriza por una formación constante de prooxidantes balanceada por la desaparición de los mismos debida a los antioxidantes.

Se denominan radicales libres (RL) a todas aquellas moléculas que contienen en su orbital más externo un electrón desapareado, por tanto, el electrón de dicho orbital necesitaría de otro para poseer una configuración bioquímica y electromagnética estable. Los radicales libres tienden a reaccionar ávidamente con otras moléculas cercanas para completar este orbital incompleto, desestabilizando con ello la configuración electrónica de las moléculas con las que reaccionan, convirtiéndolas a su vez en especies reactivas y pudiendo producir reacciones en cadena.

En el organismo y en condiciones normales, la mayoría de los RL proceden de la respiración aerobia y contienen oxígeno, (como el anión superóxido y el radical hidroxilo) por este motivo muchos autores los llaman especies reactivas de oxígeno.

Existen también las especies reactivas de nitrógeno que derivan del metabolismo del óxido nítrico. El óxido nítrico, debido al electrón desapareado que presenta en su orbital más externo es por sí mismo un radical, pero además, en su metabolismo tienen lugar reacciones con el oxígeno molecular, especies reactivas de oxígeno, metales de transición o tioles que darán lugar a la producción de especies reactivas de nitrógeno como el peroxinitrito (ONOO⁻), trióxido dinitrógeno (N₂O₃), dióxido de nitrógeno (NO₂), o nitratos (NO₃⁻) y nitritos (NO₂⁻), destacando entre ellas el primero por su alta reactividad. Por lo tanto, también existe el concepto de estrés nitrosativo, que se produce cuando existe una producción excesiva o desregulada del óxido nítrico y las especies reactivas del nitrógeno que de él derivan (Hausladen & Stamler, 1999; Cornelius et al., 2013). Esta situación puede ocurrir *in vivo* en distintas patologías, entre ellas las asociadas a procesos inflamatorios, neurotoxicidad, isquemias o durante la neurotransmisión que tiene lugar mediante activación de receptores NMDA (Klatt & Lamas, 2000).

Los radicales libres, intervienen tanto en situaciones fisiológicas como patológicas en el organismo vivo.

5.1 Papel fisiológico de los radicales libres

Se ha demostrado la función de los radicales libres en la defensa antimicrobiana y antitumoral, también como mensajeros e inductores genéticos (Satriano et al., 1993; Zimmerman et al., 2002; Hardy & Hunt, 2004; Al-Shabrawey et al., 2008). Pueden intervenir en la inactivación o activación de ciertas enzimas, (Fillebeen & Pantopoulos, 2002; Minamiyama et al., 2007; Circu & Aw, 2010) o, contribuir a la regulación de la extensión del proceso inflamatorio (Bourbon et al., 2004). Además, se ha postulado que el balance oxidante-antioxidante puede intervenir en el proceso de la apoptosis (Svensk et al., 2004; Gupta et al., 2007; Circu & Aw, 2010). El óxido nítrico interviene en la regulación de funciones en los sistemas inmunológico, cardiovascular y nervioso (Mayer & Hemmens, 1997).

5.2 Papel patogénico de los radicales libres

Los radicales libres pueden relacionarse, entre otros, con la hipertensión (Touyz, 2004) la disfunción cardiovascular (Ramachandran et al., 2003), la inflamación (Telfer & Brock, 2004), y enfermedades como la diabetes (Miranda et al., 2004; Muriach et al., 2006; Miranda et al., 2007; Arnal et al., 2010), el síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA) (Jareño et al., 2002), etc. Estos radicales pueden alterar directa o indirectamente varios mecanismos celulares y fisiológicos, pudiendo conducir a alteraciones de macromoléculas vitales para los seres vivos, entre ellas el ADN (provocando mutaciones), lípidos de membrana (provocando su peroxidación) o proteínas (alterando actividades enzimáticas) y pudiendo producir en último término apoptosis y muerte neuronal (Li et al., 2002; Torchinsky & Toder, 2007; Paravicini & Touyz, 2008).

5.3 Generación de radicales libres

Los RL y especies reactivas de oxígeno proceden de fuentes metabólicas endógenas o de agresiones oxidativas externas. Entre las fuentes endógenas de producción de radicales libres podemos incluir las siguientes:

1. La cadena electrónica mitocondrial (Kas & Blattna, 1986).
2. Una excesiva actividad de la NADPH fagocitaria (Gabig & Babior, 1979).
3. La activación del metabolismo del ácido araquidónico en procesos inflamatorios (Winyard, 1999).
4. La deslocalización de metales de transición (Fe^{2+} y Cu^{+}) de sus sitios de depósito (Halliwell & Gutteridge, 1986).
5. La hiperactividad de la xantina oxidasa (Chambers et al., 1985).
6. La activación de la enzima óxido nítrico sintetasa (Beckman et al., 1990).
7. Menor capacidad de los mecanismos protectores antioxidantes (Giugliano et al., 1996).

Algunas de las fuentes exógenas de daño oxidativo son:

1. Radiaciones ionizantes (Fridovich, 1983).
2. Aumento en la disponibilidad de metales de transición en algunas enfermedades metabólicas y en procesos inflamatorias (Halliwell & Gutteridge, 1986).
3. Acción de xenobióticos y fármacos (Trush et al., 1982).

5.4 Peroxidación lipídica

Consiste en el deterioro oxidativo de grasas oxígeno dependiente, y sobre todo de los ácidos grasos poliinsaturados. Generalmente ocurre cuando el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) es generado en la proximidad de las membranas y ataca a los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos, como el ácido araquidónico (Guéraud et al., 2010; Cornelius et al., 2013).

Un $\bullet\text{OH}$ puede convertir cientos de ácidos grasos de la membrana en lípidos hidroperoxidados, que son muy inestables y rápidamente se descomponen en otros productos, pudiéndose producir nuevos radicales libres que pueden a su vez iniciar nuevas cadenas de peroxidación (Cornelius et al., 2013). Es precisamente en la propagación del daño oxidativo donde radica la mayor importancia de los RL (Gardner, 1989; Halliwell & Chirico, 1993; Spitteller et al., 2001; Guéraud et al., 2010).

5.4.1 Productos de la peroxidación de lípidos

Entre los diferentes aldehídos que se producen en la peroxidación de lípidos, los más intensamente estudiados han sido el malondialdehído (MDA) y los 4-hidroxi-alquenos, en particular el 4-hidroxinonenal (HNE) y el 4-hidroxihexenal (Esterbauer et al., 1991).

5.4.2 Malondialdehído

El MDA es una molécula volátil, de bajo peso molecular ($PM = 72,07$), con un grupo 1,3-dicarbonilo siendo moderadamente ácido (Figura 9). En solución y en fase gaseosa, el MDA está enteramente enolizado manteniéndose a través de un enlace de hidrógeno intramolecular un equilibrio entre dos formas asimétricas. Resulta de la degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados, especialmente del ácido araquidónico (Cornelius et al., 2013). Han sido varias las rutas hipotetizadas para esta formación, pero todas implican una primera ciclación del ácido graso poliinsaturado originario, que tras sucesivos intermediarios, se rompe para formar, entre otros productos de degradación, el MDA (Pryor & Stanley, 1975; Willson, 1978). Dado que este compuesto es un producto final común de la peroxidación lipídica independientemente del ácido graso poliinsaturado oxidado, su determinación ha sido aceptada ampliamente como marcador de este proceso (Bunnag, 2006; Surekha et al., 2007; Negre-Salvayre et al., 2010).

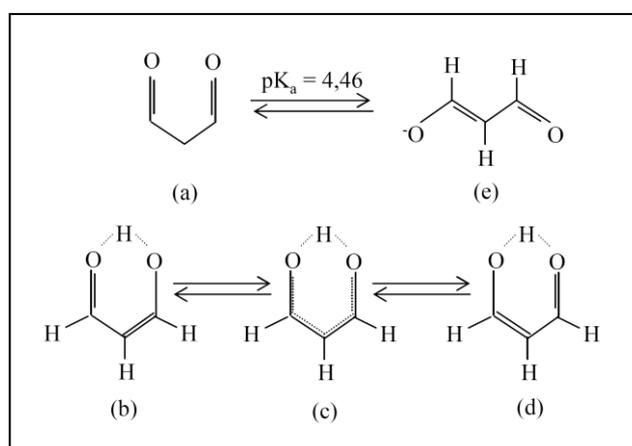


Figura 9. Estructura química del MDA, (Janero, 1990).

Desde que el estrés oxidativo y la peroxidación de lípidos han sido implicadas causalmente en la patogénesis de algunas enfermedades humanas, la determinación de productos remanentes de la peroxidación de lípidos, como el MDA, en tejidos o fluidos humanos, ha recibido considerable atención (Guéraud et al., 2010). Hasta ahora se han utilizado mayoritariamente técnicas que se basan en la reacción del MDA con el ácido tiobarbitúrico (Negre-Salvayre et al., 2010). La literatura señala que la determinación de MDA por cromatografía líquida de alta resolución (en inglés, HPLC) según el método de Richard (Richard et al., 1992) como una de las más adecuadas para reflejar el índice de peroxidación lipídica de una muestra biológica, siendo ésta precisamente la utilizada en nuestro estudio.

6. Defensas antioxidantes

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que, cuando está presente a concentraciones bajas en comparación con las del sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato (Halliwell & Gutteridge, 1986). El término “sustrato oxidable” incluye casi toda macromolécula que se encuentra en las células vivas, como proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN.

La desintoxicación de las especies reactivas del oxígeno es uno de los requisitos para la vida aerobia, por lo que se ha desarrollado un importante sistema defensivo antioxidante formado por recolectores y neutralizadores no enzimáticos que se llaman antioxidantes (vitaminas C y E, glutatión, etc.), por las enzimas con actividad antioxidante directa o primaria, llamadas así por inactivar directamente especies reactivas de oxígeno (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, etc.), y por las enzimas con actividad antioxidante secundaria, que contribuyen al mantenimiento de otros sistemas antioxidantes o bien conjugan sustancias derivadas de la acción tóxica de los radicales (glutatión S-transferasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, etc.) (Sies, 1991).

6.1 El sistema glutatión

El sistema glutatión es el conjunto formado por el glutatión y las enzimas relacionadas con su metabolismo, que son responsables del mantenimiento de su estado redox en condiciones fisiológicas (Meister & Anderson, 1983). El glutatión es un tripéptido (constituido por ácido glutámico, cisteína y glicina) de interesantes propiedades biológicas debido a dos características estructurales: el enlace γ -glutamilo que lo protege de las peptidasas, y la presencia de un grupo tiol libre (-SH) que lo convierte en un compuesto muy reactivo con todo tipo de sustancias e incluso, consigo mismo (Meister & Anderson, 1983). Es el tiol no protéico más abundante en prácticamente todas las células animales (Dringen, 2000) y su presencia se puede explicar por su función de protección frente a la toxicidad del oxígeno. Se considera estado del glutatión al equilibrio entre las distintas formas en las que este tripéptido se puede presentar (Kosower & Kosower, 1978). Podemos encontrarlo en forma de tiol reducido (GSH), en forma oxidada (GSSG) y en forma de disulfuros mixtos en su mayoría GS-S-proteína.

7. Trauma y estrés oxidativo

El SNC es muy sensible al daño causado por la liberación de RL causado por peroxidación lipídica, ya que contienen un gran nivel de lípidos poliinsaturados en las membranas neuronales, y tiene una defensa antioxidante pobre (Coyle & Puttfarcken, 1993).

En las primeras etapas del daño cerebral después de un TCE existe un daño directo al tejido cerebral, y una incapacidad para regular el metabolismo y el flujo de sangre cerebral. Este patrón se denomina “daño isquémico”, produce una acumulación de ácido láctico (originada por la glicólisis anaeróbica), que aumenta la permeabilidad de las membranas, y genera edema. Posteriormente, las membranas celulares se despolarizan activando la peroxidación lipídica, aumentando la concentración intracelular de ácidos grasos libres y RL, que llevan a la degradación celular, y en algunos casos, a la muerte celular por apoptosis (Guéraud et al., 2010; Cornelius et al., 2013).

Se sabe que después de un TCE los superóxidos radicales aumentan (Kontos & Wei, 1986) debido al daño causado y además, la activación de la microglía, la infiltración de macrófagos y neutrófilos, también favorecen este aumento de superóxidos radicales. Asimismo, la formación de peroxinitritos, en conjunto con los superóxidos radicales pueden activar la peroxidación lipídica (Cornelius et al., 2013).

La peroxidación lipídica en un TCE comienza con la peroxidación del ácido araquidónico de las membranas neuronales, que combinan un anión hidroxilo y una molécula de agua con un átomo de hidrógeno convirtiendo los lípidos poliinsaturados del ácido araquidónico en radicales. Posteriormente, se produce una propagación de la radicalización de este ácido dado la poca estabilidad molecular del mismo, y así, este proceso termina en la liberación de productos de desecho neurotóxicos como el MDA (Cornelius et al., 2013).

Estos productos de desecho que genera el estrés oxidativo, producen una respuesta inflamatoria, que por un lado, activa diferentes proteínas inhibidoras, entre ellas I κ B (IKK) a través de la vía de proteínas quinasas activadas por mitógenos (p38, MAPK) y la quinasa reguladora de señales extracelulares (ERK1/2), que posteriormente, activará al factor nuclear kappa B (NF κ B) (Je et al., 2004), con una consecuente respuesta de la proteína quinasa C (PKC) y la liberación de macrófagos (Nitti et al., 2002). Por lo tanto, el estrés oxidativo parece tener un papel doble en el daño que genera, ya que por una parte los productos de desecho que genera son neurotóxicos por sí mismos, y por otra parte, activa la liberación de macrófagos, como la microglía, que pueden contribuir a este daño, como se ha mencionado anteriormente (Ekdahl et al., 2003; Monje et al., 2003; Kierdorf & Prinz, 2013).

Algunos estudios sostienen que existe una relación entre la cantidad de aldehídos producidos en un TCE y la gravedad del mismo (Hlatky et al., 2002), porque han sido identificados como parte de un mecanismo que compromete la plasticidad e integridad neural (Steiner et al., 2004).

8. Neurogénesis

La neurogénesis es la producción de las células SNC, de neuronas y células gliales. El término neurogénesis se aplica especialmente a los seres humanos, aunque se da en cualquier animal que posea sistema nervioso y, por tanto, células nerviosas (Brus et al., 2013).

Se sabe que la mayoría de las células cerebrales se generan durante el desarrollo embrionario a partir de células madre pluripotenciales, aunque este proceso disminuye con el paso del tiempo, existe neurogénesis durante toda la vida de los vertebrados, pero este proceso sólo se lleva a cabo en áreas restringidas del SNC adulto (Gould et al. 1999; Kempermann & Gage, 2000; Álvarez-Buylla & García-Verdugo, 2002; Ming & Song, 2005; Noguès et al., 2012; Brus et al., 2013). En humanos la generación de nuevas neuronas se ha constatado y descrito en diferentes zonas del SN: en la zona subventricular, en el GD del hipocampo y en diferentes áreas de la corteza cerebral (Kempermann & Gage, 2000; Lledo et al., 2006; Arias-Carrión et al., 2007; Noguès et al., 2012).

8.1 Trauma y neurogénesis

Después de una agresión al SN, éste trata de compensar la pérdida celular en el cerebro, con un aumento de la neurogénesis. Se generan células madre pluripotenciales, que posteriormente migrarán al lugar de la lesión (Kojima et al., 2010), y allí se diferenciarán en neuronas o células gliales (Arvidsson et al., 2002; Nakatomi et al., 2002); este aumento de neurogénesis, perdurará hasta un año después de la lesión, aproximadamente (Chen et al., 2003). Pero de todas las células nuevas que se generan, solamente algunas madurarán y se convertirán en neuronas funcionales, que podrían potencialmente reponer las neuronas perdidas, contribuyendo a la reparación de los tejidos, y así favorecer la recuperación cognitiva (Lu et al., 2005; Kernie & Parent, 2012).

Este proceso es altamente complejo en el SNC, ya que los axones de las neuronas dañadas son incapaces de crecer en la lesión, porque las células de glía que rodean a los axones lesionados crean un entorno no permisivo y hostil para su

regeneración, quedando interrumpida permanentemente la vía nerviosa lesionada (Menet et al., 2003). En el lugar de la lesión se forma una cicatriz glial, constituida por microglía y astrogía, que es una fuente de moléculas inhibitoras (Whitney et al., 2009, Xia et al., 2010; Rocamonde et al., 2010), cuyo efecto final es la inhibición del proceso regenerativo, y ello conlleva una pérdida permanente e irreversible de las funciones mediadas por las neuronas dañadas (Zohar et al., 2003, Sharp et al., 2011).

9. Factores de transcripción y citoquinas

9.1 Factor Nuclear Kappa B

El Factor Nuclear kappa B (en inglés NF- κ B) es un factor de transcripción que pertenece a una familia compuesta por cinco miembros: p50 (producto de la proteína NF- κ B1 o p105), p52 (producto de la proteína NF- κ B2 o p100), p65 (también conocido como RelA), c-Rel y RelB; todos ellos tienen un dominio homólogo Rel, que contiene las regiones funcionales cruciales para este factor, como la región de unión al ADN, de dimerización, de localización nuclear y de interacción con las proteínas inhibitoras I κ B, la cual enmascara los dominios de localización nuclear y de unión al ADN (Baeuerle & Henkel, 1994).

Para ser transcripcionalmente activo, NF- κ B debe ser un dímero y por ello los miembros se combinan para dar lugar a homodímeros o heterodímeros. Los dímeros de NF- κ B existen de forma latente en el citoplasma unidos a la proteína inhibitora I κ B (Malek et al., 2001). Existe siete miembros reconocidos que componen la familia I κ B: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ , I κ B ζ , Bcl-3, y los precursores de p50 y p52, p105 y p100, respectivamente (Malek et al., 2001).

La actividad de las I κ Bs está controlada por una cascada de fosforilación, a través de I κ B quinasas (IKKs). Estas señales promueven la actividad de NF- κ B provocan la fosforilación, disociación y degradación de la I κ B a la que está unido, y finalmente la liberación de NF- κ B, que migra al núcleo y se une a las secuencias κ B del ADN para inducir la expresión de determinados genes (Alkalay et al., 1995; Chen et al., 1995) (Figura 10).

NF- κ B se activa por varios estímulos como endotoxinas bacterianas, citoquinas inflamatorias, hipoxia, hiperglucemia (Baldwin, 1996), entre otros, y desempeña un papel fundamental en la regulación de respuestas inflamatorias, inmunitarias y al estrés (Lian et al., 2012). Asimismo, las especies reactivas de oxígeno también están involucradas en la activación de este factor de transcripción (Schmidt et al., 1995) y además se ha observado que la activación de NF- κ B induce una variedad de genes implicados en respuesta a estrés oxidativo (Schreck et al., 1992). Se sabe que también participa en el proceso de muerte celular programada, teniendo efectos tanto pro-apoptóticos como anti-apoptóticos (Middleton et al., 2000; Blondeau et al., 2001; Fridmacher et al., 2003; Brambilla et al., 2005; Mattson & Meffert, 2006), aunque el efecto pro o anti-apoptótico depende del tipo y duración del estímulo, y del tipo de célula (Clemens et al., 1997). Además, NF- κ B participa en la regulación de la transmisión y plasticidad sináptica. Regula (negativamente o positivamente) la expresión de genes que generan cambios en la plasticidad sináptica y en las funciones cognitivas (West et al., 2002). Se ha descrito que algunas subunidades de NF- κ B están involucradas en la neurogénesis (Denis-Donini et al., 2008).

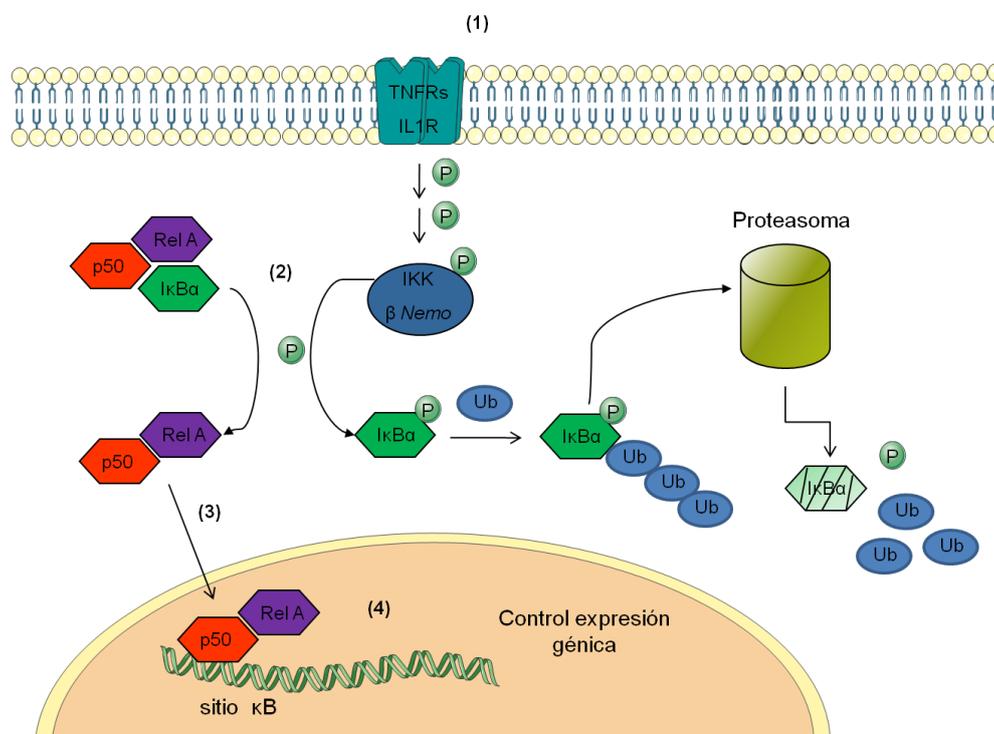


Figura 10: Ruta de señales de NF- κ B. Diferentes estímulos pueden inducir la activación de NF- κ B por activación de I κ B quinasa (1), la cual fosforila a I κ B (2), y la marca para su ubiquitinación. El NF- κ B libre se trasloca al núcleo (3) y activa la expresión de genes (4). (Adaptado de Lorenzo et al., 2011).

9.1.1 Lesión cerebral y NF- κ B

Las primeras evidencias de que NF- κ B podría desempeñar un papel importante en las respuestas de las neuronas frente a una lesión cerebral, proviene de estudios en modelos animales de trauma agudo. Evaluaron la actividad de unión de NF- κ B al ADN en tejidos de la médula espinal y cerebro. Comprobaron que NF- κ B se activa en las neuronas CA1 del hipocampo en respuesta a una isquemia focal transitoria del prosencéfalo (Clemens et al., 1997) y en asociación con las células gliales reactivas en ratas (Gabriel et al., 1999). La activación de NF- κ B en condiciones adversas parece representar parte de un mecanismo de respuesta al estrés, que está diseñado para ayudar a las neuronas a sobrevivir. La inhibición de la respuesta de NF- κ B en las neuronas, produce un aumento de la vulnerabilidad de las mismas, provocando procesos neurotóxicos que inducen a la muerte de estas células (Fridmacher et al., 2003).

En una lesión cerebral la actividad NF- κ B se eleva y se mantiene durante un período de tiempo después (Nonaka et al., 1999; Sanz et al., 2002; Plesnila et al., 2007). Dado que el equilibrio entre los efectos beneficiosos y perjudiciales de la inflamación dependen del tiempo y la intensidad de la respuesta (Lenzlinger et al., 2001; Morganti-Kossmann et al., 2002; Mattson & Meffert, 2006) y como NF- κ B interviene en procesos inflamatorios, algunos estudios han atribuido a su activación papeles tanto neuroprotectores como neurotóxicos (Brambilla et al., 2005; Lian et al., 2012).

La activación de NF- κ B, después de la lesión, crea un sustrato no permisivo para el crecimiento de neuritas por medio de la activación de los astrocitos (de Freitas et al., 2002), evitando el restablecimiento funcional. Sin embargo, esta actividad es controvertida, porque se ha visto que la activación de NF- κ B en astrocitos conduce a la síntesis de neurotrofinas esenciales para la supervivencia neuronal (Zaheer et al., 2001). Asimismo, la inhibición de NF- κ B regula la respuesta glial, disminuyéndola, para que así realice una función neuroprotectora (Acarin et al., 2001).

9.2 Proteína quinasa A

La proteína quinasa A (en inglés PKA) es una holoenzima heterotetramérica, AMPc-dependiente, que contiene dos subunidades reguladoras (R) que mantienen dos subunidades catalíticas (C) (Corbin et al., 1973; Potter et al., 1978). Cuando los niveles de AMPc son bajos, PKA está latente, sin embargo, cuando los niveles de AMPc se elevan, las moléculas de AMPc se unen a cada las subunidades de PKA activándola (Kemp et al., 1976; Corbin et al., 1977) (Figura 11).

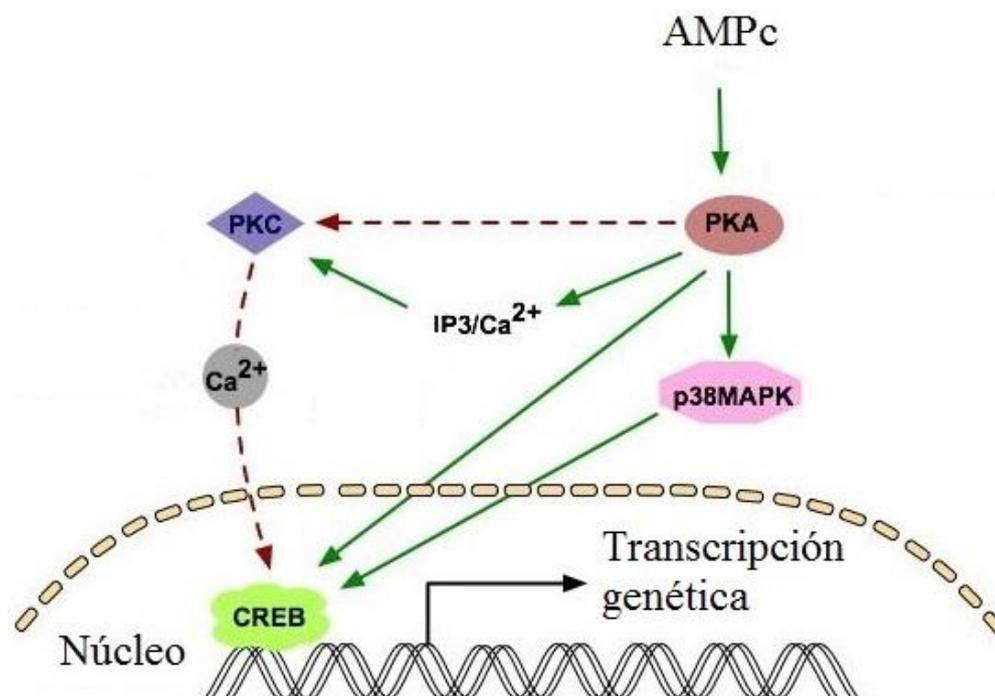


Figura 11: Funciones relacionadas con la activación de PKA. (Adaptado de Hsiao et al., 2007).

PKA desempeña múltiples funciones neuronales, aunque su localización y su especificidad son controladas en gran medida por las proteínas de anclaje AKAPs. PKA es importante para el aprendizaje y la memoria (Byrne & Kandel, 1996; Abel et al., 1997; Sweatt, 2001; Dubnau et al., 2003; Bauman et al., 2004). Además, está implicada en múltiples formas de plasticidad sináptica (Yasuda et al., 2003; Chevaleyre et al., 2007; Lu et al., 2007), incluyendo la potenciación del hipocampo a largo plazo. PKA también está implicada en el tráfico y degradación de proteínas, la

transcripción de genes y la regulación de la excitabilidad neuronal (Ehlers, 2000; Impey & Goodman, 2001; Choi et al, 2002; Hoshi et al, 2005; Inan et al, 2006).

9.2.1 Lesión cerebral y PKA

La regeneración neuronal, dentro del SNC, es altamente complicada, dado que las células de la glía obstruyen, dificultan y contribuyen, a que los axones y dendritas no consigan volver o mejorar su estado tras una lesión, y gran parte de este problema se produce por la cicatriz glial. Ésta, forma una barrera física y bioquímica, caracterizada por una astrogliosis, por un aumento de la actividad de microglía (aumentando la inflamación), y por la secreción de diferentes moléculas como proteoglicanos de sulfato de condroitina (CSPGs) sulfato de queratina, proteoglicano y citotactina/tenascina (McKeon et al., 1991; Jones et al., 2002; Silver & Miller, 2004). No obstante, algunos estudios han conseguido disminuir la astrogliosis por medio de la activación de PKA que produce una elevación de AMPc, y podría mejorar la regeneración axonal, haciendo que el ambiente del SNC sea más permisivo (Hannila & Filbin, 2008). El aumento de AMPc por medio de la vía de PKA, promueve el crecimiento y regeneración de las dendritas en este ambiente más permisivo, parecido al del SNP (Aglah et al., 2008), ayudando a la restauración de las funciones sinápticas.

Además de la cicatriz glial, existen diferentes moléculas que interfieren activamente en el crecimiento dendrítico, después de una lesión, como la glicoproteína asociada a la mielina (MAG), glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (OMgp) y la proteína Nogo-A, que inhiben el crecimiento axonal (CKerracher & Winton, 2002; Liu et al, 2006), sin embargo la activación de PKA en este proceso, produce un bloqueo en ese efecto inhibitorio, y así favorece el crecimiento de dendritas en la zona lesionada (Qiu et al, 2002; Neumann et al., 2002).

9.3 Proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc

La proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc (CREB) pertenece a una familia de factores de transcripción que se une en forma de dímero a una región

específica del ADN, al elemento de respuesta del AMPc (CRE), que se localiza en los promotores de numerosos genes, regulando su expresión (Carlezon et al., 2005). CREB es un mediador entre la señalización molecular de los estímulos externos (factores de crecimiento y agentes extracelulares) y la expresión de determinados genes con su consecuente respuesta en las células u órganos diana (Shaywitz & Greenberg, 1999) y está implicado en numerosas rutas de señalización intracelular (Figura 12).

Cuando la célula recibe una señal, se estimula la cascada de señalización intracelular y se fosforilan ambos miembros del dímero de CREB, que inician su actividad transcripcional (Mayr & Montminy, 2001). CREB es activo cuando se fosforila en la serina 133 por la proteína quinasa A (PKA) dependiente de AMPc, y se convierte en fosfo-CREB (pCREB), que tiene mayor afinidad por el ADN y así lleva a cabo la transcripción de los genes (Carlezon et al., 2005). CREB es también fosforilado en esta misma serina por otras quinasas como la calmodulina dependiente de Ca²⁺ IV (CaMKIV) y la quinasa reguladora de señales extracelulares (ERK) (Kasahara et al., 2001).

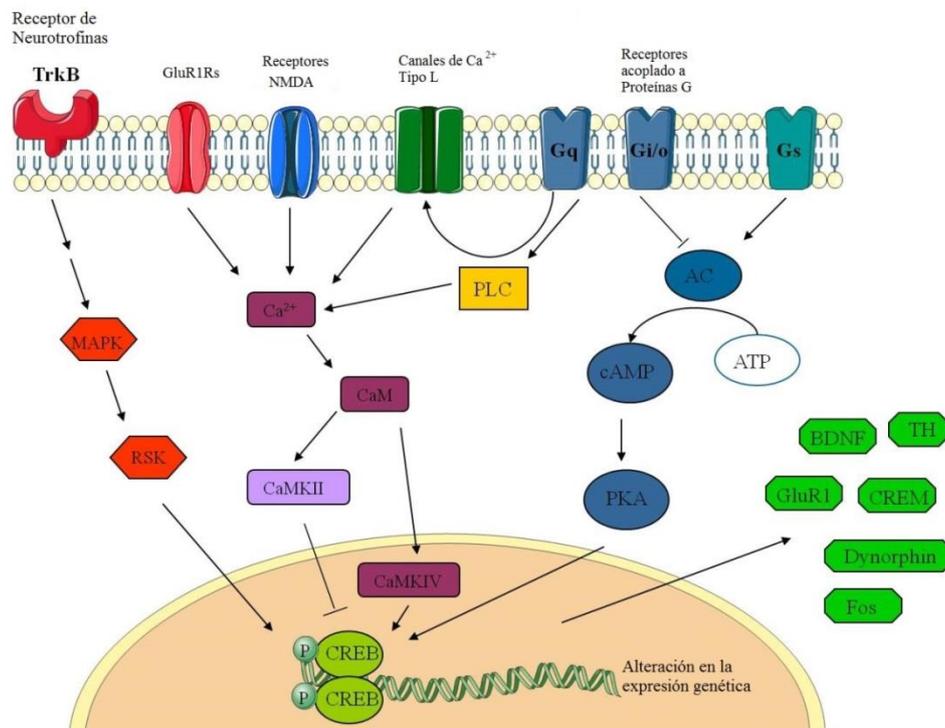


Figura 12: Rutas y eventos que intervienen en la activación de CREB. (Adaptado de Carlezon et al., 2005).

Esta proteína también está implicada en la activación de la síntesis de proteínas necesarias para la formación de memoria a largo plazo (Ishige et al., 1999; Lamprecht & Dudai, 1996; Lamprecht et al., 1997; Kitagawa, 2007). La supresión de la actividad de CREB a través de oligonucleótidos antisentido (Guzowski & McGaugh, 1997) o “knock out” genéticos (Bourtchuladze et al., 1994) altera la formación de memoria a largo plazo; mientras que la sobreexpresión de CREB puede aumentar dicho tipo de memoria (Josselyn et al., 2001). Además, CREB regula la transcripción de GABAA1, un subtipo de receptor del neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico (GABA) que participa en la excitabilidad neuronal y en la modulación de la neurotransmisión sináptica (Lujan, 2007). La interrupción de la ruta de fosforilación de CREB perjudica algunas habilidades cognitivas y aspectos del comportamiento asociados con el sistema nervioso central (Kitagawa, 2007).

9.3.1 Lesión cerebral y CREB

Existe una gran pérdida neuronal, tras un TCE, que implica un deterioro en las uniones bioquímicas y moleculares, que tiene como repercusión un daño en la transcripción de diferentes genes, y asimismo una pérdida en las funciones sinápticas, cognitivas, de memoria, entre otras (Atkins et al., 2009). El papel del organismo es reestablecer la completa funcionalidad de las neuronas dañadas, que haya regeneración axonal, y se establezcan nuevas conexiones sinápticas, sin embargo, esto se ve condicionado por la cadena de sucesos que dificultan o ayudan a que esto se lleve a cabo. Como las vías por las cuales los factores de transcripción actúan son variadas, el proceso de recuperación depende de la vía por la cual se activen los diferentes factores de transcripción

Diversos estudios han visto que existe un aumento en la activación de CREB en neuronas tras un daño cerebral, en la corteza cerebral y el hipocampo (Yoneda et al., 1994; Salminen et al., 1995; Walton et al., 1996), que favorece la regeneración y supervivencia neuronal (Lau et al., 2013). Asimismo, también existe un aumento de CREB en astrocitos, oligodendrocitos, células endoteliales y microglía, que se ha asociado a la supervivencia de estas últimas (Tanaka et al., 2001; Sugiura et al., 2004).

9.4 Quinasa reguladora de señales extracelulares

La quinasa reguladora de señales extracelulares (en inglés, ERK) está relacionada con las proteínas quinasas serina/treonina (Roskoski, 2012), es parte de la familia de la proteína MAPK (Wortzel & Seger, 2011). ERK está compuesto por un pequeño lóbulo amino-terminal, rico en glicina que alberga un componente de adenina de ATP, y un gran lóbulo carboxi-terminal que contiene varias hélices- α y filamentos- β (Knighton et al., 1991; Taylor & Kornev, 2011). ERK se activa por medio de MEK (Figura 13) que fosforila los residuos de tirosina que se producen en una secuencia específica treonina/glutamato/tirosina (Haystead et al., 1992; Burack & Sturgill, 1997), esta fosforilación de la tirosina disocia a ERK de MEK, luego se vuelve a asociar con la misma u otra proteína MEK activa, para catalizar la fosforilación de la treonina (Ferrell & Bhatt, 1997).

ERK, contiene diversas isoformas, pero las más estudiadas son: ERK 1 (p44) y ERK 2 (p42), ambos son muy similares en su secuencia y se han considerado iguales (Yoon & Seger, 2006), sin embargo algunos estudios han visto que las quinasas ERK realizan funciones diferentes (Yao et al., 2003; Vantaggiato et al., 2006; Harrington et al., 2012). Las dos proteínas ERK se coexpresan en la mayoría de los tejidos (Lloyd, 2006) y cumplen funciones importantes en el desarrollo de los individuos. Estudios realizados en animales han comprobado que la falta de ERK puede producir la muerte de los mismos (Yao et al., 2003). Una actividad baja de ERK se relacionan con la promoción de la supervivencia celular y una actividad alta se relacionan con la diferenciación celular (Halfar et al., 2001). Participa en la regulación de una gran variedad de procesos incluyendo adhesión, diferenciación, migración, proliferación y supervivencia celular, progresión del ciclo celular, el metabolismo, y la transcripción de diversos genes (Roskoski, 2012). Además juegan un papel importante en el aprendizaje y la memoria a largo plazo (Mazzucchelli et al., 2002).

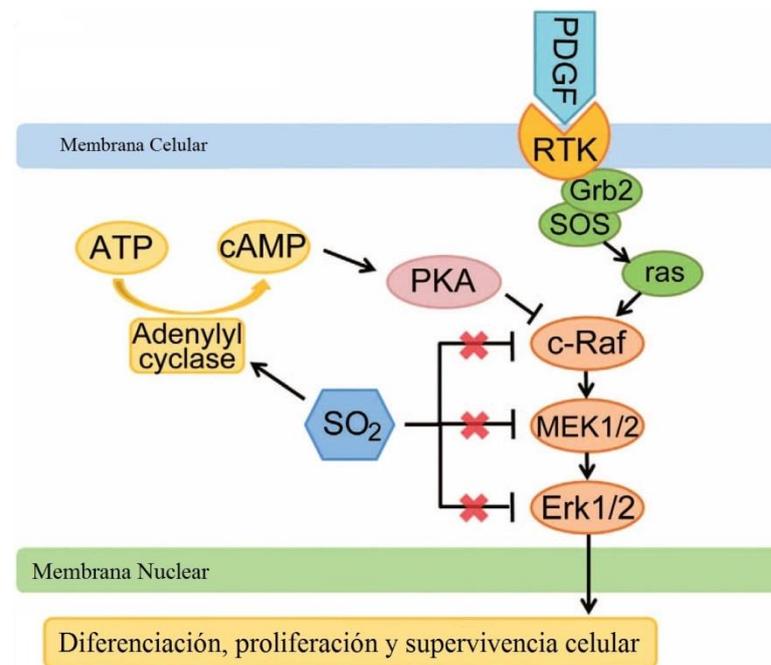


Figura 13: Rutas y eventos que intervienen en la activación de ERK1/2. (Adaptado de Liu et al., 2014).

9.4.1 Lesión cerebral y ERK

La activación de ERK 1/2 en un TCE produce una reacción en cadena que puede provocar la liberación de glutamato, que provoca a su vez, citotoxicidad, generación de especies reactivas al oxígeno y estrés oxidativo (Kawasaki et al., 2007). Además, regulan las respuestas celulares amplificando la expresión de genes diana que inducen o inhiben mecanismos de apoptosis, proliferación celular, metabolismo, crecimiento diferenciado, inflamación y neurotoxicidad (Lu et al., 2005; Liu et al., 2009).

Algunos estudios, han demostrado que ERK está implicado en la activación de factores neurotróficos, como el factor endotelial de crecimiento vascular (VEGF), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y por ello favorece la neuroprotección y regeneración (Matsuzaki et al., 2001; Xia et al., 2010; Ma et al., 2011). Y además, se sabe que la activación de ERK desencadena un aumento de la actividad de AMPc y la fosforilación de CREB, que a su vez está implicado en la regeneración y supervivencia neuronal (Lau et al., 2013),

así como también la supervivencia de las células gliales (Tanaka et al., 2001; Sugiura et al., 2004).

9.5 Factor Neurotrófico Ciliar

El factor neutrófico ciliar (en inglés, CNTF) es una proteína, que pertenece a la familia de las interleuquinas neuropoyéticas (Wen et al., 2008). Esta familia se compone por las interleuquinas 6 y 11 (IL-6, IL-11), el factor inhibidor de la leucemia (LIF), oncostatina M (OSM), cardiotrofina-1 (CT-1), neurotrofina-1 (NNT-1) y la citoquina semejante a la cardiotrofina (CLC) (Bazan, 1990; Fann & Patterson, 1994; Hibi et al., 1996; Taga & Kishimoto, 1997; Senaldi et al., 1999.) Cada una de estas citoquinas posee un receptor ligando específico, pero comparten un receptor similar, gp130, que media la transducción en la señalización (Rosell et al., 2003).

El CNTF se identificó inicialmente como tal, por su capacidad para mantener la supervivencia de las neuronas parasimpáticas de ganglios ciliares en estudios experimentales con animales (Huising et al., 2006). Diversos estudios han demostrado que esta proteína favorece la supervivencia de diferentes tipos de neuronas, como las neuronas de origen cerebral e hipocampal (Ip et al., 1991; Lärkfors et al., 1994), las neuronas sensoriales (Simon et al., 1995) y motoras (Oppenheim et al., 1991) (Figura 14).

Además de favorecer la supervivencia neuronal, CNTF actúa en varios tipos celulares, y están involucradas en diversos procesos celulares y biológicos, funciones hepáticas, hematológicas, endocrinas y cardíacas (Rosell et al., 2003), asimismo su producción, puede modificar la respuesta inflamatoria (Li et al., 2011).

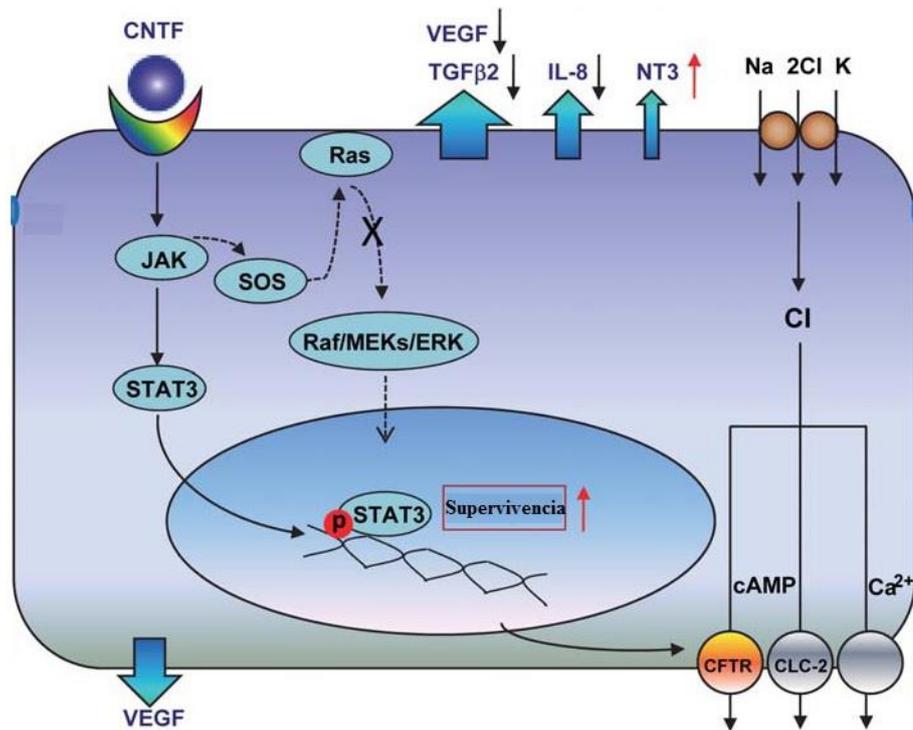


Figura 14: Rutas y eventos en los que intervienen la activación de CNTF. (Adaptado de Li et al., 2011).

9.5.1 Lesión cerebral y CNTF

Varios estudios, han corroborado que, CNTF suele actuar como un factor que se libera principalmente en los tejidos sometidos a un trauma o estrés y que existe un cambio evidente en su localización y expresión sobre las lesiones de los nervios (Friedman et al., 1992; Sendtner et al., 1992; Rudge et al., 1995).

En caso de un traumatismo cerebral la producción de CNTF aumenta por medio de la activación de los astrocitos, entre otras, como parte de la respuesta neuroinflamatoria (Lin et al., 2009), y además, está altamente relacionado con la secreción de factores neurotróficos microgliales que favorecen la supervivencia de diversas poblaciones celulares, como las neuronas y la oligodendroglía (Arakawa et al., 1990; Sendtner et al., 1992; Albrecht et al., 2002; Albrecht et al., 2007; Krady et al., 2008) y asimismo, está específicamente relacionado con la diferenciación neuronal y glial (März et al., 2002; Krady et al., 2008; Dutt et al., 2010).

Otros estudios han comprobado que tras una lesión CNTF activa la microglía, pero, a su vez, activa factores neurotróficos como el factor neurotrófico glial (Schaar et al., 1994; Bohn, 2004) o el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF-2), producido por los astrocitos (Albrecht et al., 2002), disminuyen la secreción de citoquinas relacionadas con la inflamación y la muerte celular, como el marcador de necrosis tumoral (TNF α), la interleuquina 1 β (IL-1 β) y ciclooxigenasa-2 (Kradly et al., 2008). Por ello, algunos estudios consideran que la activación de microglía por medio de este neurotrófico puede ser beneficiosa para la supervivencia celular después de la lesión, ya que cambia su fenotipo normal de inflamación a un estado que promueve el crecimiento (Kradly et al., 2008).

9.6 Proteína activadora de neutrófilos 2 o quimiocina CXC ligando 7

La proteína activadora de neutrófilos 2 (en inglés, NAP-2) o quimiocina CXC ligando 7 (CXCL-7) es una quimiocina que pertenece a la súper familia de citoquinas de unión a heparina estructuralmente homólogas que se compone por cuatro subfamilias (CC, CXC, C, CX3C) (Santoni et al., 2014). Se clasifican estructuralmente según el espaciado o la presencia de residuos de cisteína cerca del extremo amino terminal. La subfamilia CC, tiene los dos primeros residuos de cisteína adyacentes; la subfamilia CXC los dos primeros residuos están separados por un residuo aminoácido (Wang et al., 2010) y se dividen en ligandos del 1 al 17; la subfamilia C, no tiene residuos en su extremo amino terminal; por último, la subfamilia CX3C, tiene tres residuos aminoácidos entre los dos primeros de cisteína (Strieter et al., 1995; Luster, 1998; Belperio et al., 2000).

Los ligandos de las quimiocinas CXC se clasifican sobre la base de la presencia o ausencia de tres residuos de aminoácidos glucina-leucina-arginina (Glu-Leu-Arg; motivo "ELR"), que precede a la primera residuo de cisteína en la estructura primaria de estas proteínas, y que es necesario para el reconocimiento y la señalización de los receptores CXC (Feniger-Barish et al., 1999). Las quimiocinas que tienen el motivo ELR (ELR+ CXC) promueven la angiogénesis, y las quimicinas que carecen del mismo (ELR- CXC) inhiben este proceso (Strieter et al., 1995).

Las quimionas CXC interactúan con la familia molecular de receptores CXC (CXCR), que posee cinco miembros, y forman parte de la familia de receptores acoplados a la proteína G (Murphy, 1994; Loetscher et al., 1996). Específicamente, CXCL-7 interactúa y tiene más afinidad por los receptores CXCR1 y CXCR2 (Schenk et al., 2002).

Se expresa en plaquetas, megacariocitos, además, diferentes líneas celulares lo producen, como los linfocitos T y los monocitos (Idia et al., 1996; Schaffner et al., 2004). Asimismo, las células dendríticas, bajo estímulos inflamatorios, también producen CXCL-7 (Wang et al., 2010).

Estudios realizados en humanos y animales, han comprobado que CXCL-7 y sus formas más pequeñas, ayudan a la producción de plaquetas, la maduración de los megacariocitos (Khajoe et al. 2006). Es un potente quimioatrayente y activa los neutrófilos (Wang et al., 2010), además puede promover su migración a través del endotelio (Schenk et al., 2002). (Figura 15)

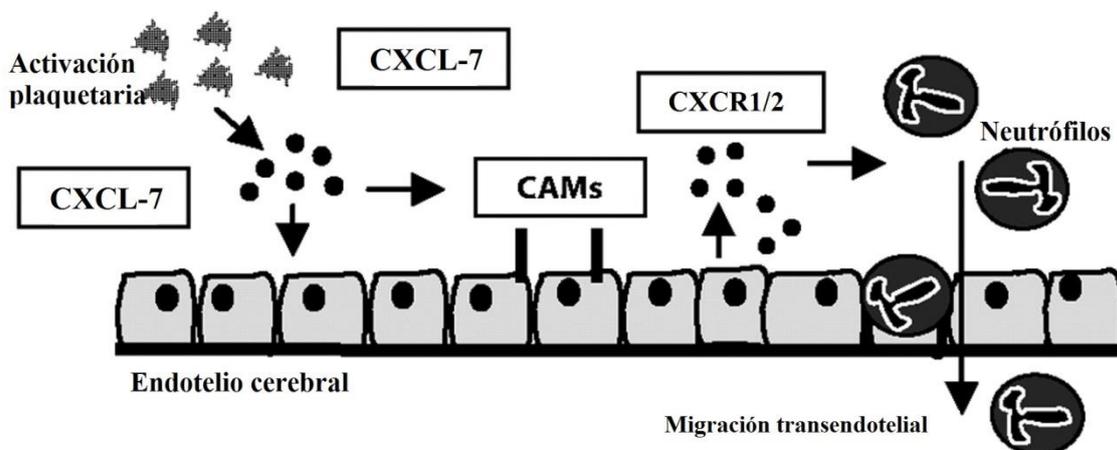


Figura 15: Rutas y eventos en los que intervienen la activación de CXCL-7. (Adaptado de Thornton et al., 2010).

9.6.1 Lesión cerebral y CXCL-7

Diferentes estudios han comprobado que después de un trauma cerebral existe una migración celular, generada por el sistema inmune, donde células, como las de la

microglía, actúan (Del Río-Hortega, 1949; Kreutzberg, 1996; Hanisch & Kettenmann, 2007; Ransohoff & Perry, 2009). Esta respuesta del SNC mediada por las células de la glía, activa una cascada de sucesos, entre ellos, un proceso inflamatorio (Quintana et al., 2007) en conjunto con el proceso de recuperación, que implica neurogénesis y angiogénesis (Rocamonde et al., 2012).

Diversos estudios han comprobado que las quimiocinas, como la subfamilia CXC, y, específicamente CXCL-7, cumplen un papel fundamental en la migración y circulación linfocitaria, así como en la modulación de la respuesta inmune, además del reclutamiento de leucocitos en zonas de inflamación (Schenk et al., 2002; Wang et al., 2010). Desempeña funciones quimioatrayentes, favorece la activación de los neutrófilos (Wang et al., 2010), la maduración de megacariocitos y la producción plaquetaria, además cumple funciones antimicrobianas (Tang et al., 2002; Schaffner et al., 2004), y parte de la resistencia antimicrobiana es mediante la producción de especies reactivas de oxígeno (Khajoei et al., 2006).

CXCL-7 cumple funciones importantes en angiogénesis y hematopoyesis (Belperio et al., 2000; Youn et al., 2000). Asimismo, se ha demostrado, en estudios experimentales *in vitro*, que favorece la atracción y reclutamiento de células madre mesenquimales, procedentes de la médula ósea, así como realizan cambios en su migración, adhesión y proliferación (Kalwitz et al., 2009).

9.7 Molécula soluble de adhesión intercelular tipo 1

La molécula soluble de adhesión intercelular tipo 1 (sICAM-1) es la forma circulante de la molécula de adhesión intercelular tipo 1 (ICAM-1) (Witkowska & Borawska, 2004). Ambas, son una glicoproteína y pertenecen a una gran familia de inmunoglobulinas, que se caracterizan por mediar la activación leucocitaria, así como la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales (Frijns & Kappelle, 2002). Estas moléculas están compuestas por cinco dominios extracelulares Ig, pero a diferencia de ICAM-1, que posee un dominio transmembrana hidrofóbico y un dominio citoplasmático corto (Marlin & Springer, 1987), sICAM-1 carece de estos dominios (Lawson & Wolf, 2009; Wolf & Lawson, 2012). Se expresan en las superficies de

diversas líneas celulares (Rothlein et al., 1991; Fonsatti et al., 1997; Marino et al., 2001; Whiteman et al., 2003).

En condiciones normales, sICAM-1 está presente en suero (Gearing & Newman, 1993), aunque también se ha detectado sICAM-1 en otros fluidos corporales, como líquido cefalorraquídeo (Tsukada et al., 1993), líquido sinovial (Mason et al., 1993), esputo (Chihara et al., 1994), orina (Teppo et al., 2001) y fluidos broncoalveolares (Shijubo et al., 1994).

Diversos grupos celulares producen sICAM-1, entre ellos, las células endoteliales, las células hematopoyéticas, las células endoteliales del cordón umbilical, las células de tejidos cardíacos (Lawson & Wolf, 2009). Y aunque no se conoce, con certeza, el mecanismo por el cual sICAM-1 aumenta su actividad o por qué vías actúa, diversos estudios han comprobado que se activa por medio de factores implicados en la inflamación (TNF- α , IL-1 β e IFN- γ), y actúa a través de la vía MAPK-ERK1/2 y NF κ B (Becker et al., 1991; Fonsatti et al., 1997; Lyons & Benveniste, 1998), aunque puede implicar otras quinasas y otras vías de señalización (Lawson & Wolf, 2009) (Figura 16).

La molécula sICAM-1 cumple funciones parecidas a ICAM-1, ambas favorecen la migración transendotelial de los leucocitos y forman conexiones entre ellos, aunque se ha comprobado en algunos estudios de investigación que sICAM-1 compite por las uniones de ligandos específicos de las membranas celulares afines a ICAM-1, como el antígeno asociado a la función leucocitaria (LFA-1) y el antígeno asociado a macrófagos (mac-1) (Marlin et al., 1990; Martin et al., 1993; Tsakadze et al., 2006). Asimismo, se ha considerado que sICAM-1 refleja el grado de activación de células endoteliales (Lawson & Wolf, 2009).

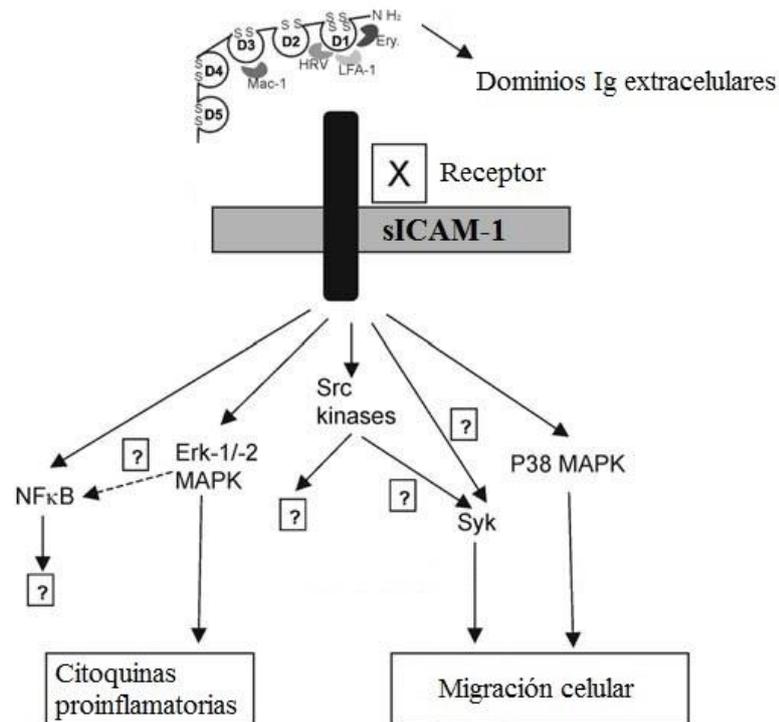


Figura 16: Rutas y eventos que intervienen en la activación de sICAM-1. (Adaptado de Lawson & Wolf, 2009).

9.7.1 Lesión cerebral y sICAM-1

Después de un trauma cerebral, existe un proceso inflamatorio, provocado por el mismo trauma o por la cascada de sucesos que desencadena este daño (Quintana et al., 2007). La respuesta inflamatoria del SNC está mediada por células de la glía (astrocitos y microglía), macrófagos, células polimorfonucleares y citoquinas, entre ellas, sICAM-1 (Harting et al., 2008; Mukherjee et al., 2011).

En diversos estudios realizados en modelos experimentales de daño cerebral, han comprobado que las moléculas solubles de adhesión celular vascular (sVCAM-1) y sICAM-1, regulan la respuesta inmune (Bevilacqua, 1993). Cumplen funciones fisiopatológicas en la inflamación cerebral inicial, reclutando células activadas de la sangre periférica a través de las células endoteliales (Hafler & Weiner, 1989), favoreciendo la migración de leucocitos hacia el lugar de la lesión a través de la barrera hematoencefálica (Yilmaz & Granger, 2008).

Los eventos que se generan a partir de las respuestas inmune e inflamatoria, que implican a estas moléculas de adhesión, cumplen funciones neuroprotectoras y neurodegenerativas a la vez (Allan, 2000; Allan & Rothwell, 2001; Morganti-Kossmann et al., 2002; Giddings, 2005). En algunos estudios han visto, que la activación y migración de leucocitos hacia la zona lesionada, por medio de estas moléculas, después de un daño cerebral ejerce una función neuroprotectora (Ziv et al., 2007). Sin embargo, otros estudios han comprobado que el aumento de sICAM-1 después de un trauma produce una peor recuperación asociada al daño secundario producido por la respuesta inmune (Wang et al., 2011). Asimismo, también se ha comprobado que en concentraciones muy altas, sICAM-1 bloquea las uniones de los leucocitos a las células endoteliales, activa la cascada inflamatoria y produce angiogénesis (Lawson & Wolf, 2009).

9.8 Selectina Leucocitaria

La selectina leucocitaria (CD62L) es una glicoproteína que pertenece a una familia de selectinas calcio-dependientes tipo I. Se compone por tres miembros: la selectina plaquetaria (CD62P), la selectina endotelial (CD62E) y la selectina leucocitaria (CD62L) (Kansas, 1996).

Estas tres selectinas están formadas por dos dominios principales: un dominio N-terminal tipo lectina y otro dominio tipo factor de crecimiento de la epidermis; un número variable de repeticiones de consenso, según las cuales se clasifican, un único dominio transmembrana y una cola citoplasmática (Ley, 2003). La selectina plaquetaria tiene nueve repeticiones, la selectina endotelial tiene seis, y la selectina leucocitaria tiene sólo dos (Kelly et al., 2007).

Sus ligandos se componen de restos de carbohidratos o mucinas, proteínas ricas en treonina o serina, aunque tienen un ligando común llamado glicoproteína selectina plaquetaria ligando 1 (PSGL-1, en inglés) que se expresa en células mieloides, linfoides y dendríticas, e interactúa con las tres selectinas, favoreciendo su actividad (Kansas, 1996).

Se ha comprobado que las selectinas son moléculas de adhesión potentes, que dirigen los leucocitos hacia los tejidos dañados para eliminar infecciones y sanar heridas, aunque también juegan un papel importante en la inflamación (Ludwig et al., 2007).

La selectina leucocitaria se expresa en la mayoría de leucocitos, promueve el tráfico de leucocitos a través del endotelio y los vasos sanguíneos (Figura 17), mediante interacciones vinculantes con ligandos de carbohidratos, en las vénulas endoteliales de los nódulos linfáticos, o en capas endoteliales activadas por una inflamación (Kelly et al., 2007).

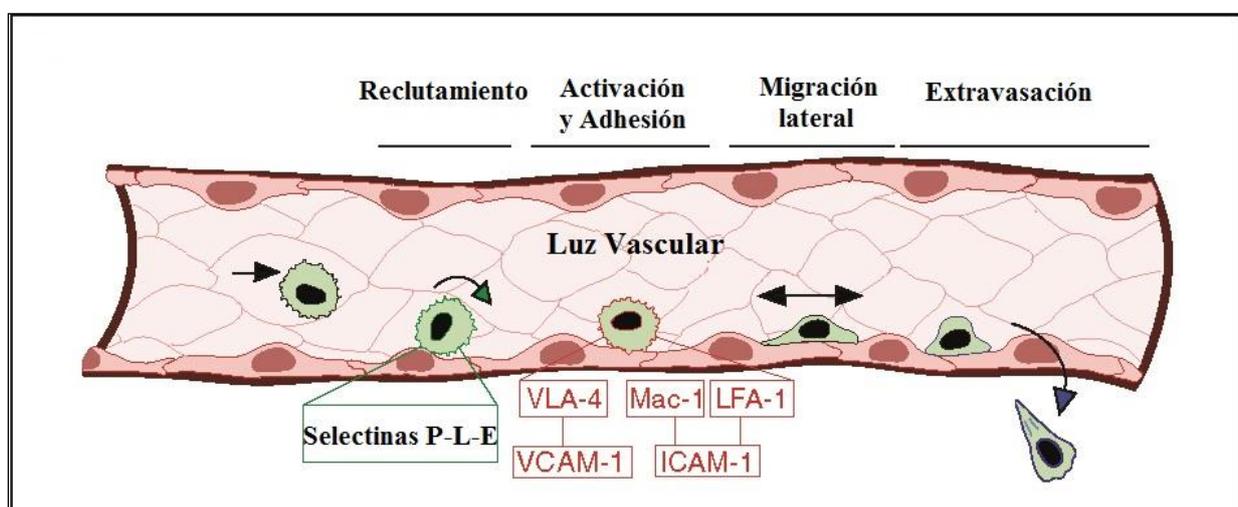


Figura 17: Reclutamiento y migración leucocitaria promovida por las Selectinas. (Adaptado de Zonneveld et al., 2014).

9.8.1 Lesión cerebral y CD62L

Para que los leucocitos puedan atravesar los tejidos, migrar, adherirse e intervenir en una inflamación, utilizan moléculas de adhesión que controlan este proceso (Grailer et al., 2009). Este proceso, llamado “cascada de adhesión”, se define como una serie de interacciones superpuestas y sinérgicas entre las diferentes familias de moléculas de adhesión: las selectinas, mucinas, inmunoglobulinas e integrinas, además de factores quimiotácticos, como las quimiocinas (Steeber & Tedder, 2000).

Estas moléculas cumplen la función de “capturar” los leucocitos de los vasos sanguíneos, favorecen la migración y adhesión transendotelial en el tejido (Ley et al., 2007).

Las selectinas, específicamente la selectina leucocitaria, son las primeras en mediar esta respuesta inmune. A través de sus ligandos, entre ellos PSGL-1, capturan y movilizan los leucocitos (Tu et al., 2002). Estos ligandos específicos se expresan en las vénulas endoteliales altas de los nódulos linfoides periféricos, y mantienen en constante circulación los leucocitos entre la sangre y la linfa (Grailer et al., 2009). Además de reclutar leucocitos circulantes y transportarlos a través de los tejidos, la selectina leucocitaria, también interactúa con leucocitos ya adheridos a otros tejidos, produciendo que aumente la migración hacia el lugar donde se da la inflamación (Eriksson et al., 2001).

Esta selectina cumple una función como molécula de señalización de transducción, ya que, la unión a esta molécula, desencadena la activación de diversas rutas de señalización intracelular, que aumentan la actividad de integrinas e incrementan la adhesión leucocitaria endotelial (Giblin et al., 1997; Steeber et al., 1997).

La selectina leucocitaria desempeña una función importante en la quimiotaxis y adhesión leucocitaria. Diversos estudios experimentales han comprobado que, existía una gran disminución de la migración de leucocitos carentes de esta selectina de los vasos sanguíneos hacia los tejidos inflamados, en comparación con los que sí la tenían (Hickey et al., 2000; Venturi et al., 2003).

9.9 Fractalquina

La fractalquina (CX3CL-1) es una quimiocina que pertenece a la súper familia de citoquinas de unión a heparina estructuralmente homólogas que se compone por cuatro subfamilias (CC, CXC, C, CX3C) (Santoni et al., 2014). Al igual que CXCL-7, su estructura se clasifica según la presencia de residuos de cisteína cerca del extremo amino terminal. La subfamilia CX3C, solamente está compuesta por dos miembros, CX3CL-1 y su receptor CX3CR-1 (Bazan et al., 1997; Imai et al., 1997; Pan et al.,

1997), y se caracteriza por tener tres residuos aminoácidos entre los dos primeros de cisteína (Strieter et al., 1995; Luster, 1998; Belperio et al., 2000).

A pesar de que CX3CL-1 y CX3CR-1 se distribuyen en gran variedad de tejidos en el organismo, se expresan de forma específica en las células del SNC: CX3CL-1 se expresa en neuronas y el receptor CX3CR-1 se expresa en las células de la microglía (Tarozzo et al., 2003; Prinz & Priller, 2010).

Esta citoquina desempeña un papel fundamental en la comunicación neurona-microglía (Figura 18), cumpliendo funciones importantes en la regulación y activación de las células de la microglía, además de favorecer la sinapsis y la plasticidad neuronal (Wolf et al., 2013).

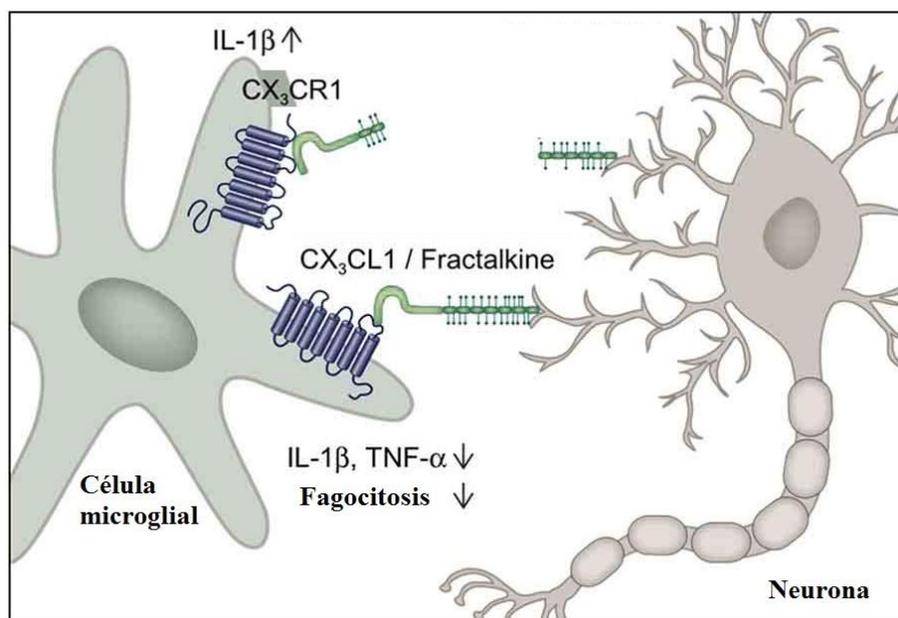


Figura 18: Unión de Fractalquina con su receptor, intercomunicación neurona-microglía.

(Adaptado de Wolf et al., 2013).

9.9.1 Lesión cerebral y CX3CL-1

En condiciones de neuroinflamación, se sabe que la microglía tiene funciones neurodegenerativas y neuroprotectoras a la vez; parte de esta ambigüedad se debe a la participación de CX3CL-1 y su receptor CX3CR-1 (Cardona et al., 2006; Fuhrmann et al., 2010; Liu et al., 2010). Existe una dependencia de la actividad de microglía con

respecto a esta citoquina y, por lo tanto, de las diversas facetas que tiene la activación de estas células en el SNC.

La actividad de CX3CL-1 regula la actividad de microglía: por una parte, resulta beneficiosa por su actividad fagocitaria, pero por otra, parece ser perjudicial debido a la secreción de citoquinas proinflamatorias asociadas a la esta actividad microglial (Wolf et al., 2014).

En modelos experimentales, se ha visto que la deficiencia de CX3CL-1 reduce la muerte neuronal relacionada con la activación de microglía, así como la velocidad de migración de la microglía (Fuhrmann et al., 2010). Sin embargo, otros estudios han comprobado que la deficiencia de CX3CL-1 produce una disminución de neurogénesis, un aumento en la producción de interleuquinas inflamatorias como IL-1 β , una disminución en la supervivencia y proliferación de las células progenitoras neuronales (Bachstetter et al., 2011).

En otro estudios exponen, que la administración de CX3CL-1 previene la muerte de neuronas dopaminérgicas (Pabon et al., 2011). Y en modelos de isquemia cerebral, reduce el tamaño de las zonas dañadas por la isquemia, la activación de caspasa-3, un marcador de apoptosis, y los déficits neurológicos asociados (Cipriani et al., 2011).

10. Naltrexona

La naltrexona es un derivado de la naloxona, un antagonista opioide sin propiedades de agonista. La actividad de la naltrexona es debida tanto al fármaco como a su metabolito el 6- β -naltrexol, con una vida media de $2,7 \pm 1,0$ h (Gonzalez & Brogden, 1988; Agrawal, 2005) (Figura 19).

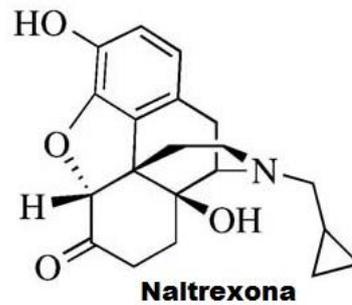


Figura 19: Estructura molecular de la naltrexona. (Adaptado de Yerramreddy et al., 2010)

La naltrexona se utiliza como tratamiento en el alcoholismo crónico, y su uso se basa en sus propiedades de bloqueo de los receptores opioides, reduciendo así las propiedades reforzantes del alcohol (O'Brien, 2005). Sin embargo, se está estudiando el uso de la naltrexona en enfermedades, como por ejemplo en la esclerosis múltiple (Cree et al., 2010; Sharafaddinzadeh et al., 2010) y en la fibromialgia (Younger & Mackey, 2009), existen ensayos clínicos donde empleando bajas dosis de naltrexona (3-4,5 mg/día) se han observado mejoras en estos pacientes. A su vez, se ha observado que la naltrexona tiene efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores tanto in vitro como in vivo (Ray et al., 1992; Greenelch et al., 2004; Lin et al., 2005; Younger et al., 2014).

Existen dos mecanismos diferentes por los cuales se propone que la naltrexona puede tener una acción antiinflamatoria: por una parte podría inhibir directamente al TNF- α , producido desde los macrófagos, y por otra parte, la inducción por la naltrexona de la producción de diferentes citoquinas antiinflamatorias como las interleuquinas 10, 4 y 3 (IL-10, IL-4 e IL-3), las cuales disminuirían la producción de TNF- α (Dinarello, 1997; Younger et al., 2014).

Además existen estudios que han observado que la administración de naltrexona produce efectos beneficiosos a través de sus propiedades antioxidantes, en estudios en hígado, su acción reduce la infiltración de linfocitos polimorfonucleares, los cuales indirectamente hubieran podido causar daño oxidativo (Wang et al., 2008). Aunque aún no se conoce con exactitud si la naltrexona tiene propiedades antioxidantes por ella misma, o si es a través de mecanismos secundarios. Sin embargo, estudios

realizados en nuestro grupo de investigación, han comprobado que el tratamiento con naltrexona, disminuye el estrés oxidativo provocado por el alcohol en un modelo animal de alcoholismo crónico (Almansa et al., 2013), lo que sugiere que la naltrexona puede tener propiedades antioxidantes en sí misma.

10.1 Naltrexona como tratamiento antioxidante y antiinflamatorio

Después de un TCE existen varios mecanismos que producen una liberación de diferentes moléculas (citoquinas, proteínas, quinasas, etcétera), que influyen de forma importante en la recuperación, regeneración o degeneración celular (Day et al., 2011).

Algunos estudios han comprobado que la activación de los astrocitos y microglía produce un aumento de especies reactivas de nitrógeno, como los peroxinitritos (Hill et al., 2004; Broholm et al., 2004). La descomposición de peroxinitritos forma radicales hidroxilo (Beckman et al., 1990), que inicia la peroxidación lipídica celular y la oxidación de proteínas, que pueden causar daño en los tejidos y muerte celular (Kukreja & Hess, 1992; Kukreja & Janin, 1997). Además de ser un daño en sí mismo, el aumento de peroxinitritos, derivado de la activación de la glía, inhibe el transporte de glutamato en las hendiduras sinápticas de las neuronas, provocando un daño añadido, porque la acumulación de glutamato produce neurotoxicidad excitatoria. El tratamiento con naltrexona disminuye la actividad oxidativa, de esta forma, sería capaz de liberar los canales de transporte del glutamato, disminuyendo la acumulación de glutamato y su toxicidad (Agrawal, 2005).

Otros estudios sostienen, que este mecanismo oxidativo podría ser debido a una activación de MAPK, que se produce, entre otros, a través de los receptores opioides (Liu et al., 2002; Singhal et al., 2002). Por ello, el tratamiento con naltrexona, como antagonista de los receptores opioides, podría bloquear los receptores endógenos y la activación de MAPK, evitando el aumento en la actividad oxidativa (Lysle & How, 1999; Liu et al., 2002; Singhal et al., 2002).

Asimismo, se cree que la naltrexona ejerce una función antiinflamatoria y neuroprotectora mediante la disminución de la actividad inflamatoria microglial en el SNC (Younger et al., 2014). Estos efectos antiinflamatorios podrían extenderse a la

periferia disminuyendo factores como TNF- α y IL-6, así como otros factores inflamatorios (Younger & Mackey, 2009) incluso en macrófagos periféricos (Liu et al., 2006). Por eso, se ha considerado que el tratamiento con naltrexona podría desempeñar un papel importante frente a la inflamación después de un TCE.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Después de un traumatismo cerebral se desencadenan diversos sucesos en el SNC que repercuten en el resto del organismo. La microglía se activa, como parte de la respuesta inmune mediante diferentes procesos celulares y moleculares. La activación de la microglía es necesaria para fagocitar las células que mueren, y así puede favorecer la regeneración del SNC y sus funciones, o dificultar la misma. Actualmente no existe un tratamiento efectivo para la regeneración del SNC y sus funciones. Pero si la activación de la microglía estuviese ligada a la producción de factores neurotróficos y antioxidantes, favorecería la regeneración del SNC y sus funciones.

Por todo ello nos planteamos la siguiente hipótesis y los siguientes objetivos:

El tratamiento con naltrexona, posterior a una lesión cerebral, disminuye la inflamación asociada a la expresión de ED-1, favoreciendo la supervivencia celular.

Objetivos:

1. Valorar los marcadores de estrés oxidativo (MDA) y antioxidantes endógenos (GSH) en el cerebro, tras la lesión y compararlos con los obtenidos tras la administración de naltrexona.

2. Determinar de forma cuantitativa mediante western blot, la expresión de pCREB, CREB, NF- κ B, PKA, pERK, ERK, en cerebro tras la lesión, y observar el efecto del tratamiento con naltrexona sobre ellas.

3. Estudiar los fenómenos de supervivencia celular, tras la lesión, y valorar el efecto del tratamiento con naltrexona sobre estos parámetros.

4. Evaluar como afecta la lesión a la expresión de interleuquinas y citoquinas, relacionadas con la inflamación y regeneración celular, y ahondar en los efectos que ejerce el tratamiento con naltrexona sobre ellas.

5. Estudiar la actividad fagocítica tras la lesión cerebral, mediante la proteína lisosomal ED-1, y el efecto del tratamiento con naltrexona.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Tratamiento de los animales

1.1 Condiciones de estabulación

Para este trabajo se utilizaron *Rattus norvegicus* (rata común) albina, machos de raza Wistar, que procedían de una camada original de Harlan (Barcelona). Los animales utilizados se solicitaron teniendo un peso, al inicio del experimento, de unos 250-300g. En todos los casos se dejaron aclimatar al menos una semana antes de iniciar los experimentos.

Durante la estabulación, los animales se mantuvieron en jaulas en condiciones controladas de temperatura (20°C) y humedad (60%), bajo ciclos constantes de luz-oscuridad de 12 horas, de 08:00 a 20:00 y de 20:00 a 08:00, respectivamente. Durante su estabulación y hasta el final del experimento tuvieron libre acceso a agua y a una dieta estándar para pequeños animales de laboratorio, fabricada y distribuida por Letica (Hospitalet, Barcelona).

1.2 Manejo de los animales

La manipulación y cuidado de los animales se realizó siguiendo las normativas internacionales de la Comunidad Económica Europea ("Orden 86/609/CEE") y se tuvo la precaución de evitar cualquier estrés innecesario o infligir dolor a los mismos. Los ensayos experimentales llevados a cabo fueron aprobados por el comité ético de la Universidad CEU Cardenal Herrera y el número de animales se redujo al mínimo necesario para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos. El sacrificio de los animales se llevó a cabo mediante la técnica más incruenta, rápida e indolora que, por otra parte, no influyera en las variables consideradas en cada experimento. Las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de eutanásico, pentobarbital sódico (Dolethal, Vetoquinol).

2. Diseño experimental

A continuación se describe los distintos protocolos de estudio desarrollados en este trabajo de investigación.

Tras la semana de aclimatación, se llevó a cabo la cirugía de criolesión basada en el modelo de Quintana (Quintana et al, 2007). Para ello se anestesió a los animales con una mezcla compuesta por Ketamina (25 mg/mL) (Imalgène 1000), Diazepam (2mg/mL) (Calmo Neosan). Cuando los animales estuvieron completamente inmóviles, fueron colocados en un estereotáxico para fijar el cráneo en la postura deseada y, a continuación, se realizó una incisión con ayuda de un bisturí (Figura 20). Para realizar la lesión se tomó como referencia el Atlas de Paxinos y Watson en las siguientes coordenadas: antero-posterior -2,76mm, lateral 3mm y dorso-ventral 2mm (Figura 21). Seguidamente se realizó una trepanación con la ayuda de un taladro quirúrgico (dremel), y una vez hecha, se enfrió un estilete de 1mm diámetro en nitrógeno líquido durante 15-20 segundos para perforar el cerebro (corteza cerebral hasta llegar al hipocampo) y realizar la criolesión. A continuación se grapó la herida.

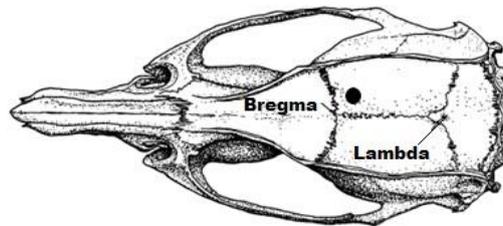


Figura 20: Imagen del cráneo de una ratona Wistar. . El punto señala el lugar de la trepanación y posterior criolesión.

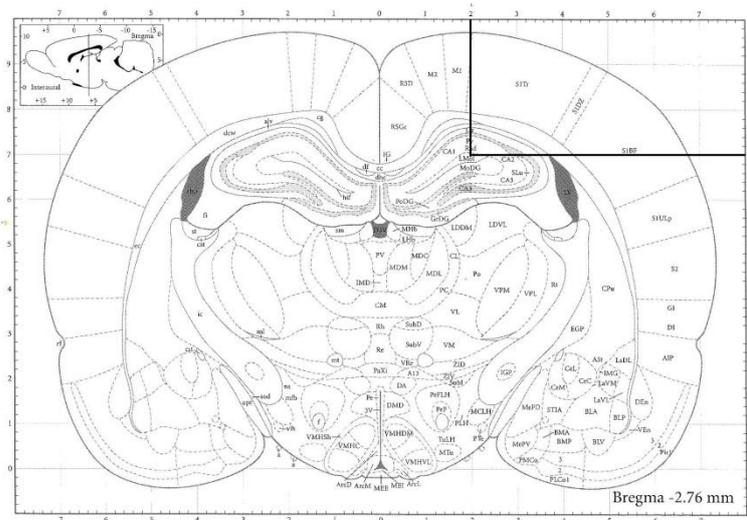


Figura 21: Lámina de un corte coronal de un cerebro de ratona indicando la posición y extensión de la lesión realizada. (Adaptado de Paxinos and Watson, 1986).

Después de la cirugía, se dividieron las ratas en grupos; trauma y trauma-naltrexona; a su vez, se consideraron los lados contralaterales de cada grupo como los controles de los lados lesionados, obteniendo así dos grupos más, trauma contralateral y trauma naltrexona contralateral. Se preparó una solución diluyendo la naltrexona (N3136-100MG, Sigma) en suero fisiológico y fue administrada diariamente durante los siete días posteriores a la criolesión, empezando el día de la misma, mediante una inyección intraperitoneal (1mg/kg). A las ratas que no se les administraba naltrexona (grupos trauma y trauma contralateral), se les inyectó el mismo volumen de suero fisiológico.

3. Administración de bromodeoxiuridina (BrdU)

La bromodeoxiuridina (5-bromo-2-deoxiuridina, BrdU) es un nucleótido sintético análogo de la timidina. La técnica de BrdU es comúnmente utilizada en la detección de células en división en tejidos vivos ya que el BrdU puede incorporarse a la nueva síntesis de ADN en la proliferación de las células (durante la fase S del ciclo celular), sustituyendo a la timidina durante la replicación del ADN. En la actualidad el

uso de bromodeoxiuridina es una de las principales técnicas para el marcaje de la proliferación neuronal (neurogénesis) para así, caracterizar las alteraciones de este fenómeno que se producen durante determinadas patologías. Se utilizan anticuerpos específicos para BrdU para detectar los productos químicos incorporados por lo que células marcadas con BrdU se encontrarían en fase de proliferación celular (Gross, 2000).

En el presente trabajo se siguió el protocolo de administración de BrdU para el estudio de la supervivencia celular según el modelo de supervivencia celular descrito por Herrera et al. 2003 (Herrera et al., 2003).

Los animales recibieron dos inyecciones intraperitoneales de BrdU (40 mg/kg/i.p.; Sigma-Aldrich), un marcador de la proliferación o supervivencia celular, que se administraron el mismo día de la criolesión y dos días más tarde. El último día del experimento se perfundieron los animales como se explica en los apartados siguientes.

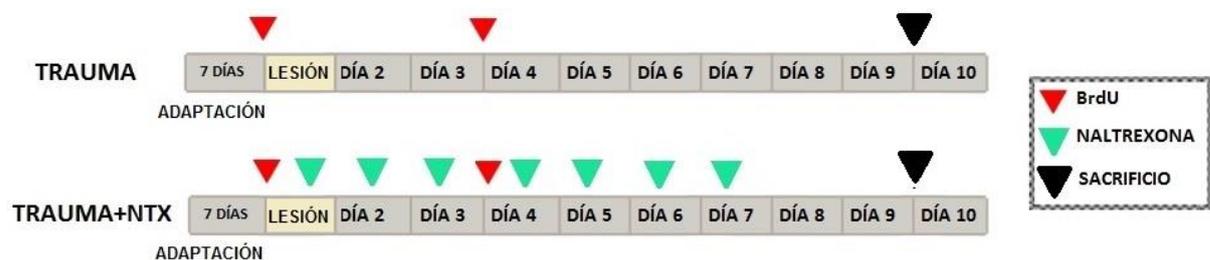


Figura 22: Imagen esquemática del experimento por días.

4. Obtención de muestras

4.1 Suero

Se extrajo la sangre de los animales inmediatamente después del sacrificio y directamente del corazón con ayuda de una jeringuilla. A continuación se centrifugó la sangre durante 2 minutos a 9000 rpm, se separó el sobrenadante y se conservaron a -20° C.

4.2 Cerebro

Tras el sacrificio de los animales, se procedió inmediatamente a la extracción del cerebro. Se tomó muestra de la criolesión con un sacabocados, y asimismo una muestra del lado contralateral a la lesión. Una vez obtenidas las muestras se homogeneizaron con un homogeneizador manual en tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7, posteriormente se centrifugaron a 6000 rpm durante 2 minutos. El sobrenadante de cada uno de los homogeneizados se conservó a -20° C hasta su utilización para la determinación de proteínas, parámetros de estrés oxidativo y el análisis de citoquinas.

Para la determinación de glutatión, inmediatamente después de la homogeneización, se acidifican 360 µL de este homogenizado con 40 µL de ácido perclórico al 20%, que se conservó a - 20 °C hasta su utilización.

En el caso del estudio inmunohistoquímico, para la obtención de los cortes de cerebro, tras la perfusión de las ratas primero con salino para limpiar los restos de sangre y ya después con la solución fijadora paraformaldehído (PFA 4%) tampón fosfato salino (PBS) 0.1M, PH 7.4, se extrajo el cerebro completo, y se conservó 12 horas en la misma solución fijadora a 4°C. Posteriormente, se cambiaron a una solución de PBS-Azida 0,01% entre 24 – 48h a 4°C. Y por último se incluyeron en parafina y se conservaron a temperatura ambiente. Para su análisis, se cortaron al microtomo como se explica a continuación.

5. Procedimientos analíticos

5.1 Determinación de proteínas

Se realizó según el procedimiento descrito por Lowry (Lowry et al., 1951), con las modificaciones utilizadas habitualmente en nuestro laboratorio, y que a continuación se detallan.

Se emplearon las siguientes soluciones:

- Solución A: Na_2CO_3 4%, NaOH 0.8%

- Solución B: CuSO_4 1.25 mM, $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6$ 1.42 mM.

Las soluciones A y B se conservan a 4°C hasta su utilización.

- Solución C: Reactivo de Folin-Ciocalteu 1N.
- Solución D: Solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) 1 mg/mL

La solución D se conserva a -20°C hasta su utilización.

Se preparan tubos de ensayo con cantidades diferentes de la solución D (0, 10, 25, 50, 75 y 100 μL) y con dos cantidades distintas de cada muestra (10 y 25 μL). Se añade agua bidestilada hasta 200 μL . Se mezclan las soluciones A y B a partes iguales y a cada tubo de ensayo se le añade 1 mL de esta mezcla. Se deja reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se añaden 100 μL de la solución C a cada uno de los tubos. Se agita bien y se espera durante 25 o 30 minutos.

Se mide la absorbancia de cada una de las soluciones en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 696 nm. La absorbancia a 696 nm es directamente proporcional a la concentración de proteínas. Con los valores de absorbancia de los distintos estándares obtenemos la recta patrón y por intrapolación obtenemos las concentraciones de proteínas que queríamos conocer.

5.2 Determinación de malondialdehído

Para la cuantificación del malondialdehído de las muestras de suero y cerebro, se utiliza una modificación del método de Richard (Richard et al., 1992) hecha por nuestro grupo de investigación (Romero et al., 1998), en el cual se determina el nivel del complejo formado entre el malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBARS), en base a la reacción de dos moléculas de TBARS con una de MDA. Se ha utilizado un equipo de HPLC (Waters) que consta de los siguientes componentes:

- Bomba cromatográfica: Waters 1525 binary HPLC Pump.
- Detector de fluorescencia Waters 2475 fluorescence.
- Inyector: Waters 717 plus Autosampler con loop de 50 μl .

- Controlador Multiport modelo RS-232.
- Ordenador IBM Windows.
- Software: Breeze.

La columna cromatográfica de separación empleada es una Kromasil C18 5 μm de 250 x 4,6 mm (Análisis Vínicos S.L.). El flujo de la fase móvil es de 1 ml/min. La longitud de onda de excitación utilizada es de 532 nm y la de emisión 553 nm. El voltaje del detector de fluorescencia empleado es de 600 y la respuesta de 2 sg.

La fase móvil se prepara con tampón fosfato 50 mM a pH 6.0 y metanol (580 ml de tampón y 420 ml de metanol). Posteriormente, se filtra a través de un filtro-membrana (Scheicher und Schuell) de 0,45 μm de poro y 47 mm de diámetro.

La solución madre de calibración se prepara diariamente. Dicha solución madre consiste en una concentración 20 mM de 1,1,3,3-tetraetoxipropano en etanol absoluto.

La solución de trabajo consiste en una preparación de ácido tiobarbitúrico (0,37%) y ácido perclórico (6,4%), 2:1 v/v respectivamente. La solución de trabajo también se prepara de forma diaria.

En tubos eppendorf de 2 ml se pipetea 0.1 ml de la muestra y 0,75 ml de la solución de trabajo. A continuación se mezclan bien y se mantienen 60 min en un baño de agua a 95°C. Pasado este tiempo se enfrían los tubos a 4°C durante 10 min con objeto de detener la reacción. Posteriormente se centrifugan 10 min a 12.000 rpm.

Hasta su inyección en el equipo HPLC los tubos se mantienen a una temperatura constante de 4°C.

Puesto que el aducto MDA-TBARS es inestable a pH neutro cada muestra se neutraliza unos minutos antes de la inyección en el equipo de HPLC. Se añaden aproximadamente 0.1 ml de hidróxido potásico 0.7 M a 0.2 ml de la mezcla que acabamos de centrifugar hasta obtener un pH de 6,0. Inmediatamente después de neutralizar se centrifuga durante 1 min para ayudar a precipitar sales insolubles que podrían interferir en la determinación y se procede, previo filtrado con filtros de jeringa no-estériles (3 mm, 20 micras, membrana de teflón, suministrados por Corning Laboratory Sciences Company), a inyectar en el equipo de HPLC.

En cada experimento se preparó un blanco y una curva de calibración de estándares (0; 0,25; 0,5; 1 y 2 μM). El área del pico obtenido es directamente proporcional a la concentración de MDA en la muestra, que se calcula por intrapolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

5.3 Determinación de glutatión.

La concentración de GSH en las distintas muestras se determinó por el procedimiento descrito por Reed (Reed et al., 1980). El método se basa en la reacción del ácido iodoacético con los grupos tioles para formar derivados carboximetilos seguido de una derivatización cromófora de los grupos amino con el reactivo de Sanger (1-fluoro-2,4-dinitrobenceno) dando lugar a derivados N-DNP. Estos derivados son rápidamente separados por HPLC lo que permite la cuantificación de niveles nanomolares de GSH, GSSG y aminoácidos relacionados, como el glutamato. Se ha trabajado con un equipo de HPLC de la marca Gilson que consta de los siguientes componentes:

- Bombas cromatográficas: HPLC PUMP 322.
- Detector: de ultravioleta-visible 156.
- Autoinyector: 234 con loop de 100 μl .
- Software: Unipoint.

La columna cromatográfica de separación empleada es una Kromasil Amino 5 μm de 250 x 4,6 mm (Análisis Vínicos S.L). Las condiciones iniciales del flujo son de 1 ml/min, 80% de la fase móvil A y 20% de la fase móvil B. Estas condiciones iniciales se mantienen durante 10 minutos seguidas de un gradiente lineal hasta el 95% de la fase móvil B durante 40 minutos y reequilibrado con las condiciones iniciales durante 10 minutos antes del análisis de la siguiente muestra. La longitud de onda utilizada es de 365 nm. El rango del detector ultravioleta empleado es 0.005 y el tiempo de respuesta de 5 seg. La inyección de cada muestra se realiza automáticamente con un autoinyector con capacidad de 45 muestras.

La fase móvil A se prepara con metanol al 80% y la fase móvil B se prepara con acetato sódico 5M en metanol al 80%. Posteriormente se filtran ambas fases a través

de un filtro-membrana (Scheicher und Schuell) de 0,45 μm de poro y 47 mm de diámetro. La solución madre de calibración se prepara diariamente, dicha solución madre consiste en una concentración 10 mM de glutatión reducido en agua, una segunda solución madre se prepara con 10 mM de glutatión oxidado.

La solución 1 es una preparación de ácido iodoacético 100mM y m-cresol 0.2 mM. La solución 2 es una preparación de 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (DNFB) 1.5% v/v etanol puro. Se prepara fresco cada día y se conserva a 4° C protegido de la luz.

En tubos eppendorf de 2 ml pipeteamos 0,2 ml de la muestra y 0.04 ml de ácido iodoacético 100 mM en 0.2 mM de m-cresol. Cada solución se ajusta a un pH de 8,5-9 por adición de KHCO_3 2,4 M en KOH 2M. Incubamos durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno para formar los derivados N-DNP los cuales requieren 4 horas en oscuridad a 4°C para su formación. Posteriormente se centrifugan 10 minutos a 13.000 rpm y el sobrenadante se utiliza para el análisis en el equipo de HPLC.

En cada experimento se prepara un blanco y una curva de calibración de estándares (0; 20; 40; 50; 60; 80 y 100 μM). El área del pico obtenido es directamente proporcional a la concentración de GSH en la muestra, que se calcula por intrapolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

5.4 Análisis de proteínas mediante la técnica de Western-Blot.

Los cerebros que se seleccionaban para el western blot eran homogeneizados con el tampón de lisis (1 % tritonX-100, 50mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl) suplementado con 1mM de DTT, 10mM NaF, 1mM de Na_2VO_4 y 1x del inhibidor de proteasas Complete mini (Roche). Cuando ya está totalmente homogeneizado se incuban durante 30 minutos a 4°C, ya por último se centrifugan durante 20 minutos a 13.000 rpm, conservando el sobrenadante a -20° C.

La metodología de Western-blot empleada se describe en *Current Protocols in Protein Science* (Coligan, 2003). Las proteínas se analizan por SDS-PAGE en geles del 7.5-12.5% de poliacrilamida, se cargan 40 μg de proteína total. Antes de realizar la

carga, se añade a las muestras tampón de carga 5x (15% SDS; 50% glicerol; 0.1% azul de bromofenol; 312.5 mM Tris-HCl, pH 6.8; 16% β -mercapto-etanol) y se calientan a 95°C durante 5 min. Para su separación por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida, se utiliza el sistema MiniProtean III (Bio-Rad) y un tampón compuesto por 50 mM Tris, 27 mM Glicina y 0.1% SDS. La electroforesis se realiza a 200V durante 60 min. La transferencia se hace a una membrana de PVDF (*ImmobilonTM-P Transfer Membrane*, Millipore) durante 90 min a 100 V en un aparato MiniProtean (Bio-Rad) y con un tampón compuesto por 20% Metanol, 20 mM Tris y 150 mM Glicina.

Transcurrido ese tiempo, las membranas se tiñen en una solución de rojo Ponceau S (Sigma) al 0.1% en 1% ácido acético para comprobar la eficacia de la transferencia. Seguidamente, las membranas se lavan con tampón tris salino (TBS) y se incuban en solución de bloqueo (5% de leche desnatada en polvo en TBS + 0.1% Tween-20, TBT) durante 1 hora a temperatura ambiente, y en agitación.

A continuación se procede a incubar las membranas con los anticuerpos primarios (Tabla 1), durante 1 hora o durante toda la noche (según anticuerpos), y después se realizan 3 lavados con TBT durante 30 min para eliminar los restos de anticuerpo. Tras estos lavados las membranas se incuban durante 45 min con los correspondientes anticuerpos secundarios, y se vuelven a lavar 3 veces con TBT durante 30 min. Los anticuerpos empleados para la inmunodetección se especifican en la Tabla 2 y fueron preparados a las concentraciones que se indica en 3% BSA en TBT. Las incubaciones de las membranas con los anticuerpos y sus posteriores lavados se realizaron a temperatura ambiente y en agitación.

La detección de las proteínas se hizo mediante quimioluminiscencia empleando el kit *ECL* (Amersham). Las membranas se cubrieron con film transparente y se revelaron con el Image Quant LAS 4000 (Healthcare Bio-Sciences).

Para poder reutilizar las membranas, antes de ser incubadas con un anticuerpo primario distinto, fueron tratadas con 200 mM glicina pH 2.5 y 0.4% SDS durante 30 min a temperatura ambiente y se lavaron abundantemente con TBS.

| Anticuerpo | Casa comercial | Referencia | Dilución | Descripción |
|--------------------|----------------|------------|----------|----------------------|
| Primario WB | | | | |
| ED-1 | AbD Serotec | MCA341 | 1:1000 | Monoclonal de ratón |
| NFκB (p65) | Santa Cruz | sc-372 | 1:200 | Policlonal de conejo |
| CREB | Santa Cruz | sc-186 | 1:800 | Policlonal de conejo |
| pCREB (ser133) | Millipore | 06-519 | 1:1000 | Policlonal de conejo |
| PKAc α | Cell Signaling | 4782 | 1:1000 | Policlonal de conejo |
| ERK | Santa Cruz | sc-93 | 1:1000 | Policlonal de conejo |
| pERK | Santa Cruz | sc-7383 | 1:1000 | Monoclonal de ratón |
| β-Actina | Sigma | A3854 | 1:30000 | Monoclonal de ratón |

Tabla 1. Lista de anticuerpos empleados en la realización de western blot.

| Anticuerpo | Casa comercial | Referencia | Dilución |
|--------------------------|------------------|------------|----------|
| Secundario WB | | | |
| anti Rabbit IgG-HRP (Fc) | Santa Cruz | sc-3837 | 1:5000 |
| anti-mouse | Thermoscientific | 31437 | 1:5000 |

Tabla 2. Lista de anticuerpos secundarios empleados en la realización de western blot.

5.5 Estudios inmunohistoquímicos.

Realización de los cortes:

Se cortan los cerebros de rata en microtomo coronalmente a 4 μ m. Todos los niveles rostro-caudales de la zona de la criolesión, se adhieren a un portaobjetos SuperFrost Plus (Thermo Scientific)

5.5.1 Inmunohistoquímica de BrdU.

La inmunohistoquímica realizada con BrdU se basa en el método descrito por Rakic (Rakic, 2002). La técnica consiste en utilizar el 5-Bromo-2'-deoxiuridine (BrdU) como un análogo de la timidina. Se incorpora a las cadenas de ADN de las células durante la fase S de síntesis donde la célula está duplicando su genoma, es por ello por lo que podemos considerar esta prueba como un marcador de la neurogénesis al realizarla en tejido nervioso.

Procedimiento:

Se lavan los cortes de cerebro en PBS 0,1M pH 7.2. A continuación se desenmascara, para hacer accesible el BrdU del ADN al anticuerpo primario, el proceso de desenmascaramiento se compone de los siguientes pasos: se realiza un baño de PBS-Tritón + METANOL 10% durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se calienta Tampón Citrato 10mM pH 8 hasta que hierva, se añade a las muestras y se deja enfriar durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Pasado este tiempo se realiza un baño de HCl 2N durante 30 minutos a 37° C (en estufa). Para finalizar el desenmascaramiento se hace un último baño de Tampón Borato 0,1M pH 8,5 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Terminado el desenmascaramiento se lava con PBS 0,01M.

Se bloquea la peroxidasa endógena en oscuridad, durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se incuba con el anticuerpo primario anti-bromodeoxyuridine (Abcam) junto con suero (20%) para bloquear durante toda la

noche en oscuridad a 4°C. El anticuerpo primario se diluye en PBS-Tritón 0,3% a una concentración de 1:200-1:300.

Al día siguiente, se lavan los cortes con PBS 0,01M se incuban con el anticuerpo secundario del kit ABC (Vectastain) durante 1h a temperatura ambiente en agitación; posteriormente se lavan los cortes durante 30' con PBS 0,01M y se incuban con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, del mismo kit ABC, Vectastain) para amplificar la señal, 1h a temperatura ambiente en agitación. Ese complejo se une a la biotina con la que está marcado el anticuerpo secundario.

Se lavan los cortes con PBS 0,01M, se revelan con diaminobencidina (DAB), se lavan los cortes con PBS 0,01M, para posteriormente deshidratar las muestras y cubrirlas.

5.6 Análisis de citoquinas

Se separaron muestras homogenizadas en tampón fosfato (como se explica en el punto 4 Obtención de muestras) para el análisis de diferentes citoquinas y quimiocinas, con el kit Rat Cytokine Array Panel A (R&D Systems).

Los componentes del kit son los siguientes:

- Membranas Rat Cytokine Array Panel A (4uds.)
- Tampón Array 4
- Tampón Array 6
- Tampón de lavado, concentrado (25x)
- Cocktail de Anticuerpos, Rat Cytokine Array Panel A (1ud.)
- Streptavidin-HRP
- Reactivo Quimioluminiscente 1
- Reactivo Quimioluminiscente 2
- Placas multipocillos (4uds.)
- Plantilla de referencia transparente

Procedimiento:

Se preparan los reactivos y las muestras que se van a utilizar. Se pipetea 2 ml del tampón array 6, en cada uno de los cuatro espacios de las placas multipocillos, para bloquear las uniones inespecíficas. Se distribuyen las cuatro membranas en cada uno de los espacios que contienen el tampón array 6, con la parte numerada hacia arriba. Incubar una hora en agitación a temperatura ambiente. Mientras se bloquean las membranas, se preparan las muestras, se añade 500 µl del tampón array 4 a 1 ml de cada muestra, para obtener un volumen final de 1,5 ml. Se agregan 15 µl del cocktail de anticuerpos a cada muestra y se incuban a temperatura ambiente en agitación durante una hora. Posteriormente, se elimina de la placa multipocillos el tampón array 6 y se añade la mezcla de anticuerpo-muestra. Se tapa e incuba durante toda la noche a 2-8°C en agitación.

Cuando haya finalizado el tiempo de incubación se retiran las membranas de las placas y se colocan en contenedores individuales con 20 ml del tampón de lavado (diluido a 1x). Mientras, se lava la placa multipocillos con agua destilada y se seca, se lavan las membranas 3 veces durante 10' a temperatura ambiente en agitación. Se diluye el revelador Streptavidin-HRP en el tampón array 6, según el factor de dilución que refiere la etiqueta del vial. Se procede a pipetear 2 ml de la dilución en cada uno de los pocillos de la placa multipocillos; se incorporan las membranas a cada pocillo, retirando el exceso del tampón de lavado y se incuba durante 30' a temperatura ambiente en agitación.

Pasados los 30', se lavan las membranas tres veces durante 10' a temperatura ambiente y en agitación. Tras los lavados, se procede a colocar las membranas en papel transparente para revelarlas. Se elimina todo resto del tampón de lavado y se pipetea un mililitro de la solución quimioluminiscente de revelado, preparada anteriormente, encima de cada membrana. Se eliminan las burbujas que pueda haber, se incuba durante un minuto, se retira lo que sobre del reactivo y se coloca en la zona de revelado con el número de las membranas hacia arriba. Se revelan las membranas utilizando el programa Image Quant LAS 4000 (Healthcare Bio-Sciences). Se exponen al revelado de 1-10 minutos.

5.7 Estudio estadístico.

5.7.1 Estadística descriptiva.

La medida de tendencia central utilizada en el presente trabajo fue la media aritmética, que se define como la suma de los datos dividida por el número de casos.

La medida de dispersión de los datos utilizada fue la desviación estándar de la muestra.

5.7.2 Pruebas estadísticas.

Para este trabajo hemos utilizado las siguientes pruebas estadísticas:

- ANOVA de un factor.

En este trabajo existe la necesidad de comparar más de dos poblaciones, surgiendo el inconveniente del elevado número de comparaciones a realizar. Para obviar esto, utilizamos el análisis de la varianza, que contrasta simultáneamente todos los casos. El ANOVA de un factor sirve por tanto para comparar varios grupos en una variable cuantitativa. A la variable categórica que define los grupos que deseamos comparar se la llama independiente o factor, mientras que a la variable cuantitativa en la que deseamos comparar los grupos se la denomina dependiente.

La hipótesis que se pone a prueba es que las medias poblacionales son iguales, si esto es así, significa que los grupos no difieren en la variable dependiente, y en consecuencia la variable dependiente es independiente del factor.

La estrategia para poner a prueba la hipótesis de igualdad de medias, consiste en obtener un estadístico, llamado F, que refleja el grado de parecido entre las medias que se comparan. Cuanto más diferentes sean las medias, mayor será el valor de F.

Si las poblaciones muestreadas son normales y sus varianzas iguales, el estadístico F se distribuye según el modelo de probabilidad F de Fisher- Snedecor.

La interpretación de este estadístico es la siguiente: si el nivel crítico asociado al estadístico es menor que 0,05 rechazaremos la hipótesis de igualdad de medias y concluiremos que no todas las medias poblacionales comparadas son iguales. En caso contrario, no podremos rechazar la hipótesis de igualdad.

En los casos en que se aplica este análisis y se descarta la hipótesis nula, hay que utilizar lo que se denomina un contraste post hoc a posteriori para averiguar qué medias en concreto difieren de qué otras.

En nuestro caso, la diferencia entre las medias de los distintos subgrupos se estimó mediante un contraste post hoc de tipo DMS (diferencia mínima significativa) que está basado en la distribución t de Student.

Para la realización del análisis estadístico se ha utilizado el programa de estadística "SPSS 15.0".

IV. RESULTADOS

1. Marcador de la actividad fagocítica (ED-1) en cerebro

Después de una lesión cerebral, las células de la microglía se activan como parte de la respuesta del sistema inmune (Streit, 1995), como se ha mencionado en el apartado de la Introducción. La proteína CD68 (ED-1) es un marcador de los actividad fagocítica, asociado en cerebro a la microglía activada (O'Keefe et al., 2002; Graeber & Streit, 2009). Para verificar si después de la lesión cerebral producida en los animales de este estudio existe o no, activación de esta proteína, se estudió ED-1 en homogenado de cerebro a través de western blot.

En la Figura 23 el western blot de ED-1 muestra que existe un aumento de esta proteína en los grupos Trauma y Trauma + Naltrexona, sin embargo, en los grupos correspondientes a los lados contralaterales de la lesión (Trauma contralateral y Trauma + Naltrexona contralateral) no se aprecia dicho aumento.

En la Figura 24 se representa y compara gráficamente la activación de ED-1 en los diferentes grupos. Se observa un aumento estadísticamente significativo en la activación de ED-1 en homogenado de cerebro en el grupo Trauma tratado con naltrexona, en comparación con el grupo Trauma que no ha recibido el tratamiento.

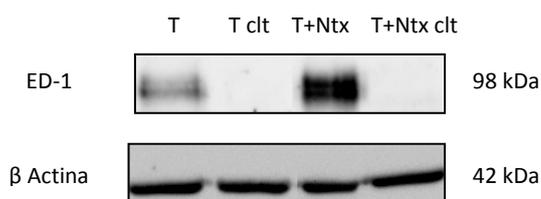


Figura 23. Western Blot de la proteína ED-1 en homogenado de cerebro. β Actina como control de carga. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). n= 8 por grupo.

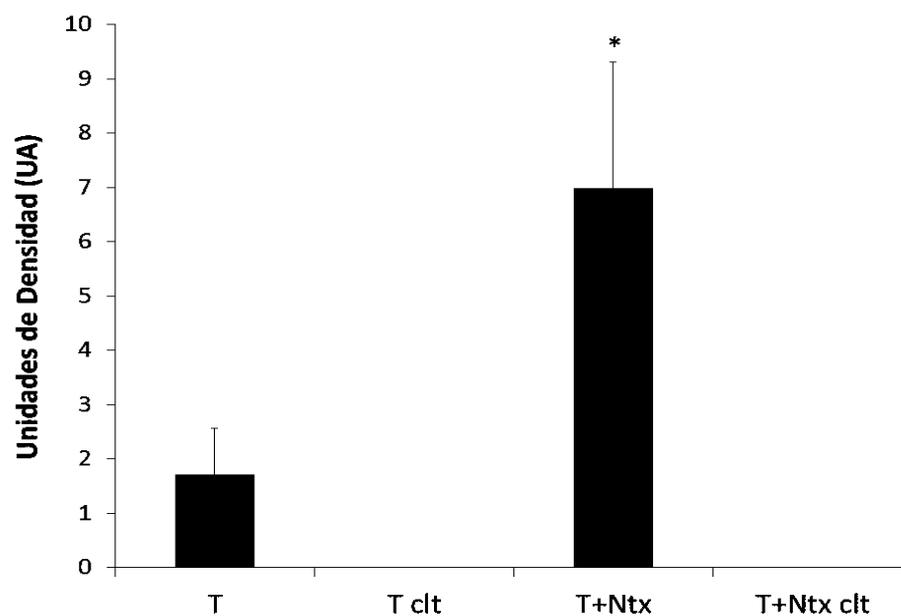


Figura 24. Gráfica de la cuantificación del Western Blot de la expresión de ED-1 en homogenado de cerebro en los grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). * $p < 0,05$ respecto al grupo Trauma. $n = 8$ por grupo.

2. Estrés oxidativo y defensas antioxidantes

Como se ha mencionado en el apartado de la Introducción el estrés oxidativo se define como una situación de desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros (Sies, 1991; Negre-Salvayre et al., 2010). Por ello, decidimos analizar los marcadores oxidantes y antioxidantes más importantes en investigación: el MDA, como producto de la peroxidación lipídica, y el GSH, como agente antioxidante.

2.1 Determinación de MDA

Para comprobar si la lesión cerebral de nuestro estudio produce un incremento de la peroxidación lipídica, se ha medido la concentración de MDA en suero y en

homogenado de cerebro de la zona de la lesión y los lados contralaterales a la lesión, según el método descrito en el apartado de Material y Métodos.

2.1.1 Determinación de MDA en suero

En la Figura 25 se compara gráficamente la concentración de MDA en suero en los grupos Trauma y Trauma + Naltrexona. Se ha comprobado que después de la lesión cerebral y tras el tratamiento con naltrexona, no existen diferencias entre el grupo tratado con naltrexona y el grupo sin tratar.

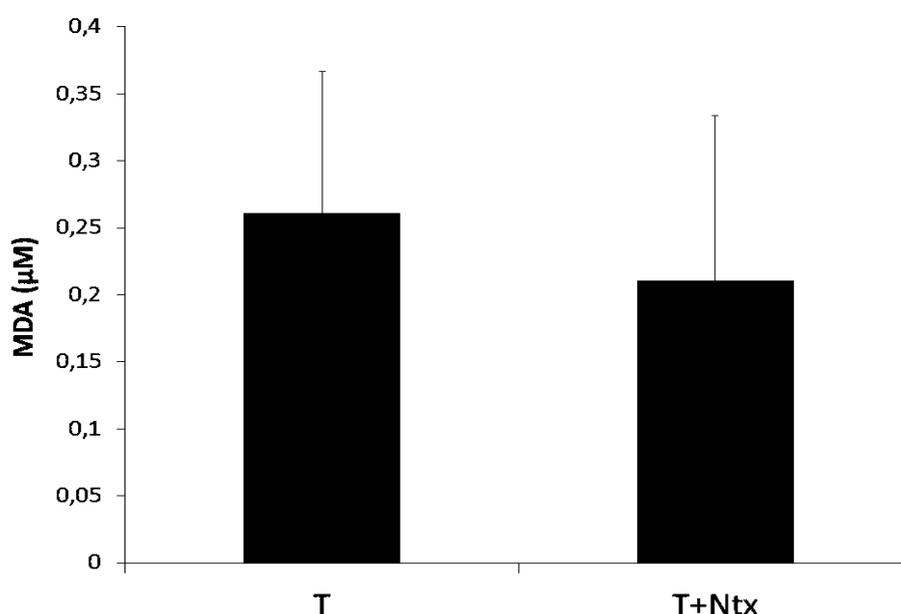


Figura 25. Concentración de MDA (μM) en suero. Grupos Trauma (T), Trauma + Naltrexona (T+Ntx). N=7 grupo T y n=8 grupo T+ Ntx.

2.1.2 Determinación de MDA en homogenado de cerebro

En la Figura 26 se compara gráficamente la concentración de MDA en homogenado de cerebro entre los diferentes grupos. Se puede apreciar, en nuestro modelo experimental, cómo la lesión no afecta a la peroxidación lipídica comparando el MDA de la lesión con el MDA del lado contralateral. A su vez, no existen

diferencias en la concentración de MDA entre los grupos que han recibido el tratamiento con naltrexona y los que no han recibido el tratamiento.

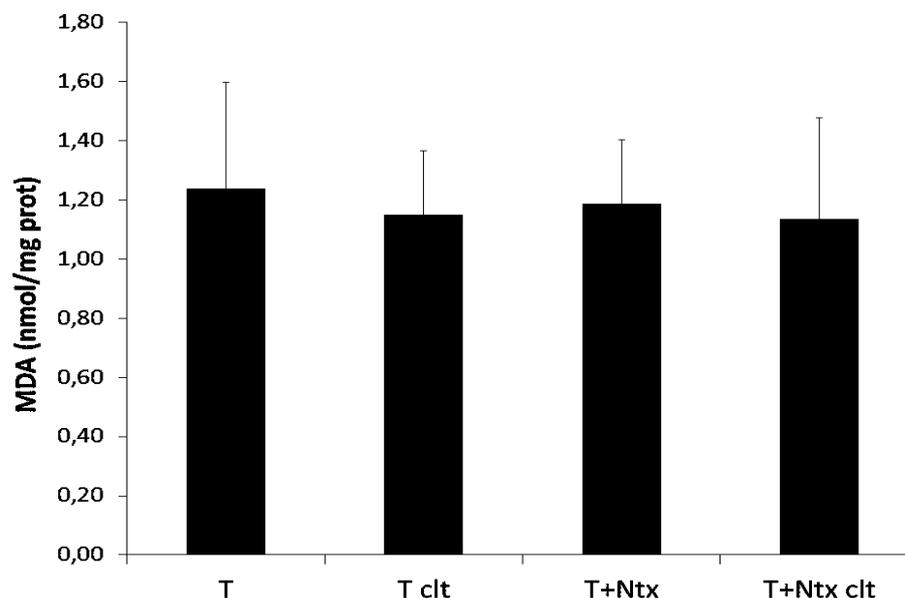


Figura 26. Concentración de MDA (nmol/mg prot) en la zona de la lesión y la zona contralateral, en homogenado de cerebro. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). n=7 grupo T y T clt; n=8 grupo T+Ntx y T+Ntx clt.

2.2 Determinación de glutatión en homogenado de cerebro

Una descompensación en las concentraciones de GSH y de MDA, nos indican si existe estrés oxidativo en los tejidos. El GSH es un marcador de la actividad antioxidante del organismo frente a las situaciones que generan estrés oxidativo, como puede ser una lesión cerebral. Para el estudio del sistema glutatión en cerebro se han medido las concentraciones en su forma reducida (GSH) y su forma oxidada (GSSG).

En la Figura 27 y 28 se representa gráficamente la concentración de GSH y GSSG en los diferentes grupos, respectivamente. Al igual como ocurría con la peroxidación lipídica, no se observa variaciones en la concentración de GSH en la zona de la lesión si se compara con su lado contralateral. Además como se puede observar no existen diferencias en la concentración de GSH y de GSSG entre los grupos tratados con naltrexona y los grupos que no han recibido el tratamiento.

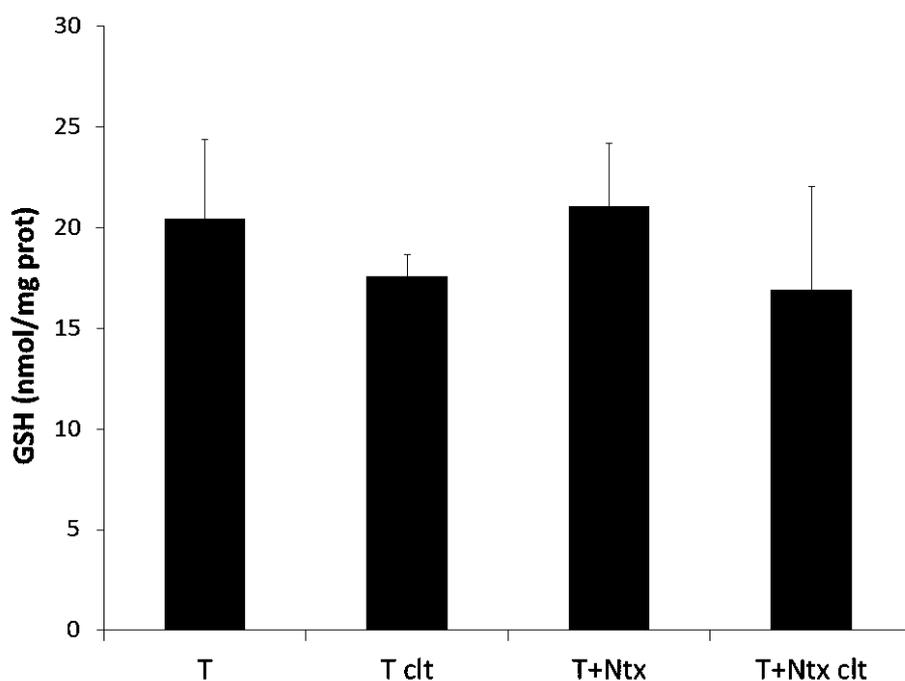


Figura 27. Concentración de GSH (nmol/mg prot) en la zona de la lesión y la zona contralateral, en homogenado de cerebro. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). n=7 grupo T y T clt; n=8 grupo T+Ntx y T+Ntx clt.

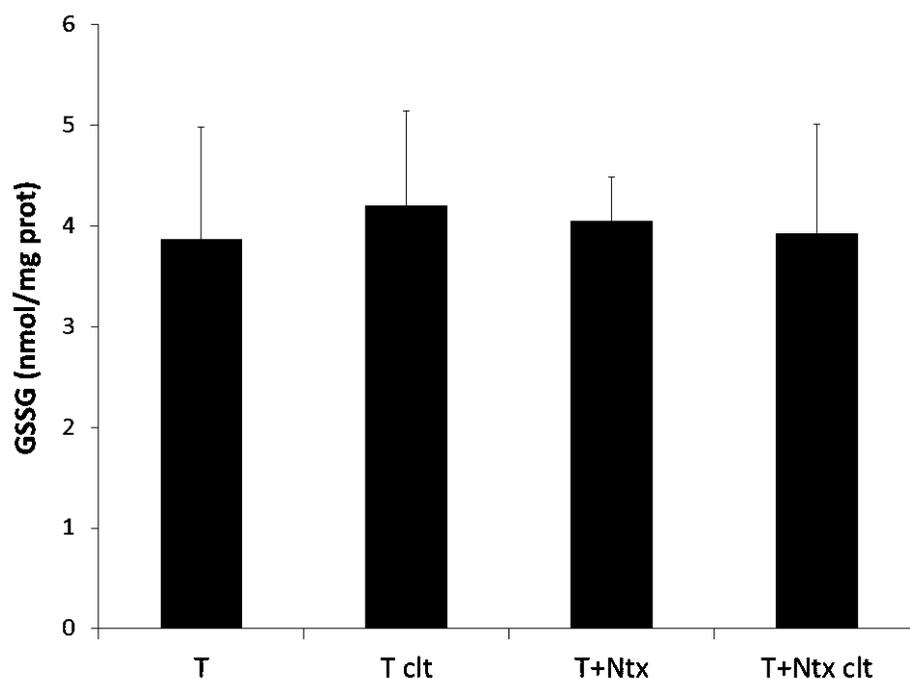


Figura 28. Concentración de GSSG (nmol/mg prot) en la zona de la lesión y la zona contralateral, en homogenado de cerebro. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). n=7 grupo T y T clt; n=8 grupo T+Ntx y T+Ntx clt.

Finalmente, en la Figura 29 se compara gráficamente el ratio de glutatión reducido y oxidado en homogenado de cerebro en los diferentes grupos de estudio. Se observa que no existen diferencias entre los grupos tratados con naltrexona y los que no han recibido el tratamiento.

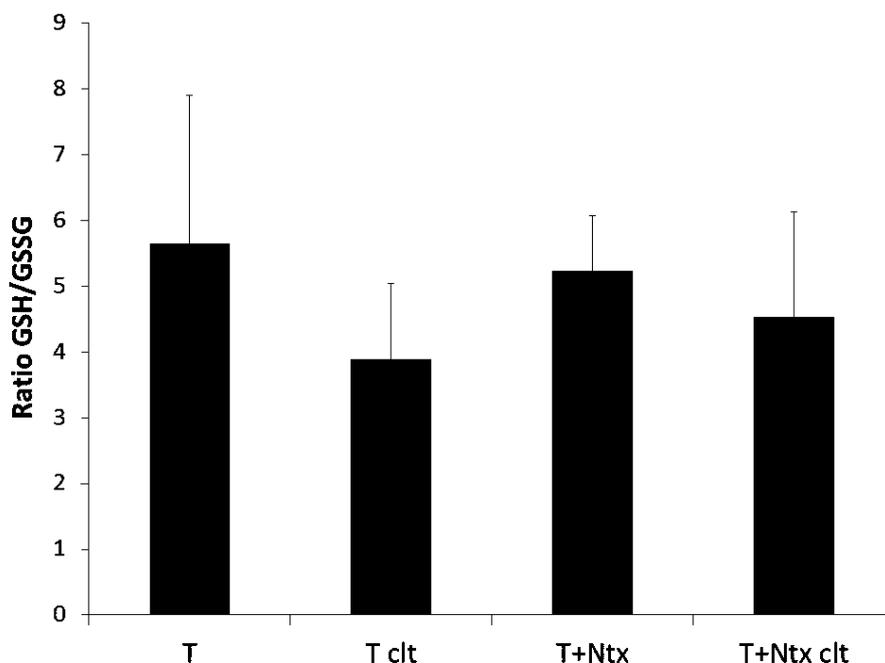


Figura 29. Ratio GSH/GSSG en la zona de la lesión y la zona contralateral, en homogenado de cerebro. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). n=7 grupo T y T clt; n=8 grupo T+Ntx y T+Ntx clt.

2.3 Determinación de glutamato en homogenado de cerebro

El glutamato es el neurotransmisor más abundante del organismo. Se sabe que el exceso de este neurotransmisor produce neurotoxicidad y por lo tanto, puede ser especialmente perjudicial después de una lesión cerebral (Agrawal, 2005). En la comparación gráfica de la Figura 30 se observa que no existen diferencias en la concentración de Glutamato entre los grupos tratados con naltrexona y los grupos que no han recibido el tratamiento.

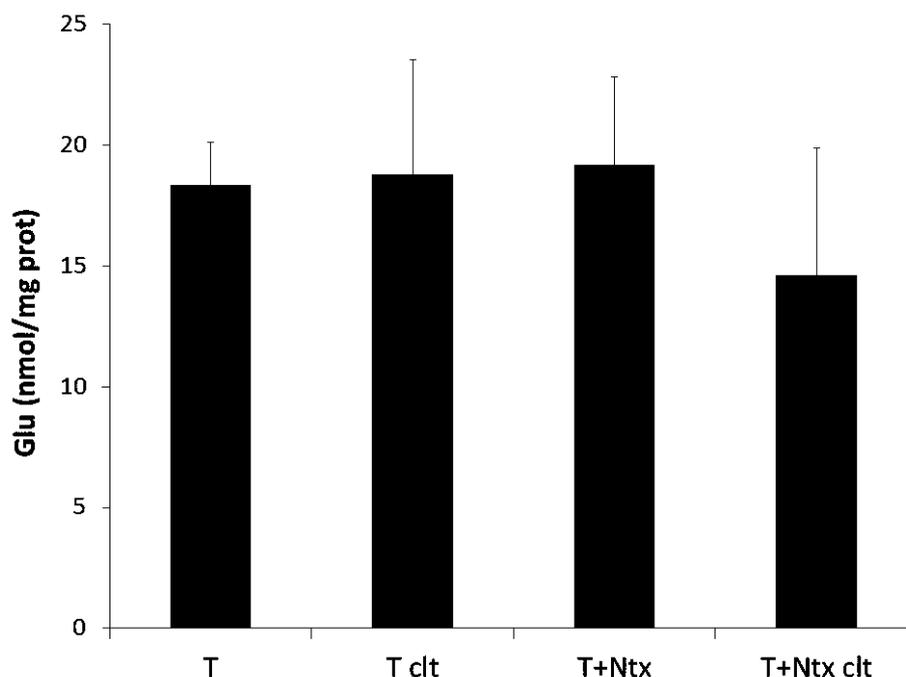


Figura 30. Concentración de Glutamato (nmol/mg prot) en la zona de la lesión y la zona contralateral, en homogenado de cerebro. Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). n=7 grupo T y T clt; n=8 grupo T+Ntx y T+Ntx clt.

3. Estudio de supervivencia celular en cerebro: inmunohistoquímica de BrdU

Tras el estudio inmunohistoquímico de BrdU (Figura 32) se puede observar, señalado con flechas, que aparecen células BrdU positivas en los grupos Trauma y Trauma + Naltrexona, no así en los grupos contralaterales, correspondientes a los grupos Trauma y Trauma contralateral.

En la Figura 31 se compara gráficamente las células BrdU positivas observadas en el estudio inmunohistoquímico (Figura 32). Se observa un aumento estadísticamente significativo de la supervivencia celular en el grupo tratado con naltrexona en la zona de la lesión cerebral, en comparación con el resto de grupos. Este dato muestra que el tratamiento con naltrexona tras la lesión, produce un aumento de la supervivencia celular en la zona lesionada.

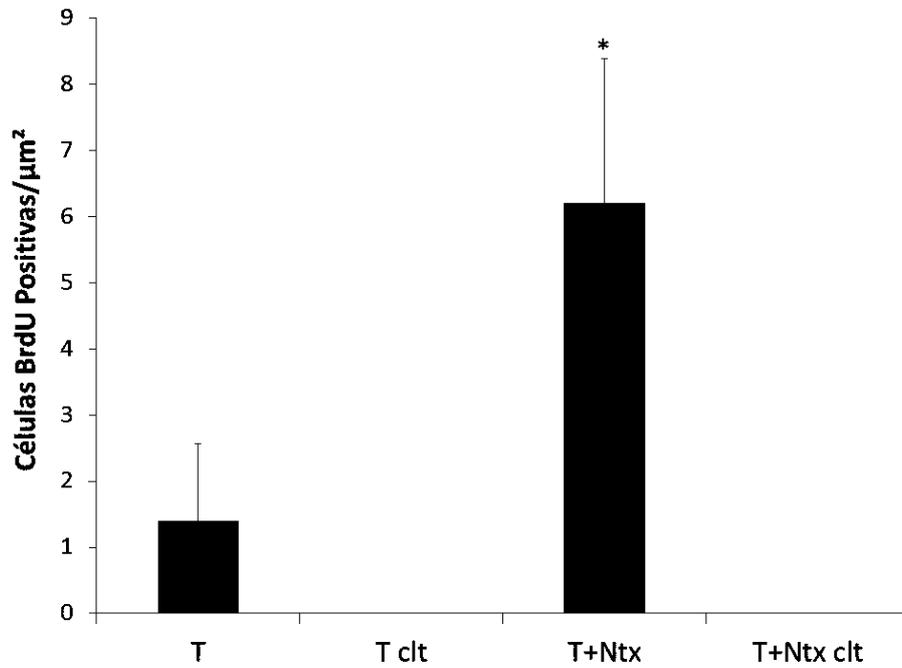


Figura 31. Expresión de células BrdU positivas (n° cel BrdU positivas/ μm^2). Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx), Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). * $p < 0,05$ respecto al grupo Trauma. $n=7$ grupo T; $n=8$ grupo T+Ntx.

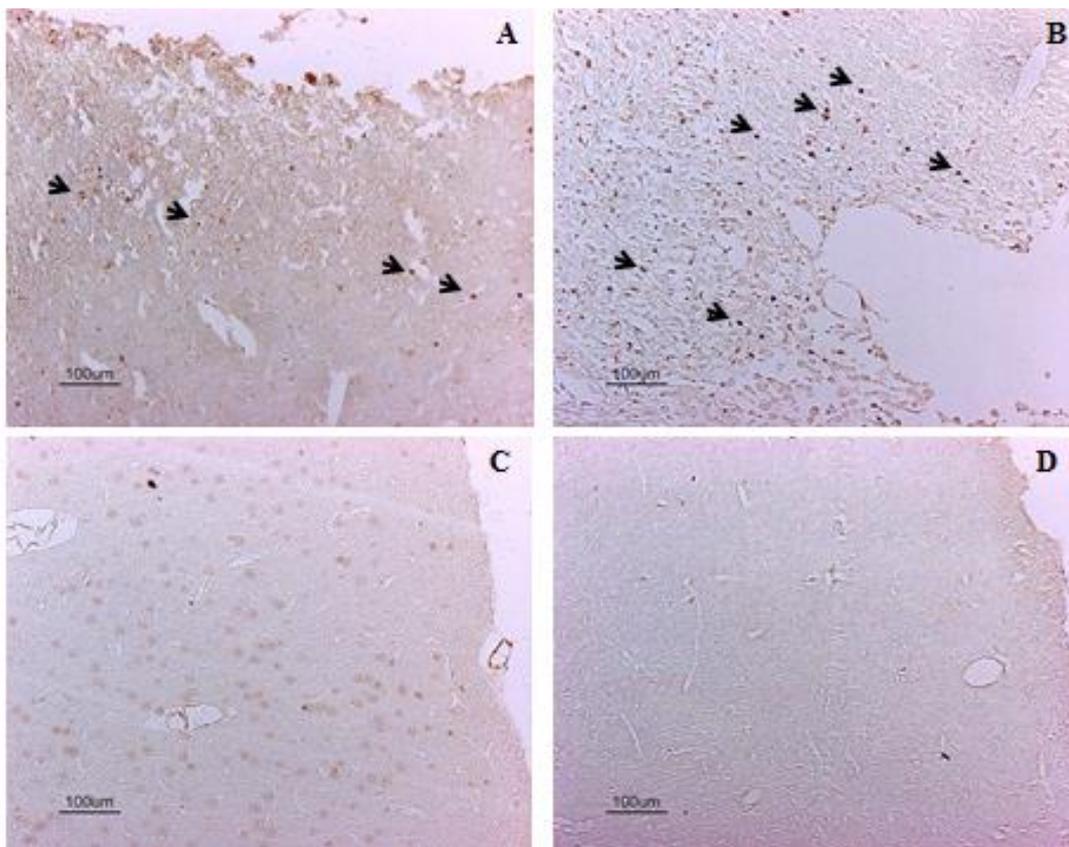


Figura 32. Expresión de células BrdU positivas en tejido cerebral (n° cel BrdU positivas/ μm^2) en las zonas de la lesión y sus lados contralaterales (20x) **A.** Trauma, **B** Trauma + Naltrexona, **C** Trauma Contralateral, **D** Trauma + Naltrexona Contralateral.

4. Estudio de los factores de transcripción y de las citoquinas

Para determinar qué cambios moleculares se han producido en el cerebro de los animales tras la lesión, y para comprobar si el tratamiento posterior con naltrexona favorece o no dichos cambios se han analizado diferentes factores de transcripción y citoquinas que pueden influir en este proceso molecular.

4.1 Factor nuclear kappa B (NF- κ B)

Se sabe que NF- κ B interviene en procesos inflamatorios, y puede producir neurotoxicidad, como se ha mencionado en el apartado de la Introducción. En la Figura 33, se puede apreciar el western blot de NF- κ B, y en la Figura 34 se representa gráficamente la cuantificación de este western blot. En la representación gráfica se observa que no hay diferencias entre los grupos de estudio, aunque existe un ligero aumento de la cantidad de NF- κ B en el grupo Trauma Naltrexona, este aumento no es significativo.

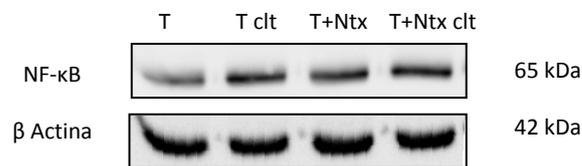


Figura 33. Western Blot de la proteína NF- κ B (p65) en homogenado de cerebro. B Actina como control de carga. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). n= 8 por grupo.

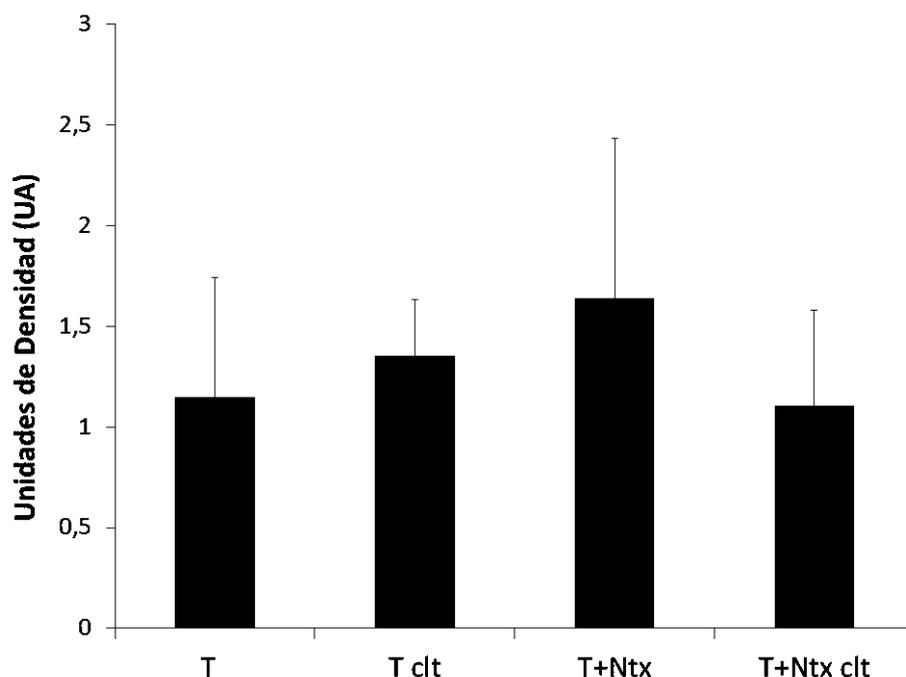


Figura 34. Gráfica de la cuantificación del western blot de la expresión de NF- κ B (p65) en homogenado de cerebro, en los grupos Trauma (T), Trauma contralateral (T clt), Trauma Naltrexona (T+Ntx) y Trauma Naltrexona contralateral (T+Ntx clt). n=8 por grupo.

4.2 Proteína quinasa A (PKA)

Se sabe que CREB es fosforilada por diferentes quinasas, entre ellas PKA, que fosforila a CREB en la serina 133. En el presente trabajo se ha analizado por western blot una subunidad que conforma esta proteína (Figura 35), PKA catalítica alpha (PKAc α). En este análisis se ha hallado que no existen diferencias en la cantidad de esta proteína entre los grupos tratados con naltrexona y los grupos no tratados como se indica en la comparación gráfica de la Figura 36.

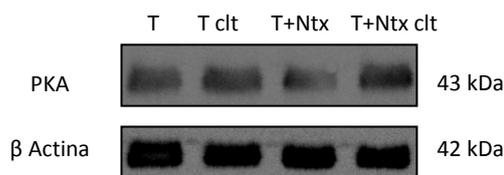


Figura 35. Western blot de la proteína PKA en homogenado de cerebro. β Actina como control de carga. Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral. n= 8 por grupo.

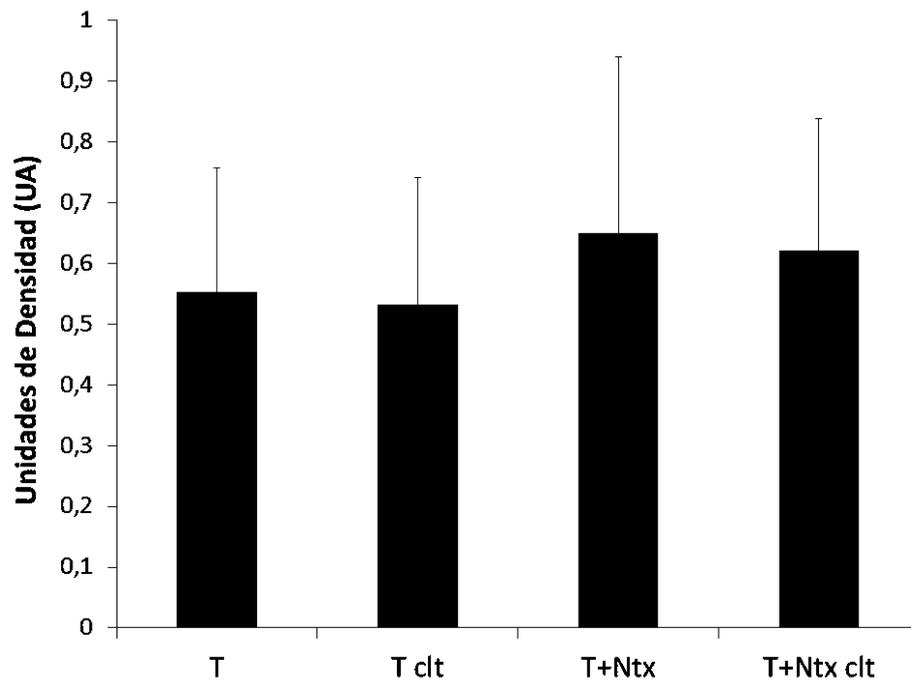


Figura 36. Gráfica de la cuantificación del western blot de la expresión de PKAc α en homogenado de cerebro, en los grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral. n= 8 por grupo.

4.3 Elemento de respuesta a la unión de AMPc (CREB)

La fosforilación, y consecuente activación, de CREB, permite la regeneración neuronal, ayudando a su supervivencia. En el estudio de western blot de pCREB se ha comprobado que existe un aumento en el grupo Trauma Naltrexona, en comparación con el resto de grupos (Figura 37), y se ha corroborado, en la representación gráfica de la Figura 38 que este aumento en el grupo Trauma Naltrexona es estadísticamente significativo en comparación con el resto de grupos analizados. Este dato implica que el tratamiento con naltrexona después de la lesión aumenta la actividad de pCREB.

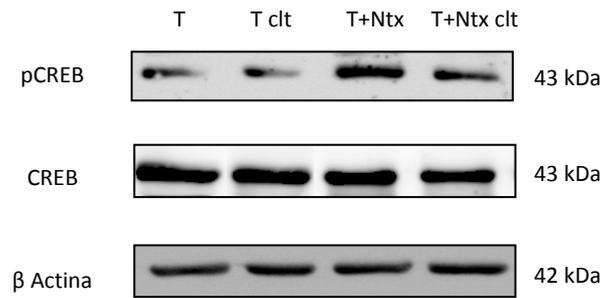


Figura 37. Western blot de las proteínas pCREB, CREB en homogenado de cerebro. B Actina como control de carga. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). n= 8 por grupo.

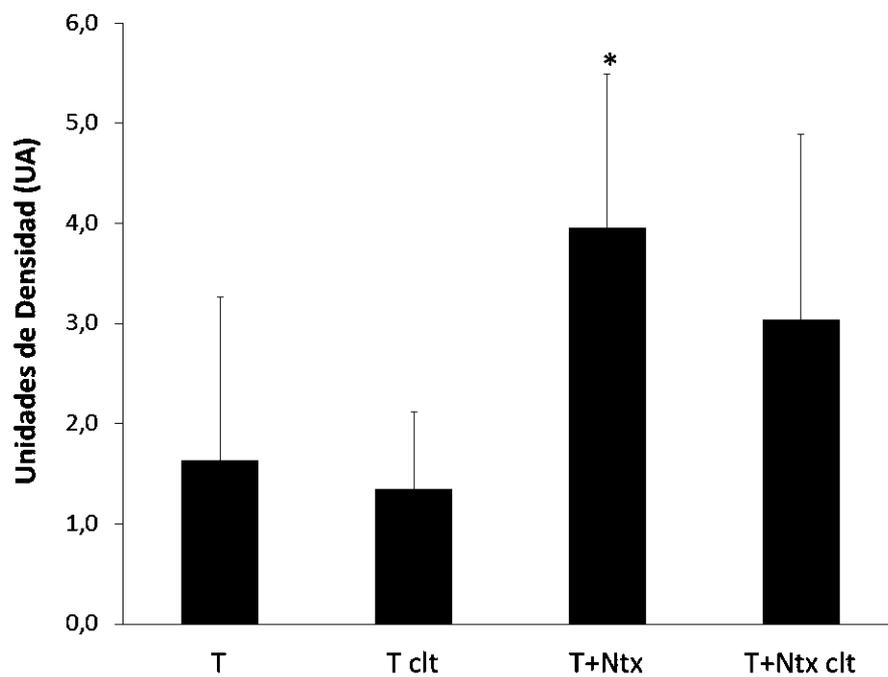


Figura 38. Gráfica de la cuantificación del western blot de la expresión de pCREB en homogenado de cerebro, en los grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). * $p < 0,05$ respecto a todos los grupos. N= 8 por grupo.

4.4 Quinasa reguladora de señales extracelulares (ERK)

La activación de ERK produce un aumento en la actividad de AMPc, y consecuentemente es una de las vías de fosforilación de CREB. En su análisis por western blot (Figura 39) se ha comprobado que existe un aumento de la fosforilación

de ERK 42 en los grupos Trauma y Trauma contralateral, en comparación con los grupos tratados con naltrexona, y dicho aumento es estadísticamente significativo como se puede comprobar en la cuantificación representada en la gráfica de la Figura 40. Se demuestra en estos resultados que el tratamiento con naltrexona, posterior a la lesión cerebral, disminuye la fosforilación de ERK 42.

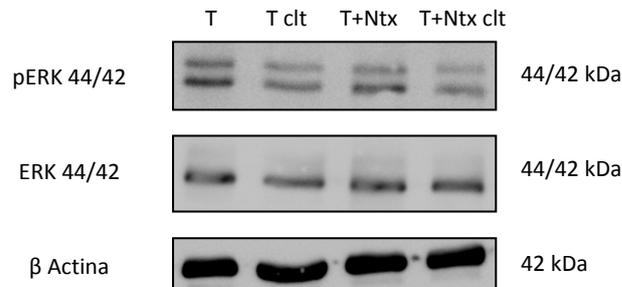


Figura 39. Western Blot de las proteínas pERK, ERK en homogenado de cerebro. B Actina como control de carga. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). n= 8 por grupo.

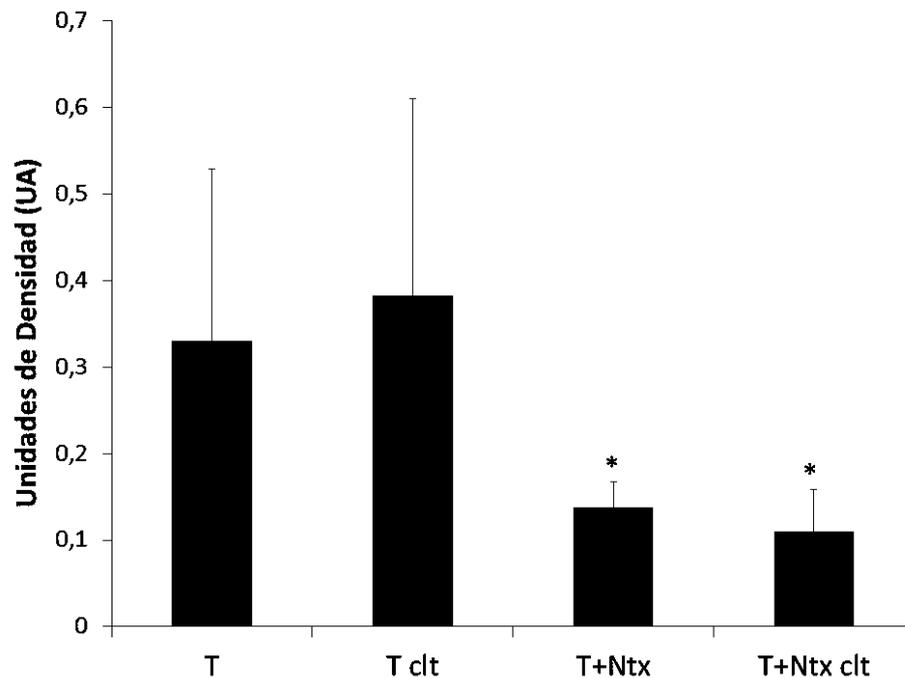


Figura 40. Gráfica de la cuantificación del western blot de la expresión de pERK 42 homogenado de cerebro, en los grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). * $p < 0,05$ respecto al grupo Trauma y al grupo Trauma Contralateral. N= 8 por grupo.

4.5 Factor neurotrófico ciliar (CNTF)

Después de una lesión se produce una activación de CNTF, especialmente en el cerebro, por mediación de los astrocitos como parte de la respuesta neuroinflamatoria (Lin et al., 2009). En su análisis por quimioluminiscencia, utilizando el kit Rat Cytokine Array Panel A (Figura 41) se ha comprobado que existe un aumento de CNTF en el grupo Trauma Naltrexona, en comparación con el resto de los grupos. En la cuantificación y representación gráfica se observa que dicho aumento es estadísticamente significativo (Figura 42). Se puede observar que el tratamiento con naltrexona aumenta la activación de CNTF tras la lesión.

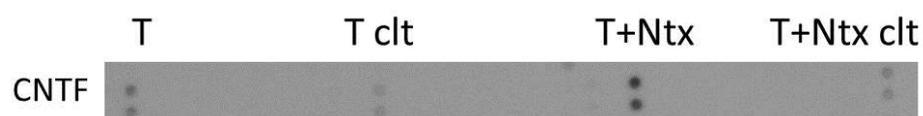


Figura 41. Rat Cytokine Array Panel A de la proteína CNTF, en homogenado de cerebro. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). n= 3 por grupo.

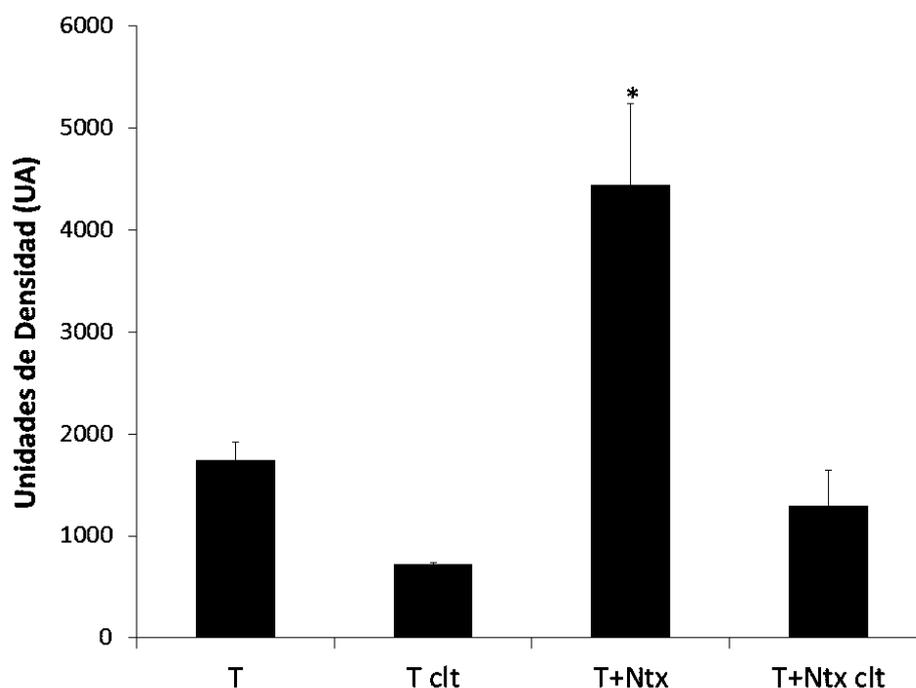


Figura 42. Gráfica de la cuantificación de la proteína CNTF, en homogenado de cerebro, en los grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). * $p < 0,05$ respecto todos los grupos. N= 3 por grupo.

4.6 Proteína activadora de neutrófilos 2 (NAP-2/CXCL-7)

La proteína CXCL-7 se activa para favorecer la migración de los leucocitos hacia los lugares dañados después de una lesión. Como se puede observar en el análisis realizado (Figura 43) existe un aumento de CXCL-7 en el grupo Trauma Naltrexona, en comparación con el resto de los grupos. Y en la Figura 44 se observa gráficamente que este aumento en la cuantificación de CXCL-7 es estadísticamente significativo. Lo cual indica el tratamiento de naltrexona, aplicado después de la lesión cerebral, favorece la activación de CXCL-7.



Figura 43. Rat Cytokine Array Panel A de la proteína CXCL-7 en homogenado de cerebro. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). n= 3 por grupo.

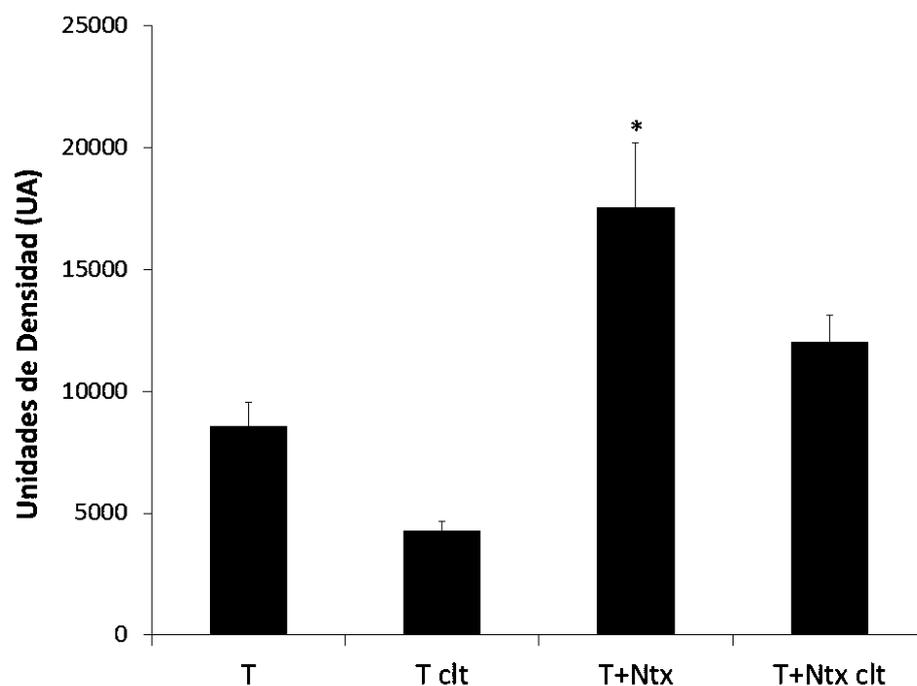


Figura 44. Gráfica de la cuantificación de la proteína CXCL-7 en homogenado de cerebro, en los grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). * $p < 0,05$ respecto todos los grupos. n= 3 por grupo.

4.7 Molécula soluble de adhesión intercelular tipo 1 (sICAM-1)

Esta molécula de adhesión forma parte de las moléculas que regulan la respuesta inmune. sICAM-1 activada, en conjunto con CXCL-7 y las selectinas, favorecen la migración de leucocitos hacia el lugar de la lesión. Como se puede apreciar en la Figura 45 existe un aumento en la activación de sICAM-1 en el grupo Trauma Naltrexona en comparación con el resto de grupos. Este aumento se ve reflejado gráficamente en la Figura 46 y se puede observar que es estadísticamente significativo, lo que implica que el tratamiento con naltrexona posterior a la lesión cerebral aumenta la activación de sICAM-1.



Figura 45. Rat Cytokine Array Panel A de la proteína sICAM-1 en homogenado de cerebro. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). n= 3 por grupo.

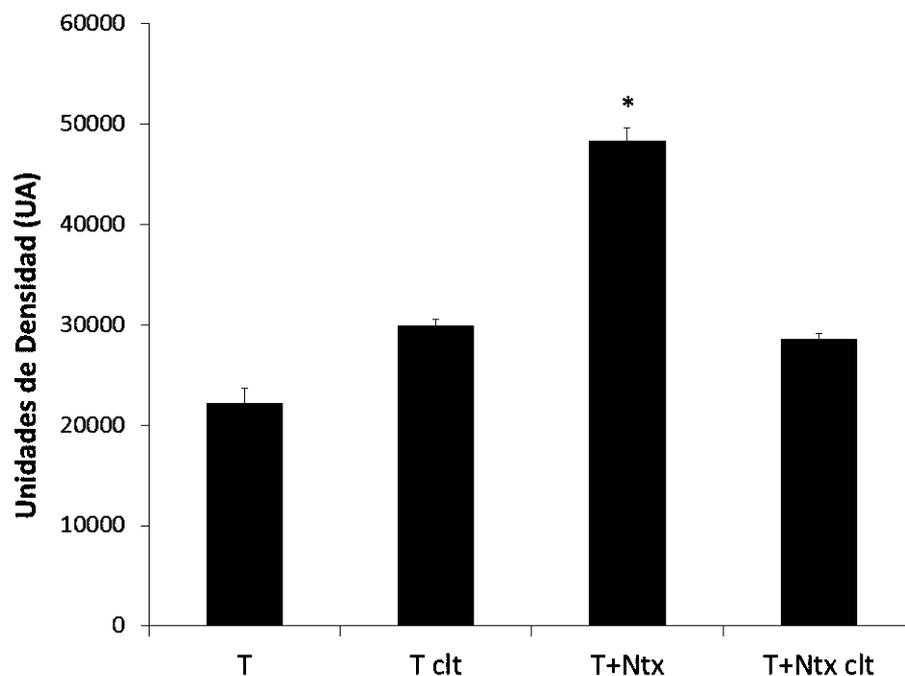


Figura 46. Gráfica de la cuantificación de la proteína sICAM-1 en homogenado de cerebro, en los grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). * p<0,05 respecto todos los grupos. N= 3 por grupo.

4.8 Selectina Leucocitaria (CD62L)

Las selectinas son las primeras en activarse en caso de daño. La selectina leucocitaria favorece la migración rápida de los leucocitos hacia los lugares dañados. Como se puede apreciar en su análisis (Figura 47) existe un aumento de CD62L en el grupo Trauma Naltrexona, en comparación con el resto de los grupos. La representación gráfica de la Figura 48 demuestra que este aumento es estadísticamente significativo, indicando que el tratamiento con naltrexona aplicado después de la lesión cerebral favorece la activación de CD62L.

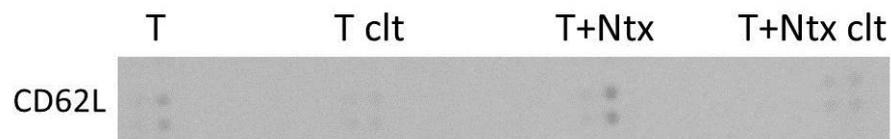


Figura 47. Rat Cytokine Array Panel A de la proteína sICAM-1 en homogenado de cerebro. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). n= 3 por grupo.

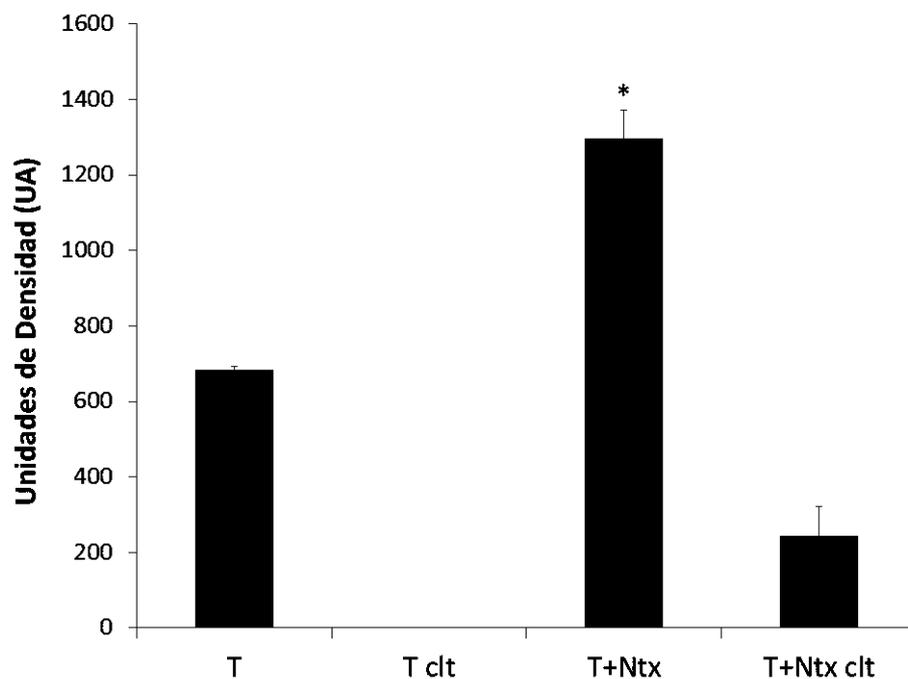


Figura 48. Gráfica de la cuantificación de la proteína CD62L en homogenado de cerebro, en los grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). * $p < 0,05$ respecto todos los grupos. N= 3 por grupo.

4.9 Fractalquina (CX3CL-1)

La fractalquina desempeña un papel importante en la comunicación que existe entre las neuronas y la microglía, regulando la activación de esta última. Después una lesión cerebral existe una activación de esta proteína (Wolf et al., 2014), y como se puede apreciar en la Figura 49 de nuestros resultados, existe una activación de CX3CL-1 en el homogenado de la lesión cerebral. Esta activación, sin embargo, no muestra diferencias entre los grupos tratados con naltrexona y los que no han recibido el tratamiento como se aprecia en la comparación gráfica (Figura 50).



Figura 49. Rat Cytokine Array Panel A de la proteína CX3CL-1 en homogenado de cerebro. Grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). n= 3 por grupo.

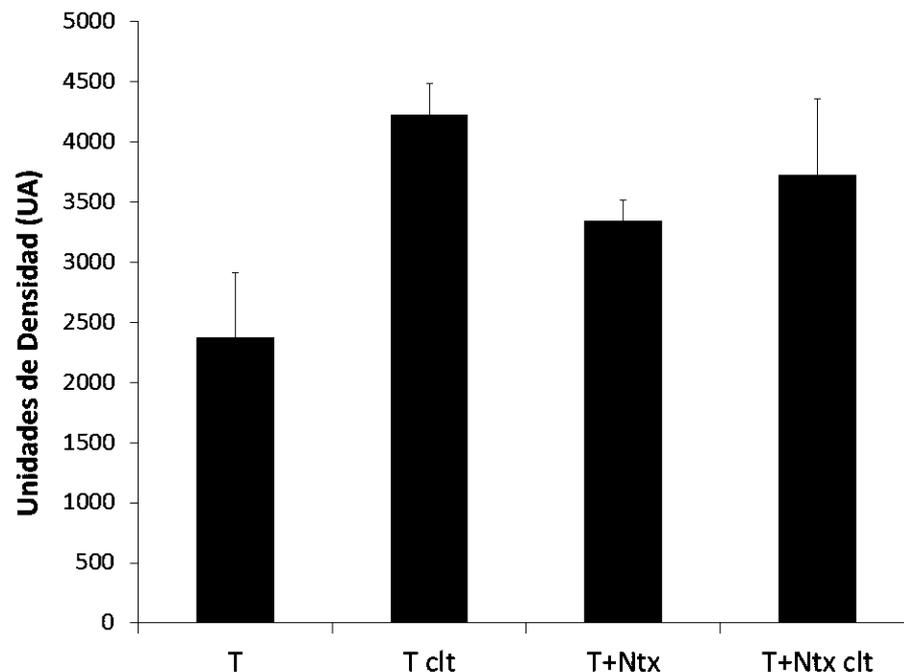


Figura 50. Gráfica de la cuantificación de la proteína CX3CL-1 en homogenado de cerebro, en los grupos Trauma (T), Trauma Contralateral (T clt), Trauma + Naltrexona (T+Ntx) y Trauma + Naltrexona Contralateral (T+Ntx clt). n= 3 por grupo.

V. DISCUSIÓN

1. Marcador de la actividad fagocítica: ED-1

Después de realizar las pruebas de western blot de ED-1 (Figura 23), se ha comprobado, que tras el estímulo producido por la lesión cerebral, esta proteína incrementa su expresión comparándolo con el lado contralateral, en el que no había lesión. En nuestro modelo experimental, este aumento, en el grupo tratado con naltrexona es mucho mayor y es estadísticamente significativo en comparación con el grupo sin tratar (Figura 24). Se sabe que la microglía son las células residentes del sistema inmune del SNC que funcionan como macrófagos; actúan como una primera línea de defensa (Chavarría & Cárdenas, 2013) y responden a diversos estímulos (Ransohoff & Perry, 2009; Suzumura, 2013), como en el caso de la lesión cerebral, activándose. Una vez activada, cambia su morfología espinosa por una ameboide, y migran hacia las zonas lesionadas, allí liberan diversas sustancias como interleuquinas, quimiocinas y nucleótidos de ATP (Honda et al., 2001; El Khoury & Luster, 2008; Suzumura, 2013). Además la microglía desempeña funciones neurotóxicas y neuroprotectoras (Farfara et al., 2008; Skaper et al., 2013; Suzumura, 2013). Como se ha mencionado en la Introducción, ED-1 es una proteína lisosomal presente en la microglía, macrófagos y fagocitos mononucleares (Graeber et al., 1990; Slepko & Levi 1996). Inmunohistoquímicamente y microscópicamente no se puede identificar si las células ED-1 positivas son microglía o macrófagos que han migrado a la zona lesionada (Annunziato et al., 2013). Sin embargo, la microglía residente del SNC son las células inmunocompetentes predominantes (Schilling et al., 2005).

Para determinar si esta activación fagocítica mononuclear en nuestros grupos tratados con naltrexona es beneficiosa o perjudicial, hemos tenido en cuenta parámetros de estrés oxidativo, supervivencia celular, diversos factores de transcripción y citoquinas.

Hay una gran cantidad de estudios que investigan sobre el verdadero papel que cumple la microglía en el cerebro; algunos sostienen que la microglía tiene una función de regulación de la neurogénesis favoreciéndola (Ekdahl et al., 2003; Monje et al., 2003; Butovsky et al., 2006; Ziv et al., 2006), y otros, en cambio, postulan que la perjudica, disminuyendo la supervivencia neuronal (Fujioka & Akema, 2010; Keohane et al., 2010; Kohman & Rhodes, 2013). Sin embargo, en nuestros resultados se puede

observar que, el aumento de ED-1 en el grupo tratado con naltrexona (Figura 24) coincide con un aumento estadísticamente significativo en la supervivencia celular, como indican las células BrdU positivas encontradas en el grupo Trauma Naltrexona (Figura 31). Dado que la activación de fagocitos mononucleares, como la microglía, es necesaria para fagocitar las células que mueren, y favorecer que las células que nacen como parte de la regeneración celular, migren hacia la zona lesionada y puedan madurar en ese lugar (Sierra et al., 2010). Es posible que este aumento en la actividad fagocítica ayude a la eliminación de las células muertas en la zona de la lesión cerebral y así facilite las posibilidades de recuperación del tejido y sus funciones.

Estudios experimentales han determinado que el papel perjudicial que desempeña la activación de microglía/fagocitos en la supervivencia celular, se debe a que favorece la secreción de sustancias neurotóxicas como citoquinas inflamatorias IL-1 β , TNF α , IL-6, óxido nítrico, superóxidos y glutamato, entre otros. Estas sustancias dificultan la recuperación de las funciones celulares y, específicamente después de una lesión cerebral, las funciones neuronales. Sin embargo, se ha comprobado que la naltrexona disminuye la producción de TNF α en un modelo experimental de shock séptico (Dinarello, 1997) y el estrés oxidativo en el hipocampo, en un modelo experimental de alcoholismo crónico (Almansa et al., 2013). Teniendo en cuenta estos datos, se puede suponer que el tratamiento con naltrexona, aplicado en nuestro estudio, podría producir una disminución de factores neurotóxicos como TNF α , favoreciendo la supervivencia y recuperación de las células dañadas después de la lesión cerebral.

Por otro lado, se ha atribuido a la microglía activada un papel importante en la producción de factores neurotróficos, como CNTF, que contribuyen a la reparación y restauración tisular, y la regulación de la homeostasis (Neumann et al., 2006; Lalancette-Hébert et al., 2007), mediante la disminución de la secreción de IL-1 β y TNF α , entre otras funciones (Kradly et al., 2008; Lin et al., 2009). Ya que en nuestros resultados encontramos que el tratamiento con naltrexona aumenta, de forma estadísticamente significativa, la activación de CNTF en el grupo tratado en comparación con el resto de grupos (Figura 42), es posible que este factor neurotrófico ayude a disminuir la secreción de IL-1 β y TNF α , ambos factores neurotóxicos, y favorezca la supervivencia neuronal en nuestros animales. Teniendo en cuenta los datos anteriores, se puede considerar que CNTF también esté involucrado en el

aumento de supervivencia celular que podemos observar en el grupo tratado con naltrexona en la Figura 31.

2. Estrés oxidativo: Peroxidación Lipídica y Defensas Antioxidantes

En el apartado de la Introducción se ha descrito que la peroxidación lipídica produce alteraciones en los flujos de las membranas celulares, aumenta su permeabilidad, y la degradación oxidativa de los lípidos, que provoca una inestabilidad en las membranas celulares, se genera un daño celular, especialmente en las neuronas, donde los lípidos poliinsaturados son muy abundantes (Cornelius et al., 2013). En el caso de un trauma cerebral, ya sea por isquemia, hemorragia o contusión, la peroxidación lipídica forma parte del daño secundario, que genera una alteración en los lípidos, las proteínas, ácidos nucleicos (Povlishock & Kontos, 1992; Juurlink & Paterson, 1998; Mendes Arent et al., 2014), que conlleva un aumento de la muerte celular (Guéraud et al., 2010; Cornelius et al., 2013). Por este motivo, se puede asumir que tras la lesión cerebral existe un aumento de la peroxidación lipídica, y posiblemente del estrés oxidativo. Y para verificar si existe un aumento de la peroxidación lipídica y el estrés oxidativo en nuestro estudio, se realizaron pruebas para medir la concentración de MDA y GSH en suero y homogenado de la lesión cerebral, como se explica en el apartado de Material y Métodos.

Según los resultados obtenidos comparando la zona de la lesión con su lado contralateral, la lesión no afecta a la peroxidación lipídica ni a la concentración de GSH, un antioxidante endógeno. En el análisis realizado en el presente estudio, se observa que no existen diferencias en la concentración de MDA en suero entre los grupos Trauma y Trauma Naltrexona, como se puede apreciar en la Figura 25; así como tampoco se observan diferencias entre los grupos tratados con naltrexona y los que no han recibido el tratamiento, en los niveles de MDA en el homogenado de la lesión cerebral (Figura 26). Se ha documentado que después de la segunda hora tras una lesión cerebral los niveles de MDA aumentan, y persisten hasta siete días aproximadamente (Bayir et al., 2002). El análisis que realizamos en nuestro estudio se lleva a cabo diez días después de la lesión cerebral. Dado que los niveles de MDA

disminuyen a partir del séptimo día, es posible que al realizar la cuantificación de MDA al décimo día, dichos niveles de MDA hayan disminuido hasta conseguir la homeostasis en todos los grupos analizados en suero y homogenado de cerebro. Por ello, se ha considerado como un posible motivo por el cual no existan diferencias en la cuantificación de MDA en los grupos tratados con naltrexona y los no tratados.

En el análisis realizado en homogenado de cerebro, se puede apreciar en la cuantificación de glutamato que no existen diferencias entre los grupos (Figura 30). Asimismo, en la cuantificación de GSH tampoco se observan diferencias en cerebro entre los grupos tratados y los grupos que no han recibido tratamiento con naltrexona (Figura 27).

Por lo tanto, según los datos obtenidos, la lesión cerebral parece no efectuar ningún cambio en los niveles de MDA, GSH y glutamato. Así como tampoco el tratamiento con naltrexona parece no generar diferencias en los parámetros de estrés oxidativo en los grupos tratados en comparación con los grupos que no han recibido el tratamiento.

3. Supervivencia celular

Actualmente se sabe que la producción de células en el SNC (neuronas y células gliales), se lleva a cabo durante toda la vida de los vertebrados, pero está restringida a determinadas áreas del SNC adulto (Gould et al. 1999; Kempermann & Gage, 2000; Álvarez-Buylla & García-Verdugo, 2002; Ming & Song, 2005; Noguès et al., 2012; Brus et al., 2013), siendo éstas la zona subventricular, el GD del hipocampo y diferentes áreas de la corteza cerebral (Kempermann & Gage, 2000; Lledo et al., 2006; Arias-Carrión et al., 2007; Noguès et al., 2012). Sin embargo, después de una agresión al SN, se incrementa la proliferación celular para compensar la pérdida ocasionada por el daño, y se generan células madre pluripotenciales, que posteriormente migrarán al lugar de la lesión (Kojima et al., 2010), y allí se diferenciarán en neuronas o células gliales (Arvidsson et al., 2002; Nakatomi et al., 2002).

En el presente estudio, se puede apreciar cómo en las zonas lesionadas, de los grupos Trauma y Trauma Naltrexona, existe un aumento de la supervivencia celular, en comparación con las zonas contralaterales (Figuras 31-32). Además, se puede observar cómo el grupo Trauma tratado con naltrexona tiene un mayor número de células BrdU positivas que el grupo lesionado que no ha recibido el tratamiento.

Se sabe que la activación de la microglía puede favorecer la recuperación y regeneración neuronal (Neumann et al., 2006; Lalancette-Hébert et al., 2007). Como se ha observado en los resultados de ED-1, existe un aumento de esta proteína en el grupo Trauma Naltrexona, así como también existe un aumento de células BrdU positivas en el mismo grupo, y en ambos casos (los resultados de ED-1 y BrdU) es estadísticamente significativo en comparación con el resto de grupos (Figuras 24 y 31). Por eso se ha considerado la posibilidad de que el aumento de ED-1, producido mediante el tratamiento con naltrexona, pueda favorecer la supervivencia celular en el cerebro, después de la lesión cerebral.

4. Factores de transcripción y citoquinas

Se realizaron diversas pruebas para determinar si el aumento en ED-1 en el grupo tratado con naltrexona modifica la liberación de dichos factores. Ya que estos factores de transcripción están implicados en procesos de neurogénesis y neuroprotección, asociados a la regeneración y degeneración celular. Dado que la microglía tiene un papel controvertido, no se puede afirmar que su activación sea precursora de regeneración celular, por ello, el análisis de estas moléculas, pretende ayudar a determinar el papel que juega el aumento en la actividad de microglía/fagocitos observado después de la lesión en nuestro estudio.

4.1 Factor Nuclear Kappa B (NF- κ B)

Uno de los factores de transcripción analizados ha sido NF- κ B, porque se sabe que desempeña un papel importante en las respuestas neuronales frente a una lesión.

Diversos estudios han comprobado que después de una lesión cerebral la actividad NF- κ B aumenta y se mantiene durante un tiempo (Nonaka et al., 1999; Sanz et al., 2002; Plesnila et al., 2007). Asimismo, NF- κ B interviene en procesos inflamatorios, y por ello se le atribuyen acciones neuroprotectoras y neurotóxicas (Acarin et al., 2001; Brambilla et al., 2005; Lian et al., 2012); aunque varios autores sostienen que esta ambigüedad se debe a que los efectos beneficiosos y/o perjudiciales de NF- κ B dependen del tiempo y la intensidad de la respuesta inflamatoria (Lenzlinger et al., 2001; Morganti-Kossmann et al., 2002; Mattson & Meffert, 2006).

En algunos estudios se ha observado que la activación de NF- κ B promueve la producción de óxido nítrico (Bhaskaran et al., 2010), favoreciendo la inflamación y empeorando la recuperación. Otro estudios, sostienen que inhibiendo la ruta de señalización de NF- κ B puede haber una disminución en la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-6 y óxido nítrico en la microglía activada (Xue et al., 2008; He et al., 2011). Como se ha comprobado en nuestros resultados de NF- κ B, no se observan diferencias entre los grupos.

4.2 Proteína quinasa A (PKA)

PKA, como se ha mencionado en apartados anteriores, es una proteína AMPc dependiente, que favorece la fosforilación de CREB (Carlezon et al., 2005) y cumple funciones neuronales importantes; está implicada en el tráfico y degradación de proteínas, la transcripción de genes, la regulación de la excitabilidad neuronal y otras funciones neuronales (Choi et al, 2002; Hoshi et al, 2005; Inan et al, 2006). Después de un TCE se puede considerar que existe un aumento de los niveles de AMPc como parte de la cascada de sucesos que se desencadenan y, consiguientemente, un aumento en los niveles de PKA. Sin embargo, en estudios realizados con diferentes modelos de trauma cerebral, se ha observado que los niveles de AMPc pueden permanecer inmutables (Armstead, 1997; Bell et al., 1998) o incluso pueden descender crónicamente y mantenerse así hasta dos semanas después del trauma (Pearse et al., 2004). Dado que los niveles de AMPc después de un trauma cerebral pueden

disminuir, es posible que la activación de PKA también disminuya (Hu et al., 2004; Atkins et al., 2006; Chen et al., 2006).

Inicialmente se había considerado que PKAc (subunidad catalítica) podría ser una de las proteínas activadas después de la lesión y una de las vías de activación de CREB para este estudio experimental. Tras en el análisis por western blot se ha observado que PKA no difiere entre los grupos de estudio (Figura 35 y 36). Sin embargo, sí que se observa un incremento de pCREB en el grupo Trauma Naltrexona (Figura 38). Por lo que se podría considerar que la vía por la cual se activa pCREB es diferente a la vía de PKA.

En estudios experimentales se ha visto que la inhibición de la activación de PKA reduce los factores que promueven el estrés oxidativo y la apoptosis (Hui et al., 2010; Eftekhazadeh et al., 2012), y que favorecen la expresión de genes involucrados en los procesos inflamatorios (Kim et al., 2009). Dado que la activación de PKA parece estar ligada al estrés oxidativo, sería interesante comparar los resultados que hemos obtenido con respecto al análisis de estrés oxidativo por medio del estudio de MDA (Figuras 25-26), GSH y GSSG (Figuras 27-28). En estos resultados se observa que no existen diferencias entre los grupos analizados, al igual que en el análisis de PKA tampoco se observan diferencias entre los grupos (Figura 36). Por eso, se ha considerado la posibilidad de que la vía de activación de los factores que producen estrés oxidativo esté mediada por PKA y que los factores que promueven el estrés oxidativo y la apoptosis mediante la vía de señalización de PKA estén reducidos, como otros estudios han comprobado (Hui et al., 2010; Eftekhazadeh et al., 2012). Por lo tanto, si la vía de señalización de estrés oxidativo es la de PKA, y en ella no hay diferencias, consecuentemente no existirían diferencias entre los grupos en la cuantificación de MDA, GSH y GSSG, que es precisamente lo que se puede apreciar en nuestros resultados.

4.3 Proteína de unión al elemento de respuesta de AMPc (CREB)

Tras un TCE, existe una gran pérdida neuronal que implica un deterioro en las uniones bioquímicas y moleculares. Esta pérdida tiene como repercusión un daño en la

transcripción de diferentes genes, y asimismo una pérdida en las funciones sinápticas, cognitivas y de memoria, entre otras (Atkins et al., 2009). El papel del organismo es reestablecer la completa funcionalidad de las neuronas dañadas, que haya regeneración axonal, y que se establezcan nuevas conexiones sinápticas, sin embargo, esto se ve condicionado por la cadena de sucesos que dificultan o ayudan a que esto se lleve a cabo. Diversos estudios han visto que existe un aumento en la activación de CREB tras un daño cerebral en neuronas, en la corteza cerebral y en el hipocampo (Yoneda et al., 1994; Salminen et al., 1995; Walton et al., 1996), que favorece la regeneración y supervivencia neuronal (Lau et al., 2013). Así como se ha considerado como regulador directo de la expresión genética antioxidante (Krönke et al. 2003). Sin embargo, también es posible que después de un TCE los niveles de pCREB disminuyan (Atkins et al., 2009), lo que puede derivar en un daño cerebral secundario.

En la cuantificación de pCREB se puede observar un aumento estadísticamente significativo en la activación de pCREB, en el grupo Trauma Naltrexona en comparación con el resto de grupos (Figura 38). Este aumento de pCREB en el grupo Trauma Naltrexona, parece estar relacionado con el aumento de supervivencia celular en el mismo grupo obtenido de la cuantificación de las células BrdU positivas (Figura 31). Estos datos sugieren que el tratamiento con naltrexona después de una lesión cerebral podría favorecer la supervivencia celular en el cerebro gracias en parte a la activación de CREB.

Diversos estudios han observado que después de una lesión existe un aumento de la activación de CREB en astrocitos, oligodendrocitos, células endoteliales y microglía, que se ha asociado a la supervivencia celular (Tanaka et al., 2001; Sugiura et al., 2004). Como se puede comprobar en la Figura 24, en el grupo Trauma Naltrexona existe un aumento de ED-1 al igual que en la Figura 38 existe un aumento de pCREB en el mismo grupo, ambos aumentos estadísticamente significativos. Esto indica que el tratamiento con naltrexona en nuestro estudio favorece la activación pCREB, posiblemente por medio de ED-1. Lo que nos permite pensar que la activación de la microglía y demás fagocitos esté relacionada con la activación de CREB, como otros estudios han visto en modelos de lesión cerebral isquémica (Jung et al., 2010).

4.4 Quinasa reguladora de señales extracelulares (ERK)

La vía de señalización de ERK participa de forma activa en diversos procesos celulares como la adhesión, diferenciación, migración, proliferación y supervivencia (Fang & Richardson, 2005), así como en el metabolismo y la transcripción de genes (Roskoski, 2012). Se ha comprobado que ERK cumple funciones relacionadas con la supervivencia neuronal (Subramaniam & Unsicker, 2006), así como también cumple funciones en la muerte neuronal (Subramaniam & Unsicker, 2010). Se sabe, asimismo, que la vía de señalización de MAPK/ERK se activa tras una lesión cerebral (Mori et al., 2002). En el presente trabajo en los grupos Trauma que han recibido el tratamiento con naltrexona (Trauma Naltrexona y Trauma Naltrexona contralateral), se observa que pERK está reducida significativamente, en comparación con los grupos que no han recibido el tratamiento (Figura 40).

Hasta la fecha, ningún estudio ha podido comprobar que ERK actúe de forma autónoma en los procesos celulares desencadenados por una lesión cerebral. Generalmente, desempeña sus funciones cooperando con factores de transcripción e interleuquinas, entre otros, y de esta forma es capaz de ejercer funciones para favorecer la supervivencia o muerte neuronal (Luo & DeFranco, 2006). Si se asocia a factores neurotróficos como, por ejemplo, BDNF o VEGF, pERK desempeñaría una función de intermediario favoreciendo la reparación y protección neuronal (Almeida et al., 2005; Ma et al., 2011). No obstante, en nuestros resultados se puede observar una disminución de pERK en los grupos Trauma Naltrxona y Trauma Naltrexona contralateral (Figura 40).

La vía de señalización de MAPK/ERK está involucrada con la regulación del aumento de apoptosis neuronal producida por la lesión (Zhao et al., 2012), por lo que la inhibición de esta vía de señalización, podría tener efectos neuroprotectores, como estudios anteriores han demostrado (Zhao et al., 2012; Han et al., 2014). Si se observan los resultados obtenidos en su conjunto, el tratamiento con naltrexona favorece la supervivencia celular y la regeneración celular a través del aumento de diversas proteínas (pCREB, CNTF). Por lo que se puede considerar que la inhibición de la vía de señalización de ERK por medio del tratamiento con naltrexona, favorece la supervivencia y regeneración celular.

4.5 Factor Neurotrófico Ciliar

Como ya se ha mencionado CNTF cumple funciones neuroprotectoras (Lee et al., 2013), favoreciendo la supervivencia de diversas poblaciones neuronales (Ip et al., 1991; Oppenheim et al., 1991; Lärkfors et al., 1994; Simon et al., 1995). La producción de CNTF también favorece la supervivencia de células de la retina, incluidas las células madre progenitoras (Dutt et al., 2010), además, parece estar implicado en la inhibición de apoptosis (Santos et al., 2011) y en la regeneración de neuritas (Pernet et al., 2013). CNTF, no sólo favorece la supervivencia neuronal, sino que también cumple funciones en la respuesta inmune regulando la neuroinflamación (Lin et al., 2009) y promueve la proliferación de las células gliales (Fu et al., 2014). Si se observan los resultados obtenidos en la cuantificación de CNTF en los grupos de estudio, se puede apreciar que existe una activación significativamente mayor en el grupo Trauma Naltrexona (Figura 42). A su vez se observó un aumento significativo en la supervivencia celular en el mismo grupo (Figura 31), lo cual parece ser congruente con las funciones protectoras de CNTF y su capacidad de favorecer la supervivencia celular. Asimismo, CNTF parece no ser el único factor neurotrófico activado, ya que en el grupo Trauma Naltrexona también se observa un aumento estadísticamente significativo de pCREB (Figura 38), que se sabe que favorece la regeneración y supervivencia neuronal (Lau et al., 2013). El aumento estadísticamente significativo en el grupo Trauma Naltrexona de CNTF (Figura 42), pCREB (Figura 38) y las células BrdU positivas (Figura 31), parecen indicar que el tratamiento con naltrexona favorece la supervivencia y la regeneración celular.

Después de una lesión, CNTF incrementa su expresión activando a la microglía (Martin et al., 2003; Lin et al., 2009). Como se puede apreciar en nuestros resultados existe un aumento de CNTF en el grupo Trauma Naltrexona y un aumento de ED-1 en el mismo grupo (Figura 24). Es posible que CNTF favorezca la proliferación y activación de las células gliales, incluyendo la microglía (Kradly et al., 2008; Fu et al., 2014). Sin embargo, no se debe desestimar que la activación de la glía después de una lesión cerebral favorece la secreción de múltiples sustancias, y algunas de ellas pueden resultar tóxicas para las neuronas, como lo son $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ y la ciclooxigenasa-2, todas ellas proteínas inflamatorias (Ekdahl et al., 2003; Monje et al., 2003; Kierdorf & Prinz, 2013). Sin embargo, CNTF disminuye la activación de estas proteínas

inflamatorias (Kradly et al., 2008; Lin et al., 2009) y promueve la supervivencia celular después de una lesión, favoreciendo el crecimiento tisular (Kradly et al., 2008). Por consiguiente, se puede suponer que el tratamiento con naltrexona por medio de la activación de CNTF, secretadas por la microglía activada, favoreciendo así la regeneración tras lesión.

4.6 Proteína activadora de neutrófilos 2

Tras una lesión cerebral existe una migración celular al lugar lesionado, como parte de la respuesta inmune, generalmente encabezada por las células gliales, que desencadena inflamación, y posteriormente favorecen la recuperación por medio de la regeneración tisular, la neurogénesis y angiogénesis (Rocamonde et al., 2012). Se ha descrito que CXCL-7 favorece esta migración celular a las zonas lesionadas (Schenk et al., 2002; Kalwitz et al., 2009; Carlson et al., 2013). Se ha observado en nuestro estudio, que la activación de CXCL-7 es estadísticamente mayor en el grupo Trauma Naltrexona en comparación con el resto de grupos (Figura 43 y 44). Dado que en nuestros resultados hemos obtenido un aumento de la expresión de ED-1, en el grupo Trauma Naltrexona (Figura 24), sería razonable que existiese un aumento en las proteínas quimioatrayentes que promuevan la migración transendotelial de leucocitos como lo es CXCL-7/NAP-2. Por lo que, este aumento de CXCL-7 que se observa en nuestros resultados (Figura 44) se podría asociar al aumento existente en la expresión de ED-1 (Figura 24).

Asimismo, CXCL-7 activa diversos factores como IL-6, LIF y gp130, que forman parte de la familia de CNTF, y que están involucrados en la diferenciación celular y la inflamación (Falconi et al., 2007; Levashova et al., 2007). Por este motivo, sería posible que CXCL-7 esté involucrado en la activación de CNTF, ya que en nuestros resultados se puede observar que en ambos casos existe un aumento estadísticamente significativo en la cuantificación de estas proteínas en el grupo Trauma Naltrexona (Figuras 42 y 44). CXCL-7 podría desempeñar un papel importante disminuyendo la inflamación y favoreciendo diferenciación y supervivencia celular, mediante la activación de CNTF por medio del tratamiento con

naltrexona, ya que como se ha mencionado en el apartado anterior CNTF actúa disminuyendo algunas proteínas inflamatorias (Kradny et al., 2008; Lin et al., 2009).

4.7 Molécula soluble de adhesión intercelular tipo 1

La proteína sICAM-1 forma parte de las citoquinas expresadas en la respuesta inflamatoria que se da después de un TCE (Pugin et al., 1999; Harting et al., 2008; Mukherjee et al., 2011). Esta, regula la respuesta inmune, atrayendo al lugar de la lesión células activadas, favoreciendo la migración leucocitaria a través del endotelio (Hafler & Weiner, 1989; Yilmaz & Granger, 2008) y la angiogénesis (Lawson & Wolf, 2009). Por eso, podría desempeñar un papel importante en la respuesta inmune después de un TCE.

En el análisis realizado en los grupos de estudio se ha comprobado que existe un aumento de la expresión de sICAM-1 estadísticamente significativo en el grupo Trauma Naltrexona, en comparación con el resto de grupos (Figura 46). Este aumento observado en el grupo Trauma Naltrexona concuerda con el aumento encontrado en la cuantificación de ED-1 (Figura 24). Dado que las células de la microglía expresan sICAM-1 (Zielasek et al., 1993; Kim et al., 2012), es posible que las células de la microglía estén involucradas en la expresión de sICAM-1, y por ello se observe en la cuantificación del grupo Trauma Naltrexona un aumento en ED-1 y sICAM-1. Asimismo, sICAM-1 no sólo se expresa en la microglía sino que además disminuye los factores inflamatorios de esta, favoreciendo la fagocitosis y la regeneración celular (Townsend et al., 2005; Kim et al., 2012). Teniendo en cuenta estos datos, se podría pensar que este aumento de sICAM-1 en el grupo Trauma Naltrexona favorece la supervivencia celular después de la lesión. Y si se observan los resultados obtenidos en el análisis inmunohistoquímico de BrdU (Figura 31), que marca supervivencia celular, se puede comprobar que existe mayor supervivencia celular en el grupo Trauma Naltrexona.

Sin embargo, esta molécula se considera como un factor inflamatorio en sí mismo, y un posible marcador de enfermedad e inflamación epitelial (Chae et al., 2001; Witkowska & Borawska, 2004; Lawson & Wolf, 2009), aunque diversos

estudios experimentales han determinado que la supresión o disminución de sICAM-1, entre otras citoquinas inflamatorias, aumenta el riesgo de muerte tras un trauma (Rancan et al., 2001; Briassoulis et al., 2007). Dado que la inflamación es necesaria para iniciar la producción de factores de crecimiento y la reparación de los tejidos dañados (Briassoulis et al., 2007), es posible que sICAM-1 mediante este proceso favorezca la producción de factores tróficos y de esta forma pueda favorecer la supervivencia celular.

4.8 Selectina Leucocitaria

Esta proteína forma parte de las proteínas expresadas durante la inflamación que se produce después de una lesión, que favorecen la migración, adhesión y circulación de los leucocitos, como parte de la respuesta inmune (Steeber & Tedder, 2000; Ley et al., 2007; Grailer et al., 2009). Como se ha expuesto, la respuesta inmune es variada y compleja, activando en sí misma procesos de regeneración y protección neuronal, así como toxicidad y muerte celular (Quintana et al., 2007). Sin embargo, la respuesta inflamatoria es necesaria para favorecer la regeneración celular por medio de la activación de factores de crecimiento (Briassoulis et al., 2007), y en esta respuesta inflamatoria está involucrada la selectina leucocitaria siendo la primera en activarse después de una lesión (Tu et al., 2002).

Ya que después de un TCE existe un proceso inflamatorio y contando con estas premisas, se esperaría observar en nuestros resultados que la selectina leucocitaria estuviese activada después del TCE. Y como se puede apreciar en la gráfica de la cuantificación de esta selectina, existe un aumento estadísticamente significativo en la activación de la selectina leucocitaria en el grupo Trauma Naltrexona en comparación con el resto de grupos (Figura 48). Teniendo en cuenta que esta selectina forma parte del proceso inflamatorio producido por el TCE, estos datos obtenidos parecen ser un reflejo del resto de resultados, donde se puede apreciar un aumento en la cuantificación de ED-1 en el grupo Trauma Naltrexona (Figura 24), así como un aumento de la proteína leucocitaria CXCL-7 (Figura 44), un aumento de sICAM-1 en el mismo grupo que que los anteriores (Figura 46), y un umento de la selectina leucocitaria (Figura 48)

también en el grupo Trauma Naltrexona. Todas estas proteínas están implicadas en los procesos inflamatorios después de un TCE. Lo que da pie a pensar que todo esto forma parte de la cascada de sucesos desencadenados por el TCE, derivados de la inflamación y la respuesta inmune.

Aunque se ha visto que la falta de selectina leucocitaria reduce el edema y la hemorragia, disminuye el reclutamiento de neutrófilos y la producción de TNF- α en estudios de infecciones cutáneas (Kaburagi et al., 2002), también se ha comprobado que las selectinas e ICAM-1 promueven la regeneración del tejido en heridas interactuando entre ellas, y la falta de alguna de ellas enlentece esta regeneración tisular (Nagaoka et al., 2000; Yukami et al., 2007). Cabe destacar que el tratamiento con naltrexona favorece una mayor producción de CNTF, que se sabe que disminuye la producción de TNF- α , entre otras proteínas inflamatorias. Teniendo en cuenta los resultados de sICAM-1 (forma circulante de ICAM-1), CNTF y la selectina leucocitaria, es posible que se favorezca una respuesta rápida frente a la lesión cerebral, participando así en la regeneración del tejido dañado por la lesión. En nuestros resultados se puede comprobar que este proceso de interacción entre estas proteínas parece favorecer la supervivencia celular en el grupo Trauma Naltrexona, ya que se observa, en la Figura 31, un aumento de las células BrdU positivas.

4.9 Fractalquina

Parte de las consecuencias de una lesión cerebral es la pérdida neuronal, como consecuencia del daño mecánico, o de los procesos desencadenados por la lesión, y que, posteriormente, activa todo un mecanismo de regeneración y reestructuración del SNC para poder recuperar las funciones afectadas por la pérdida neuronal (Albert-Weissenberger & Sirén, 2010; Corneluis et al., 2013). Estos procesos se desarrollan por medio de la activación de múltiples recursos que el organismo utiliza para restaurar las conexiones y el correcto funcionamiento del cerebro, e inequívocamente la microglía cumple un rol fundamental en este proceso, así como los elementos que interactúan con ella, como CX3CL-1, que forma parte de la comunicación neurona/microglía (Tarozzo et al., 2003; Prinz & Priller, 2010; Wolf et al., 2013).

Como se puede apreciar en nuestros resultados de CX3CL-1, sí existe un aumento de la expresión de esta proteína (Figura 49), aunque los grupos lesionados parecen tener menos fractalquina que los grupos contralaterales no existen diferencias estadísticamente significativas entre ellos (Figura 50). Estos resultados, podrían determinar, como se observa en otros estudios, que esta menor activación CX3CL-1 provoque una recuperación neuronal menos favorable, disminuyendo la neuroprotección, la neurogénesis y la neuroregeneración (Bachstetter et al., 2011; Cipriani et al., 2011; Pabon et al., 2011).

Sin embargo, estudios recientes han visto que la supresión parcial de la activación de la microglía, por una menor activación del complejo CX3CL-1/CX3CR-1 (ligando-receptor), reduce la muerte neuronal (Fuhrmann et al., 2010) y promueve la recuperación tras una lesión cerebral (Donnelly et al., 2011; Tang et al., 2014). Este papel se atribuye a que en la comunicación microglía/neurona, con un menor estímulo del complejo CX3CL-1/CX3CR-1, activa principalmente el fenotipo microglial M2, caracterizado por sus propiedades antiinflamatorias y reparadoras, en vez del fenotipo M1, que resulta citotóxico y favorece la inflamación (Tang et al., 2014). Contrariamente a estos estudios, en nuestros resultados se observa un aumento en la activación de ED-1 en el grupo Trauma Naltrexona (Figura 24), y por ello, se podría pensar que esta mayor activación de esta proteína sea perjudicial para la recuperación después de la lesión. Sin embargo, este aumento de ED-1 en el grupo Trauma Naltrexona observado en la Figura 24, está ligado al aumento que se observa en diversos factores tróficos, favorables para la regeneración y supervivencia neuronal, como pCREB (Figura 38) y CNTF (Figura 42). Asimismo, el grupo Trauma Naltrexona también tiene un mayor número de células BrdU positivas (Figura 31), que indican una mayor supervivencia celular en este grupo.

Se sabe que la naloxona y la naltrexona poseen propiedades antiinflamatorias y neuroprotectoras (Hutchinson et al., 2008). Asimismo, desempeña funciones en los receptores no opiodes como los receptores tipo toll 4 (en inglés, TLR4) que se encuentran en los macrófagos como la microglía (Watkins et al., 2007), y se cree que por medio de estos receptores ejerce su función antiinflamatoria. Mediante la disminución de la actividad inflamatoria microglial favorece la neuroprotección (Younger et al., 2014). Además los efectos antiinflamatorios podrían extenderse a la periferia disminuyendo factores como TNF- α y IL-6, así como otros factores inflamatorios (Younger & Mackey, 2009) incluso en macrófagos periféricos (Liu et al., 2006). Por todo esto, se podría considerar que el aumento en la actividad fagocítica vista en los resultados de ED-1 que produce el tratamiento con naltrexona (Figura 24), estaría asociado a una mayor producción de microglía del fenotipo M2, con siderado neurotrófico y antiinflamatorio (Tang et al., 2014).

En el presente estudio se ha comprobado que tras la lesión cerebral se desencadena una serie de sucesos donde diversas citoquinas, factores de transcripción y moléculas se activan como respuesta frente al daño producido por la lesión. Dentro de estos sucesos, se ha observado que el tratamiento con naltrexona administrado posteriormente a la lesión favorece la expresión de ED-1 en nuestros animales (Figura 24), junto a otros factores de transcripción y citoquinas. El aumento de estas citoquinas y factores de transcripción son una pequeña parte de lo que una lesión cerebral conlleva, ya que son muchos los procesos involucrados en ello. Teniendo en cuenta, que en este estudio, ED-1 principalmente incrementa su expresión ~~activa~~ mediante el tratamiento con naltrexona, se puede pensar que las citoquinas que favorecen la migración leucocitaria, sICAM-1 (Figura 46), y la selectina leucocitaria (Figura 48), estén relacionadas con este fármaco. Es complicado comprender el papel de la activación de la fractalquina (Figura 49), que está involucrada en la comunicación entre las neuronas y la microglía. Sin embargo, con los datos que se han obtenido se puede ver el inicio de lo que parece ser el proceso de recuperación de la lesión cerebral, dado que el tratamiento con naltrexona favorece el aumento de CNTF (Figura 42) y pCREB (Figura 38), que promueven la supervivencia celular (Figura 30). Por lo que se puede observar en estos resultados, el tratamiento con naltrexona aumenta la expresión de la ED-1, y por lo que parece puede estar involucrado en la regeneración y

la supervivencia neuronal, promoviendo la liberación de estas citoquinas regeneradoras y los factores de transcripción.

VI. CONCLUSIONES

1. La lesión cerebral no afecta a la concentración de MDA ni GSH en nuestro modelo experimental, así como tampoco lo hace la administración del tratamiento con naltrexona posterior a la misma.

2. Los niveles de PKA y NF- κ B, analizados después de la lesión, no se modifican tras el tratamiento con naltrexona. Sin embargo, el tratamiento posterior a la lesión favorece la expresión de la forma activada de CREB y disminuye la expresión de pERK.

3. El tratamiento con naltrexona, posterior a la lesión cerebral, produce un aumento en la supervivencia celular en nuestro modelo experimental, observado en las células BrdU positivas en el cerebro.

4. Después de la lesión cerebral y tras el tratamiento con naltrexona se favorece la activación de citoquinas que participan en la respuesta tisular frente a la lesión.

5. Después de una lesión cerebral la actividad fagocítica aumenta, siendo esto favorecido por el tratamiento con naltrexona. Esta activación podría promover la supervivencia celular en nuestro modelo experimental.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abel T, Nguyen PV, Barad M, Deuel TA, Kandel ER, Bourtchouladze R. Genetic demonstration of a role for PKA in the late phase of LTP and in hippocampus-based long-term memory. *Cell*. 1997; 88(5):615-626.
- Abdul-Muneer PM, Schuetz H, Wang F, Skotak M, Jones J, Gorantla S, Zimmerman MC, Chandra N, Haorah J. Induction of oxidative and nitrosative damage leads to cerebrovascular inflammation in an animal model of mild traumatic brain injury induced by primary blast. *Free Radic Biol Med*. 2013; 60:282-291.
- Acarin L, González B, Castellano B. Triflusal posttreatment inhibits glial nuclear factor-kappaB, downregulates the glial response, and is neuroprotective in an excitotoxic injury model in postnatal brain. *Stroke*. 2001; 32(10):2394-2402.
- Aglah C, Gordon T, Posse de Chaves EI. cAMP promotes neurite outgrowth and extension through protein kinase A but independently of Erk activation in cultured rat motoneurons. *Neuropharmacology*. 2008; 55(1):8-17.
- Agrawal YP. Low dose naltrexone therapy in multiple sclerosis. *Med Hypotheses*. 2005; 64(4):721-724.
- Albert-Weissenberger C, Sirén AL. Experimental traumatic brain injury. *Exp Transl Stroke Med*. 2010; 2(1):2-16.
- Albouy G, King BR, Maquet P, Doyon J. Hippocampus and striatum: Dynamics and interaction during acquisition and sleep-related motor sequence memory consolidation. *Hippocampus*. 2013; 23(11):985-1004.
- Albrecht PJ, Dahl JP, Stoltzfus OK, Levenson R, Levison SW. Ciliary neurotrophic factor activates spinal cord astrocytes, stimulating their production and release of fibroblast growth factor-2, to increase motor neuron survival. *Exp Neurol*. 2002; 173(1):46-62.
- Albrecht PJ, Enterline JC, Cromer J, Levison SW. CNTF-activated astrocytes release a soluble trophic activity for oligodendrocyte progenitors. *Neurochem Res*. 2007; 32(2):263-271.
- Alkalay I, Yaron A, Hatzubai A, Orian A, Ciechanover A, Ben-Neriah Y. Stimulation-dependent I kappa B alpha phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92(23):10599-10603.
- Allan SM. The role of pro- and antiinflammatory cytokines in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 917:84-93.
- Allan SM, Rothwell NJ. Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*. 2001; 2(10):734-744.
- Allen NJ, Barres BA. Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature*. 2009; 457(7230):675-677.

- Almansa I, Barcia JM, López-Pedrajas R, Muriach M, Miranda M, Romero FJ. Naltrexone reverses ethanol-induced rat hippocampal and serum oxidative damage. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:296898.
- Almeida RD, Manadas BJ, Melo CV, Gomes JR, Mendes CS, Grãos MM, Carvalho RF, Carvalho AP, Duarte CB. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death Differ*. 2005; 12(10):1329-1343.
- Aloisi F. Immune function of microglia. *Glia*. 2001; 36(2):165-179.
- Aloisi F, Ambrosini E, Columba-Cabezas S, Magliozzi R, Serafini B. Intracerebral regulation of immune responses. *Ann Med*. 2001; 33(8):510-515.
- Al-Shabrawey M, Rojas M, Sanders T, Behzadian A, El-Remessy A, Bartoli M, Parpia AK, Liou G, Caldwell RB. Role of NADPH oxidase in retinal vascular inflammation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49(7):3239-3244.
- Álvarez-Buylla A, García-Verdugo JM. Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci*. 2002; 22(3):629-634.
- Amaral DG, Witter MP. The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. 1989; 31(3):571-591.
- Annunziato L, Boscia F, Pignataro G. Ionic transporter activity in astrocytes, microglia, and oligodendrocytes during brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013; 33(7):969-982.
- Arakawa Y, Sendtner M, Thoenen H. Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *J Neurosci*. 1990; 10(11):3507-3515.
- Arciniegas DB. Addressing neuropsychiatric disturbances during rehabilitation after traumatic brain injury: current and future methods. *Dialogues Clin Neurosci*. 2011; 13(3):325-345.
- Arias-Carrión O, Olivares-Buñuelos T, Drucker-Colín R. Neurogenesis in the adult brain. *Rev Neurol*. 2007; 44(9):541-550.
- Armstead WM. Role of impaired cAMP and calcium-sensitive K⁺ channel function in altered cerebral hemodynamics following brain injury. *Brain Res*. 1997; 768(1-2):177-184.
- Arnal E, Miranda M, Barcia J, Bosch-Morell F, Romero FJ. Lutein and docosahexaenoic acid prevent cortex lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rat cerebral cortex. *Neuroscience*. 2010; 166(1):271-278.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med*. 2002; 8(9):963-970.

- Atkins CM, Chen S, Alonso OF, Dietrich WD, Hu BR. Activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006; 26(12):1507-1518.
- Atkins CM, Falo MC, Alonso OF, Bramlett HM, Dietrich WD. Deficits in ERK and CREB activation in the hippocampus after traumatic brain injury. *Neurosci Lett.* 2009; 459(2):52-56.
- Bachstetter AD, Morganti JM, Jernberg J, Schlunk A, Mitchell SH, Brewster KW, Hudson CE, Cole MJ, Harrison JK, Bickford PC, Gemma C. Fractalkine and CX 3 CR1 regulate hippocampal neurogenesis in adult and aged rats. *Neurobiol Aging.* 2011; 32(11):2030-2044.
- Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12:141-179.
- Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996; 14:649-683.
- Bárcena-Orbe A, Rodríguez-Arias CA, Rivero-Martín B, Cañizal-García JM, Mestre-Moreiro C, Calvo-Pérez JC, Molina-Foncea AF, Casado-Gómez J. Overview of head injury. *Neurocirugia (Astur).* 2006; 17(6):495-518.
- Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron.* 2008; 60(3):430-440.
- Baugh CM, Stamm JM, Riley DO, Gavett BE, Shenton ME, Lin A, Nowinski CJ, Cantu RC, McKee AC, Stern RA. Chronic traumatic encephalopathy: neurodegeneration following repetitive concussive and subconcussive brain trauma. *Brain Imaging Behav.* 2012; 6(2):244-254.
- Bauman AL, Goehring AS, Scott JD. Orchestration of synaptic plasticity through AKAP signaling complexes. *Neuropharmacology.* 2004; 46(3):299-310.
- Bayir H, Kagan VE, Tyurina YY, Tyurin V, Ruppel RA, Adelson PD, Graham SH, Janesko K, Clark RS, Kochanek PM. Assessment of antioxidant reserves and oxidative stress in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *Pediatr Res.* 2002; 51(5):571-578.
- Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature.* 1997; 385(6617):640-644.
- Bazan JF. Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today.* 1990; 11(10):350-354.
- Bearer EL, Orci L. Endothelial fenestral diaphragms: a quick-freeze, deep-etch study. *J Cell Biol* 1985; 100: 418-428.

-
- Bechara A, Damasio H, Damasio AR. Emotion, decision making and the orbitofrontal cortex. *Cereb Cortex*. 2000; 10(3):295-307.
 - Becker JC, Dummer R, Hartmann AA, Burg G, Schmidt RE. Shedding of ICAM-1 from human melanoma cell lines induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. Functional consequences on cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol*. 1991; 147(12):4398-4401.
 - Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87(4):1620-1624.
 - Bell MJ, Kochanek PM, Carcillo JA, Mi Z, Schiding JK, Wisniewski SR, Clark RS, Dixon CE, Marion DW, Jackson E. Interstitial adenosine, inosine, and hypoxanthine are increased after experimental traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma*. 1998; 15(3):163-170.
 - Belperio JA, Keane MP, Arenberg DA, Addison CL, Ehlert JE, Burdick MD, Strieter RM. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol*. 2000; 68(1):1-8.
 - Bevilacqua MP. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol*. 1993; 11:767-804.
 - Bisley JW, Zaksas D, Droll JA, Pasternak T. Activity of neurons in cortical area MT during a memory for motion task. *J Neurophysiol*. 2004; 91(1):286-300.
 - Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C. Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance. *J Neurosci*. 2001; 21(13):4668-4677.
 - Bohn MC. Motoneurons crave glial cell line-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol*. 2004; 190(2):263-275.
 - Bordey A, Hablitz JJ, Sontheimer H. Reactive astrocytes show enhanced inwardly rectifying K⁺ currents in situ. *Neuroreport*. 2000; 11(14):3151-3155.
 - Bourbon A, Vionnet M, Leprince P, Vaissier E, Copeland J, McDonagh P, Debré P, Gandjbakhch I. The effect of methylprednisolone treatment on the cardiopulmonary bypass-induced systemic inflammatory response. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2004; 26(5):932-938.
 - Bourtchuladze R, Frenguelli B, Blendy J, Cioffi D, Schutz G, Silva AJ. Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell*. 1994; 79(1):59-68.
 - Bouton ME, Westbrook RF, Corcoran KA, Maren S. Contextual and temporal modulation of extinction: behavioral and biological mechanisms. *Biol Psychiatry*. 2006; 60(4):352-360.

- Bradford, H. 1988. Fundamentos de neuroquímica. Editorial Labor, S.A. Barcelona, España. 485 p
- Brambilla R, Bracchi-Ricard V, Hu WH, Frydel B, Bramwell A, Karmally S, Green EJ, Bethea JR. Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J Exp Med.* 2005; 202(1):145-156.
- Bramlett HM, Dietrich WD. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004; 24(2):133-150.
- Briassoulis G, Papassotiriou I, Mavrikiou M, Lazaropoulou C, Margeli A. Longitudinal course and clinical significance of TGF-beta1, sL- and sE-Selectins and sICAM-1 levels during severe acute stress in children. *Clin Biochem.* 2007; 40(5-6):299-304.
- Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol* 1969; 40: 648-677.
- Brod G, Werkle-Bergner M, Shing YL. The Influence of Prior Knowledge on Memory: A Developmental Cognitive Neuroscience Perspective. *Front Behav Neurosci.* 2013; 7:139.
- Broholm H, Andersen B, Wanscher B, Frederiksen JL, Rubin I, Pakkenberg B, Larsson HB, Lauritzen M. Nitric oxide synthase expression and enzymatic activity in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2004; 109(4):261-269.
- Brus M, Keller M, Lévy F. Temporal features of adult neurogenesis: differences and similarities across mammalian species. *Front Neurosci.* 2013; 7:135.
- Bunnag SC. Implications of microcirculation-research based information on prevention and treatment of diabetes mellitus type 2: a perspective. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2006; 34(1-2):43-50.
- Burack WR, Sturgill TW. The activating dual phosphorylation of MAPK by MEK is nonprocessive. *Biochemistry.* 1997; 36(20):5929-5933.
- Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, Landa G, Talpalar AE, Pluchino S, Martino G, Schwartz M. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci.* 2006; 31(1):149-160.
- Byrne JH, Kandel ER. Presynaptic facilitation revisited: state and time dependence. *J Neurosci.* 1996; 16(2):425-435.
- Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, Huang D, Kidd G, Dombrowski S, Dutta R, Lee JC, Cook DN, Jung S, Lira SA, Littman DR, Ransohoff RM. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nat Neurosci.* 2006; 9(7):917-924.

-
- Carlén M, Meletis K, Göritz C, Darsalia V, Evergren E, Tanigaki K, Amendola M, Barnabé-Heider F, Yeung MS, Naldini L, Honjo T, Kokaia Z, Shupliakov O, Cassidy RM, Lindvall O, Frisén J. Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nat Neurosci.* 2009; 12(3):259-267.
 - Carlezon WA Jr, Duman RS, Nestler EJ. The many faces of CREB. *Trends Neurosci.* 2005; 28(8):436-445.
 - Carlson J, Baxter SA, Dréau D, Nesmelova IV. The heterodimerization of platelet-derived chemokines. *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1834(1):158-168.
 - Carnegie GK, Means CK, Scott JD. A-kinase anchoring proteins: from protein complexes to physiology and disease. *IUBMB Life.* 2009; 61(4):394-406.
 - Cernak I. Animal models of head trauma. *NeuroRx.* 2005; 2(3):410-422.
 - Chaboub LS, Deneen B. Developmental origins of astrocyte heterogeneity: the final frontier of CNS development. *Dev Neurosci.* 2012; 34(5):379-388.
 - Chae CU, Lee RT, Rifai N, Ridker PM. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. *Hypertension.* 2001; 38(3):399-403.
 - Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, Parmley LF, Downey JM. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 1985; 17(2):145-152.
 - Chavarría A, Cárdenas G. Neuronal influence behind the central nervous system regulation of the immune cells. *Front Integr Neurosci.* 2013; 7:64.
 - Chen S, Atkins CM, Liu CL, Alonso OF, Dietrich WD, Hu BR. Alterations in mammalian target of rapamycin signaling pathways after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007; 27(5):939-949.
 - Chen XH, Iwata A, Nonaka M, Browne KD, Smith DH. Neurogenesis and glial proliferation persist for at least one year in the subventricular zone following brain trauma in rats. *J Neurotrauma.* 2003; 20(7):623-631.
 - Chen Z, Hagler J, Palombella VJ, Melandri F, Scherer D, Ballard D, Maniatis T. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev.* 1995; 9(13):1586-1597.
 - Chevaleyre V, Heifets BD, Kaeser PS, Südhof TC, Castillo PE. Endocannabinoid-mediated long-term plasticity requires cAMP/PKA signaling and RIM1alpha. *Neuron.* 2007; 54(5):801-812.
 - Chihara J, Yamamoto T, Kurachi D, Nakajima S. Soluble ICAM-1 in sputum of patients with bronchial asthma. *Lancet.* 1994; 343(8905):1108.

- Chmielnicki E, Benraiss A, Economides AN, Goldman SA. Adenovirally expressed noggin and brain-derived neurotrophic factor cooperate to induce new medium spiny neurons from resident progenitor cells in the adult striatal ventricular zone. *J Neurosci*. 2004; 24(9):2133-2142.
- Choi J, Ko J, Park E, Lee JR, Yoon J, Lim S, Kim E. Phosphorylation of stargazin by protein kinase A regulates its interaction with PSD-95. *J Biol Chem*. 2002; 277(14):12359-12363.
- Cipriani R, Villa P, Chece G, Lauro C, Paladini A, Micotti E, Perego C, De Simoni MG, Fredholm BB, Eusebi F, Limatola C. CX3CL1 is neuroprotective in permanent focal cerebral ischemia in rodents. *J Neurosci*. 2011; 31(45):16327-16335.
- Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2010; 48(6):749-762.
- Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig EB, Dixon EP, Little SP. Global ischemia activates nuclear factor-kappa B in forebrain neurons of rats. *Stroke*. 1997; 28(5):1073-1081.
- Cook LG, Chapman SB, Levin HS. Self-regulation abilities in children with severe traumatic brain injury: a preliminary investigation of naturalistic action. *NeuroRehabilitation*. 2008; 23(6):467-475.
- Corbin JD, Soderling TR, Park CR. Regulation of adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase. I. Preliminary characterization of the adipose tissue enzyme in crude extracts. *J Biol Chem*. 1973; 248(5):1813-1821.
- Corbin JD, Sugden PH, Lincoln TM, Keely SL Compartmentalization of adenosine 3':5'-monophosphate and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase in heart tissue. *J Biol Chem*. 1977; 252(11):3854-3861.
- Cornelius C, Crupi R, Calabrese V, Graziano A, Milone P, Pennisi G, Radak Z, Calabrese EJ, Cuzzocrea S. Traumatic brain injury: oxidative stress and neuroprotection. *Antioxid Redox Signal*. 2013; 19(8):836-853.
- Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science*. 1993; 262(5134):689-695.
- Cunningham CL, Martínez-Cerdeño V, Noctor SC. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *J Neurosci*. 2013; 33(10):4216-4233.
- Curtis MA, Kam M, Nannmark U, Anderson MF, Axell MZ, Wikkelso C, Holtås S, van Roon-Mom WM, Björk-Eriksson T, Nordborg C, Frisén J, Dragunow M, Faull RL, Eriksson PS. Human neuroblasts migrate to the olfactory bulb via a lateral ventricular extension. *Science*. 2007; 315(5816):1243-1249.

- Dail WG, Feeney DM, Murray HM, Linn RT, Boyeson MG. Responses to cortical injury: II. Widespread depression of the activity of an enzyme in cortex remote from a focal injury. *Brain Res.* 1981; 211(1):79-89.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci.* 2005; 8(6):752-758.
- Day SA, Lakner AM, Moore CC, Yen MH, Clemens MG, Wu ES, Schrum LW. Opioid-like compound exerts anti-fibrotic activity via decreased hepatic stellate cell activation and inflammation. *Biochem Pharmacol.* 2011; 81(8):996-1003.
- de Felipe J, Fariñas I. The pyramidal neuron of the cerebral cortex: morphological and chemical characteristics of the synaptic inputs. *Prog Neurobiol.* 1992; 39(6):563-607.
- de Francisco ML, Portero G, Echeburúa E, Quemada JI. Guía para la evaluación clínico-forense del daño psíquico consecutivo a los traumatismos craneoencefálicos. *Cuad Med Forense* 2009; 15(55):37-54
- de Freitas MS, Spohr TC, Benedito AB, Caetano MS, Margulis B, Lopes UG, Moura-Neto V. Neurite outgrowth is impaired on HSP70-positive astrocytes through a mechanism that requires NF-kappaB activation. *Brain Res.* 2002; 958(2):359-370.
- Dehghan F, Khaksari Hadad M, Asadikram G, Najafipour H, Shahrokhi N. Effect of melatonin on intracranial pressure and brain edema following traumatic brain injury: role of oxidative stresses. *Arch Med Res.* 2013; 44(4):251-258.
- Del Bigio MR. The ependyma: a protective barrier between brain and cerebrospinal fluid. *Glia.* 1995; 14(1):1-13.
- Del Río-Hortega P. Art and artifice in histologic science. *Tex Rep Biol Med.* 1949; 7(3):363-390.
- Denis-Donini S, Dellarole A, Crociara P, Francese MT, Bortolotto V, Quadrato G, Canonico PL, Orsetti M, Ghi P, Memo M, Bonini SA, Ferrari-Toninelli G, Grilli M. Impaired adult neurogenesis associated with short-term memory defects in NF-kappaB p50-deficient mice. *J Neurosci.* 2008; 28(15):3911-3919.
- Dermietzel R, Krause D. Molecular anatomy of the blood-brain barrier as defined by immunocytochemistry. *Int Rev Cytol* 1991; 127:57-109.
- Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest.* 1997; 112(6 Suppl): 321S-329S.
- Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods.* 1991; 39(3):253-262.

- Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell*. 1999; 97(6):703-716.
- Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*. 1997; 17(13):5046-5061.
- Donkin JJ, Vink R. Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. *Curr Opin Neurol*. 2010; 23(3):293-299.
- Donnelly DJ, Longbrake EE, Shawler TM, Kigerl KA, Lai W, Tovar CA, Ransohoff RM, Popovich PG. Deficient CX3CR1 signaling promotes recovery after mouse spinal cord injury by limiting the recruitment and activation of Ly6Clo/iNOS⁺ macrophages. *J Neurosci*. 2011; 31(27):9910-9922.
- Dringen R. Metabolism and functions of glutathione in brain. *Prog Neurobiol*. 2000; 62(6):649-671.
- Dubnau J, Chiang AS, Tully T. Neural substrates of memory: from synapse to system. *J Neurobiol*. 2003; 54(1):238-253.
- Duhamel JR, Colby CL, Goldberg ME. The updating of the representation of visual space in parietal cortex by intended eye movements. *Science*. 1992; 255(5040):90-92.
- Dutt K, Cao Y, Ezeonu I. Ciliary neurotrophic factor: a survival and differentiation inducer in human retinal progenitors. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2010; 46(7):635-646.
- Edvinsson L, Krause DN. The Blood vessel wall. In Edvinsson L, Krause DN, eds. *Cerebral blood flow and metabolism*. 2 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p. 30-42.
- Eftekharzadeh B, Ramin M, Khodaghali F, Moradi S, Tabrizian K, Sharif R, Azami K, Beyer C, Sharifzadeh M. Inhibition of PKA attenuates memory deficits induced by β -amyloid (1-42), and decreases oxidative stress and NF- κ B transcription factors. *Behav Brain Res*. 2012; 226(1):301-308.
- Ehlers MD. Reinsertion or degradation of AMPA receptors determined by activity-dependent endocytic sorting. *Neuron*. 2000; 28(2):511-525.
- Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(23):13632-13637.
- El Khoury J, Luster AD. Mechanisms of microglia accumulation in Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Trends Pharmacol Sci*. 2008; 29(12):626-632.
- Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J Exp Med*. 2001; 194(2):205-218.

-
- Eriskat J, Fürst M, Stoffel M, Baethmann A. Correlation of lesion volume and brain swelling from a focal brain trauma. *Acta Neurochir Suppl.* 2003; 86:265-266.
 - Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 1991; 11(1):81-128.
 - Eyo UB, Wu LJ. Bidirectional microglia-neuron communication in the healthy brain. *Neural Plast.* 2013; 2013:456857.
 - Falconi D, Oizumi K, Aubin JE. Leukemia inhibitory factor influences the fate choice of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells.* 2007; 25(2):305-312.
 - Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer. *Lancet Oncol.* 2005; 6(5):322-327.
 - Fann MJ, Patterson PH. Neurotrophic cytokines and activin A differentially regulate the phenotype of cultured sympathetic neurons. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(1):43-47.
 - Fanselow MS, Poulos AM. The neuroscience of mammalian associative learning. *Annu Rev Psychol.* 2005; 56:207-234.
 - Farfara D, Lifshitz V, Frenkel D. Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med.* 2008; 12(3):762-780.
 - Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull.* 1999; 49(6):377-391.
 - Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res.* 1981; 211(1):67-77.
 - Feniger-Barish R, Ran M, Zaslaver A, Ben-Baruch A. Differential modes of regulation of cxc chemokine-induced internalization and recycling of human CXCR1 and CXCR2. *Cytokine.* 1999; 11(12):996-1009.
 - Ferrell JE Jr, Bhatt RR. Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1997; 272(30):19008-19016.
 - Fillebeen C, Pantopoulos K. Redox control of iron regulatory proteins. *Redox Rep.* 2002; 7(1):15-22.
 - Fleminger S. Why do some patients after head injury deteriorate over the long term? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012; 83(11):1036.
 - Fonsatti E, Altomonte M, Coral S, Cattarossi I, Nicotra MR, Gasparollo A, Natali PG, Maio M. Tumour-derived interleukin 1alpha (IL-1alpha) up-regulates the release of soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) by endothelial cells. *Br J Cancer.* 1997; 76(10): 1255-1261.

- Francis GJ, Martinez JA, Liu WQ, Xu K, Ayer A, Fine J, Tuor UI, Glazner G, Hanson LR, Frey WH 2nd, Toth C. Intranasal insulin prevents cognitive decline, cerebral atrophy and white matter changes in murine type I diabetic encephalopathy. *Brain*. 2008; 131(Pt 12):3311-3334.
- Friedman B, Scherer SS, Rudge JS, Helgren M, Morrisey D, McClain J, Wang DY, Wiegand SJ, Furth ME, Lindsay RM. Regulation of ciliary neurotrophic factor expression in myelin-related Schwann cells in vivo. *Neuron*. 1992; 9(2):295-305.
- Fridmacher V, Kaltschmidt B, Goudeau B, Ndiaye D, Rossi FM, Pfeiffer J, Kaltschmidt C, Israël A, Mémet S. Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection. *J Neurosci*. 2003; 23(28):9403-9408.
- Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1983; 23:239-257.
- Frijns CJ, Kappelle LJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke*. 2002; 33(8):2115-2122.
- Fu XM, Liu SJ, Dan QQ, Wang YP, Lin N, Lv LY, Zou Y, Liu S, Zhou X, Wang TH. Combined Bone Mesenchymal Stem Cells and Olfactory Ensheathing Cells Transplantation Promote Neural Repair Associated with CNTF Expression in Traumatic Brain Injured Rats. *Cell Transplant*. 2014 Mar 7.
- Fuhrmann M, Bittner T, Jung CK, Burgold S, Page RM, Mitteregger G, Haass C, LaFerla FM, Kretschmar H, Herms J. Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci*. 2010; 13(4):411-413.
- Fuster JM. The cognit: a network model of cortical representation. *Int J Psychophysiol*. 2006; 60(2):125-132.
- Fuster JM. Cortex and memory: emergence of a new paradigm. *J Cogn Neurosci*. 2009; 21(11):2047-2072.
- Gabig TG, Babior BM. The O₂ (-) -forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. Properties of the solubilized enzyme. *J Biol Chem*. 1979; 254(18):9070-9074.
- Gaetz M. The neurophysiology of brain injury. *Clin Neurophysiol*. 2004; 115(1):4-18.
- Gardner HW. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med*. 1989; 7(1):65-86.
- Giblin PA, Hwang ST, Katsumoto TR, Rosen SD. Ligation of L-selectin on T lymphocytes activates beta1 integrins and promotes adhesion to fibronectin. *J Immunol*. 1997; 159(7):3498-3507.
- Giddings JC. Soluble adhesion molecules in inflammatory and vascular diseases. *Biochem Soc Trans*. 2005; 33(Pt 2):406-408.

- Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care*. 1996; 19(3):257-267.
- Goldstein GW, Betz AL. The blood-brain barrier. *Sci Am* 1986; 255: 74-83.
- Golgi C. Sulla fine anatomía degli organi centrali del sistema nervoso. Milano: Hoepli; 1886.
- Gonzalez JP, Brogden RN. Naltrexone. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of opioid dependence. *Drugs*. 1988; 35(3):192-213.
- Gould E, Reeves AJ, Graziano MS, Gross CG. Neurogenesis in the neocortex of adult primates. *Science*. 1999; 286(5439):548-552.
- Graeber MB, Streit WJ, Kiefer R, Schoen SW, Kreutzberg GW. New expression of myelomonocytic antigens by microglia and perivascular cells following lethal motor neuron injury. *J Neuroimmunol*. 1990; 27(2-3):121-32.
- Graeber MB, Streit WJ. Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010; 119(1):89-105.
- Grailer JJ, Kodera M, Steeber DA. L-selectin: role in regulating homeostasis and cutaneous inflammation. *J Dermatol Sci*. 2009; 56(3):141-147.
- Greeneltch KM, Haudenschild CC, Keegan AD, Shi Y. The opioid antagonist naltrexone blocks acute endotoxic shock by inhibiting tumor necrosis factor-alpha production. *Brain Behav Immun*. 2004; 18(5):476-484.
- Gross CG. Neurogenesis in the adult brain: death of a dogma. *Nat Rev Neurosci*. 2000; 1(1):67-73.
- Guéraud F, Atalay M, Bresgen N, Cipak A, Eckl PM, Huc L, Jouanin I, Siems W, Uchida K. Chemistry and biochemistry of lipid peroxidation products. *Free Radic Res*. 2010; 44(10):1098-1124.
- Gupta A, Tripathi AK, Tripathi RL, Madhu SV, Banerjee BD. Advanced glycosylated end products-mediated activation of polymorphonuclear neutrophils in diabetes mellitus and associated oxidative stress. *Indian J Biochem Biophys*. 2007; 44(5):373-378.
- Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiología Médica*. McGraw-Hill Interamericana. 10ª Edición. 2000 B; Cap. 45: 621-639.
- Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiología Médica*. McGraw-Hill Interamericana. 10ª Edición. 2000 A; Cap. 55: 765-779.
- Guzowski JF, McGaugh JL. Antisense oligodeoxynucleotide-mediated disruption of hippocampal cAMP response element binding protein levels impairs consolidation of memory for water maze training. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94(6):2693-2698.

-
- Hafler DA, Weiner HL. MS: a CNS and systemic autoimmune disease. *Immunol Today*. 1989; 10(3):104-107.
 - Halfar K, Rommel C, Stocker H, Hafen E. Ras controls growth, survival and differentiation in the *Drosophila* eye by different thresholds of MAP kinase activity. *Development*. 2001; 128(9):1687-1696.
 - Hall ED, Vaishnav RA, Mustafa AG. Antioxidant therapies for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*. 2010; 7(1):51-61.
 - Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*. 1986; 246(2):501-514.
 - Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*. 1993; 57(5 Suppl):715S-724S; discussion 724S-725S.
 - Han Q, Liu S, Li Z, Hu F, Zhang Q, Zhou M, Chen J, Lei T, Zhang H. DCPIB, a potent volume-regulated anion channel antagonist, attenuates microglia-mediated inflammatory response and neuronal injury following focal cerebral ischemia. *Brain Res*. 2014; 1542:176-185.
 - Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*. 2007; 10(11):1387-1394.
 - Hannila SS, Filbin MT. The role of cyclic AMP signaling in promoting axonal regeneration after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2008; 209(2):321-332.
 - Hardy K, Hunt NH. Effects of a redox-active agent on lymphocyte activation and early gene expression patterns. *Free Radic Biol Med*. 2004; 37(10):1550-1563.
 - Harrington HA, Komorowski M, Beguerisse-Díaz M, Ratto GM, Stumpf MP. Mathematical modeling reveals the functional implications of the different nuclear shuttling rates of Erk1 and Erk2. *Phys Biol*. 2012; 9(3):036001.
 - Hartfuss E, Förster E, Bock HH, Hack MA, LePrince P, Luque JM, Herz J, Frotscher M, Götz M. Reelin signaling directly affects radial glia morphology and biochemical maturation. *Development*. 2003; 130(19):4597-4609.
 - Harting MT, Jimenez F, Adams SD, Mercer DW, Cox CS Jr. Acute, regional inflammatory response after traumatic brain injury: Implications for cellular therapy. *Surgery*. 2008; 144(5):803-813.
 - Hausladen A, Stamler JS. Nitrosative stress. *Methods Enzymol*. 1999; 300:389-395.
 - Haystead TA, Dent P, Wu J, Haystead CM, Sturgill TW. Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase. *FEBS Lett*. 1992; 306(1):17-22.

- He FQ, Qiu BY, Li TK, Xie Q, Cui de J, Huang XL, Gan HT. Tetrandrine suppresses amyloid- β -induced inflammatory cytokines by inhibiting NF- κ B pathway in murine BV2 microglial cells. *Int Immunopharmacol*. 2011; 11(9):1220-1225.
- Henninger N, Dützmann S, Sicard KM, Kollmar R, Bardutzky J, Schwab S. Impaired spatial learning in a novel rat model of mild cerebral concussion injury. *Exp Neurol*. 2005; 195(2):447-457.
- Herrera DG, Yague AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M, Romero FJ, Garcia-Verdugo JM. Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(13):7919-7924.
- Hibi M, Nakajima K, Hirano T. IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med (Berl)*. 1996; 74(1):1-12.
- Hickey MJ, Forster M, Mitchell D, Kaur J, De Caigny C, Kubes P. L-selectin facilitates emigration and extravascular locomotion of leukocytes during acute inflammatory responses in vivo. *J Immunol*. 2000; 165(12):7164-7170.
- Hill KE, Zollinger LV, Watt HE, Carlson NG, Rose JW. Inducible nitric oxide synthase in chronic active multiple sclerosis plaques: distribution, cellular expression and association with myelin damage. *J Neuroimmunol*. 2004; 151(1-2):171-179.
- Hlatky R, Furuya Y, Valadka AB, Goodman JC, Robertson CS. Comparison of microdialysate arginine and glutamate levels in severely head-injured patient. *Acta Neurochir Suppl*. 2002; 81:347-349.
- Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S. Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci*. 2001; 21(6):1975-1982.
- Hoshi N, Langeberg LK, Scott JD. Distinct enzyme combinations in AKAP signalling complexes permit functional diversity. *Nat Cell Biol*. 2005; 7(11):1066-1073.
- Hsiao HY, Mak OT, Yang CS, Liu YP, Fang KM, Tzeng SF. TNF- α /IFN- γ -induced iNOS expression increased by prostaglandin E2 in rat primary astrocytes via EP2-evoked cAMP/PKA and intracellular calcium signaling. *Glia*. 2007; 55(2):214-223.
- Hu B, Liu C, Bramlett H, Sick TJ, Alonso OF, Chen S, Dietrich WD. Changes in trkB-ERK1/2-CREB/Elk-1 pathways in hippocampal mossy fiber organization after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004; 24(8):934-943.
- Hui L, Hong Y, Jingjing Z, Yuan H, Qi C, Nong Z. HGF suppresses high glucose-mediated oxidative stress in mesangial cells by activation of PKG and inhibition of PKA. *Free Radic Biol Med*. 2010; 49(3):467-473.

-
- Huising MO, Kruiswijk CP, Flik G. Phylogeny and evolution of class-I helical cytokines. *J Endocrinol.* 2006; 189(1):1-25.
 - Hutchinson MR, Zhang Y, Brown K, Coats BD, Shridhar M, Sholar PW, Patel SJ, Crysdale NY, Harrison JA, Maier SF, Rice KC, Watkins LR. Non-stereoselective reversal of neuropathic pain by naloxone and naltrexone: involvement of toll-like receptor 4 (TLR4). *Eur J Neurosci.* 2008; 28(1):20-29.
 - Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiya H, Schall TJ, Yoshie O. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell.* 1997; 91(4):521-530.
 - Impey S, Goodman RH. CREB signaling--timing is everything. *Sci STKE.* 2001; 2001(82):pe1.
 - Inan M, Lu HC, Albright MJ, She WC, Crair MC. Barrel map development relies on protein kinase A regulatory subunit II beta-mediated cAMP signaling. *J Neurosci.* 2006; 26(16):4338-4349.
 - Insausti R, Amaral DG. Hippocampal Formation. In "The Human Nervous System" 2012. (J. K. Mai and G. Paxinos, eds.), Vol. 4, pp. 897-942. Elsevier Inc., San Diego.
 - Ip NY, Li YP, van de Stadt I, Panayotatos N, Alderson RF, Lindsay RM. Ciliary neurotrophic factor enhances neuronal survival in embryonic rat hippocampal cultures. *J Neurosci.* 1991; 11(10):3124-3134.
 - Ishige K, Ito Y, Fukuda H. Cyclic AMP responsive element- and activator protein 1 DNA-binding activities in epilepsy model mice. *Yakugaku Zasshi.* 1999; 119(7):510-518.
 - Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* 1990; 9(6):515-540.
 - Jareño EJ, Romá J, Romero B, Marín N, Muriach M, Johnsen S, Bosch-Morell F, Marselou L, Romero FJ. Serum malondialdehyde correlates with therapeutic efficiency of high activity antiretroviral therapies (HAART) in HIV-1 infected children. *Free Radic Res.* 2002; 36(3):341-344.
 - Je JH, Lee JY, Jung KJ, Sung B, Go EK, Yu BP, Chung HY. NF-kappaB activation mechanism of 4-hydroxyhexenal via NIK/IKK and p38 MAPK pathway. *FEBS Lett.* 2004; 566(1-3):183-189.
 - Jennett B, MacMillan R. Epidemiology of head injury. *Br Med J (Clin Res Ed).* 1981; 282(6258):101-104.

- Jiang LY, Tang SS, Wang XY, Liu LP, Long Y, Hu M, Liao MX, Ding QL, Hu W, Li JC, Hong H. PPAR γ agonist pioglitazone reverses memory impairment and biochemical changes in a mouse model of type 2 diabetes mellitus. *CNS Neurosci Ther.* 2012; 18(8):659-666.
- Jones EG. Neurotransmitters in the cerebral cortex. *J Neurosurg.* 1986; 65(2):135-153.
- Jones LL, Yamaguchi Y, Stallcup WB, Tuszynski MH. NG2 is a major chondroitin sulfate proteoglycan produced after spinal cord injury and is expressed by macrophages and oligodendrocyte progenitors. *J Neurosci.* 2002; 22(7):2792-2803.
- Jones MW, Wilson MA. Theta rhythms coordinate hippocampal-prefrontal interactions in a spatial memory task. *PLoS Biol.* 2005; 3(12):e402.
- Josselyn SA, Shi C, Carlezon WA Jr, Neve RL, Nestler EJ, Davis M. Long-term memory is facilitated by cAMP response element-binding protein overexpression in the amygdala. *J Neurosci.* 2001; 21(7):2404-2412.
- Joung B, Xu Z, Kim I, Lee MH, Kim S. The effect of cryoinjury on ventricular tachycardia in the swine right ventricle. *Yonsei Med J.* 2006; 47(5):672-679.
- Jung JS, Shin JA, Park EM, Lee JE, Kang YS, Min SW, Kim DH, Hyun JW, Shin CY, Kim HS. Anti-inflammatory mechanism of ginsenoside Rh1 in lipopolysaccharide-stimulated microglia: critical role of the protein kinase A pathway and hemeoxygenase-1 expression. *J Neurochem.* 2010; 115(6):1668-1680.
- Juurlink BH, Paterson PG. Review of oxidative stress in brain and spinal cord injury: suggestions for pharmacological and nutritional management strategies. *J Spinal Cord Med.* 1998; 21(4):309-334.
- Kaburagi Y, Hasegawa M, Nagaoka T, Shimada Y, Hamaguchi Y, Komura K, Saito E, Yanaba K, Takehara K, Kadono T, Steeber DA, Tedder TF, Sato S. The cutaneous reverse Arthus reaction requires intercellular adhesion molecule 1 and L-selectin expression. *J Immunol.* 2002; 168(6):2970-2978.
- Kalwitz G, Endres M, Neumann K, Skriner K, Ringe J, Sezer O, Sittinger M, Häupl T, Kaps C. Gene expression profile of adult human bone marrow-derived mesenchymal stem cells stimulated by the chemokine CXCL7. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009; 41(3):649-658.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. Principles of neural science. 4 ed. New York: McGraw-Hill; 2000. p. 523-547.
- Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood.* 1996; 88(9):3259-3287.
- Kás J, Blattná J. Phospholipids in foodstuffs. *Acta Univ Carol Med (Praha).* 1986; 32(1-2):81-92.

- Kasahara J, Fukunaga K, Miyamoto E. Activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV in long term potentiation in the rat hippocampal CA1 region. *J Biol Chem.* 2001; 276(26):24044-24050.
- Kawasaki T, Kitao T, Nakagawa K, Fujisaki H, Takegawa Y, Koda K, Ago Y, Baba A, Matsuda T. Nitric oxide-induced apoptosis in cultured rat astrocytes: protection by edaravone, a radical scavenger. *Glia.* 2007 Oct; 55(13):1325-1333.
- Kelly M, Hwang JM, Kubes P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2007; 120(1):3-10.
- Kemp BE, Benjamini E, Krebs EG. Synthetic hexapeptide substrates and inhibitors of 3':5'-cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976; 73(4):1038-1042.
- Kempermann G, Gage FH. Neurogenesis in the adult hippocampus. *Novartis Found Symp.* 2000; 231:220-235; discussion 235-241, 302-306.
- Kernie SG, Parent JM. Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol Dis.* 2010; 37(2):267-274.
- Khajoe V, Saito M, Takada H, Nomura A, Kusuhara K, Yoshida SI, Yoshikai Y, Hara T. Novel roles of osteopontin and CXC chemokine ligand 7 in the defence against mycobacterial infection. *Clin Exp Immunol.* 2006; 143(2):260-268.
- Kierdorf K, Prinz M. Factors regulating microglia activation. *Front Cell Neurosci.* 2013; 7:44.
- Kim HS, Lim JY, Sul D, Hwang BY, Won TJ, Hwang KW, Park SY. Neuroprotective effects of the new diterpene, CBNU06 against beta-amyloid-induced toxicity through the inhibition of NF-kappaB signaling pathway in PC12 cells. *Eur J Pharmacol.* 2009 Nov; 622(1-3):25-31.
- Kitagawa K. CREB and cAMP response element-mediated gene expression in the ischemic brain. *FEBS J.* 2007; 274(13):3210-3217.
- Klatt P, Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur J Biochem.* 2000; 267(16):4928-4944.
- Klementiev B, Novikova T, Korshunova I, Berezin V, Bock E. The NCAM-derived P2 peptide facilitates recovery of cognitive and motor function and ameliorates neuropathology following traumatic brain injury. *Eur J Neurosci.* 2008;27(11):2885-2896.
- Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM. Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science.* 1991; 253(5018):407-414.

- Kojima T, Hirota Y, Ema M, Takahashi S, Miyoshi I, Okano H, Sawamoto K. Subventricular zone-derived neural progenitor cells migrate along a blood vessel scaffold toward the post-stroke striatum. *Stem Cells*. 2010; 28(3):545-554.
- Kokaia Z, Lindvall O. Neurogenesis after ischaemic brain insults. *Curr Opin Neurobiol*. 2003; 13(1):127-132.
- Kontos HA, Wei EP. Superoxide production in experimental brain injury. *J Neurosurg*. 1986; 64(5):803-807.
- Kosower NS, Kosower EM. The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol*. 1978; 54:109-160.
- Krady JK, Lin HW, Liberto CM, Basu A, Kremlev SG, Levison SW. Ciliary neurotrophic factor and interleukin-6 differentially activate microglia. *J Neurosci Res*. 2008; 86(7):1538-1547.
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996; 19(8):312-318.
- Krönke G, Bochkov VN, Huber J, Gruber F, Blüml S, Fürnkranz A, Kadl A, Binder BR, Leitinger N. Oxidized phospholipids induce expression of human heme oxygenase-1 involving activation of cAMP-responsive element-binding protein. *J Biol Chem*. 2003; 278(51):51006-51014.
- Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*. 2001; 81(2):807-869.
- Kwan KY, Sestan N, Anton ES. Transcriptional co-regulation of neuronal migration and laminar identity in the neocortex. *Development*. 2012; 139(9):1535-1546.
- Lalancette-Hébert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci*. 2007; 27(10):2596-2605.
- Lamprecht R, Dudai Y. Transient expression of c-Fos in rat amygdala during training is required for encoding conditioned taste aversion memory. *Learn Mem*. 1996; 3(1):31-41.
- Lamprecht R, Hazvi S, Dudai Y. cAMP response element-binding protein in the amygdala is required for long- but not short-term conditioned taste aversion memory. *J Neurosci*. 1997; 17(21):8443-8450.
- Lane NJ, Reese TJ, Kacher B. Structural domains of the tight junctional intramembrane fibrils. *Tissue Cell* 1992; 24: 291-300.
- Lärkfors L, Lindsay RM, Alderson RF. Ciliary neurotrophic factor enhances the survival of Purkinje cells in vitro. *Eur J Neurosci*. 1994; 6(6):1015-1025.

- Lau BY, Fogerson SM, Walsh RB, Morgan JR. Cyclic AMP promotes axon regeneration, lesion repair and neuronal survival in lampreys after spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2013; 250:31-42.
- Lawson C, Wolf S. ICAM-1 signaling in endothelial cells. *Pharmacol Rep*. 2009; 61(1):22-32.
- Lee I, Kesner RP. Time-dependent relationship between the dorsal hippocampus and the prefrontal cortex in spatial memory. *J Neurosci*. 2003; 23(4):1517-1523.
- Lee N, Spearry RP, Leahy KM, Robitz R, Trinh DS, Mason CO, Zurbrugg RJ, Batt MK, Paul RJ, MacLennan AJ. Muscle ciliary neurotrophic factor receptor α promotes axonal regeneration and functional recovery following peripheral nerve lesion. *J Comp Neurol*. 2013; 521(13):2947-2965.
- Lenzlinger PM, Morganti-Kossmann MC, Laurer HL, McIntosh TK. The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. *Mol Neurobiol*. 2001; 24(1-3):169-181.
- Levashova ZB, Sharma N, Timofeeva OA, Dome JS, Perantoni AO. ELR+-CXC chemokines and their receptors in early metanephric development. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18(8):2359-2370.
- Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med*. 2003; 9(6):263-268.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7(9):678-689.
- Li R, Wen R, Banzon T, Maminishkis A, Miller SS. CNTF mediates neurotrophic factor secretion and fluid absorption in human retinal pigment epithelium. *PLoS One*. 2011; 6(9):e23148.
- Li ZG, Zhang W, Grunberger G, Sima AA. Hippocampal neuronal apoptosis in type 1 diabetes. *Brain Res*. 2002; 946(2):221-231.
- Lian H, Shim DJ, Gaddam SS, Rodriguez-Rivera J, Bitner BR, Pautler RG, Robertson CS, Zheng H. I κ B α deficiency in brain leads to elevated basal neuroinflammation and attenuated response following traumatic brain injury: implications for functional recovery. *Mol Neurodegener*. 2012; 7:47.
- Lin HW, Jain MR, Li H, Levison SW. Ciliary neurotrophic factor (CNTF) plus soluble CNTF receptor alpha increases cyclooxygenase-2 expression, PGE2 release and interferon-gamma-induced CD40 in murine microglia. *J Neuroinflammation*. 2009; 6: 6:7.
- Lin SL, Lee YM, Chang HY, Cheng YW, Yen MH. Effects of naltrexone on lipopolysaccharide-induced sepsis in rats. *J Biomed Sci*. 2005; 12(2):431-440.

- Liu B, Gao HM, Wang JY, Jeohn GH, Cooper CL, Hong JS. Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 962:318-331.
- Liu BP, Cafferty WB, Budel SO, Strittmatter SM. Extracellular regulators of axonal growth in the adult central nervous system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006; 361(1473):1593-1610.
- Liu D, Huang Y, Bu D, Liu AD, Holmberg L, Jia Y, Tang C, Du J, Jin H. Sulfur dioxide inhibits vascular smooth muscle cell proliferation via suppressing the Erk/MAP kinase pathway mediated by cAMP/PKA signaling. *Cell Death Dis.* 2014; 5:1251. doi: 10.1038/cddis.2014.229.
- Liu S, Qu Y, Stewart TJ, Howard MJ, Chakraborty S, Holekamp TF, McDonald JW. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(11):6126-6131.
- Liu SL, Li YH, Shi GY, Chen YH, Huang CW, Hong JS, Wu HL. A novel inhibitory effect of naloxone on macrophage activation and atherosclerosis formation in mice. *J Am Coll Cardiol.* 2006; 48(9):1871-1879.
- Liu XY, Yao LL, Chen YJ, Tao BB, Yu YC, Bian WH, Yu J, Wang YG. Survivin is involved in the anti-apoptotic effect of edaravone in PC12 cells. *Mol Cell Biochem.* 2009; 327(1-2):21-28.
- Liu Z, Condello C, Schain A, Harb R, Grutzendler J. CX3CR1 in microglia regulates brain amyloid deposition through selective protofibrillar amyloid- β phagocytosis. *J Neurosci.* 2010; 30(50):17091-17101.
- Lledo PM, Alonso M, Grubb MS. Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci.* 2006; 7(3):179-193.
- Lloyd AC. Distinct functions for ERKs? *J Biol.* 2006; 5(5):13.
- Loetscher M, Gerber B, Loetscher P, Jones SA, Piali L, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Moser B. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J Exp Med.* 1996; 184(3):963-969.
- Lorente de No' R. Studies on the structure of the cerebral cortex. I. The area entorhinalis. *J Psychol Neurol* 1933; 45:381-438.
- Lorenzo O, Picatoste B, Ares-Carrasco S, Ramírez E, Egado J, Tuñón J. Potential role of nuclear factor κ B in diabetic cardiomyopathy. *Mediators Inflamm.* 2011; 2011:652097. doi: 10.1155/2011/652097.
- Lu D, Mahmood A, Qu C, Goussev A, Schallert T, Chopp M. Erythropoietin enhances neurogenesis and restores spatial memory in rats after traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2005; 22(9):1011-1017.

- Lu KT, Wang YW, Wo YY, Yang YL. Extracellular signal-regulated kinase-mediated IL-1-induced cortical neuron damage during traumatic brain injury. *Neurosci Lett.* 2005; 386(1):40-45.
- Lu Y, Allen M, Halt AR, Weisenhaus M, Dallapiazza RF, Hall DD, Usachev YM, McKnight GS, Hell JW. Age-dependent requirement of AKAP150-anchored PKA and GluR2-lacking AMPA receptors in LTP. *EMBO J.* 2007; 26(23):4879-4890.
- Lubbers ME, van den Bos R, Spruijt BM. Mu opioid receptor knockout mice in the Morris Water Maze: a learning or motivation deficit? *Behav Brain Res.* 2007; 180(1):107-111.
- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol.* 2006; 147 Suppl 1:S232-240.
- Ludwig RJ, Schön MP, Boehncke WH. P-selectin: a common therapeutic target for cardiovascular disorders, inflammation and tumour metastasis. *Expert Opin Ther Targets.* 2007; 11(8):1103-1117.
- Luján R. Subcellular regulation of metabotropic GABA receptors in the developing cerebellum. *Cerebellum.* 2007; 6(2):123-129.
- Luo Y, DeFranco DB. Opposing roles for ERK1/2 in neuronal oxidative toxicity: distinct mechanisms of ERK1/2 action at early versus late phases of oxidative stress. *J Biol Chem.* 2006; 281(24):16436-16442.
- Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 1998; 338(7):436-445.
- Lyons PD, Benveniste EN. Cleavage of membrane-associated ICAM-1 from astrocytes: involvement of a metalloprotease. *Glia.* 1998; 22(2):103-112.
- Lysle DT, How T. Endogenous opioids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase by splenocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999; 288(2):502-508.
- Ma J, Xiong JY, Hou WW, Yan HJ, Sun Y, Huang SW, Jin L, Wang Y, Hu WW, Chen Z. Protective effect of carnosine on subcortical ischemic vascular dementia in mice. *CNS Neurosci Ther.* 2012; 18(9):745-753.
- Ma Y, Liu W, Wang Y, Chao X, Qu Y, Wang K, Fei Z. VEGF protects rat cortical neurons from mechanical trauma injury induced apoptosis via the MEK/ERK pathway. *Brain Res Bull.* 2011; 86(5-6):441-446.
- Maegele M, Schaefer U. Stem cell-based cellular replacement strategies following traumatic brain injury (TBI). *Minim Invasive Ther Allied Technol.* 2008; 17(2):119-131.
- Malek S, Chen Y, Huxford T, Ghosh G. I κ B β , but not I κ B α , functions as a classical cytoplasmic inhibitor of NF- κ B dimers by masking both NF- κ B

- nuclear localization sequences in resting cells. *J Biol Chem.* 2001; 276(48):45225-45235.
- Mandel LJ, Bacallao R, Zampighi G. Uncoupling of the molecular 'fence' and paracellular 'gate' functions in epithelial tight junctions. *Nature* 1993; 361: 552-555.
 - Marieb EN, Hoehn KN. *Human Anatomy and Physiology.* Pearson. 9ª Edición. 2003. Cap. 11: 389-397.
 - Marino M, Scuderi F, Mazzarelli P, Mannella F, Provenzano C, Bartoccioni E. Constitutive and cytokine-induced expression of MHC and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human myoblasts. *J Neuroimmunol.* 2001; 116(1): 94-101.
 - Marklund N, Bakshi A, Castelbuono DJ, Conte V, McIntosh TK. Evaluation of pharmacological treatment strategies in traumatic brain injury. *Curr Pharm Des.* 2006; 12(13):1645-1680.
 - Marlin SD, Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell.* 1987; 51(5):813-819.
 - Marlin SD, Staunton DE, Springer TA, Stratowa C, Sommergruber W, Merluzzi VJ. A soluble form of intercellular adhesion molecule-1 inhibits rhinovirus infection. *Nature.* 1990; 344(6261):70-72.
 - Martin S, Martin A, Staunton DE, Springer TA. Functional studies of truncated soluble intercellular adhesion molecule 1 expressed in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993; 37(6):1278-1284.
 - Martin A, Hofmann HD, Kirsch M. Glial reactivity in ciliary neurotrophic factor-deficient mice after optic nerve lesion. *J Neurosci.* 2003; 23(13):5416-5424.
 - März P, Ozbek S, Fischer M, Voltz N, Otten U, Rose-John S. Differential response of neuronal cells to a fusion protein of ciliary neurotrophic factor/soluble CNTF-receptor and leukemia inhibitory factor. *Eur J Biochem.* 2002; 269(12):3023-3031.
 - Mason JC, Kapahi P, Haskard DO. Detection of increased levels of circulating intercellular adhesion molecule 1 in some patients with rheumatoid arthritis but not in patients with systemic lupus erythematosus. Lack of correlation with levels of circulating vascular cell adhesion molecule 1. *Arthritis Rheum.* 1993; 36(4):519-527.
 - Mattson MP, Cheng B, Baldwin SA, Smith-Swintosky VL, Keller J, Geddes JW, Scheff SW, Christakos S. Brain injury and tumor necrosis factors induce calbindin D-28k in astrocytes: evidence for a cytoprotective response. *J Neurosci Res.* 1995; 42(3):357-370.
 - Mattson MP, Meffert MK. Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death Differ.* 2006; 13(5):852-860.

- Matsuzaki H, Tamatani M, Yamaguchi A, Namikawa K, Kiyama H, Vitek MP, Mitsuda N, Tohyama M. Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity: signal transduction cascades. *FASEB J.* 2001; 15(7):1218-1220.
- Matyash V, Kettenmann H. Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev.* 2010; 63(1-2):2-10.
- Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends Biochem Sci.* 1997; 22(12):477-481.
- Maynard EA, Schultz RL, Pease DC. Electron microscopy of the vascular bed of rat cerebral cortex. *Am J Anat* 1957; 100:409-422.
- Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2(8):599-609.
- Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A, Fasano S, Pakhotin P, Krezel W, Welzl H, Wolfer DP, Pagès G, Valverde O, Marowsky A, Porrazzo A, Orban PC, Maldonado R, Ehrengruber MU, Cestari V, Lipp HP, Chapman PF, Pouyssegur J, Brambilla R. Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron.* 2002; 34(5):807-820.
- McKenzie S, Robinson NT, Herrera L, Churchill JC, Eichenbaum H. Learning causes reorganization of neuronal firing patterns to represent related experiences within a hippocampal schema. *J Neurosci.* 2013; 33(25):10243-10256.
- McKeon RJ, Schreiber RC, Rudge JS, Silver J. Reduction of neurite outgrowth in a model of glial scarring following CNS injury is correlated with the expression of inhibitory molecules on reactive astrocytes. *J Neurosci.* 1991; 11(11):3398-3411.
- McKerracher L, Winton MJ. Nogo on the go. *Neuron.* 2002; 36(3):345-348.
- McNamara RK, Skelton RW. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. *Brain Res Brain Res Rev.* 1993; 18(1):33-49.
- McMillan TM, Teasdale GM, Stewart E. Disability in young people and adults after head injury: 12-14 year follow-up of a prospective cohort. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2012; 83(11):1086-1091.
- McNamara KC, Lisembee AM, Lifshitz J. The whisker nuisance task identifies a late-onset, persistent sensory sensitivity in diffuse brain-injured rats. *J Neurotrauma.* 2010; 27(4):695-706.
- Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem.* 1983; 52:711-760.
- Mendes Arent A, de Souza LF, Walz R, Dafre AL. Perspectives on molecular biomarkers of oxidative stress and antioxidant strategies in traumatic brain injury. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 723060.

-
- Menet V, Prieto M, Privat A, Giménez y Ribotta M. Axonal plasticity and functional recovery after spinal cord injury in mice deficient in both glial fibrillary acidic protein and vimentin genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(15):8999-9004.
 - Merkle FT, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A. Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science*. 2007; 317(5836):381-384.
 - Middleton G, Hamanoue M, Enokido Y, Wyatt S, Pennica D, Jaffray E, Hay RT, Davies AM. Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons. *J Cell Biol*. 2000; 148(2):325-332.
 - Minamiyama Y, Takemura S, Tsukioka T, Shinkawa H, Kobayashi F, Nishikawa Y, Kodai S, Mizuguchi S, Suehiro S, Okada S. Effect of AOB, a fermented-grain food supplement, on oxidative stress in type 2 diabetic rats. *Biofactors*. 2007; 30(2):91-104.
 - Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci*. 2005; 28:223-250.
 - Minghetti L. Role of inflammation in neurodegenerative diseases. *Curr Opin Neurol*. 2005; 18(3):315-321.
 - Miranda M, Bosch-Morell F, Johnsen-Soriano S, Barcia J, Almansa I, Asensio S, Araiz J, Messeguer A, Romero FJ. Oxidative stress in rat retina and hippocampus after chronic MDMA ('ecstasy') administration. *Neurochem Res*. 2007; 32(7):1156-1162.
 - Miranda M, Muriach M, Johnsen S, Bosch-Morell F, Araiz J, Romá J, Romero FJ. Oxidative stress in a model for experimental diabetic retinopathy: treatment with antioxidants. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2004; 79(6):289-294.
 - Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*. 2003; 302(5651):1760-1765.
 - Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care*. 2002; 8(2):101-105.
 - Mori T, Wang X, Jung JC, Sumii T, Singhal AB, Fini ME, Dixon CE, Alessandrini A, Lo EH. Mitogen-activated protein kinase inhibition in traumatic brain injury: in vitro and in vivo effects. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002; 22(4):444-452.
 - Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*. 1982; 297(5868):681-683.
 - Mukherjee S, Katki K, Arisi GM, Foresti ML, Shapiro LA. Early TBI-Induced Cytokine Alterations are Similarly Detected by Two Distinct Methods of Multiplex Assay. *Front Mol Neurosci*. 2011; 4:21.

-
- Muriach M, Bosch-Morell F, Alexander G, Blomhoff R, Barcia J, Arnal E, Almansa I, Romero FJ, Miranda M. Lutein effect on retina and hippocampus of diabetic mice. *Free Radic Biol Med.* 2006; 41(6):979-984.
 - Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12:593-633.
 - Nagaoka T, Kaburagi Y, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Steeber DA, Tedder TF, Sato S. Delayed wound healing in the absence of intercellular adhesion molecule-1 or L-selectin expression. *Am J Pathol.* 2000; 157(1):237-247.
 - Nagy Z, Peters H, Hüttner I. Fracture faces of cell junctions in cerebral endothelium during normal and hyperosmotic conditions. *Lab Invest.* 1984; 50(3):313-322.
 - Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T, Nakafuku M. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell.* 2002; 110(4):429-441.
 - Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci.* 2003; 26(10):523-530.
 - Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R, Chapple S, Cohen G, Feher J, Grune T, Lengyel G, Mann GE, Pamplona R, Poli G, Portero-Otin M, Riahi Y, Salvayre R, Sasson S, Serrano J, Shamni O, Siems W, Siow RC, Wiswedel I, Zarkovic K, Zarkovic N. Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res.* 2010; 44(10):1125-1171.
 - Neumann J, Gunzer M, Gutzeit HO, Ullrich O, Reymann KG, Dinkel K. Microglia provide neuroprotection after ischemia. *FASEB J.* 2006; 20(6):714-716.
 - Neumann S, Bradke F, Tessier-Lavigne M, Basbaum AI. Regeneration of sensory axons within the injured spinal cord induced by intraganglionic cAMP elevation. *Neuron.* 2002; 34(6):885-893.
 - Nieuwenhuys R, Donkelaar HJ, Nicholson C. The central nervous system of vertebrates. 1998. PRO EDIT GmbH, Heidelberg.
 - Nitti M, Domenicotti C, d'Abramo C, Assereto S, Cottalasso D, Melloni E, Poli G, Biasi F, Marinari UM, Pronzato MA. Activation of PKC-beta isoforms mediates HNE-induced MCP-1 release by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 294(3):547-552.
 - Noguès X, Corsini MM, Marighetto A, Abrous DN. Functions for adult neurogenesis in memory: an introduction to the neurocomputational approach and to its contribution. *Behav Brain Res.* 2012; 227(2):418-425.
 - Nonaka M, Chen XH, Pierce JE, Leoni MJ, McIntosh TK, Wolf JA, Smith DH. Prolonged activation of NF-kappaB following traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma.* 1999; 16(11):1023-1034.

- O'Brien CP. Anticraving medications for relapse prevention: a possible new class of psychoactive medications. *Am J Psychiatry*. 2005; 162(8):1423-1431.
- O'Keefe GM, Nguyen VT, Benveniste EN. Regulation and function of class II major histocompatibility complex, CD40, and B7 expression in macrophages and microglia: Implications in neurological diseases. *J Neurovirol*. 2002; 8(6):496-512.
- Oppenheim RW, Prevette D, Yin QW, Collins F, MacDonald J. Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. *Science*. 1991; 251(5001):1616-1618.
- Pabon MM, Bachstetter AD, Hudson CE, Gemma C, Bickford PC. CX3CL1 reduces neurotoxicity and microglial activation in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*. 2011; 8:9.
- Pan Y, Lloyd C, Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo JA, Vath J, Gosselin M, Ma J, Dussault B, Woolf E, Alperin G, Culpepper J, Gutierrez-Ramos JC, Gearing D. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nature*. 1997; 387(6633):611-617.
- Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008; 31 Suppl 2:S170-180.
- Pardridge WM. Brain metabolism: a perspective from the blood brain barrier. *Physiol Rev* 1983; 63: 1481-535.
- Pardridge WM. The blood-brain barrier. Permeability, substrate transport and drug and gene targeting. In Edvinsson L, Krause DN, eds. *Cerebral blood flow and metabolism*. 2 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002. p. 119-139.
- Pascual Garvi JM, González Llanos F, Prieto Arribas R, Cerdán S, Roda JM. Blood brain barrier: development of a structure which supports the functional heterogeneity of the central nervous system. *Rev Neurol*. 2004; 38(6):565-581.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego Academic Press. 1986.
- Pearse DD, Pereira FC, Marcillo AE, Bates ML, Berrocal YA, Filbin MT, Bunge MB. cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *Nat Med*. 2004; 10(6):610-616.
- Pellerin L, Bouzier-Sore AK, Aubert A, Serres S, Merle M, Costalat R, Magistretti PJ. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. *Glia*. 2007; 55(12):1251-1262.

- Penkowa M, Giralt M, Lago N, Camats J, Carrasco J, Hernández J, Molinero A, Campbell IL, Hidalgo J. Astrocyte-targeted expression of IL-6 protects the CNS against a focal brain injury. *Exp Neurol*. 2003; 181(2):130-148.
- Pernet V, Joly S, Dalkara D, Jordi N, Schwarz O, Christ F, Schaffer DV, Flannery JG, Schwab ME. Long-distance axonal regeneration induced by CNTF gene transfer is impaired by axonal misguidance in the injured adult optic nerve. *Neurobiol Dis*. 2013; 51:202-213.
- Petters A, Palay SL, Webster H. The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells. 1991. 3rd ed. Oxford University, New York.
- Pifarré P, Prado J, Giralt M, Molinero A, Hidalgo J, Garcia A. Cyclic GMP phosphodiesterase inhibition alters the glial inflammatory response, reduces oxidative stress and cell death and increases angiogenesis following focal brain injury. *J Neurochem*. 2010; 112(3):807-817.
- Plesnila N, von Baumgarten L, Retiounskaia M, Engel D, Ardeshiri A, Zimmermann R, Hoffmann F, Landshamer S, Wagner E, Culmsee C. Delayed neuronal death after brain trauma involves p53-dependent inhibition of NF-kappaB transcriptional activity. *Cell Death Differ*. 2007; 14(8):1529-1541.
- Ploeger GE, Spruijt BM, Cools AR. Spatial localization in the Morris water maze in rats: acquisition is affected by intra-accumbens injections of the dopaminergic antagonist haloperidol. *Behav Neurosci*. 1994; 108(5):927-934.
- Potter RL, Stafford PH, Taylor S. Regulatory subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase I from porcine skeletal muscle: purification and proteolysis. *Arch Biochem Biophys*. 1978; 190(1):174-180.
- Povlishock JT, Kontos HA. The role of oxygen radicals in the pathobiology of traumatic brain injury. *Hum Cell*. 1992; 5(4):345-353.
- Prins ML, Povlishock JT, Phillips LL. The effects of combined fluid percussion traumatic brain injury and unilateral entorhinal deafferentation on the juvenile rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*. 2003; 140(1):93-104.
- Prinz M, Priller J. Tickets to the brain: role of CCR2 and CX3CR1 in myeloid cell entry in the CNS. *J Neuroimmunol*. 2010; 224(1-2):80-84.
- Pryor WA, Stanley JP. Letter: A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J Org Chem*. 1975; 40(24):3615-36157.
- Pugin J, Verghese G, Widmer MC, Matthay MA. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 1999; 27(2):304-312.

- Qiu J, Cai D, Dai H, McAtee M, Hoffman PN, Bregman BS, Filbin MT. Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron*. 2002; 34(6):895-903.
- Quintana A, Giralt M, Rojas S, Penkowa M, Campbell IL, Hidalgo J, Molinero A. Differential role of tumor necrosis factor receptors in mouse brain inflammatory responses in cryolesion brain injury. *J Neurosci Res*. 2005; 82(5):701-716.
- Quintana A, Giralt M, Molinero A, Campbell IL, Penkowa M, Hidalgo J. Analysis of the cerebral transcriptome in mice subjected to traumatic brain injury: importance of IL-6. *Neuroimmunomodulation*. 2007; 14(3-4):139-143.
- Rakic P. Specification of cerebral cortical areas. *Science*. 1988; 241(4862):170-176.
- Rákos G, Kis Z, Nagy D, Lür G, Farkas T, Hortobágyi T, Vécsei L, Toldi J. Evans Blue fluorescence permits the rapid visualization of non-intact cells in the perilesional rim of cold-injured rat brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2007; 67(2):149-154.
- Ramachandran V, Watts LT, Maffi SK, Chen J, Schenker S, Henderson G. Ethanol-induced oxidative stress precedes mitochondrially mediated apoptotic death of cultured fetal cortical neurons. *J Neurosci Res*. 2003; 74(4):577-588.
- Ramón y Cajal S. *Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés*. Paris, Maloine, 1909.
- Rancan M, Otto VI, Hans VH, Gerlach I, Jork R, Trentz O, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Upregulation of ICAM-1 and MCP-1 but not of MIP-2 and sensorimotor deficit in response to traumatic axonal injury in rats. *J Neurosci Res*. 2001; 63(5):438-446.
- Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*. 2009; 27:119-145.
- Raslan F, Schwarz T, Meuth SG, Austinat M, Bader M, Renné T, Roosen K, Stoll G, Sirén AL, Kleinschnitz C. Inhibition of bradykinin receptor B1 protects mice from focal brain injury by reducing blood-brain barrier leakage and inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2010; 30(8):1477-1486.
- Raslan F, Albert-Weißenberger C, Ernestus RI, Kleinschnitz C, Sirén AL. Focal brain trauma in the cryogenic lesion model in mice. *Exp Transl Stroke Med*. 2012; 4-6.
- Ray A, Mediratta PK, Sen P. Modulation by naltrexone of stress-induced changes in humoral immune responsiveness and gastric mucosal integrity in rats. *Physiol Behav*. 1992; 51(2):293-296.
- Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 1967; 34: 207-217.
- Ribak CE, Seress L, Amaral DG. The development, ultrastructure and synaptic connections of the mossy cells of the dentate gyrus. *J Neurocytol*. 1985; 14(5):835-857.

-
- Ribak CE, Shapiro LA, Perez ZD, Spigelman I. Microglia-associated granule cell death in the normal adult dentate gyrus. *Brain Struct Funct.* 2009; 214(1):25-35.
 - Richard MJ, Guiraud P, Meo J, Favier A. High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *J Chromatogr.* 1992; 577(1):9-18.
 - Risau W, Hallmann R, Albretch U, Henkefahle S. Brain induces the expression of an early cell surface marker for blood-brain barrier-specific endothelium. *EMBO J* 1986; 5: 3179-3184.
 - Rocamonde B, Paradells S, Barcia JM, Barcia C, García Verdugo JM, Miranda M, Romero Gómez FJ, Soria JM. Neuroprotection of lipoic acid treatment promotes angiogenesis and reduces the glial scar formation after brain injury. *Neuroscience.* 2012; 224:102-115.
 - Roozenbeek B, Maas AI, Menon DK. *Journal Nat Rev Neurol.* Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. 2013; 9(4):231-236.
 - Rosell DR, Nacher J, Akama KT, McEwen BS. Spatiotemporal distribution of gp130 cytokines and their receptors after status epilepticus: comparison with neuronal degeneration and microglial activation. *Neuroscience.* 2003; 122(2):329-348.
 - Rosenfeld J, Ford NL. Bomb blast, mild traumatic brain injury and psychiatric morbidity: a review. *Injury.* 2010; 41(5):437-443.
 - Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res.* 2012; 66(2):105-143.
 - Rothlein R, Mainolfi EA, Czajkowski M, Marlin SD. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J Immunol.* 1991; 147(11): 3788-3793.
 - Rudge JS, Pasnikowski EM, Holst P, Lindsay RM. Changes in neurotrophic factor expression and receptor activation following exposure of hippocampal neuron/astrocyte cocultures to kainic acid. *J Neurosci.* 1995; 15(10):6856-6867.
 - Salamone JD, Correa M. Motivational views of reinforcement: implications for understanding the behavioral functions of nucleus accumbens dopamine. *Behav Brain Res.* 2002; 137(1-2):3-25.
 - Salminen A, Liu PK, Hsu CY. Alteration of transcription factor binding activities in the ischemic rat brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 212(3):939-944.
 - Santoni M, Bracarda S, Nabissi M, Massari F, Conti A, Bria E, Tortora G, Santoni G, Cascinu S. CXC and CC chemokines as angiogenic modulators in nonhaematological tumors. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:768758.

- Santos GJ, Oliveira CA, Boschero AC, Rezende LF. CNTF protects MIN6 cells against apoptosis induced by Alloxan and IL-1 β through downregulation of the AMPK pathway. *Cell Signal*. 2011; 23(10):1669-1676.
- Sanz O, Acarin L, González B, Castellano B. NF-kappaB and IkappaBalpha expression following traumatic brain injury to the immature rat brain. *J Neurosci Res*. 2002; 67(6):772-780.
- Satriano JA, Shuldiner M, Hora K, Xing Y, Shan Z, Schlondorff D. Oxygen radicals as second messengers for expression of the monocyte chemoattractant protein, JE/MCP-1, and the monocyte colony-stimulating factor, CSF-1, in response to tumor necrosis factor-alpha and immunoglobulin G. Evidence for involvement of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-dependent oxidase. *J Clin Invest*. 1993; 92(3):1564-1571.
- Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, Murcia NS, Garcia-Verdugo JM, Marin O, Rubenstein JL, Tessier-Lavigne M, Okano H, Alvarez-Buylla A. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*. 2006; 311(5761):629-632.
- Schaar DG, Sieber BA, Sherwood AC, Dean D, Mendoza G, Ramakrishnan L, Dreyfus CF, Black IB. Multiple astrocyte transcripts encode nigral trophic factors in rat and human. *Exp Neurol*. 1994; 130(2):387-393.
- Schaffner A, King CC, Schaer D, Guiney DG. Induction and antimicrobial activity of platelet basic protein derivatives in human monocytes. *J Leukoc Biol*. 2004; 76(5):1010-1018.
- Schenk BI, Petersen F, Flad HD, Brandt E. Platelet-derived chemokines CXC chemokine ligand (CXCL) 7, connective tissue-activating peptide III, and CXCL4 differentially affect and cross-regulate neutrophil adhesion and transendothelial migration. *J Immunol*. 2002; 169(5):2602-2610.
- Schilling M, Besselmann M, Müller M, Strecker JK, Ringelstein EB, Kiefer R. Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol*. 2005; 196(2):290-297.
- Schmidt KN, Amstad P, Cerutti P, Baeuerle PA. The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chem Biol*. 1995; 2(1):13-22.
- Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun*. 1992; 17(4):221-237.

- Schünke M, Schulte E, Schumacher U. Prometheus. Texto y Atlas de Anatomía. Cabeza, Cuello y Neuroanatomía. Vol. 3. Interamericana. 2ª Edición. 2011.
- Senaldi G, Varnum BC, Sarmiento U, Starnes C, Lile J, Scully S, Guo J, Elliott G, McNinch J, Shaklee CL, Freeman D, Manu F, Simonet WS, Boone T, Chang MS. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96(20):11458-11463.
- Sendtner M, Götz R, Holtmann B, Thoenen H. Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. *J Neurosci*. 1997; 17(18):6999-7006.
- Sendtner M, Schmalbruch H, Stöckli KA, Carroll P, Kreutzberg GW, Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature*. 1992; 6; 358(6386):502-504.
- Sendtner M, Stöckli KA, Thoenen H. Synthesis and localization of ciliary neurotrophic factor in the sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. *J Cell Biol*. 1992; 118(1):139-148.
- Seri B, García-Verdugo JM, McEwen BS, Alvarez-Buylla A. Astrocytes give rise to new neurons in the adult mammalian hippocampus. *J Neurosci*. 2001; 21(18):7153-7160.
- Sharp DJ, Beckmann CF, Greenwood R, Kinnunen KM, Bonnelle V, De Boissezon X, Powell JH, Counsell SJ, Patel MC, Leech R. Default mode network functional and structural connectivity after traumatic brain injury. *Brain*. 2011; 134(Pt 8):2233-2247.
- Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem*. 1999; 68:821-861.
- Shijubo N, Imai K, Shigehara K, Honda Y, Koba H, Tsujisaki M, Hinoda Y, Yachi A, Ohmichi M, Hiraga Y, Abe S. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in sera and bronchoalveolar lavage fluid of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Clin Exp Immunol*. 1994; 95(1):156-161.
- Shimamura AP. Toward a cognitive neuroscience of metacognition. *Conscious Cogn*. 2000; 9(2 Pt 1):313-323; discussion 324-326.
- Siapas AG, Lubenov EV, Wilson MA. Prefrontal phase locking to hippocampal theta oscillations *Neuron*. 2005; 46(1):141-151.
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*. 2010; 7(4):483-495.
- Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med*. 1991; 91(3C):31S-38S.

- Silva RM, Rossi GC, Mathis JP, Standifer KM, Pasternak GW, Bodnar RJ. Morphine and morphine-6beta-glucuronide-induced feeding are differentially reduced by G-protein alpha-subunit antisense probes in rats. *Brain Res.* 2000; 876(1-2):62-75.
- Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5(2):146-156.
- Simon R, Thier M, Krüttgen A, Rose-John S, Weiergräber O, Heinrich PC, Schröder JM, Weis J. Human CNTF and related cytokines: effects on DRG neurone survival. *Neuroreport.* 1995; 7(1):153-157.
- Singhal PC, Bhaskaran M, Patel J, Patel K, Kasinath BS, Duraisamy S, Franki N, Reddy K, Kapasi AA. Role of p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation and Fas-Fas ligand interaction in morphine-induced macrophage apoptosis. *J Immunol.* 2002; 168(8):4025-4033.
- Skålhegg BS, Taskén K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front Biosci.* 1997; 2:d331-342.
- Skaper SD, Facci L, Giusti P. Mast cells, glia and neuroinflammation: partners in crime? *Immunology.* 2013. doi: 10.1111/imm.12170.
- Slepko N, Levi G. Progressive activation of adult microglial cells in vitro. *Glia.*; 16(3):241-246.
- Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist.* 2005; 11(5):400-407.
- Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* 2009; 32(12):638-647.
- Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol.* 2010; 119(1):7-35.
- Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci.* 2005; 25(1):10-18.
- Spiteller P, Kern W, Reiner J, Spiteller G. Aldehydic lipid peroxidation products derived from linoleic acid. *Biochim Biophys Acta.* 2001; 1531(3):188-208.
- Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev.* 1992; 99(2):195-231.
- Steeber DA, Engel P, Miller AS, Sheetz MP, Tedder TF. Ligation of L-selectin through conserved regions within the lectin domain activates signal transduction pathways and integrin function in human, mouse, and rat leukocytes. *J Immunol.* 1997; 159(2):952-963.

- Steeber DA, Tedder TF. Adhesion molecule cascades direct lymphocyte recirculation and leukocyte migration during inflammation. *Immunol Res.* 2000; 22(2-3):299-317.
- Steiner J, Rafols D, Park HK, Katar MS, Rafols JA, Petrov T. Attenuation of iNOS mRNA exacerbates hypoperfusion and upregulates endothelin-1 expression in hippocampus and cortex after brain trauma. *Nitric Oxide.* 2004; 10(3):162-169.
- Stewart PA, Coomber BL. Astrocytes and the blood-brain barrier. In Fedoroff S, Vernadakis A, eds. *Astrocytes. Vol. I. Development, morphology and regional specialization of astrocytes.* Orlando, FL: Academic Press; 1986.
- Stoffel M, Blau C, Reinl H, Breidt J, Gersonde K, Baethmann A, Plesnila N. Identification of brain tissue necrosis by MRI: validation by histomorphometry. *J Neurotrauma.* 2004; 21(6):733-740.
- Streit WJ. Microglia and neuroprotection: implications for Alzheimer's disease. *Brain Res Brain Res Rev.* 2005; 48(2):234-239.
- Strieter RM, Polverini PJ, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Kasper J, Dzuiba J, Van Damme J, Walz A, Marriott D, Chan SY, Roczniak S, Shanafelt AB. The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem.* 1995; 270(45):27348-27357.
- Subramaniam S, Unsicker K. ERK and cell death: ERK1/2 in neuronal death. *FEBS J.* 2010; 277(1):22-29.
- Sugiura S, Kitagawa K, Omura-Matsuoka E, Sasaki T, Tanaka S, Yagita Y, Matsushita K, Storm DR, Hori M CRE-mediated gene transcription in the peri-infarct area after focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Res.* 2004; 75: 401-407.
- Surekha RH, Srikanth BB, Jharna P, Ramachandra RV, Dayasagar RV, Jyothy A. Oxidative stress and total antioxidant status in myocardial infarction. *Singapore Med J.* 2007; 48(2):137-142.
- Suzumura A. Neuron-microglia interaction in neuroinflammation. *Curr Protein Pept Sci.* 2013; 14(1):16-20.
- Svensk AM, Soini Y, Pääkkö P, Hiravikoski P, Kinnula VL. Differential expression of superoxide dismutases in lung cancer. *Am J Clin Pathol.* 2004; 122(3):395-404.
- Sweatt JD. Memory mechanisms: the yin and yang of protein phosphorylation. *Curr Biol.* 2001; 11(10):R391-394.
- Taga T, Kishimoto T. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15:797-819.
- Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir (Wien).* 2006; 148(3):255-268

- Tanaka K, Nogawa S, Ito D, Suzuki S, Dembo T, Kosakai A, Fukuuchi Y. Phosphorylation of cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in oligodendrocytes in the corpus callosum after focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 21(10):1177-1188.
- Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun.* 2002; 70(12):6524-6533.
- Tang Z, Gan Y, Liu Q, Yin JX, Liu Q, Shi J, Shi FD. CX3CR1 deficiency suppresses activation and neurotoxicity of microglia/macrophage in experimental ischemic stroke. *J Neuroinflammation.* 2014; 11:26.
- Tarozzo G, Bortolazzi S, Crochemore C, Chen SC, Lira AS, Abrams JS, Beltramo M. Fractalkine protein localization and gene expression in mouse brain. *J Neurosci Res.* 2003; 73(1):81-88.
- Taylor JA, Ivry RB. The role of strategies in motor learning. *Ann N Y Acad Sci.* 2012; 1251:1-12.
- Taylor SS, Kim C, Cheng CY, Brown SH, Wu J, Kannan N. Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1784(1):16-26.
- Taylor SS, Kornev AP. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem Sci.* 2011; 36(2):65-77.
- Telfer JF, Brock JH. Proinflammatory cytokines increase iron uptake into human monocytes and synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Med Sci Monit.* 2004; 10(4):BR91-95.
- Teppo AM, von Willebrand E, Honkanen E, Ahonen J, Grönhagen-Riska C. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1) after kidney transplantation: the origin and role of urinary sICAM-1?. *Transplantation.* 2001; 71(8):1113-1119.
- Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Leker RR. Vascular endothelial growth factor increases neurogenesis after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010; 30(5):1008-1016.
- Thornton P, McColl BW, Greenhalgh A, Denes A, Allan SM, Rothwell NJ. Platelet interleukin-1alpha drives cerebrovascular inflammation. *Blood.* 2010; 115(17):3632-3639.
- Tirapu-Ustárroz J, Muñoz-Céspedes JM. Memory and the executive functions. *Rev Neurol.* 2005; 41(8):475-484.
- Toliás CM, Reinert M, Seiler R, Gilman C, Scharf A, Bullock MR. Normobaric hyperoxia--induced improvement in cerebral metabolism and reduction in intracranial pressure in

- patients with severe head injury: a prospective historical cohort-matched study. *J Neurosurg.* 2004; 101(3):435-444.
- Tonegawa S, Nakazawa K, Wilson MA. Genetic neuroscience of mammalian learning and memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003; 358(1432):787-795.
 - Toni N, Teng EM, Bushong EA, Aimone JB, Zhao C, Consiglio A, van Praag H, Martone ME, Ellisman MH, Gage FH. Synapse formation on neurons born in the adult hippocampus. *Nat Neurosci.* 2007; 10(6):727-734.
 - Tontsch U, Bauer HC. Glial cells and neurons induce blood brain barrier related enzymes in cultured cerebral endothelial cells. *Brain Res* 1991; 539: 247-253.
 - Torchinsky A, Toder V. TNFalpha in the pathogenesis of diabetes-induced embryopathies: functions and targets. *Rev Diabet Stud.* 2007; 4(4):200-209.
 - Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension.* 2004; 44(3):248-252.
 - Trush MA, Mimnaugh EG, Gram TE. Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem Pharmacol.* 1982; 31(21):3335-3346.
 - Tu L, Poe JC, Kadono T, Venturi GM, Bullard DC, Tedder TF, Steeber DA. A functional role for circulating mouse L-selectin in regulating leukocyte/endothelial cell interactions in vivo. *J Immunol.* 2002; 169(4):2034-2043.
 - Tsakadze NL, Sithu SD, Sen U, English WR, Murphy G, D'Souza SE. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain cleavage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *J Biol Chem.* 2006; 281(6):3157-3164.
 - Tsukada N, Matsuda M, Miyagi K, Yanagisawa N. Increased levels of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and tumor necrosis factor receptor in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *Neurology.* 1993; 43(12):2679-2682.
 - van Kesteren MT, Ruiters DJ, Fernández G, Henson RN. How schema and novelty augment memory formation. *Trends Neurosci.* 2012; 35(4):211-219.
 - van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature.* 2002; 415(6875):1030-1034.
 - Vantaggiato C, Formentini I, Bondanza A, Bonini C, Naldini L, Brambilla R. ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially. *J Biol.* 2006; 5(5):14.
 - Vendrell P, Junqué C, Pujol J, Jurado MA, Molet J, Grafman J. The role of prefrontal regions in the Stroop task. *Neuropsychologia.* 1995; 33(3):341-352.

- Venturi GM, Tu L, Kadono T, Khan AI, Fujimoto Y, Oshel P, Bock CB, Miller AS, Albrecht RM, Kubes P, Steeber DA, Tedder TF. Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. *Immunity*. 2003; 19(5):713-724.
- Villegas JC, Broadwell RD. Transcytosis of protein through the mammalian cerebral epithelium and endothelium. II. Adsorptive transcytosis of WGA-HRP and the blood-brain and brain-blood barriers. *J Neurocytol* 1993; 22: 67-80.
- Walton M, Sirimanne E, Williams C, Gluckman P, Dragunow M. The role of the cyclic AMP-responsive element binding protein (CREB) in hypoxic-ischemic brain damage and repair. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996; 43(1-2):21-29.
- Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, Levkoff LH, Kearns SM, Marshall GP 2nd, Scheffler B, Steindler DA. Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia*. 2006; 54(8):815-825.
- Wang HC, Lin WC, Lin YJ, Rau CS, Lee TH, Chang WN, Tsai NW, Cheng BC, Kung CT, Lu CH. The association between serum adhesion molecules and outcome in acute spontaneous intracerebral hemorrhage. *Crit Care*. 2011; 15(6):R284.
- Wang HK, Lin SH, Sung PS, Wu MH, Hung KW, Wang LC, Huang CY, Lu K, Chen HJ, Tsai KJ. Population based study on patients with traumatic brain injury suggests increased risk of dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2012; 83(11):1080-1085.
- Wang YS, Liao KW, Chen MF, Huang YC, Chu RM, Chi KH. Canine CXCL7 and its functional expression in dendritic cells undergoing maturation. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010; 135(1-2):128-136.
- Watkins LR, Hutchinson MR, Ledebor A, Wieseler-Frank J, Milligan ED, Maier SF. Norman Cousins Lecture. Glia as the "bad guys": implications for improving clinical pain control and the clinical utility of opioids. *Brain Behav Immun*. 2007; 21(2):131-146.
- Wen R, Song Y, Liu Y, Li Y, Zhao L, Laties AM. CNTF negatively regulates the phototransduction machinery in rod photoreceptors: implication for light-induced photostasis plasticity. *Adv Exp Med Biol*. 2008; 613:407-413.
- West AE, Griffith EC, Greenberg ME. Regulation of transcription factors by neuronal activity. *Nat Rev Neurosci*. 2002; 3(12):921-931.
- Whiteman SC, Bianco A, Knight RA, Spiteri MA. Human rhinovirus selectively modulates membranous and soluble forms of its intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) receptor to promote epithelial cell infectivity. *J Biol Chem*. 2003; 278(14):11954-11961.
- Whitney NP, Eidem TM, Peng H, Huang Y, Zheng JC. Inflammation mediates varying effects in neurogenesis: relevance to the pathogenesis of brain injury and neurodegenerative disorders. *J Neurochem*. 2009; 108(6):1343-1359.

- Willson RL. Hydroxyl radicals and biological damage in vitro: what relevance in vivo? *Ciba Found Symp.* 1978; (65):19-42.
- Winyard, P., Morris, C., Winrow, V., Ziaidi, M., and Blake, D. Free radical pathways in the inflammatory response. In "Free radical damage and its control" (C. Rice Evans and R. Burdon, eds.) 1994. pp. 361-383. Elsevier Science, Amsterdam.
- Witkowska AM, Borawska MH. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur Cytokine Netw.* 2004; 15(2): 91-98.
- Wolburg H, Risau W. Formation of the blood-brain barrier. In Kettenmann H, Ransom BR, eds. *Neuroglia.* New York: Oxford University Press; 1995. p. 763-776.
- Wolf S, Lawson C. ICAM-1: Contribution to Vascular Inflammation and Early Atherosclerosis, Coronary Artery Disease. *New Insights and Novel Approaches.* Intech. 2012. Cap: 3.
- Wolf Y, Yona S, Kim KW, Jung S. Microglia, seen from the CX3CR1 angle. *Front Cell Neurosci.* 2013; 7:26.
- Wolff JR. The development of intracerebral blood vessels interacts with astrocyte development and neuron positioning in the rat neocortex. In Wolff JR, Sievers J, Berry M, eds. *Mesenchymal-epithelial interactions in neural development.* NATO ASI series. Vol. 45. Berlin: Springer-Verlag; 1987; p. 399-412.
- Wolburg H, Neuhaus J, Kniesel U, Krauss B, Schmid EM, Ocalan M, Farrell C, Risau W. et al. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells: Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci* 1994; 107: 1347-1357.
- Wortzel I, Seger R. The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles. *Genes Cancer.* 2011; 2(3):195-209.
- Xia W, Han J, Huang G, Ying W. Inflammation in ischaemic brain injury: current advances and future perspectives. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2010; 37(2):253-258.
- Xia Y, Wang CZ, Liu J, Anastasio NC, Johnson KM. Brain-derived neurotrophic factor prevents phencyclidine-induced apoptosis in developing brain by parallel activation of both the ERK and PI-3K/Akt pathways. *Neuropharmacology.* 2010; 58(2):330-336.
- Xue Y, Wang Y, Feng DC, Xiao BG, Xu LY. Tetrandrine suppresses lipopolysaccharide-induced microglial activation by inhibiting NF-kappaB pathway. *Acta Pharmacol Sin.* 2008; 29(2):245-251.
- Yamaki T, Murakami N, Iwamoto Y, Sakakibara T, Kobori N, Ueda S, Kikuchi T, Uwahodo Y. Evaluation of learning and memory dysfunction and histological findings in rats with chronic stage contusion and diffuse axonal injury. *Brain Res.* 1997; 752(1-2):151-160.

-
- Yao Y, Li W, Wu J, Germann UA, Su MS, Kuida K, Boucher DM. Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100(22):12759-12764.
 - Yasuda H, Barth AL, Stellwagen D, Malenka RC. A developmental switch in the signaling cascades for LTP induction. *Nat Neurosci*. 2003; 6(1):15-16.
 - Yerramreddy TR, Milewski M, Penthala NR, Stinchcomb AL, Crooks PA. Novel 3-O-pegylated carboxylate and 3-O-pegylated carbamate prodrugs of naltrexone for microneedle-enhanced transdermal delivery. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010; 20(11):3280-3283.
 - Yilmaz G, Granger DN. Cell adhesion molecules and ischemic stroke. *Neurol Res*. 2008; 30(8):783-793.
 - Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*. 2006; 24(1):21-44.
 - Yoneda Y, Ogita K, Inoue K, Mitani A, Zhang L, Masuda S, Higashihara M, Kataoka K. Rapid potentiation of DNA binding activities of particular transcription factors with leucine-zipper motifs in discrete brain structures of the gerbil with transient forebrain ischemia. *Brain Res*. 1994; 667:54-66.
 - Youn BS, Mantel C, Broxmeyer HE. Chemokines, chemokine receptors and hematopoiesis. *Immunol Rev*. 2000; 177:150-174.
 - Younger J, Mackey S. Fibromyalgia symptoms are reduced by low-dose naltrexone: a pilot study. *Pain Med*. 2009; 10(4):663-672.
 - Younger J, Parkitny L, McLain D. The use of low-dose naltrexone (LDN) as a novel anti-inflammatory treatment for chronic pain. *Clin Rheumatol*. 2014; 33(4):451-459.
 - Yukami T, Hasegawa M, Matsushita Y, Fujita T, Matsushita T, Horikawa M, Komura K, Yanaba K, Hamaguchi Y, Nagaoka T, Ogawa F, Fujimoto M, Steeber DA, Tedder TF, Takehara K, Sato S. Endothelial selectins regulate skin wound healing in cooperation with L-selectin and ICAM-1. *J Leukoc Biol*. 2007; 82(3):519-531.
 - Zaheer A, Yorek MA, Lim R. Effects of glia maturation factor overexpression in primary astrocytes on MAP kinase activation, transcription factor activation, and neurotrophin secretion. *Neurochem Res*. 2001; 26(12):1293-1299.
 - Zatorre RJ, Fields RD, Johansen-Berg H. Plasticity in gray and white: neuroimaging changes in brain structure during learning. *Nat Neurosci*. 2012; 15(4):528-536.
 - Zhang RL, Zhang ZG, Wang Y, LeTourneau Y, Liu XS, Zhang X, Gregg SR, Wang L, Chopp M. Stroke induces ependymal cell transformation into radial glia in the subventricular zone of the adult rodent brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007; 27(6):1201-1212.

- Zhao Y, Luo P, Guo Q, Li S, Zhang L, Zhao M, Xu H, Yang Y, Poon W, Fei Z. Interactions between SIRT1 and MAPK/ERK regulate neuronal apoptosis induced by traumatic brain injury in vitro and in vivo. *Exp Neurol*. 2012; 237(2):489-498.
- Zhong H, Sia GM, Sato TR, Gray NW, Mao T, Khuchua Z, Haganir RL, Svoboda K. Subcellular dynamics of type II PKA in neurons. *Neuron*. 2009; 62(3):363-374.
- Zielasek J, Archelos JJ, Toyka KV, Hartung HP. Expression of intercellular adhesion molecule-1 on rat microglial cells. *Neurosci Lett*. 1993; 153(2):136-139.
- Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR, Davisson RL. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res*. 2002; 91(11):1038-1045.
- Ziv Y, Finkelstein A, Geffen Y, Kipnis J, Smirnov I, Shpilman S, Vertkin I, Kimron M, Lange A, Hecht T, Reyman KG, Marder JB, Schwartz M, Yoles E. A novel immune-based therapy for stroke induces neuroprotection and supports neurogenesis. *Stroke*. 2007; 38(2 Suppl):774-782.
- Ziv Y, Ron N, Butovsky O, Landa G, Sudai E, Greenberg N, Cohen H, Kipnis J, Schwartz M. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. *Nat Neurosci*. 2006; 9(2):268-275.
- Zohar O, Schreiber S, Getslev V, Schwartz JP, Mullins PG, Pick CG. Closed-head minimal traumatic brain injury produces long-term cognitive deficits in mice. *Neuroscience*. 2003; 118(4):949-955.
- Zonneveld R, Martinelli R, Shapiro NI, Kuijpers TW, Plötz FB, Carman CV. Soluble adhesion molecules as markers for sepsis and the potential pathophysiological discrepancy in neonates, children and adults. *Crit Care*. 2014; 18(1):204.