



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Alberto
Fernández Liste

Tesis doctoral

Marcadores inmunohistoquímicos del daño axonal difuso en modelos experimentales murinos y su correlación con encéfalos humanos. Modificación del método Marmarou & Foda de neurotrauma en ratas tras aceleración por impacto.

Santiago de Compostela, 2023

Programa de doctorado en Medicina Molecular



ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

TESIS DOCTORAL

**MARCADORES INMUNOHISTOQUÍMICOS DEL DAÑO AXONAL
DIFUSO EN MODELOS EXPERIMENTALES MURINOS Y SU
CORRELACIÓN CON ENCÉFALOS HUMANOS. MODIFICACIÓN DEL
MÉTODO MARMAROU & FODA DE NEUROTRAUMA EN RATAS
TRAS ACELERACIÓN POR IMPACTO**

Autor

Alberto Fernández Liste

Directores:

Jose Luis Cascallana Álvarez. Rosalía Gallego Gómez

Tutor: Tomás García-Caballero Parada



PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA

A meus pais, sen eles endexamais tería chegado ata aquí

A Ana, princesa, a miña compañeira de vida para poder avanzar, sempre xuntos

A Álvaro e Alexandre, porque vós facedes que todo esforzo paga a pena

Agradecimientos

A mis directores, los Dres. Cascallana y Gallego, por todo el trabajo y la orientación desempeñada en esta tesis.

A mi tutor, el Dr. García-Caballero por su apoyo constante y sus consejos siempre inteligentes y precisos en momentos clave de esta tesis

Al Dr. Cantalapiedra y al Dr. Cascallana por todo el excelente trabajo de tantas horas desarrollado en el Hospital Veterinario Rof Codina de Lugo.

A María Otero y Patricia Viaño por el excelente trabajo realizado en el laboratorio con las muestras.

Al Dr. Gude por su ayuda en el estudio estadístico.

Índice

Resumen	5
Introducción	7
Daño axonal difuso (DAI)	8
<u>Definición</u>	8
<u>Mecanismo de producción</u>	9
<u>Clínica y tipos</u>	10
<u>DAI según la edad</u>	12
<u>Evolución del cuadro patológico en el DAI</u>	13
DAI como lesión traumática, diagnóstico diferencial	16
Reproducción experimental del DAI	20
<u>Mecanismos lesionales</u>	20
<u>Método de Marmarou y Foda</u>	22
Reproducción experimental de isquemia en animales	25
<u>Diagnóstico diferencial entre apoptosis y necrosis</u>	26
Valoración de edema	28
Anestesia en experimentación animal	29
Marcadores inmunohistoquímicos (IHQ)	30
<u>β-APP</u>	30
<i>Detección de β-APP</i>	31
<i>Criterios diagnósticos con β-APP</i>	32
<i>DAI. Criterios diagnósticos y graduación histológica</i>	33
<u>Caspasa-3</u>	33
<i>Diagnóstico de muerte neuronal por hipoxia/isquemia</i>	34
<i>Detección temporal</i>	35
<u>Fractina</u>	36

Correlación β -APP y caspasa.....	36
Repercusión forense.....	37
Justificación y objetivos.....	39
Material y métodos.....	41
Experimentos con ratas.....	41
<u>Método traumático.....</u>	41
<i>Columna.....</i>	42
<i>Disco protector.....</i>	42
<i>Espuma.....</i>	42
<u>Método isquémico.....</u>	43
<u>Craniectomía descompresiva.....</u>	44
<u>Sacrificio y fijación de los órganos.....</u>	45
<u>Controles.....</u>	46
<u>Tallado del encéfalo de la rata.....</u>	46
<u>Análisis inmunohistoquímico.....</u>	48
Encéfalos humanos.....	49
<u>Tallado del encéfalo.....</u>	50
<u>Muestreo.....</u>	50
Resultados.....	53
Modificación del método de Marmarou.....	53
Protocolo experimental.....	56
<u>Expresión de β-Amiloide en lesión traumática y en isquemia.....</u>	57
<i>Áreas con una mayor positividad para β-APP.....</i>	57
<u>Inmunorreactividad para fractina.....</u>	60
<i>Áreas con mayor expresión de fractina.....</i>	61
<i>Patrón de marcaje.....</i>	62
<u>Comparación β-APP y fractina.....</u>	63
<u>Patrón lesional.....</u>	66

<u>Otros marcadores</u>	66
Casos humanos	67
Discusión	69
Modificación del método de Marmarou y Foda	69
Modelo experimental en ratas	72
Ensayo experimental. Inmunomarcaje β-APP	72
<u>Localización del inmnomarcaje con β-APP</u>	73
Ensayo experimental. Inmunomarcaje con fractina	74
<u>Localización del inmnomarcaje con fractina</u>	74
Cuantificación de la expresión de β-APP y fractina	75
Otros marcadores	75
DAI en cerebros humanos	76
Correlación del DAI en cerebros humanos y murinos	76
Conclusiones	79
Bibliografía	81
Declaración: Conflicto de intereses	93
Anexo 1: Publicación	95
Anexo 2: Permisos y comités de ética	113

Resumen

Hoy día se sabe que los traumatismos craneoencefálicos (TCE) cerrados e incluso traumatismos craneales con pocas lesiones superficiales pueden causar daño axonal difuso (DAI) y muerte de la persona. El daño axonal producido por un traumatismo se puede detectar con supervivencias muy cortas (2-3 h) utilizando marcadores inmunohistoquímicos. Sin embargo, estos marcadores de DAI solo indican una interrupción del transporte axonal rápido anterógrado que es independiente de la etiología de la lesión. Desde el punto de vista forense es importante excluir otras causas de patología de la sustancia blanca que ocasionan y que producen un DAI patológico difícil de diferenciar del traumático. Entre estas causas se encuentran episodios previos de hipoxia, encefalitis virales, infarto cerebral isquémico/hemorrágico, incremento de la presión intracraneal de cualquier tipo, herniación cerebral y muchas más. Las dificultades son particularmente importantes para acreditar daño traumático en casos de supervivencia corta en los que, de forma práctica, el médico forense solo dispone de métodos diagnósticos basados en la IHQ.

Acreditar o excluir un daño traumático como causa de la muerte de una persona tiene una importancia trascendental desde el punto de vista médico legal, lo cual es obvio para todos. Este proyecto de investigación pretende avanzar en la búsqueda de criterios útiles que faciliten un diagnóstico más preciso sobre el origen del DAI.

Como objetivo general se pretende profundizar en la etiopatogenia del DAI focalizado en la discriminación entre el daño axonal de origen traumático y no traumático. Para ello se utilizarán técnicas de inmunohistoquímica en modelos experimentales murinos a los que se provocará un DAI similar al que aparece en patología humana.

De forma secundaria se investigará la influencia de la presencia o ausencia del edema/tumefacción cerebral en la evolución del DAI. Se analizará el paralelismo entre los resultados experimentales y varios casos de DAI reales investigados en el Instituto de Medicina Legal y la repercusión de los hallazgos en la práctica forense.

Los protocolos experimentales se realizaron en ratas macho sprague-dawley. En uno grupo se produjo una lesión traumática provocando una aceleración craneal con el método de Marmarou y Foda. En el otro se provocó una lesión isquémica produciendo una isquemia cerebral con la oclusión/clampaje de las 4 arterias cervicales principales. En la mitad de los casos de cada grupo se realizó una craniectomía descompresiva para evitar el daño secundario.

Con objeto de disminuir la mortalidad e incrementar el porcentaje de DAI secundario al traumatismo, modificamos el método original de Marmarou y Foda. Las modificaciones propuestas se centran en el diámetro del disco de protección craneal y en las características de la espuma de apoyo.

Las ratas después del impacto traumático o la oclusión arterial isquémica se mantuvieron con vida durante 24 h tras las cuales se sacrificaron se extrajeron los encéfalos y se procesaron en el laboratorio de histopatología, un procesado similar al de los cerebros humanos.

Las secciones histológicas de cerebro murinas y humanas se marcaron con dos anticuerpos: β -APP como marcador de traumatismo y fractina como marcador de isquemia.

Con las modificaciones propuestas del método de Marmarou y Foda disminuyeron la mortalidad del 50 al 20% consiguiendo DAI en el 85,7% de las ratas que supervivientes. El DAI producido mostró unas características histopatológicas e inmnohistoquímicas similares a las del DAI en seres humanos

Utilizando β -APP como marcador, el área más frecuente e intensamente afectada fue el cuerpo calloso, observando además marcaje en el tálamo, el hipocampo y las pirámides de la protuberancia (y áreas

anexas) en los casos traumáticos. En los casos isquémicos, con β -APP, se inmunomarcó positivamente la corteza y el caudado putamen. Con fractina las áreas de expresión fueron el hipocampo y el núcleo caudado-putamen. La combinación ambos marcadores facilita la discriminación de la etiopatogenia y así, los casos con un alto valor promedio de lesión con β -APP y bajo con fractina sugieren un origen traumático. Este patrón se ha observado también en los casos de DAI estudiados en cerebros humanos lo que demuestra su utilidad en patología forense.

Introducción

(Incluye contenido del artículo publicado con DOI: 10.1111/1556-4029.15276)

Los traumatismos craneoencefálicos (TCEs) suponen un problema de salud pública importante. Se estima que, en el mundo, precisan atención médica por TCEs leves entre 100-300/100.000 personas. Si se tiene en cuenta que muchos pacientes no acuden al médico, la incidencia supera las 600/100.000 habitantes al año, lo que supone en torno a 42 millones de personas/año en el mundo, debiéndose la mayor parte de estos traumatismos a caídas o accidentes de tráfico (Cassidy, 2004). En EEUU los TCEs han sido la cuarta causa de muerte más importante en los últimos 50 años y la primera en la población de 1-44 años (Kraus, 1996; Bain, 2000; Cernak, 2004; Flierl, 2009), involucrando a 2 millones de pacientes cada año (Smith, 2000) de los que llegan a fallecer, según distintas fuentes, de 52.000 a 30.000 personas (Laborde, 2000; Bain, 2000). Además, se estima que entre 2.5 y 6.5 millones de personas viven con secuelas derivadas de un TCE, suponiendo un gasto que se sitúa entre de 35 y 50 billones de dólares por año (Laurer, 2000; Laurer, 1999; Flierl, 2009), produciéndose un incremento anual de TCEs estimado entre 70.000 y 90.000 individuos/año (Laurer, 2000). En Europa, las lesiones cerebrales son responsables de un millón de ingresos hospitalarios al año (Morales, 2005). En individuos de mayor edad los traumatismos suelen ocurrir en el propio domicilio, mientras que los de menor edad es más probable que ocurran en el trabajo o en accidentes de tráfico (Majdan, 2015).

En los TCEs, cuando la fuerza mecánica externa que actúa sobre la cabeza tiene suficiente intensidad, provoca una lesión cerebral permanente o transitoria, con afectación cognitiva, física, psicosocial y/o deterioro del nivel de conciencia. En general, las lesiones se producen cuando la tensión aplicada al encéfalo por la aceleración supera la tolerancia que tiene ese tejido a la distensión (Bain, 2000).

Es importante delimitar anatómicamente las lesiones traumáticas del SNC, ya que la misma lesión en diferentes localizaciones puede causar distinta clínica, y viceversa, diferentes tipos de lesiones en un mismo lugar pueden causar síntomas similares (Kalimo, 2004).

Los TCEs lesionan tanto la sustancia gris como la sustancia blanca. Esta última es la encargada de trasladar toda la información que entra y sale de la corteza cerebral. En general, las fibras nerviosas de la sustancia blanca se dividen en tres tipos, de *asociación*, que conectan diferentes áreas corticales del mismo hemisferio, *comisurales*, como el cuerpo caloso, que interconectan estructuras homólogas a ambos lados del neuroeje, y de *proyección*, como la cápsula interna, que incluyen tanto a células que se originan en la corteza (eferentes) como las que se proyectan sobre ésta (aférentes). Igualmente son vulnerables todas las fibras que se agrupan en el tronco del encéfalo, ascendiendo o descendiendo. Se ha llegado a decir que los axones son las estructuras más vulnerables del SNC (Brody, 2015), especialmente en traumatismos de impacto-aceleración (Armstrong, 2015).

El mecanismo de lesión de los traumatismos encefálicos puede ser focal o difuso (O'Connor, 2011):

-Traumatismos focales: se caracterizan por producir una lesión tisular localizada. Engloban varios tipos dependiendo de la localización anatómica y el grado de impacto. Las lesiones corticales se establecen por hemorragias parenquimatosas en la corteza cerebral, frecuentemente acompañadas de focos de hemorragia subaracnoidea (HSA). Las lesiones subcorticales son el resultado de impactos temporales u occipitales, y se explican por la trayectoria de la lesión del golpe y contragolpe debido al rebote del encéfalo contra la calota craneal. Las lesiones producidas por el golpe son secundarias al impacto del cerebro contra el cráneo; las de contragolpe se producen por el rebote del cerebro contra

la región opuesta del cráneo, con la posibilidad de desarrollar burbujas de cavitación dentro del cerebro debidas a las presiones negativas elevadas. El crecimiento y el colapso de estas burbujas provoca lesiones focales (El Sayed, 2008). Las colecciones de sangre intracraneales son el resultado de la ruptura de los vasos sanguíneos, que ocasionan pequeños hematomas en el cerebro y las meninges. Los hematomas ocupan volumen, comprimen el tejido nervioso y alteran la función neurológica. Entre las hemorragias de origen traumático nos interesan especialmente las hemorragias/hematomas subdurales (HSD) ya que su causa más común es la aceleración producida por el impacto y no el impacto en sí mismo.

-Traumatismos difusos: Se asume que las lesiones que producen son secundarias a la torsión y el cizallamiento en correspondencia con las fuerzas inerciales generadas en el momento de la lesión y no requiere que haya fractura de cráneo ni impacto directo y por esta razón se observa en casos de TCE leve (Blennow, 2012). La patología derivada más común es la isquémica, el daño axonal difuso (DAI por sus siglas en inglés) y el edema cerebral. Estos cambios se observan no solo en la vecindad del impacto, sino también en lugares a distancia. La severidad del DAI está directamente relacionada con la pérdida de conciencia prolongada, con una alta mortalidad y con numerosas secuelas en los supervivientes.

Daño axonal difuso (DAI)

La primera referencia al DAI aparece en el año 1956 citado por Strich (Strich, 1956) que remarcaba una degeneración difusa de la sustancia blanca en pacientes con demencia severa postraumática. Pero no es hasta el año 1982 en que Adams le pone el nombre con el que se designa actualmente (Adams, 1982) y establece una graduación de tres niveles según la gravedad (Adams, 1989). El DAI es una entidad cada vez más estudiada con más de mil publicaciones relacionadas en los últimos 50 años, especialmente desde 1992 (Wang, 2023).

Definición

El DAI se ha tratado de definir desde un punto de vista clínico y desde el punto de vista de la patología, pero en realidad, como describen *Davceva et al.*, es una entidad clínico-patológica. Clínicamente se caracteriza por una inconsciencia inmediata y prolongada tras el impacto mecánico en la cabeza, típicamente sin intervalo lúcido, que deriva en fracaso cerebral severo, estado vegetativo y muerte. Patológicamente se define por la producción de daño difuso y diseminado de las fibras axonales en la sustancia blanca cerebral, incluyendo axones de la sustancia blanca parasagital cerca de la corteza cerebral, del cuerpo caloso y del tronco del encéfalo (Davceva, 2015).

Aunque en la definición se establece que hay pérdida de conciencia tras el traumatismo, entre el 14-30% de los pacientes presentan un intervalo lúcido o parcialmente lúcido (Adams, 1989). Además, algunos no pierden la conciencia, aunque sí se observan hallazgos microscópicos, sin tener claro si estos hallazgos tienen repercusión funcional (Browne, 2011).

El traumatismo puede lesionar cualquiera de las fibras nerviosas del sistema nervioso central. El hecho de que se lesionen los axones no implica que también lo haga el cuerpo neuronal correspondiente y de hecho, se ha observado que en las neuronas asociadas a los axones lesionados, se producen cambios moleculares orientados a una recuperación neuronal sostenida (Greer, 2011; Wang 2013; Armstrong, 2015). Las fibras mielínicas son más tolerantes a las fuerzas mecánicas y las amielínicas son más sensibles, como se ha demostrado tanto en estudios in vivo como in vitro (Reeves, 2005; Staal,

2011). En general, cuando un axón se lesiona se produce una degeneración distal a la lesión, llamada anterógrada o walleriana (Johnson, 2013). Los primeros cambios en el soma no pueden explicar las alteraciones axonales rápidas y lejanas a la zona del traumatismo (Povlishock, 1992). En el SNC la degradación de los segmentos axónicos lesionados es lenta, tarda varias semanas. Los lugares más frecuentes para encontrar los bulbos axonales que indican desconexión de los axones, son los surcos corticales y la interfase entre la sustancia blanca y la gris (Blennow, 2012). Las células de la microglía y monocitos que migran al lugar de la lesión eliminan los fragmentos de mielina y el axón. También ocurre cierta degeneración retrógrada, pero sólo se extiende por unos cuantos segmentos internodales. El soma de la neurona dañada sufre tumefacción, su núcleo se desplaza a la periferia y la sustancia de Nissl desaparece (cromatólisis) (Ross, 2007). La biomecánica y la aproximación estereotáctica también puede ayudar a explicar la localización preferente del DAI por la corona radiata, el cuerpo calloso, el *fórnix* o el puente ya que estas regiones anatómicas se corresponden con el centro geométrico de diferentes segmentos de la estructura craneal (Obreja, 1999).

Es importante, como veremos más adelante, descartar entidades patológicas naturales que puedan lesionar la sustancia blanca antes de pensar en el trauma como origen de esa patología (Geddes, 1997).

Mecanismo de producción

Ya *Simpson et al.* en el año 1985 hizo referencia a dos publicaciones previas, de los años 40 y 60, formulando algo que en ese tiempo parecía de sentido común, como era que al aplicar fuerzas de cizallamiento o rotacionales al cerebro se producía una disrupción de las neuronas, sus conexiones y los vasos sanguíneos (Simpson, 1985). El mecanismo de producción del daño axonal difuso se produce, al menos, de dos formas distintas (Davceva 2015):

- 1 – Por impacto
- 2 – Por aceleración y desaceleración

La aceleración provoca un gradiente de presión en la cavidad craneal que provoca fuerzas de cizallamiento y distensión, que típicamente producen hemorragia subdural (HSD) aguda secundaria a la ruptura de los vasos puente subdurales, y DAI (Gennarelli, 1982). Pero se han visto ciertas diferencias entre ellas, y así las HSD se provocan con movimientos de corta duración (5-10 milisegundos) en aceleraciones angulares grandes, mientras que el DAI tiene más predisposición cuando la cabeza se mueve en el plano coronal con aceleraciones más duraderas (20-25 milisegundos), con un rango de aceleración menor (Gennarelli, 1982; Oehmichen, 1998). El cerebro resiste mejor la aceleración lineal que la angular (Blennow, 2012). Y la angular coronal mejor que la axial (Browne, 2011). El papel de la aceleración angular en el DAI, especialmente en el plano coronal, ha sido enfatizada y confirmada por varios autores (Gennarelli, 1982; Yoganandan, 2009; Zhang, 2006). Wang (2010) describe que una combinación de traslación y aceleración angular es el efecto más determinante en cuanto a la producción del DAI (Wang, 2010).

Las deceleraciones angulares y rotacionales producen, en general, la mayor deformación cerebral, y si le sumamos un impacto, se produce con altísima probabilidad una lesión en la sustancia blanca (Maxwell, 2012). Según la teoría de la inercia, las aceleraciones lineales producen lesiones superficiales y las rotacionales provocan lesiones profundas (Obreja, 2000; Obreja, 1999).

U En la vida real, la HSD ocurre en las caídas en las que la cabeza se golpea contra una superficie firme. Sin embargo, el DAI aparece en accidentes de tráfico en los que el impacto se produce contra una superficie blanda y deformable, haciendo una deceleración más progresiva. Así la HSD aparece en

casos de agresiones, ciclistas que se caen de la bicicleta y caídas en el mismo plano, y el DAI se produce en accidentes de tráfico y en precipitaciones. Para que se produzca DAI no es preciso que se produzca un impacto. Por eso, aunque no ocurre prácticamente nunca en un caso real, sí hay que recordar que un pequeño golpe puede producir lesiones serias o letales (Davceva, 2012; Davceva 2015).

Clínica y tipos

Como entidad clínica, parece que el indicador más claro es una pérdida de conciencia que ocurre de forma inmediata tras el traumatismo y que provoca coma prolongado sin la evidencia de ninguna lesión craneal. Esta es la descripción inicial del cuadro y que se conserva en textos recientes (Davceva, 2015; Adams 2011). Sin embargo, el diagnóstico real es clínico-patológico, ya que es un cuadro caracterizado por inconsciencia prolongada e inmediata tras el impacto craneal, típicamente sin intervalo lúcido, que lleva a fracaso cerebral, estado vegetativo y muerte; y en el que se detecta un daño diseminado de fibras axonales en la sustancia blanca, incluyendo los cordones encefálicos y el tronco del encéfalo (Davceva 2015). En la TC o RMN inicial no se detectan alteraciones patológicas o los cambios son mínimos, no obstante, horas o días después se ve una pérdida de densidad en la unión de sustancia blanca y gris en el cerebro, en los núcleos de la base, en el tronco del encéfalo y en el cuerpo calloso (Meythaler, 2001). Otras veces se observan inicialmente hemorragias en el cuerpo calloso o en el puente (cuadrante dorsolateral). Pero la confirmación del diagnóstico sólo se puede verificar tras el estudio microscópico de diferentes regiones del encéfalo (Geddes, 1997).

Hay discordancias entre el diagnóstico clínico y el histopatológico, como muestra el estudio de *Bisht et al.* en el que, con pruebas de imagen se diagnostica únicamente 1 caso como DAI en el hospital, pero los hallazgos microscópicos en 8 casos (de un total de 16 individuos de la muestra) son compatibles con esta entidad nosológica (Bisht, 2013).

Los lugares lesionados con más frecuencia en el DAI son los siguientes (Meythaler, 2001):

- Sustancia blanca parasagital del córtex cerebral
- Cuerpo calloso
- Unión puente-mesencéfalo, junto a los pedúnculos cerebelosos superiores

De todos ellos, sin duda el más destacado en cuanto a la aparición de lesión es el puente, en su región posterior (Geddes, 2000; Niess, 2002). Esto se explica por un fenómeno estereotáctico en el mecanismo de producción de las lesiones traumáticas y por el hecho de que los lugares donde hay cruces de fibras, los axones son más sensibles a la lesión (Obreja, 2000).

Inicialmente el daño axonal fue aceptado como un indicador de trauma cerebral. Durante los últimos años se ha demostrado que los pacientes con TCE leve, moderado o grave pueden tener daño axonal de diferente intensidad (Povlishock, 1995), hasta el punto de que un traumatismo sin lesión objetivable anatómicamente puede dejar secuelas neurológicas en habilidades cognitivas o de comportamiento (Zohar, 2011).

El diagnóstico de DAI es complejo ya que, la presencia de axones alargados de forma sinusoidal puede ser debida a un artefacto *post mortem*, por lo que mientras no se detecta la presencia de los bulbos axonales no se podría confirmar el diagnóstico. Además, las lesiones en el cuerpo calloso pueden ser infartos focales secundarios a un hematoma intracraneal (Adams, 1989), es decir secundarias a hipoxia local.

Con el paso del tiempo y el uso de marcadores inmunohistoquímicos (IHQs) específicos, se demostró que el DAI no se presenta en casos exclusivamente traumáticos, sino que los axones dañados expresan dichos marcadores, independientemente del origen del daño traumático, isquémico o de otro tipo (Adams, 1989; Gentleman, 1995; Sherriff, 1994; Niess, 2002; Smith, 2003).

Por este motivo se ha intentado hacer una clasificación, en la que se proponen distintos subtipos diagnósticos dentro del DAI según el origen del daño:

- TAI: se introduce el término de daño axonal traumático (TAI) para hacer hincapié en el origen traumático en los casos en que así se considere, y diferenciarlo de los casos en que aparece el daño, pero que no es de origen traumático, o es de origen desconocido, en cuyo caso se conservaría el término DAI (Geddes, 2000).

- AI: englobaría casos con daño axonal en el que el origen del daño es desconocido.

Otros autores, como Reichard, proponen hacer una diferenciación entre los distintos daños axonales según el origen del daño, usando nombres diferentes para cada cuadro según su etiología (Reichard, 2003):

- dTAI: Daño axonal traumático difuso. Los axones están dispersos o en grupos y no se observa un patrón de distribución vascular

- mTAI: Es igual que el dTAI pero sólo se observa marcaje de axones supratentoriales y no presenta un patrón vascular. La “m” es de multifocal.

- VAI: Daño axonal vascular. Se acompaña de un patrón en “zig-zag” secundario a compromiso vascular. La lesión axonal sigue una distribución vascular e implica elevada presión intracraneal, afectando tanto a la sustancia gris como a la blanca. El VAI ha sido descrito también por otros autores (Geddes, 2001; Geddes, 2001; Oehmichen, 1999).

- MAI: El daño de origen metabólico es aquel en el que aparecen axones marcados de forma difusa sin historia clínica ni evidencia patológica de trauma y no tiene un patrón vascular. Las causas posibles serían una hipoglucemia o una hipoxia global. Muchas serían de etiología desconocida.

- PAI: Hace referencia al daño axonal que aparece en las zonas de penumbra de lesiones focales como infartos, laceraciones o abscesos.

Todos estos diagnósticos no son necesariamente excluyentes entre sí, especialmente VAI y TAI. Si el VAI es muy extenso puede conducir a un infradiagnóstico de dTAI (Reichard, 2003). En la descripción inicial de Adams y sus tres niveles de DAI, se observa un componente vascular en los niveles 2 y 3 que se evidencia por una hemorragia focal (Adams, 1989).

Algunos autores consideran el DAI como un diagnóstico por exclusión, basado en la imposibilidad de detectar una lesión cerebral con una prueba clínica de imagen en la que no aparece ninguna patología severa. Se denomina daño axonal difuso en la sustancia blanca (Geddes, 2000; Geddes, 1997), aunque no es así en realidad, ya que más que difuso, es diseminado o multifocal (Meythaler, 2001; Smith, 2003; Smith, 2003).

En los últimos años, un gran número de publicaciones sobre el DAI, han esclarecido muchas cuestiones, de las que destacamos las siguientes (Davceva, 2015):

- El DAI se puede producir simplemente por aceleración, sin impacto directo (Gennarelli, 1982).

- Con la introducción del concepto de daño cerebral focal y difuso se ha visto que la gravedad de un traumatismo craneal cerrado depende más de lo difuso de la lesión que de lo amplia que sea la lesión focal. Es decir, cuanto más difusa sea la lesión, peor pronóstico. Además, se ha encontrado una estrecha relación entre el DAI y el GOS (*Glasgow Outcome Scale*) *pre mortem* (Maxwell, 2010; Adams, 2011). En esta misma línea, algunos autores han propuesto que el DAI es una lesión universal en los traumatismos craneales mortales (Gentleman, 1995).

- Casi la mitad de los pacientes con traumatismo craneal cerrado que lleva a la muerte, y con alteración de la función cerebral severa, no tienen ninguna evidencia clínica de lesión intracraneal masiva. Es más, usando un examen de rutina en la autopsia, puede ser muy difícil definir la lesión a menos que se haga una fijación, disección y estudio histológico adecuado (Kalimo, 2004).

- El lugar con mayor pérdida de neuronas tras DAI es el córtex prefrontal (Maxwell, 2010).

DAI según la edad

Según la edad del individuo, el traumatismo craneal se muestra de formas diferentes ya que la maduración de la sustancia blanca central se produce desde el tercer trimestre de gestación hasta los treinta años de edad (Lebel, 2008; Tamnes, 2010; Knickmeyer, 2008). El estado de los axones mielinizados de la sustancia blanca central influye en la respuesta del tejido a la lesión. Así en los niños pequeños el cráneo es relativamente elástico y la lesión cerebral es rara, excepto por los hematomas que puedan ocupar espacio. Con la edad, el cráneo aumenta su consistencia y se producen fracturas del cráneo y lesiones del encéfalo al chocar con el cráneo.

Geddes et al. no observaron daño axonal traumático en cadáveres de 53 niños menores de 9 meses con TCE no accidental, aunque sí daño difuso explicado por daño hipóxico y/o tumefacción cerebral. Esto no quiere decir que el cerebro inmaduro del niño esté a salvo del daño axonal traumático. Tal y como se explica en su publicación, en estos casos de niños zarandeados, el cerebro no estaría expuesto a las fuerzas necesarias para producir DAI y las sacudidas en los niños ocasionaron la muerte por lesiones en la unión cráneo-cervical por estiramiento del neuroeje (Geddes, 2001).

En este artículo de *Geddes et al.*, los casos con daño axonal traumático se observaron en niños mayores de 15 meses y generalmente tenían más de 10 meses que aquellos que no presentaban daño traumático. Hay que tener en cuenta que, en este estudio el 82% de los niños murieron por hipertensión intracraneal secundaria a la tumefacción cerebral. La anoxia asociada a la hipertensión supuso un problema a la hora del diagnóstico, algo que los mismos autores reconocen.

Otros autores, como *Oehmichen et al.*, en un estudio que agrupaba 252 casos desde 11 días a 92 años, no encontraron diferencias significativas con relación a la edad o al sexo en cuanto a la aparición de daño axonal (Oehmichen, 1998). Se debe mencionar que en la publicación no se especifica el número de niños pequeños que participaron en la serie, ni la edad que tenían, ni como se agruparon estos para el análisis estadístico.

En cuanto al patrón lesivo, *Geddes et al.* afirman que es diferente según la edad (Geddes, 2001). El tipo de lesión depende del mecanismo de producción del trauma y de la edad del paciente. Se ha probado que hasta los 6 años el tamaño del encéfalo no alcanza el 90% del tamaño del adulto (Tamnes, 2010). Además, los estudios de maduración del encéfalo en relación a la edad especifican que la evolución de las vías axonales dura hasta los 25 años (Lebel, 2008) además de cambios en el espesor cortical y en el volumen de sustancia blanca (Tamnes, 2010). En resumen, el cerebro inmaduro del niño mientras alcanza el desarrollo final justificaría un patrón de distribución del DAI diferente al de los adultos.

Además, los niños pequeños son particularmente susceptibles al traumatismo craneal debido a la delicadeza del tejido nervioso cerebral, el cual está compuesto primariamente de neuronas sin conexiones dendríticas, a la escasez de vainas de melina en los axones y a la naturaleza del espacio subaracnoideo, el cual es grande en extensión, pero poco profundo (Medana 2003).

En niños se ha propuesto que la expresión de β -APP se utilice como una prueba de rutina ya que permite desenmascarar la posibilidad de episodios previos de traumatismos ocultos, eventos que amenacen la vida y sofocaciones accidentales o provocadas. Todo ello siendo cautos ya que la inmunopositividad para β -APP no implica necesariamente un traumatismo (Byard, 2006).

Como la literatura actual coinciden en que el grado de maduración del SNC y del cráneo son factores que modifican el desarrollo de lesiones y al tener un número reducido de muestreo, en el presente estudio contemplamos sólo individuos adultos.

Evolución del cuadro patológico en el DAI

Tras un traumatismo encefálico se producen lesiones primarias y lesiones secundarias (O'Connor, 2011):

- Primarias: son las que ocurren inmediatamente tras la lesión. Pueden observarse contusiones, laceraciones, daño axonal difuso o hemorragia intracraneal.

- Secundarias: son las lesiones que ocurren con posterioridad. Aunque se inician en el momento del impacto, no se presentan clínicamente hasta horas o días después del impacto. Es el daño secundario a isquemia, edema y alteraciones en la función neuronal y de la glía. La apnea y la hipoxia son características de las lesiones secundarias.

A nivel axonal, las lesiones primarias y secundarias, se traducen en axotomía primaria y secundaria.

En la *axotomía primaria* la exposición del axón a fuerzas mecánicas da lugar a la fragmentación, disrupción o desconexión de éste. Estas alteraciones producen cambios de la actividad eléctrica de las fibras nerviosas afectadas. Produce además cambios irreversibles en el citoesqueleto y alteración del transporte axonal que lleva a un aumento de diámetro del axón. Estos axones edematosos aumentan de tamaño a medida que aumenta la supervivencia llegando a un momento en que se produce una separación de los fragmentos proximal y distal, mostrando una imagen de dos bulbos axonales enfrentados. El axón ha evolucionado a *axotomía secundaria* (MAXWELL, 1997). En las varicosidades, es decir formaciones redondeadas sucesivas, se produce la ruptura periódica de los neurofilamentos a lo largo del axón (Tang, 2012).

Hay un consenso cada vez mayor de que la axotomía primaria es rara y sólo ocurre en casos muy severos, en los que el paciente entra en coma de forma inmediata tras el accidente (Smith, 2000; Maxwell, 2012; Johnson, 2013). Los traumatismos leves o medios provocan una disrupción en el citoesqueleto. En los traumatismos severos se altera la permeabilidad del axolema, lo que provoca la entrada de calcio en el axón (Povlishock, 1995) y un daño suplementario del citoesqueleto (Smith, 2000) acompañado por edema de las mitocondrias axonales (MAXWELL, 1997). Esta entrada de calcio produce una reducción de ATP, que modifica la actividad de la ATP-asa calcio dependiente. Se ha demostrado que la entrada de calcio es dependiente de la entrada de sodio a través de canales voltaje dependientes y de la actuación reversa de la bomba sodio-calcio (intercambiador) (Meythaler, 2001; Smith, 2003; Johnson, 2013). Además, se liberan muchos oxidantes que producen estrés oxidativo (Meythaler, 2001). La entrada de calcio también activa varias lipasas, lo que desencadena la

producción de ácido araquidónico, que da lugar a neutrofilia e invasión macrófaga y la creación de más oxidantes. Asimismo, inicia la función de proteasas dependientes de calcio, como la caspasa 3, que hidroliza proteínas dando lugar a necrosis y apoptosis celular (Meythaler, 2001). El infiltrado leucocitario, tras 4-6 horas del inicio de la isquemia, se ha mostrado como un hallazgo crítico en el desarrollo de la lesión focal (Kunz, 2010). De esta manera, la axotomía primaria se relaciona con el calcio intracelular y la secundaria con el calcio extracelular, lo que abriría una vía terapéutica. La inhibición del calcio extracelular, minimizaría la axotomía secundaria (Staal, 2010).

La disrupción axonal tras el TCE no es un evento único, pero representa una pérdida inicial de tejido que dura semanas y se continúa con una pérdida de sustancia blanca y de sustancia gris de larga duración (Maxwell, 2010), lo cual indica la complejidad de la patología en individuos cuya supervivencia es de años o décadas (Maxwell, 2012).

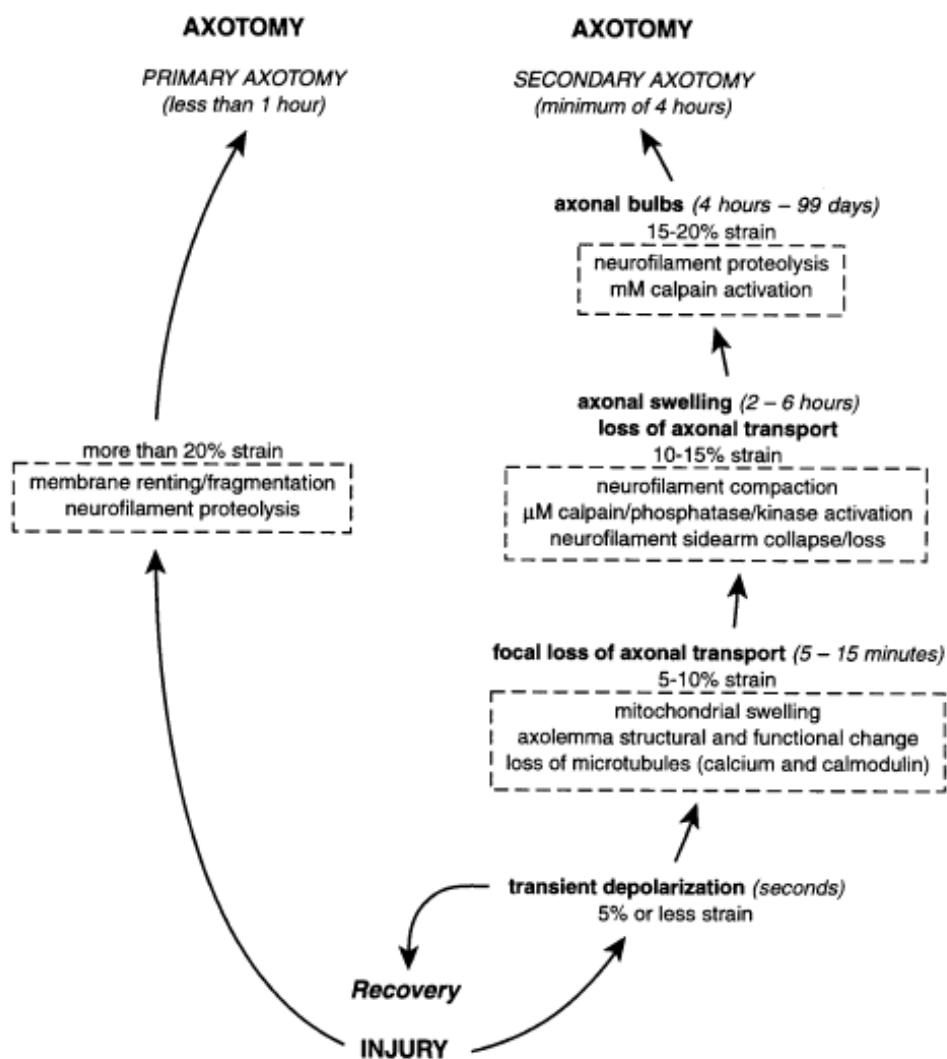


Figura 1: Esquema que representa la lesión axonal humana distinguiendo entre axotomía primaria y secundaria, la evolución temporal y los cambios estructurales y ultraestructurales (tomado de Maxwell, 1997, con permiso de la editorial Mary Ann Liebert).

Aunque la teoría clásica del daño axonal inducido por un traumatismo ocasionaría rotura o desgarro mecánico justo en el momento del impacto, se ha demostrado que esto solo ocurriría en una subpoblación de axones, los que recibieron la lesión más severa. Hoy en día se considera que las fuerzas tensionales sobre los axones inducen un aumento de la permeabilidad del axolema con entrada de Ca^{2+} que lleva a la activación de las calpaínas y las caspasas las cuales ocasionarían la degradación local del citoesqueleto causando fallo axonal y desconexión (Büki, 2006). Incluso con doble marcaje se ha comprobado que el colapso del citoesqueleto no impide el transporte axonal en el sitio donde se formaron bulbos al menos en algunos axones lesionados (Büki, 2006; Stone, 2001). Incluso se ha demostrado que la entrada masiva de Ca^{2+} cambia el flujo del transporte anterógrado a retrógrado en lesiones severas, alterando la cinética local y atenuando el desarrollo de edema axonal secundario (Marmarou, 2005). Todo esto demuestra que la patobiología del daño axonal es muy compleja y que el número de bulbos axonales no identifica la población total de fibras dañadas en una lesión traumática.

Entre las complicaciones frecuentes del DAI se encuentra la isquemia, debida al fracaso de la perfusión cerebral. La disminución de la perfusión cerebral puede ser secundaria al incremento de la PIC (presión intracraneal) o al descenso de la presión arterial. El aumento de la PIC es la complicación secundaria más importante, y la causa de muerte más común tras una lesión cerebral, el cual, secundariamente, produce isquemia. Otra complicación habitual es el edema cerebral, que puede ser secundario a congestión, dilatación arterial u obstrucción venosa, o a un aumento del contenido de agua. Aparte de los hematomas, el edema es la causa más frecuente de aumento de la PIC (Finnie, 2014). Es esencial controlar la hipotensión, uno de los principales indicadores de mal pronóstico, y la hipoxemia, que aparecen en un tercio de los casos con TCE severo. La ausencia de control de estos factores y la no diferenciación de los traumatismos con y sin lesiones secundarias es algo habitual en muchos estudios (Newcombe, 2013).

Mediante el uso de la microscopía electrónica (ME) en el DAI se observan dos situaciones (Wang, 2010):

- 1 – Vacuolización y disrupción concomitante de la vaina de mielina
- 2 – Edema axonal y disolución del citoesqueleto, junto con acumulación de organelas.

El hallazgo de axones patológicos a nivel ultramicroscópico, cuando aún no están dilatados, nos hace pensar que la microscopía óptica infradiagnostica este tipo de patología (Brody, 2015).

En humanos no se conoce con exactitud el tiempo transcurrido hasta que se produce la axotomía ya que ésta varía en los animales de experimentación y no es fácil de extrapolar. En animales de experimentación en los que las preparaciones pueden estudiarse meticulosamente, se puede diferenciar una varicosidad axonal (axón agrandado pero intacto) y un bulbo axonal (bola de retracción) que se produce porque se ha perdido la continuidad con el resto del axón (axotomía). En las muestras de humanos al observar un grupo de axones lesionados que han sufrido desconexión no es posible hacer esa distinción tan clara, además, la axotomía probablemente no ocurre en todos los lugares del cerebro al mismo tiempo, axones de diferente tamaño reaccionan de manera diferente y la axotomía secundaria puede aparecer/continuar bastante tiempo después de la lesión, incluso un año, lo cual se ha demostrado en ratas (Geddes, 2000).

DAI como lesión traumática, diagnóstico diferencial

Inicialmente el β -APP se utilizó para identificar los traumatismos, ya que se creyó que era un marcador específico de lesión violenta, porque el DAI era una patología de etiología traumática. Posteriormente se descubrió que marcaba axones también en otros muchos casos que nada tenían que ver con los traumatismos (Gentleman, 1995; Sherriff, 1994; Harrington, 2000; Niess, 2002; Reichard, 2003; Smith, 2003; Medana, 2003; Mori, 2005; Mahad, 2009; Haynes, 2008), asociando la acumulación del precursor del amiloide a la inflamación. Se fue encontrando su marcaje en patologías infecciosas de toda clase, destacando en áreas donde las células de la microglía se transformaron en macrófagos (Mori, 2005).

En casos de lesión craneal penetrante, los axones marcados con β -APP se distribuyen por todo el tejido nervioso y muestran un patrón ondulado, formando agregados de axones irregulares y fragmentos de axones en áreas con cambios edematosos. En casos de TCE cerrado aparecen axones dañados en los hemisferios cerebrales, el cuerpo caloso, el tronco del encéfalo y ocasionalmente en el cerebelo. En los casos secundarios a una explosión, el marcaje más destacado aparece alrededor de los ventrículos laterales, introduciéndose en el tejido unas 200 μm desde el límite ventricular (de Lanerolle, 2015).

La proteína precursora de amiloide puede comportarse como una proteína neuroprotectora. *Harrington et al.* demuestran marcaje para β -APP en el citoplasma neuronal en los casos de isquemia a los 15 min tras el evento, lo que les lleva a considerar al precursor del amiloide como una proteína de fase aguda que se expresa tras una lesión focal o difusa (Harrington, 2000). Otros autores proponen que el aumento de APP podría estar relacionado con la función de promover el crecimiento axonal tras la lesión ya que la APP tendría funciones neurotróficas, incluida la promoción del brote axonal, el crecimiento del axón y dendritas y la formación de nuevas sinapsis (Blennow, 2012).

Teniendo todo esto en cuenta, los investigadores se focalizaron en describir patrones morfológicos diferenciadores de lesiones de etiología traumática y no traumática obteniendo las siguientes conclusiones (Reichard, 2005; Oehmichen, 2003; Graham, 2004; Geddes, 2000; Davceva, 2012; Davceva, 2015):

- Traumática: Se observan axones dispersos o en grupos, especialmente si forman parte de un haz de fibras. Con β -APP los axones se ven dilatados o varicosos, edematosos o como bulbos de retracción o bulbos axonales. Las lesiones focales se localizan en el cuerpo caloso y cuadrante dorsolateral del puente anterior.

- No traumática (isquémica): El patrón es lineal o geográfico, habitualmente disseminado, en relación con vasos y no respeta límites anatómicos, frecuentemente descritos como en "zigzag". La expresión focal del marcador se localiza habitualmente en diencefalo y tronco del encéfalo. Estas se han considerado áreas de isquemia incipiente como resultado del edema cerebral. Con frecuencia se observa mayor ruido de fondo en las preparaciones.

Es probable que la hipoxia por sí sola no produzca daño axonal pero sí el aumento de la presión intracraneal o la herniación (Dolinak, 2000). Este mismo autor considera que la ventilación mecánica no es un factor determinante en la aparición de daño axonal.

Actualmente, la mayoría de los investigadores del campo coinciden en la dificultad en discriminar el origen traumático o isquémico en el DAI. A continuación, se expone un resumen de los artículos más relevantes:

Johnson et al. en su estudio obtienen unos patrones de expresión β -APP similares en niños con traumatismos craneales y sin traumatismo. Los investigadores evaluaron los resultados a ciegas (Johnson, 2011).

MacKenzie et al. afirman que para concluir que el cuadro es de origen traumático tienen que concurrir tres exclusiones (MacKenzie, 2015):

1. Que no haya evidencia de edema cerebral en el examen macroscópico.
2. Que no haya evidencia de neuronas isquémicas, sustancia blanca pálida o hemorragia en áreas en las que las muestras para β -APP hayan sido seleccionadas.
3. El patrón de β -APP no debe ser geográfico y las áreas en las que aparecen los axones inmunorreactivos no deben situarse limítrofes de la zona de irrigación de una arteria ni de un área traumática hemorrágica.

Según *Oehmichen et al.* no es posible diferenciar la etiología hipóxica o traumática en los casos del síndrome del niño zarandeado. En su estudio con 18 niños encontraron axones reactivos a β -APP en la sustancia blanca en varias zonas (cuerpo caloso y protuberancia) que no cumplieron los criterios de DAI concluyendo que el daño axonal (IA) se debía en parte a un evento vasogénico y en parte a un impacto traumático (Oehmichen, 2008).

También *Shannon et al.* encuentran en su serie un marcaje β -APP positivo en la sustancia blanca tanto en los niños zarandeados (n=14) así como en otros niños muertos por encefalopatía hipóxico-isquémica no traumática (n=7) y además hallaron axones β -APP positivos en los axones de la sustancia blanca del cordón cervical (Shannon, 1998). *Geddes et al* explican que el mecanismo de hiperextensión en el niño zarandeado puede ser la causa de la apnea, un signo frecuente de presentación en estos casos (Geddes, 2001). La apnea produce hipoxia, lo que da lugar al edema cerebral y éste al fallecimiento de la persona (Geddes, 2001).

Autores como *Tang-Schomer et al.* se inclinan hacia los microtúbulos como indicadores de origen traumático, basándose en que el proceso de desmontaje de los microtúbulos durante el estiramiento distingue la lesión axonal traumática de otras formas de lesión del axón como las debidas a hipoxia o isquemia. Mencionar que este estudio no se realizó sobre muestras in vivo sino en cultivos de células neuronales (Tang, 2010).

Oehmichen et al. encontraron resultados similares en aquellos casos con lesión cerebral traumática y los que tuvieron hipoxia/isquemia como causa de muerte. Si bien no identificaron cuántos de ellos han sufrido edema o aumento de presión intracraneal (Oehmichen, 1998; Oehmichen, 1999).

Kaur et al. detectaron un claro marcaje positivo para β -APP en 12 de 28 casos de hipoxia sin historia de lesión craneal y recalcaron la importancia de la elevación de la presión intracraneal reflejada por el incremento del peso del cerebro y de la hemorragia intracraneal unilateral al ocasionar efectos de cizallamiento sobre los axones (Kaur, 1999).

Reichard et al. combinando β -APP y H-E consiguen clasificar de forma correcta el 85% de los casos como traumático, metabólico o ausente de patología cuando es valorado por patólogos externos. Usando sólo β -APP sólo aciertan 26 de 73 casos (Reichard, 2005). Además, al comparar los casos traumáticos e isquémicos observaron que la distribución anatómica en ambos casos es muy similar. Destacan que los lugares recogidos habitualmente en lesiones craneales como más proclives a la formación de bulbos axonales, son también los lugares donde los cordones de axones tienen más probabilidad de ser comprimidos o deformados tal y como mencionan *Harrington et al.* (Harrington

2000), lo que es de gran importancia a la hora de la aparición de edema cerebral. Estas diferencias pueden observarse en el siguiente esquema:

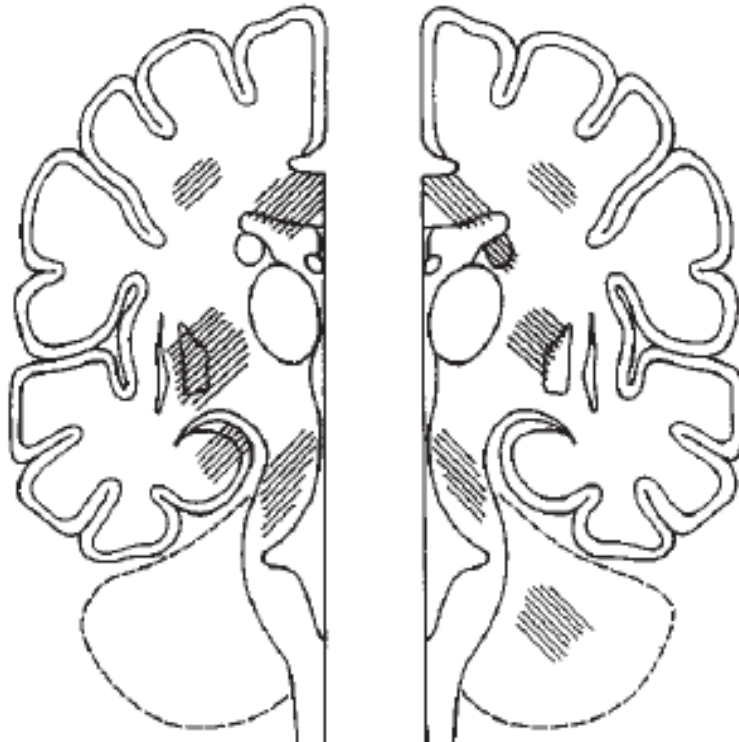


Figura 2: Esquema que representa la distribución de marcaje positivo para β -APP en casos traumáticos (izquierda) y no traumáticos (derecha). Tomado de Harrington D et al, 2000 (Harrington, 2000) con permiso de la editorial Elsevier.

Según de Lanerolle et al, el inmunomarcaje β -APP no permite distinguir si una lesión axonal es secundaria a isquemia o si se debe a deformación mecánica. Esta distinción es importante, ya que la isquemia es una de las lesiones secundarias asociadas que aparece en el 88% de las lesiones craneales fatales (de Lanerolle, 2015) o en el 91% de todas las lesiones cefálicas (Kaur, 1999).

En el estudio de Kaur et al. en el que tratan de diferenciar las áreas afectadas en el encéfalo por un traumatismo, por DAI o por hipoxia (sola o añadida a un traumatismo), dibuja un esquema que es difícil de sostener ya que el patrón de lesión traumática dependerá del traumatismo y el patrón de “traumatismo+hipoxia” no es igual al sumatorio de los dos cuadros por separado (Kaur, 1999) (Figura 3).

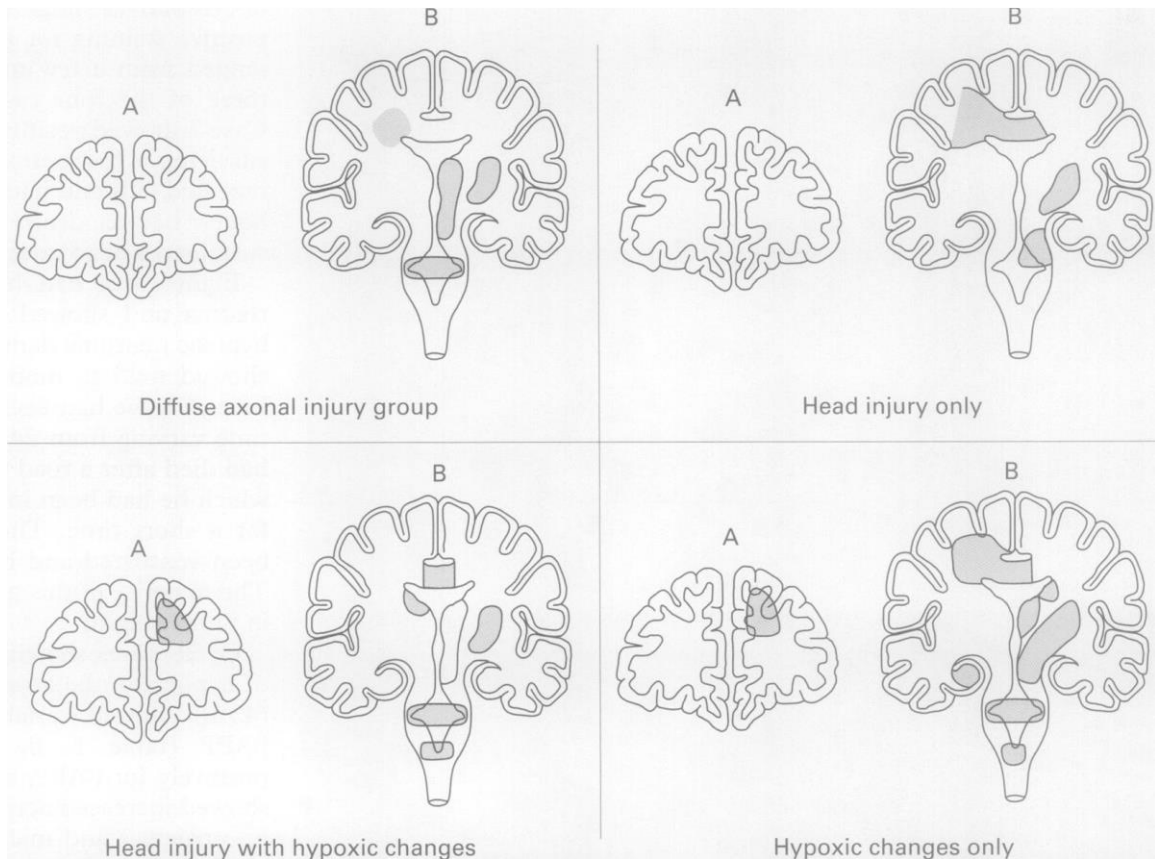


Figura 3: Esquema con representación de la distribución anatómica del marcaje axonal positiva para β -APP en los cuatro grupos del estudio de Kaur et al. (Kaur, 1999), con permiso de la editorial BMJ.

Igualmente, destacan *Smith et al.*, que en muchos casos de traumatismo severo es difícil determinar la contribución relativa de la patología axonal que deriva de la lesión mecánica y la que deriva de la hipoxia, el edema o el efecto masa del hematoma (Smith, D.H. 2003).

Hayashi et al. distinguen dos patrones morfológicos en el DAI: En el 1º, los axones se orientan a lo largo de los haces de fibras de la sustancia blanca y en el 2º los axones están situados de forma irregular. Estos autores observaron el patrón 1º en 5 de 14 casos, el 2º patrón no se vio en ninguno de los casos y en otros 5 casos apareció un patrón combinado de 1º y 2º, dejando 4 casos sin clasificar. Todos sus casos sufrieron TCE, pero la diferenciación en dos patrones no parece aportar nada nuevo (Hayashi, 2009). En la revisión que hace el autor de su propio método encuentra el patrón traumático (patrón 1º) en 14 de 44 casos y el patrón isquémico (patrón 2º) en 3 de 44, que paradójicamente fueron los únicos 3 controles con β -APP positivo (usaron una única muestra de cuerpo calloso por caso) (Hayashi, 2015).

Para complicar más esta diferenciación hay que considerar el factor dinámico propio de todos los mecanismos del organismo, que por una parte son procesos que evolucionan independientemente del origen del daño, y por otro que las lesiones son reversibles al menos cuando no hay fragmentación del axón (Armstrong, 2015). Ciertamente, lo que se desconoce aún, es si las lesiones inmunopositivas para β -APP, son o no reversibles (Medana, 2003). Los axones recorren una gran distancia desde el cuerpo neuronal de origen, lo que indica que son susceptibles de daño isquémico o tóxico en diferentes

territorios vasculares, en principio sin que se ocasione la muerte de la neurona de origen (Medana, 2003).

A todo lo recogido en este apartado, hay que añadir que se debe evitar tomar muestras del núcleo de área contundida en momento del tallado. Por fuera de este núcleo necrótico de contusión hay un área de edema vasogénico y más afuera de esta hay un borde delgado de edema citotóxico. Es difícil determinar con precisión desde el punto de vista macroscópico cuales son los límites de estas zonas (Newcombe, 2013).

Reproducción experimental del DAI

El DAI detectado en seres humanos es reproducible en especies no humanas, por lo tanto, los traumatismos reproducidos en animales permiten analizar los cambios morfológicos hallados en personas (Gennarelli, 1994). Sin embargo, tanto la distribución espacial de las lesiones en el interior del cerebro como la temporalidad de los cambios axonales reactivos difieren, en cierta medida, entre las especies (Maxwell, 1997). Asimismo, la bibliografía recoge modelos animales que manipulando primates remedan el espectro completo del DAI, y también modelos en otros animales de experimentación, no tan costosos como los primates, que emulan el DAI en una buena medida, indicando que la patogénesis es comparable en humanos y animales (Povlishock, 1995). Es difícil correlacionar el grado de severidad lesiva en humanos y animales ya que varios parámetros como la GCS, la DRS (*Disability Rating Scale*) y la duración de la amnesia postraumática no se pueden usar para evaluar la respuesta clínica al traumatismo infligido (Meythaler, 2001).

Para escoger el animal de experimentación más adecuado se debería tener en cuenta los patrones morfológicos, cerebrovasculares y metabólicos, el tipo de receptores implicados en el estudio y los cambios de comportamiento en relación a la etología, todo ello para intentar una compatibilidad biológica alta (Gennarelli, 1994). En el momento actual, ningún animal de experimentación es totalmente satisfactorio para reproducir el espectro lesional completo del DAI, por lo que previamente, se debe seleccionar el animal que más se adecúa a cada investigación en particular (O'Connor, 2011; Laurer, 1999; Laurer, 2000).

Mecanismos lesionales

En los animales de experimentación además de reproducir el cuadro patológico que nos interesa, es decir DAI, el daño recibido debe formar parte de un *continuum*, que aumenta a medida que incrementamos la fuerza mecánica empleada (Laurer, 2000; Laurer, 1999). Los métodos experimentales publicados hasta el momento son los siguientes (O'Connor, 2011; Johnson, 2013):

1) Deformación directa del encéfalo

- a. Impacto cortical controlado (CCI): Es un método invasivo, mecanizado, que usa un cilindro rígido que impacta sobre el cráneo o la duramadre del animal, comúnmente una rata, que suele estar atada. Permite controlar la deformación de los tejidos sobre los que impacta al controlar el tiempo, velocidad y avance. La ausencia de riesgo de rebote también es una garantía.



- b. Caída de peso: El método se basa en dejar caer un peso guiado sobre la cabeza del animal, bien sobre la piel, bien directamente sobre el cráneo o sobre el propio

encéfalo. Provoca una lesión focal. Los inconvenientes se deben a las variaciones en la velocidad de impacto del peso y a la posibilidad de que haya un rebote, lo que alteraría los resultados.

- c. Aceleración por impacto de caída de peso: El método se basa en dejar caer un peso guiado sobre el cráneo del animal que ha sido previamente protegido con un casco con la finalidad de que no se produzca una lesión focal, sino una aceleración que tenga como resultado una lesión difusa. Las limitaciones son, de nuevo, la variación de la velocidad de impacto del objeto y la posibilidad de que haya un rebote que ocasionaría un segundo impacto y alteraría los resultados. En este modelo es muy importante la densidad de la esponja sobre la que se coloca el animal, ya que esta determinará la intensidad de la gravedad, así como la biomecánica de la lesión (Piper, 1996).
 - d. Deformación por vacío: El método consiste en aplicar una deformación rápida del córtex cerebral expuesto, mediante la generación de una presión negativa (vacío) que causa tensión local en las meninges. Las limitaciones del método se deben al desplazamiento permanente del córtex y la falta de precisión en la medida aplicada (Shreiber, 1999).
 - e. Lesión por percusión líquida: Método muy usado que consiste en introducir un bolo líquido de forma rápida a través de un trépano craneal que impacte contra la duramadre intacta. Posteriormente, el líquido se desplaza concéntricamente por el espacio epidural. Las ventajas son similares a las del CCI al poder provocar lesiones de distintas gravedades y producir lesiones axonales y contusiones, así como alteraciones neurológicas de la función motora y déficits cognitivos. Las desventajas se deben a que las características del fluido y su presión no están directamente relacionadas con el impacto en el cerebro, por lo que la comparación con las lesiones clínicas es muy difícil. Por otra parte, el método lesional no es similar a ninguno que suela ocurrir en los humanos. Y, además, las características del flujo del fluido dentro del cráneo dependen de la geometría y la especie empleada (Lindgren, 1965).
- 2) Deformación por aceleración inercial: Pensado fundamentalmente en los accidentes de tráfico en los que el paciente no sufre impacto craneal pero sí fuerzas inerciales y rotacionales que establecen un cuadro de lesión cerebral difusa. Los experimentos se llevan a cabo idealmente con primates debido a su encéfalo con circunvoluciones, su geometría y la relativa gran masa encefálica en relación a su peso corporal. Ésta es su principal limitación, además del alto coste.

Probablemente, el mejor método para reproducir el daño axonal sea utilizando aceleración e inercia (Gennarelli, 1994), aunque la elección del animal en ese caso es determinante. El tamaño y la forma del cerebro humano juegan un papel importante en el desarrollo del DAI debido a las fuerzas de cizallamiento entre las distintas partes del tejido (Smith, 2003; Johnson, 2013). Las ratas y ratones tienen una masa encefálica muy pequeña, con una ratio sustancia blanca/gris muy distinta a los humanos, además de una cantidad de circunvoluciones y una disposición encefálica respecto del cuello distinta, es decir, una geometría diferente, debida al mayor ángulo cráneo espinal, por lo que la modelización con los traumatismos humanos no es exacta. El plano de rotación de la cabeza con relación al tronco del encéfalo durante el impacto, es crítico a la hora de inducir la pérdida de conciencia y, determina la duración de esta. Así, la rotación transversal al tronco del encéfalo se asocia a coma, mientras que la rotación circunferencial al tronco no (Smith, 2000). También se sabe de otras alteraciones respecto de los humanos, en relación a la fisiología, distribución de los receptores de los neurotransmisores, transducción de señales o diferencias genómicas, además de profundas diferencias en las respuestas histológicas a los marcadores (Laurer, 2000; Laurer, 1999).

Este método fue empleado por *Gennarelli et al.* en primates en los años 80 (Gennarelli, 1981; Gennarelli, 1982), y posteriormente otros como *Xiao-Sheng et al.*, generando una aceleración por rotación de la cabeza en el plano coronal sin impacto (Xiao-Sheng, 2000). Estos últimos autores, que hicieron el estudio en ratas, describieron resultados muy positivos evaluados utilizando tinciones con sales de plata. Lo cual es llamativo, ya que *Fijalkowski et al.* unos años después con un método totalmente parejo al anterior, marcando con β -APP, mucho más sensible, no consiguió ningún resultado (Fijalkowski, 2007). El mismo método de rotación lo intentaron *Friess et al.* con cerdos consiguiendo un marcaje leve en casos de trauma moderado y ningún marcaje ni en los traumatismos leves ni en los simulados (controles), sacrificando a los cerdos a los 12 días tras el traumatismo (Friess, 2007).

Un tiempo más tarde, *Wang et al.* realizaron un estudio en el que provocaban en las ratas aceleración lineal y angular. De forma aislada observaron alguna lesión macroscópica (HSA) y 0% de mortalidad, pero al combinar ambas aceleraciones ya apareció hemorragia parenquimatosa y daño axonal en las muestras de cuerpo calloso, puente y bulbo, con resultados máximos a las 24 horas de supervivencia. Con este último método la mortalidad ascendió al 21,7% (Wang, 2010).

Muchos autores han tratado de establecer unos criterios que permitan distinguir entre traumatismo leve, moderado o severo, no siendo ninguno completamente satisfactorio. En el ámbito de la medicina humana, el método más popular es el uso de la escala clínica del GCS, en la que resultados >13 indican un trauma leve, 9-12 uno moderado y <9 nos habla de un traumatismo severo. En cualquier caso, esto no es extrapolable a los animales.

En cuanto al sexo de las ratas, es bien sabido que el efecto neuroprotector de los estrógenos y la progesterona puede causar diferencias de género neurodegenerativas (Roof, 2000; ROOF, 2000; Kupina, 2003). Particularmente con el método de aceleración por impacto, las ratas hembras tienden a tener una mejor evolución clínica después del DAI (Gupte, 2019). Estudios más recientes también han encontrado diferentes respuestas entre sexos después de 7 días tras la lesión (Jullienne, 2018; Kupina, 2003), sin embargo, otros autores no han encontrado diferencias de género (Hall, 2005). Para obtener un cuadro patológico de DAI, los autores suelen escoger ratas machos con los que consiguen lesiones más graves y peor pronóstico. Además, el hecho de evitar el ciclo hormonal femenino simplifica el manejo de los experimentos en términos de transporte de ratas, tiempos de cuarentena y disponibilidad de quirófano.

Método de Marmarou y Foda

Tras analizar las ventajas e inconvenientes de los distintos métodos, y restringiendo el espectro animal de experimentación a los roedores, entendemos que el método más eficaz para nuestro estudio de cara a la maximización de resultados sería el de aceleración por impacto, siguiendo el modelo de *Marmarou y Foda* (Marmarou, 1994; Foda, 1994). Se trata de un método sencillo, barato, que funciona en ratas, el más común de los animales de experimentación y además es muy reproducible. Todas estas propiedades han hecho este método muy popular.

Con este método se genera una aceleración craneal como resultado del impacto de un peso que desciende dentro de un cilindro (un tubo de plexiglás), empujado únicamente por la fuerza de la gravedad. El peso de acero de 450 g se deja caer desde una altura de 2 m. Previamente, la cabeza del roedor ha sido protegida con un “casco” o disco fabricado en acero, que permite que la energía llegue al cerebro, minimizando las lesiones focales.

El objetivo era ocasionar un daño cerebral grave (DAI) con la mínima mortalidad posible lo que permite estudiar la evolución de las lesiones al menos durante las primeras 24 horas. La mortalidad media que obtuvieron fue próxima al 50%.

El gradiente máximo de compresión que se producía sobre el cráneo fue de 0.28 mm. Consiguieron unos resultados histopatológicos positivos para DAI cuando empleaban una altura de caída del peso de 2 m, y unos resultados moderados con 1 m. La máxima gravedad lesional se observaba a las 24 h de supervivencia tras el impacto.

La mortalidad de las ratas suele ocurrir en los primeros 20-30 min debido a la apnea que aparece tras el traumatismo. Si sobreviven a este periodo inicial es más raro el fallecimiento espontáneo (Carré, 2004). Dado que el principal problema para la supervivencia es la apnea y la hipoxia secundaria a ésta, el empleo de ventilación mecánica reduce muy significativamente la mortalidad en los casos de traumatismo grave (Foda, 1994), y mejora de forma sustancial la supervivencia en otros estudios (Foda, 1994; Carré, 2004; Meythaler, 2001).

En la rata, el impacto directo sin protección provoca desde ausencia de cambios a cambios dramáticos debido a la gran pendiente de curva que representa la tolerancia a la lesión del cráneo de rata (O'Connor, 2011). Además, los impactos craneales directos tienen un alto grado de variabilidad en la respuesta, tal que incluso un pequeño cambio en los parámetros de impacto puede cambiar la lesión desde mínima a fatal (O'Connor, 2011).

El problema de la aceleración por impacto y de la caída de peso es que ambos provocan una abolladura en el cerebro, es decir, lesión focal. Este aspecto negativo se mejora con el uso de un disco metálico fijado al cráneo antes del impacto. Aun así, el daño inducido es mucho menor al que se produciría en humanos (Meythaler, 2001).

La carga dinámica del impacto se puede dividir en efectos del impacto y efectos inerciales. Por lo tanto, la base sobre la que se apoya la cabeza de la rata es determinante a la hora de establecer la carga de cada efecto en la lesión. Si la cabeza está fija, la fuerza del impacto y la compresión secundaria son los predominantes, sin embargo, si la cabeza se encuentra libre para moverse, las fuerzas de cizallamiento entre tejidos son las dominantes. Los resultados de estos investigadores (Foda, 1994) fueron buenos y concluyeron que este método produce daño axonal difuso similar al descrito en humanos. Tan sólo queda la duda de que, estando muchos de sus hallazgos localizados debajo del área contundida, si la lesión es producida directamente por la deformación o por el golpe (*coup*) (Kilbourne, 2009).

Unos años después, *Baranova et al.* usaron el mismo método que *Marmarou*, con 450 g de peso con caída a 2 m de altura, y las lesiones que el primero las consideraba como severas, en este estudio las consideran moderadas debido a su respuesta vascular. En este estudio experimental no realizó ningún análisis histopatológico post-traumatismo (Baranova, 2008).

También *Fujita et al.* emplearon ese método con traumatismos repetidos de distintas intensidades e intervalos de repetición. Usaron un peso de 450 g desde una altura máxima de 1 m, consiguiendo el marcaje más acentuado en traumatismo doble, con intervalo de 3 horas, desde 1 m de altura. Con un único impacto desde 1 m de altura no consiguieron ningún marcaje IHQ tras el sacrificio de los animales a las 4 horas después del golpe. Cabe destacar de este estudio que demuestran que la disfunción microvascular es paralela a los cambios axonales patológicos, estimando que las alteraciones microvasculares debían ser un factor colaborador en la morbilidad (Fujita, 2012).

Igualmente *Ucar et al.* utilizaron el mismo método, introduciendo la variante de lubricar el interior del tubo y de colocar un sedal en el peso para garantizar que no golpee dos veces sobre el cráneo. No

colocaba la cabeza de la rata próxima al extremo de la esponja y desconocemos la resistencia de ésta, pero su mortalidad con 450 g y 1 m fue del 78,5%, con 350 g y 1 m fue de un 42.8% y de 300 g y 1 m del 7.1%. En todos los grupos hubo casos de apnea tras el traumatismo, incluso en el control sin traumatismo (Ucar, 2006).

En el trabajo firmado por *Mu et al* utilizan el método de Marmarou y Foda dejando caer el peso desde 1 metro de altura con la finalidad de obtener lesiones moderadas. Obtuvieron una mortalidad del 20% y demostraron la pérdida de mielina con el paso de los días y un aumento de apoptosis de oligodendrocitos (Mu, 2019)

Una comparativa de estudios usando el mismo modelo puede consultarse en la tabla 1.

Tabla 1: Tabla comparativa de estudios que usaron el método de Marmarou y Foda

Autor (año)	Objetivo	Método	Resultados
Marmarou (1994)	Traumatismo grave con 50% mortalidad	450 y 500 g - 2 m 450 g - 1 m	450 g - 2 m → Lesión grave 450 g - 1 m → Lesión moderada
Carré (2004)	Monitorizar el O ₂ antes, durante y después del traumatismo	430 g - 2 m	No hacen clasificación en función de la gravedad de la lesión
Ucar (2006)	Nivel de trauma para conseguir lesión moderada	450 g, 350 g & 300 g - 1 m Aceite en tubo	450/350 g - 1 m → Lesión severa (mortalidad 78.5/42.8%) 300 g - 1 m → Lesión moderada (mort. 7.1%)
Baranova (2008)	Estudio de la reacción vascular al traumatismo (moderado)	450 g - 2 m	Demostraron cambios vasculares
Fujita (2012)	Daño microvascular secundario al traumatismo	450 g - 1 m	1 impacto → No lesión 2 impactos → Lesión intensa (no IHQ)
Calikoglu (2015)	Efecto de la pregabalina en el trauma	450 g - 2 m (40 cases)	7 paradas respiratorias, 4 pupilas dilatadas, 2 muertes, 8 sin lesión histopatológica
Jiao Mu (2019)	Analizar la mielina en DAI	450 g - 1 m	Lesión moderada (mort. 20%) Disminución mielina y aumento de apoptosis oligodendrocitos

Por último, el método diseñado por *Kilbourne* (Kilbourne, 2009) crea una aceleración anteroposterior con componente rotacional en plano sagital sin deformación ni fractura craneal, tratando de emular los accidentes de tráfico. El marcaje máximo para β -APP apareció al 7º día después de traumatismo severo. Hallaron resultados positivos en el encéfalo pero no en el tronco encefálico, asumiendo que la

causa se debía a una aceleración producida en el sentido del eje principal de éste y no en perpendicular como el de *Marmarou*.

Reproducción experimental de isquemia cerebral en animales

La mayoría de los estudios de este tipo están hechos en ratas inmaduras o de pocos días de vida, tratando de profundizar en el conocimiento de la isquemia intraparto o la viabilidad de las crías cuando la madre sufre un evento letal o grave. Y aunque los encéfalos inmaduros son más sensibles a la isquemia, los acontecimientos fisiopatológicos y la metodología empleada para producir la hipoxia/isquemia, tienen un gran interés general.

Towfighi et al. estudiaron los cambios neuropatológicos sobre ratas de 7 días de vida, a las que sometieron a una ligadura de la arteria carótida común unilateral combinada con una hipoxia (respirando aire con el 8% de oxígeno) durante dos horas de duración. Los tiempos de sacrificio se realizaron desde las dos horas hasta tres semanas y describieron los cambios celulares a lo largo de ese tiempo tanto en la zona lesionada ipsilateral como en el hemisferio contralateral. Los cambios, con su específica temporalidad y localización fueron los esperados en lesiones de este tipo, tales como necrosis neuronal, necrosis por coagulación (infarto), cavidad quística, activación de microglía/macrófagos, astrocitosis reactiva etc. (Towfighi, 1995).

Namura et al provocaron una oclusión de la arteria cerebral media a ratones adultos machos mediante la introducción quirúrgica de un filamento de nylon que interrumpía el flujo sanguíneo durante dos horas, para reperfundir posteriormente. Detectaron apoptosis neuronal con supervivencia de 1-2 horas detectada tanto con técnicas TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling*) como por inmunoreactividad de la caspasa-3 (Namura, 1998). Igual técnica la realizó *Liu et al.* en ratas adultas macho, con sólo 1 hora de isquemia consiguiendo inducir apoptosis neuronal con activación de la caspasa-3 y otras proteínas en el hipocampo y en el *cortex* (Liu, 2013).

Otra técnica distinta, puramente hipóxica, fue la practicada por *Ginet et al.* en la que indujeron muerte celular, detectada también mediante TUNEL y caspasa-3, en cerebros de ratas que se mantuvieron respirando oxígeno al 8% durante 2 horas (Ginet, 2014).

Otras técnicas muy utilizadas son las de oclusión de vasos cervicales arteriales. Se pueden ocluir dos o cuatro vasos. La técnica de 2 vasos consiste en clampar las dos arterias carótidas comunes mediante un abordaje cervical anterior (Kaur, 1999). De esta manera no se consigue provocar una isquemia importante, debido a la circulación colateral que se realiza a través de las arterias del polígono de Willis, por lo que es necesario combinar el clampaje anterior con algún otro procedimiento, como como la hipoxia con disminución de oxígeno respirable o bien mediante el incremento de la concentración de nitrógeno (Levine, 1960). El sistema de oclusión de cuatro vasos, consiste en realizar un abordaje posterior para obliterar las arterias vertebrales en los agujeros transversos y un abordaje anterior para clampar las carótidas temporalmente (Pulsinelli, 1979; Pulsinelli, 1988).

La isquemia lleva a la hipoxia tisular y, si la situación se prolonga lo suficiente, las células mueren por necrosis (infarto). Pero las células también pueden morir de forma aislada por apoptosis, la muerte celular programada. Cuando en el encéfalo aparecen células nerviosas aisladas muertas el investigador precisa diferenciar cuál de estos dos procesos de muerte están siguiendo esas células.

Diagnóstico diferencial entre apoptosis y necrosis

MacKenzie et al. estudiaron casos puramente isquémicos y hemorrágicos en pacientes que sufrieron ictus hemorrágico o isquémico, sin traumatismo craneal, y concluyeron que los patrones histológicos de reactividad frente a β -APP, que se producían en estos casos, no eran diferentes de las detectadas en casos de traumatismo craneal ya que toda lesión traumática iba asociada con tumefacción cerebral o hemorragia, lo que finalmente ocasionaba daño isquémico. Por ello, este estudio cuestionó que determinados patrones de expresión de β -APP puedan ser utilizados para acreditar que una determinada lesión axonal sea isquémica o traumática (MacKenzie, 2015).

La apoptosis está mediada por mecanismos intrínsecos activos, aunque pueden existir moduladores externos. La morfología histológica de la apoptosis se caracteriza por la preservación de la integridad de membrana, por condensación nuclear y citoplasmática, por la disminución del volumen celular y formación de vacuolas citoplásmicas y por la conservación morfológica de las estructuras de las organelas. Finalmente, la célula se fragmenta creando cuerpos apoptóticos, constituidos por fragmentos tanto de cromatina como de fragmentos citoplasmáticos, que son degradados al ser engullidos por las células vecinas (Martin, 1998; Yakovlev, 1997). Es la muerte celular fisiológica y está considerada como una muerte celular programada organizada, mediada por mecanismos activos, intrínsecos, en las que ciertas vías moleculares son activadas para iniciar la apoptosis. En contraste a la necrosis, la apoptosis no lleva a una pérdida del contenido celular y no inicia una respuesta inflamatoria (Martin, 1999).

La necrosis implica disrupción de la membrana, estructural y funcional, entrada rápida de calcio y agua, y muerte celular. Es inducida por una perturbación abrupta del entorno con alteración de las condiciones fisiológicas. El tejido necrótico se caracteriza por pérdida de la integridad de la membrana, picnosis nuclear (densidad uniforme y regular), hinchazón y degeneración de organelas, floculación nuclear, pérdida del contenido de los lisosomas, tumefacción celular y lisis con disolución de la célula (Martin, 1998; Yakovlev, 1997). Es siempre una muerte celular patológica inducida por alteración de las condiciones fisiológicas, que incluye perturbaciones en la estructura e integridad funcional de la membrana plasmática y anormalidades de los niveles intracelulares de sodio, calcio y agua con la consiguiente ruptura celular (Martin, 1999; Mu, 2015).

Hay teorías que defienden que la apoptosis, que es dependiente de ATP, y la necrosis, son un continuum según la disponibilidad de energía. Cuando el ATP se agota se anula la apoptosis y comienza la necrosis (Raghupathi, 2000). Igualmente se teoriza que las células de la región lesionada, bien por un traumatismo, bien por isquemia, sufren necrosis. La necrosis necesita de minutos a horas para instaurarse. Las células próximas a la lesión (zonas de penumbra en isquemia) sufren fundamentalmente apoptosis, comenzando a las pocas horas y durando días (Kunz, 2010).

Rossiter et al. (Rossiter, 2002) en su artículo sobre hipoxia-isquemia perinatal en humanos hablan de un patrón morfológico de apoptosis cuando se pueda demostrar fragmentación del ADN *in situ* al menos con una correlación de 1:1 de células que están muriendo, aunque reconocen también que la morfología apoptótica-necrótica es probablemente un *continuum in vivo*.

Teóricamente las células necróticas debieran reconocerse con mayor rapidez, ya que la apoptosis requiere varias horas para comenzar y más horas para mostrar cambios morfológicos. Se observó que el marcaje de caspasa-3 podía llevar a equivocación al poder actuar también sobre células necróticas, a diferencia de la caspasa-3 activada que marcaría exclusivamente las células apoptóticas (región pontosubicular humana) (Takizawa, 2006)

Rink et al. en un trabajo de DAI en ratas, distinguía células apoptóticas de necróticas por su patrón morfológico tras el marcaje con TUNEL, aunque necesitaba 72 horas de evolución y, al usar la percusión líquida como método de producción de la lesión en las ratas, sólo obtuvo marcaje en el área lesionada y no en la contralateral. Destaca que a la necrosis la acompaña la inflamación, mientras que a la apoptosis no. En este artículo se pone de manifiesto que la inflamación que acompaña a la necrosis persiste en el tejido mucho tiempo y proporciona proteasas que facilitarían la fragmentación aleatoria del ADN por digestión del nucleosoma mucho después, por lo que es posible detectar con TUNEL necrosis y apoptosis celular a diferentes estadios temporales tras lesión traumática (Rink, 1995).

Algunos defienden que en realidad son procesos complementarios y sucesivos, ya que, tras la isquemia, las primeras células afectadas serían las que mueren por necrosis. Y posteriormente (a las 24 horas) aparecería la apoptosis en otras células, como segunda fase lesional, aunque también puede existir una fase híbrida necrosis-apoptosis (Northington, 2001).

La degeneración de neuronas vulnerables secundariamente a isquemia global (ej. células de Purkinje cerebelares) muestra la apariencia morfológica de necrosis pero también da lugar a la degeneración secundaria de otros tipos celulares como células granulares o gliales en las cuales la muerte celular se produce por apoptosis. Por lo tanto, los dos tipos de muerte celular por apoptosis o necrosis pueden coexistir de forma separada en diferentes poblaciones celulares tras una lesión del SNC, si bien, probablemente, necrosis y apoptosis no son independientes uno del otro (Martin, 1998).

Love S et al. descubrieron que parte de la división del ADN ocurre *post mortem* y que el marcaje de TUNEL no necesariamente implica apoptosis (Love, 2000).

Incluso en trabajos experimentales en los que se usa la reperfusión sanguínea con el fin de que la lesión sea más suave y la apoptosis más recargada (ya que los radicales libres liberados durante la reperfusión se asocian a apoptosis) mostraron que entre las células que expresaban caspasa-3, el 60-80% también se marcaban con TUNEL. Y de las que marcaban con túnel, el 40-50% marcaban también caspasa-3, por lo que asumieron que la caspasa-3 no es imprescindible para la apoptosis. Además, consiguieron el marcaje máximo entre las 12-24 horas post isquemia (Namura, 1998).

El TUNEL, por lo tanto, no distingue entre apoptosis, necrosis e híbridos de ambos y no provee información sobre la degeneración de axones o terminaciones nerviosas (Northington, 2001).

Además, teóricamente, la caspasa-3 y el TUNEL señalan momentos de evolución diferentes según podemos ver en la figura 4.

En el estudio de *Stadelmann et al.* hallaron que las células marcadas con caspasa-3 activada tenían mayoritariamente morfología de apoptosis y no se apreciaban células necróticas, mientras que el anticuerpo de procaspasa-3 marcaba células sin preferencia por este patrón morfológico. Además, como sus casos son neonatos hipóxicos, estiman que la hipoxia provoca apoptosis, aclarando que esto funciona de forma diferente en adultos (Stadelman, 2001).

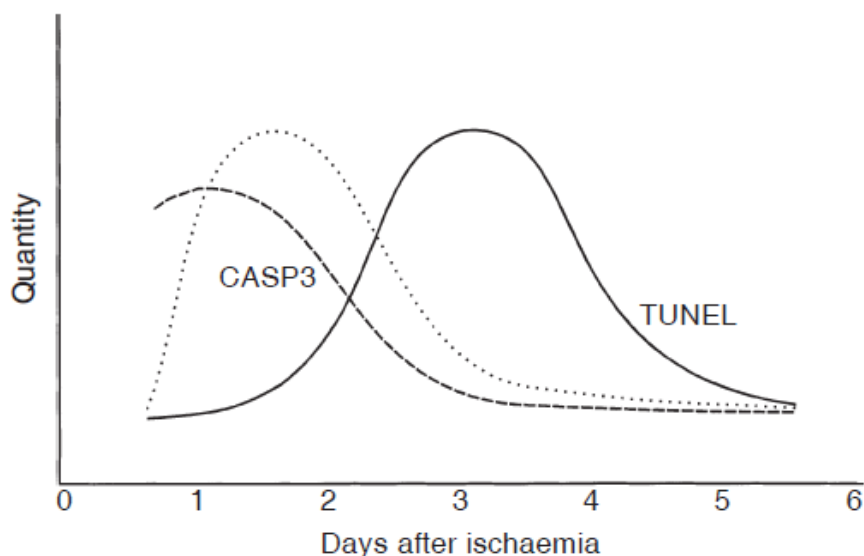


Figura 4: Ilustración esquemática de la evolución temporal del marcaje de Caspasa3 (línea discontinua) y TUNEL (línea continua) en infartos tromboembólicos focales en humanos. La línea de puntos indica la evolución temporal aproximada de apoptosis tras lesión isquémica y reperfusión en animales de experimentación, aunque debe destacarse que esto varía de forma considerable según las condiciones precisas del experimento. La escasez de marcaje temprano con TUNEL en infartos cerebrales humanos debe ser secundaria a la mucho menor reperfusión y perfusión colateral del tejido isquémico que ocurre en modelos experimentales. Estos hallazgos sugieren que el marcaje retardado con TUNEL, entre 2 y 4 días, no indica apoptosis. Extraída del estudio de Love S, 2000 (Love, 2000) con permiso de la editorial John Wiley.

Valoración del edema cerebral

El edema cerebral se caracteriza por una cantidad de líquido anormalmente grande en el espacio extracelular del tejido nervioso, preferentemente en la sustancia blanca.

Un problema fundamental en neuropatología consiste en acreditar el edema. Se sabe que la hipoxia cerebral primaria causa edema (citotóxico, que se caracteriza por la disminución de potasio intracelular), y que el edema en un lugar cerrado como es el cráneo provoca compresión de estructuras y herniación encefálica. Tanto la compresión como la herniación se traducen en, al menos, defectos de vascularización en las zonas afectadas.

Adams et al. diagnosticaron edema cerebral en cerebros humanos (o el aumento de la PIC) verificando la presencia de necrosis en las circunvoluciones parahipocámpales (Adams, 2011).

Reichard et al. definen el edema cerebral como un peso cerebral mayor del 10% sobre el esperado en relación a la edad, talla y peso corporal, o evidencia de herniación macro o microscópica (Reichard, 2003).

Radojevic et al. proponen un modelo matemático que utiliza tres diámetros de la cavidad craneal, relacionándolos con el volumen y el peso del cerebro durante la autopsia. El algoritmo se basa en que la densidad del cerebro edematoso es mayor que la del cerebro normal. (Radojevic, 2016).

Röthig y Schaarschmidt encontraron una relación lineal (coeficiente de correlación) entre la longitud corporal y el peso del cerebro. Incrementos de peso por encima de ese coeficiente (0,3) indicarían

edema cerebral. Sin embargo, el valor de este método está restringido por el amplio rango estadístico (Rothig, 1977).

Hay estudios antiguos en los que no se consigue establecer un nexo entre el diagnóstico analítico, mediante determinaciones de agua, sodio y potasio, con el diagnóstico histológico. Tan sólo consideraron fiable la observación macroscópica directa en los casos severos (Yates, 1975). Se debe tener en cuenta que se trataba de muestras procedentes de cadáver, a veces con un número indeterminado de horas de evolución *post mortem*, por lo que pudieron aparecer artefactos que modificaban tanto la morfología como los hallazgos microscópicos.

Hausmann et al. investigaron el valor de la morfología macroscópica del encéfalo y de los hallazgos histológicos para apreciar el edema cerebral. El rango normal de peso cerebral se calculó con la fórmula de *Röthig y Schaarschmidt*. Concluyeron que tanto la sección macroscópica como los hallazgos histológicos tienen una importancia mínima a la hora de diagnosticar edema cerebral (Hausmann, 2006).

Por todo esto, la literatura actual considera que el diagnóstico del edema cerebral es complejo y no se debería basar solamente en los hallazgos macroscópicos y/o microscópicos.

Por último, varios autores en sus estudios han utilizado un método relativo, no universalizado, que no establece un diagnóstico definitivo, pero sí es útil en algunas circunstancias. El método consiste en seleccionar el área encefálica que interesa, diseccionarla, pesarla (peso húmedo), dejarla secar 48 horas a 70°C (ó 24 h a 95°C ó 72 h a 100°C) y volver a pesar (peso seco). El porcentaje de agua en los tejidos se calcula según la siguiente fórmula: $\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco} / \text{Peso húmedo} \times 100$. El porcentaje de contenido de agua en el área encefálica de interés (o en el encéfalo entero) se compara con las mismas áreas en los animales control (Dempsey, 2000; Cernak, 2004; Flierl, 2009).

Anestesia en experimentación animal

Todas las sustancias anestésicas tienen efectos en el metabolismo y fisiología cerebral, lo que puede interactuar de alguna manera con las lesiones secundarias que aparecen después del experimento (Morales, 2005).

El pentobarbital deprime el flujo sanguíneo, el metabolismo cerebral y es posible que altere de alguna manera los radicales libres (Dempsey, R.J. 2000) y también el metabolismo de la glucosa (Morales, 2005).

El halotano, paradójicamente, aumenta el flujo cerebral y el volumen circulante de sangre al cerebro y disminuye la reabsorción de líquido céfalo-raquídeo (LCR) (Dempsey, 2000).

El NO también aumenta el flujo cerebral y produce vasodilatación con un mínimo incremento en el metabolismo cerebral (Dempsey, 2000), lo que puede jugar un papel a tener en cuenta en la producción de edema.

El isoflurano atenúa déficits funcionales y reduce la muerte cerebral en la región CA1 del hipocampo. Puede incrementar el flujo sanguíneo cerebral y reducir la excitotoxicidad (Morales, 2005). Destaca entre sus características que tiene un tiempo de inducción muy rápido y una recuperación también muy rápida.

El propofol y los narcóticos son los anestésicos que han dado peores resultados, a pesar de ser tan usados en el campo de la clínica médica (Morales, 2005).

Marcadores inmunohistoquímicos (IHQ)

Son muchos los anticuerpos utilizados por los investigadores en el campo del DAI (*S100*; *TAU-L*; *VGF*; *HSP60*; *HIF-1 α* ; *Sinaptofisina*; *Neurofilamentos*; *CD15*; *Vimentina*; *CD45*; *PGFA*; *NSE*) aunque los que mejores resultados han proporcionado son los siguientes:

β -APP

La proteína precursora del β -Amiloide (β -APP) es una glicoproteína transmembrana introducida por Sheriff en 1994 para el diagnóstico de DAI (Sherriff, 1994). Existen varias isoformas y se encuentra en la mayoría de las células del organismo siendo más abundante en el sistema nervioso central, tanto en neuronas como en células gliales. Su función exacta es desconocida, pero se ha propuesto que interviene en las interacciones intercelulares y de las células con la matriz. Podría actuar también como factor de crecimiento, y realizar funciones autocrinas. Más importante, se han encontrado efectos potenciales en las lesiones neuronales excitotóxicas, especialmente tras hipoglucemia, y como moduladora de flujo de entrada de Ca^{+2} en la célula tras una lesión (Harrington, 2000). Aunque también se ha sugerido que tendría un papel protector frente a las lesiones neuronales ya que se ha observado una menor muerte neuronal y apoptosis (Corrigan, 2012).

La utilidad del β -APP como marcador del DAI se basa en que se acumula en los axones rotos ya que no es capaz de continuar su trayecto por transporte axonal anterógrado rápido. Para el transporte de β -APP es necesaria una gran cantidad de energía (proceso activo), lo que en la práctica se traduce en supervivencia o vitalidad tras el impacto traumático. Esta supervivencia es necesaria para que haya una acumulación suficiente a nivel axonal que permita ser observada al microscopio óptico (Hortobagyi, 2007; Gentleman, 1995).

La β -APP también se detecta también los cuerpos neuronales, lo que se ha asociado al estrés postraumático agudo de estas células (Wang, 2010).

La mayor parte de los anticuerpos creados frente a la β -APP se dirigen al extremo N-terminal. Al encontrarse éste en el interior de la vesícula de β -APP el marcador tiene peores resultados que el que se fija sobre el extremo C-terminal. El extremo C-terminal se ubica intracelularmente en la superficie externa de las vesículas por lo que es más accesible a la penetración del anticuerpo que el N-terminal intravesicular. Además, en el proceso de preparación de las muestras, no es necesario romper las vesículas exponer el antígeno, por lo que el marcaje es más intenso y presenta menos fondo. El tiempo de detección es menor, pasando de 60 a 30 minutos y se puede utilizar a diluciones elevadas disminuyendo los costes (Stone, 2000).

Algún autor ha propuesto el estudiar la proteína adaptadora del β -APP, la FE65 (Russo, 1998), una proteína de unión que transporta a la β -APP y que se puede utilizar como marcador precoz de DAI mediante técnicas de RT-PCR, con resultados positivos a partir de 30 minutos en ratas, con una expresión que aumenta hasta un máximo nivel a la hora de la lesión para disminuir luego progresivamente (Iino, 2003).

El marcaje inmunohistoquímico con β -APP se ha utilizado para muchos fines diferentes, tanto en medicina clínica como forense en casos traumáticos y no traumáticos, ya que la presencia de DAI puede en el cadáver de un niño alertar acerca de episodios previos de traumatismos ocultos o de algún tipo de patología hipóxica. Entre estas enfermedades, el síndrome de la muerte súbita del lactante que tiene un especial interés médico legal, se caracterizó por mostrar un patrón de tinción con β -APP similar a los casos de muerte infantil traumática o por asfixia mecánica (Byard, 2006; Oehmichen, 2008; Jensen, 2014).

Detección de β -APP

Es necesario un tiempo de evolución de al menos varias horas para que la interrupción del transporte axonal ocasione una acumulación adecuada de β -APP detectable al microscopio óptico (Maxwell, 1997; Geddes, 2000; Geddes, 1997). Inicialmente con tinciones clásicas como H&E (Hematoxilina y Eosina) y con tinciones de plata eran necesarias 12-24 h para distinguir la presencia de los bulbos axonales. Con la introducción de técnicas de IHQ que detectan la β -APP se redujo el tiempo de forma importante.

Distintos autores han sido capaces de demostrar un cuadro de daño axonal difuso (DAI) con tiempos de evolución mínimos. Según *Wilkinson et al.* el tiempo mínimo para que aparezca el inmunomarcaje para β -APP es de 60 min (Wilkinson, 1999). *Geddes et al.* establecieron un tiempo mínimo de detección en 2-3 h tras la lesión (Geddes 2000), lo que coincide con el tiempo que publican *Harrington et al.* (Harrington, 2000). *Oehmichen et al.* establecen una horquilla de 1,5-3 horas (Oehmichen, 2008), un tiempo similar al publicado por *Sherriff et al.* que detectan marcaje transcurridas 3 h (Sherriff, 1994). *Hortobagyi et al.* refieren positividad para β -APP a los 35 minutos de supervivencia (Hortobagyi, 2007) y *Dikranian et al.* detectaron lo mismo en ratas incluso tras ocasionar un daño definido como moderado (Dikranian, 2008).

En cuanto al momento de la máxima inmunoexpresión β -APP varios autores coinciden en que marcaje es máximo a las 24 horas tras la lesión y suele declinar a partir de las 48 h (Huh, 2011; Cernak, 2004; Johnson, 2013). La degeneración axonal puede aparecer más tarde, tal y como publicó *Povlishock* hace muchos años, incluso con traumatismos locales que no causan disrupción mecánica del axón pero que pueden causar deterioro del transporte axonal, tumefacción y finalmente desconexión (Povlishock, 1992). *Wilkinson et al.* encontraron una relación positiva entre la expresión β -APP y el tiempo de supervivencia, estableciendo una fase de meseta alrededor de las 85 h tras la lesión (Wilkinson, 1999). A partir de 3-4 sem de supervivencia el rendimiento de este marcador va disminuyendo (Adams, 2011).

Esta evolución concuerda con los resultados de los estudios de *Huh et al.* (Huh, 2011; Huh, 2008), quienes encontraron marcaje inmunohistoquímico con β -APP en la zona de impacto y también en lugares remotos. Sin embargo, mientras el área contundida presentaba su máximo marcaje a las 24 h tras la lesión, en los sitios remotos los axones dilatados eran más numerosos a los 3 d. A partir de este día 3 las lesiones tisulares mejoraban y el inmunomarcaje disminuía. Y si el caso concreto es de DAI evolucionado asociado a degeneración Walleriana, aparecerá un marcaje negativo para β -APP con una infiltración macrofágica a lo largo de la sustancia blanca (Reichard, 2005).

Con relación a la edad, se ha demostrado que la velocidad de transporte de las vesículas anterógradas y retrógradas en el axón es más lenta en los animales viejos, volviéndose las vesículas de mayor tamaño más lentas. Por lo tanto, las vesículas de transporte rápido, que son las de menor tamaño y las que expresan β -APP se enlentecen en menor medida con la edad. Se desconoce las implicaciones clínicas de estos datos si es que las tienen (Viancour, 1993).

Criterios diagnósticos con B-APP

No hay un acuerdo unánime respecto a los hallazgos necesarios para diagnosticar DAI. El hecho de que sea difuso debe exigir que podamos demostrar el ente patológico en diferentes regiones del cerebro, ya que si no se trataría simplemente de una entidad focal. Por otra parte, el término daño axonal *difuso* podría ser impreciso ya que el daño más que difuso es multifocal. De hecho, el daño se encuentra con frecuencia en determinadas estructuras, y en otras no aparece nunca.

En el contexto de la medicina forense, es importante recordar que el DAI puede ser una causa de muerte y por lo tanto su existencia no debe de pasarse por alto en la práctica diaria (Davceva, 2015).

Entre los criterios mínimos para establecer el diagnóstico, varios autores proponen distintos métodos. *Davceva et al.* proponen que la lesión debe ser multifocal, y que al menos un foco de lesión debe estar situado por encima del *tentorium cerebelli* y otro por debajo. Se consideran zonas especialmente significativas las regiones que incluyen cordones axonales, como el cuerpo calloso o la cápsula interna (Davceva, 2015). *Geddes et al.* entienden que el daño se debe evidenciar en muestras de 3 bloques de tejido de los 5 que propone como mínimos e imprescindibles: el cuerpo calloso con sustancia blanca parasagital anterior y posterior, la región posterior de la cápsula interna y el puente, un bloque con pedúnculo cerebeloso medio y otro con pedúnculo cerebeloso superior (Geddes, 1997). Unos años más tarde, en otra publicación, añaden un bloque de hemisferio cerebeloso a los mínimos imprescindibles (Geddes, 2000). Todo ello debería asociarse con una historia clínica de trauma. En ausencia de un antecedente historiado de traumatismo, un patrón histológico que demuestre DAI debería acreditarse mediante un muestreo más amplio (Smith, 2003).

También se ha propuesto combinar otros marcadores inmunohistoquímicos con el β -APP para aumentar las posibilidades de diagnóstico. El SNTF (*Fragment of alpha-II spectrin*) además de marcar los mismos axones que el β -APP fue capaz de revelar una subpoblación de axones degenerados no detectados por β -APP. Otros marcadores como el RMO-14 (*Compacted neurofilament-medium*) y el NF-68 (*Neurofilament-68*) mostraron positividad en casos de DAI traumático de forma independiente de SNTF y β -APP. Esto demuestra, siguiendo a *Johnson et al.* que existen múltiples fenotipos axonales patológicos después de una lesión cerebral traumática (Johnson, 2016).

Está bien establecido que una lesión traumática moderada o grave puede provocar muerte celular excitotóxica inicial (necrosis) en el lugar del impacto, pero la muerte neuronal por apoptosis puede aparecer tras la degeneración axonal traumática en las neuronas conectadas a esos axones (Bittigau, 2003). *Dikranian et al.* provocaron DAI traumático en ratones tras un impacto. Durante las primeras 24 horas los axones lesionados mostraban esferoides β -APP inmunoreactivos, expresión que declinaba significativamente a partir de las 48 h. Esta degeneración axonal fue seguida por muerte celular apoptótica en las neuronas del tálamo y del cortex que alcanzó el pico máximo entre las 16 y las 24 h después del impacto. A las 48 h, la muerte celular apoptótica disminuía, en paralelismo a la reducción de la expresión β -APP en los axones. Este retraso en la aparición de la apoptosis neuronal lo atribuyen, los autores, a que en primer lugar y debido a las fuerzas de cizallamiento se produciría la lesión axonal con interrupción y pérdida de conexiones sinápticas funcionales lo que iniciaría la activación de la cascada de la apoptosis en las neuronas. Esto demuestra una relación temporoespacial compleja entre la degeneración axonal y la muerte de las neuronas (Dikranian, 2008).

DAI. Criterios diagnósticos y graduación histológica

Ya en el año 1989, *Adams et al.* definieron el DAI y propusieron criterios diagnósticos y de graduación de la intensidad de las lesiones. Establecieron 3 grados histológicos y, además, si las lesiones se observan macroscópicamente se añadía la consideración de severo al grado correspondiente (Adams, 1989): en el grado 1 hay evidencia histológica de lesión axonal en la sustancia blanca de los hemisferios cerebrales, en el cuerpo calloso, en el tronco del encéfalo y, ocasionalmente, en el cerebelo; en el grado 2 además de lo observado en el grado 1 hay lesión focal (o necrosis) en el cuerpo calloso y, en el grado 3, además de lo observado en el grado 2 hay lesión focal (o necrosis) en el área dorsolateral del tronco del encéfalo

Más tarde, se han propuesto diversos criterios para diagnosticar y evaluar la intensidad de las lesiones en el DAI por medio del uso del marcador β -APP, empleando métodos cuantitativos, que usan una puntuación en función del número de sectores afectados de los 116 en los que dividen el cerebro (Blumbergs, 1995) o utilizando múltiples secciones cerebrales coronales (Gorrie, 1999), o bien empleando métodos semi-cuantitativos estableciendo una graduación de (0) cuando no hay ninguna expresión β -APP, (+) en caso de axones o bulbos positivos aislados o diseminados y (++) cuando estos axones o bulbos positivos se presentan *en grupos* o focos o de forma difusa (Oehmichen, 1998; Oehmichen, 1999; Reichard, 2003; Takahito, 2009; Sherriff, 1994; Thornton, 2006), o graduando la intensidad de marcaje expresándolo con otra terminología, por ejemplo, utilizando suave, moderado y severo; suave representa varicosidades ocasionales focales y severo representa tinción axonal difusa intensa con bulbos abundantes (Gentleman, 1995; Wilkinson, 1999; Gleckman, 1999; Kaur, 1999; Harrington, 2000; Shannon, 1998; Morrison, 2008), o utilizando un sistema de graduación sencillo (1, 2 y 3) basado en el número y en la morfología de los bulbos axonales de 8 regiones anatómicas (Jensen, 2014).

Destacamos los criterios semicuantitativos propuestos por *Johnson et al.*, por su simplicidad, porque aparecían pocas diferencias inter e intraobservadores y, además, por ser una de las más utilizadas (Johnson, 2011). Las preparaciones IHQ eran revisadas por tres investigadores. Cada portaobjetos fue clasificado de la siguiente manera:

- Negativo
- Focal: Marcaje solamente en un área de la muestra (portaobjetos)
 - . Leve: 1-3 axones marcados por campo de 40x (Objetivo 40x, visor 10x)
 - . Moderado: 3-10 axones por campo de 40x
 - . Severo: Más de 10 axones marcados por campo de 40x
- Multifocal: Marcaje en más de un área de la muestra, separadas por un campo mayor de 10x (Objetivo 10x, visor 10x) dentro del mismo portaobjetos
 - . Leve: 1-3 axones marcados por campo de 40x
 - . Moderado: 3-10 axones por campo de 40x
 - . Severo: Más de 10 axones marcados por campo de 40x

Caspasa-3

Las caspasas son una familia de proteasas involucradas principalmente en la muerte celular programada y en la activación de citoquinas proinflamatorias. La familia de las caspasas está constituida por 12 proteasas que se caracterizan por tener residuos de cisteína en su sitio activo. Los precursores de las caspasas (procaspasas) son inactivos y se transforman en moléculas activas por rotura proteolítica. Una vez activada, la caspasa induce una reacción en cadena que lleva a la activación

de otras caspasas y finalmente a la muerte de la célula. Los estímulos que inician la apoptosis de la célula pueden ser intracelulares (vía intrínseca) o extracelulares (vía extrínseca) (Thornberry, 1998)

El inicio de la cascada se produce en respuesta a estímulos que disparan en definitiva el proceso de la apoptosis. Las caspasas actúan sobre enzimas encargadas de la reparación del ADN y sobre proteínas estructurales como las de la lámina nuclear o la actina a las que degradan y sobre endonucleasas como la ADNasa a las que activan.

La caspasa-3, una caspasa ejecutora, es activada por las caspasas iniciadoras (caspasas 2, 8, 9 y 10). Participa tanto de la vía intrínseca como de la vía extrínseca de la muerte celular programada, y estimula el procesamiento y activación de la interleucina 1B (Troy, 1996).

La vía intrínseca es activada por el estrés y otras señales como la isquemia que inducen la salida del citocromo c de la mitocondria al citosol. Esto da lugar a la pérdida del potencial de membrana en la mitocondria. Se activan los canales dependientes de Ca^{+2} y algunos aminoácidos excitadores se liberan al espacio extracelular. La acumulación citotóxica intracelular de Ca^{+2} inicia una serie de eventos citoplasmáticos y nucleares, entre los que destaca esta vía intrínseca de la apoptosis. Esto se debe a que, en el citosol, el citocromo C se une a Apaf-1 lo cual recluta y activa la procaspasa-9, la cual, puede, a su vez activar la procaspasa-3 que da lugar a caspasa-3. En la cascada disminuye tanto la cantidad de procaspasa como se eleva la de caspasa (Dubois-Dauphin, 2001; Pfister, 2003).

La vía extrínseca se activa tras la unión de un ligando (péptido de la familia del TNF) a su receptor, lo cual activa a las caspasas iniciadoras (2, 8 y 10). Una vez activada, la caspasa-8 induce la liberación del complejo DISC (*death-inducing signaling complex*) al citoplasma e inicia la cascada de la caspasa-3 por mecanismo directo o dependiente de mitocondrias (Broughton, 2009).

La apoptosis inducida por caspasa-3 funciona en neuronas, pero también se ha descrito en astrocitos y microglía (Krupinski, 2000). En neuronas juega un papel central la activación de la caspasa y, la caspasa-3, aparece como un efector enzimático especialmente importante en la apoptosis neuronal (Rossiter, 2002). En la isquemia se activa de forma temprana en la región peri-infarto (Kunz, 2010).

Diagnóstico de muerte neuronal por hipoxia/isquemia

Las áreas más susceptibles a la hipoxia/isquemia son las áreas limítrofes del aporte vascular (Oehmichen, 2003), como son el surco entre la primera y segunda circunvolución frontal, el globo pálido, la región CA1 del hipocampo y la capa de células de *Purkinje*.

Histológicamente se puede reconocer la cariorrexis neuronal siguiendo a *Takizawa et al.* (Takizawa, 2006) por la presencia de un núcleo denso oscuro o bien un núcleo contraído y fragmentado que se tiñe de forma homogénea además de un citoplasma eosinofílico que en ocasiones puede aparecer pálido y/o inaparente.

Love et al. describen y clasifican los criterios histológicos de muerte celular según evolución temporal. Y así en casos de menos de 24 horas de evolución, en las neuronas aparece tumefacción moderada de citoplasma, vacuolización del neuropilo perineuronal que poco a poco se va haciendo difusa, el perfil de núcleo muestra una morfología triangular y hay picnosis leve. A las 24 horas el núcleo se muestra oval o triangular, la cromatina se encuentra dispersa, los núcleos son anfófilos y el nucleolo es aún discernible. A las 48 horas las neuronas se ven en forma de vidrio esmerilado y el citoplasma toma una coloración eosinofílica brillante. A las 48-72 horas la cromatina se desintegra, pero el núcleo

eosinofílico aún se distingue. A las 96 horas el neuropilo se desestructura y las neuronas dejan de ser visibles (Love, 2000).

El patrón morfológico de muerte celular según *Northington et al.* es diferente según la etiología de la misma. Así, la muerte isquémica/anóxica se caracteriza por mostrar un citoplasma eosinófilo, vacuolización del citoplasma, un cuerpo celular hinchado, un núcleo condensado (picnosis) y la cromatina condensada, en grumos. Cuando el origen es necrótico, se observa un citoplasma hinchado pero residual alrededor del núcleo (Northington, 2011).

Detección temporal

Se ha demostrado la elevación de ARNm para caspasa-3 en el cerebro de rata 1 hora tras isquemia focal (Asahi, 1997) y también tras reperusión temprana en la rata sometida a 2 horas de oclusión de arteria cerebral media (Namura, 1998). Similares observaciones se han encontrado en humanos, con elevación de la caspasa-3 tras isquemia (Rami, 2003).

El marcaje más intenso para la caspasa-3 se encontró a las 18-24 horas en el citoplasma y núcleo de las neuronas de la zona lesionada aunque también fue detectado en las neuronas dispersas por el parénquima cerebral adyacente a la zona infarto (Love, 2000; Dikranian, 2008). Otros autores, *Cernak et al.* (Cernak, 2004), detectaron este mismo marcaje más allá de las 24 horas.

Usando TUNEL sólo se encontró un marcaje muy ocasional frente a caspasa-3 en las primeras 24 horas. A los 2 días se pueden detectar DNA fragmentado en muchas más células, la mayoría próximas al borde del infarto o en el tejido adyacente inmediato. En casos en que el marcaje es más intenso, la positividad persiste hasta el día 4 y después va desapareciendo (Love, 2000). No obstante, *Hausmann et al.*, ya observan positividad intensa a partir de 45 minutos, apareciendo el pico de máximo marcaje a las 24 h, el cual se mantiene hasta las 22 semanas (Hausmann, 2004), pico temporal que coincide con el señalado por *Cernak et al.* quienes ya no encuentran marcaje a partir de los 7 días (Cernak, 2004).

En el hipocampo y *cortex* se ha observado que el marcaje de caspasa-3 va aumentando progresivamente desde las 3 horas postreperusión hasta las 48 h, disminuyendo progresivamente a partir de ese momento (Liu, 2013).

Dressler et al. detectan el marcaje positivo más temprano a caspasa-3 a los 80 min utilizando marcadores inmunohistoquímicos y con hibridación *in situ* (TUNEL) a los 110 minutos a diferencia de los casos control, es decir encéfalos sin traumatismo, en los que no hubo marcaje de caspasa-3 y fue escaso con el ensayo TUNEL. Para cuantificar la expresión utilizaron el promedio de células marcadas positivamente en 10 campos (x40) (Dressler, 2007).

La variabilidad en el tiempo de evolución de las diferentes lesiones como acabamos de ver (Figura 5) y, los diferentes intervalos *post mortem* que varían en cada caso, incrementan la dificultad en la interpretación de los resultados.

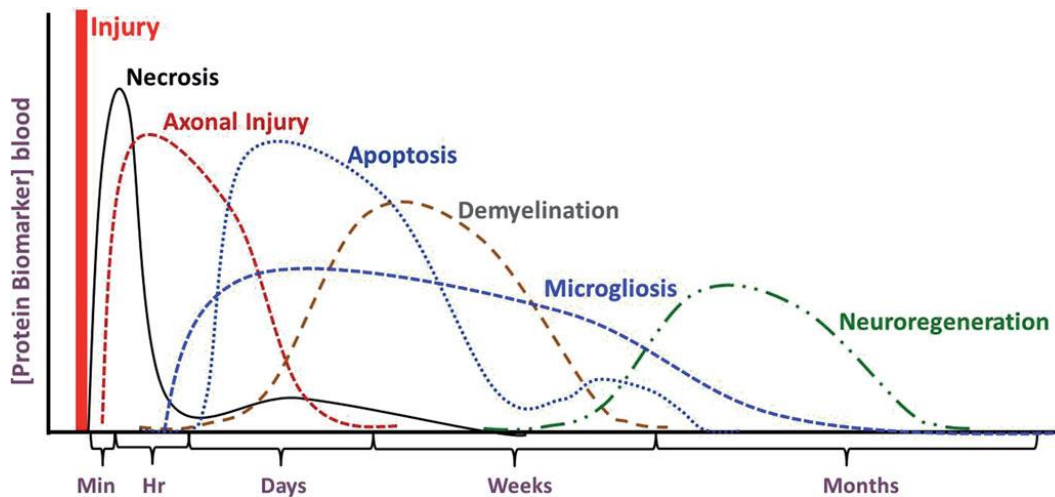


Figura 5: Cascada de marcadores de daño cerebral traumático. Los biomarcadores muestran una distinta evolución temporal según el proceso patobiológico asociado. Extraído de Mondello, S. et al, 2014 (Mondello, 2014) con permiso de la editorial John Wiley.

Fractina

La fractina es un fragmento de la subunidad beta de la actina que se produce tras la activación de las caspasas durante la apoptosis. El anticuerpo anti-fractina, por lo tanto, es un antisuero que reconoce específicamente la fractina procedente de la degradación proteica una vez activada la vía de las caspasas (pero no es capaz de reconocer la actina intacta). El anticuerpo marca tanto el núcleo como el citoplasma y las porciones proximales de los procesos neuríticos que se encuentran en apoptosis, pero no reconoce células necróticas (Yang, 1998). El marcaje nuclear reflejaría una translocación de la fractina del citosol al núcleo debida a cambios en la integridad de la membrana nuclear o a la degradación de la actina nuclear intrínseca (Rossiter, 2002). El anticuerpo identifica los axones de la corteza cerebral y de la sustancia blanca subcortical y también algunas dendritas. Además, mantiene su actividad estable en cadáveres con largos intervalos *post mortem*, características que lo hacen muy útil en el campo de la patología forense (Rossiter, 2002).

El inmunomarcaje con fractina ha sido utilizado para probar la presencia de apoptosis en cerebros de ratas neonatales tras una lesión hipoxico/isquémica (Pulera, 1998).

La fractina como fragmento de la actina activada por caspasa-3, puede ser detectada en ratas inmediatamente tras la isquemia y su expresión se eleva y permanece muy alta durante 3 a 19 h. Después de este tiempo, desciende rápidamente hasta hacerse prácticamente indetectable a las 24-48 horas (Rossiter, 2002). Evidentemente, en humanos, esta evolución temporal puede ser diferente.

Correlación β -APP y caspasa

Kilbourne et al. hallaron una correlación entre el marcaje de β -APP y Caspasa-3, en ratas que recibieron un impacto craneal. El inmunomarcaje β -APP se detectó tanto en los axones lesionados como en el

citoplasma neuronal y la caspasa-3 marcaba los núcleos en las mismas regiones cerebrales (destacando el hipocampo y el cerebelo) (Kilbourne, 2009). En este estudio el sacrificio de las ratas se demoró hasta los 7 d tras el impacto por lo que hubo bastante tiempo para la evolución de las lesiones y las áreas donde obtuvieron expresión de caspasa-3 fueron aquellas con predisposición a la isquemia. Aunque estos datos no apoyan la relación directa y precoz entre traumatismo y apoptosis, varios autores han encontrado apoptosis neuronal en el cerebro de las ratas a las que causaron un impacto craneal detectando la fragmentación del ADN mediante marcaje con TUNEL (Newcomb, 1999; Rink, 1995; Yakovlev, 1997), lo cual indica que la apoptosis está involucrada en la patología de la lesión cerebral traumática y podría contribuir al menos en parte a la muerte celular resultante después del traumatismo.

Repercusión forense

Cuando el paciente ha sobrevivido al traumatismo unos pocos días o menos, la inmunohistoquímica con suero anti- β -APP es la mejor herramienta para detectar axones dañados, la cual será positiva de 2 a 3 h después del golpe en la cabeza (Sherriff, 1994). Si el paciente sobrevive más tiempo se puede detectar una reacción celular a la lesión de la sustancia blanca (microglía) para lo cual es útil un marcador como CD68 y si se trata de un caso médico forense se debería demostrar o excluir la reacción astrocítica mediante tinciones PERLS para hemosiderina o marcadores de proteína fibrilar glial ácida (GFAP) (Geddes, 2000).

La aparición de un cambio neuronal isquémico (expansión y eosinofilia del citosol acompañadas de cariólisis) podrían sugerir una etiología de lesión o infarto de la sustancia blanca hipóxico/isquémica, pero para que este cambio histológico aparezca es necesaria una supervivencia mínima de 4-6 h en adultos (Withwell, 2021; Geddes, 2000).

Como se ha mencionado previamente, la expresión β -APP puede aparecer en determinadas entidades como en el daño hipoglucémico, en la intoxicación por monóxido de carbono o como en la esclerosis múltiple (Ferguson, 1997), en la encefalitis por VIH (Giometto, 1997) o en la malaria cerebral. Cuando se trata de traumatismos, el principal diagnóstico diferencial es la hipoxia/isquemia (focal o generalizada) que igualmente causa daño axonal con inmunoreactividad β -APP (Kaur, 1999), sobre todo cuando hay un aumento de la PIC. Una vez que la presión intracraneal se eleva, los vasos sanguíneos que penetran resultan comprimidos, llevando a la isquemia y al infarto de las áreas cerebrales por ellos perfundidas. Algunos focos de compromiso vascular en el cerebro tumefacto son comunes en traumatismos craneales y los axones próximos a tales áreas serán positivos con anti β -APP. De hecho, la mayoría de los cerebros con lesiones cerebrales fatales estarán gravemente edematizados (tumefactos) por lo que ambos daños axonales, traumático e isquémico estarán presentes en el mismo cerebro (Withwell, 2021).

La distribución anatómica de las lesiones puede proporcionar indicios sobre la etiología del daño; bien si es de origen traumático o causado por una lesión isquémica/anóxica. Un cerebro tumefacto o herniado implica que al menos una parte del daño axonal detectado tendrá un origen vascular y se encontrará en el territorio de los vasos sanguíneos colapsados por la hernia. Si, por el contrario, fuera una lesión de origen traumático, aparecerán axones inmunoreactivos dispersos o agrupados que involucran a un solo haz de sustancia blanca (Geddes, 2000). Si la supervivencia es más larga no habrá dificultad para distinguir entre infarto y daño axonal traumático atendiendo a los criterios histopatológicos clásicos. Pero la topografía de las lesiones no siempre va a servir de ayuda, ya que las áreas cerebrales donde existe compresión vascular terminal coinciden con los mismos lugares en los que se manifiesta el daño axonal traumático (Shannon, 1998). En definitiva, una supervivencia larga

permite el desarrollo de las reacciones celulares y la distinción entre daño traumático e hipóxico/isquémico es más sencillo. Por el contrario, si la supervivencia es corta, puede resultar imposible acreditar si la etiología axonal se debe a un traumatismo o tiene otro origen, sobre todo si el cerebro está tumefacto. En este sentido, siguiendo a *Geddes et al.* la inmunopositividad β -APP en general tiene utilidad en el ámbito forense para acreditar una supervivencia de al menos 2-3 h después de la lesión. De igual manera, la expresión de β -APP es un indicador de una circulación intacta durante el proceso de lesión axonal lo que implica vitalidad de la lesión, es decir, que el sujeto estaba vivo en el momento de la producción de las lesiones (Oehmichen, 1998).

Como se ha mencionado previamente, casi la mitad de los pacientes con traumatismo craneal cerrado letal y con disfunción cerebral severa, no tienen ninguna evidencia clínica de lesión intracraneal. En el examen de rutina en la autopsia, el cerebro puede mostrar un aspecto de normalidad y puede ser muy difícil definir el DAI a menos que se realice un estudio histopatológico meticuloso (Kalimo, 2004).

Un alto porcentaje de pacientes que sufre una lesión craneal de moderada a grave presenta de forma acompañante lesiones en otros órganos, con alteraciones hemodinámicas y episodios hipotensivos o hipertensivos ocasionalmente prolongados, que llevan a hipoxia o isquemia encefálica. Estas circunstancias dificultan la discriminación entre una etiología traumática o hipóxico/isquémica. Estas situaciones clínicas de isquemia surgidas tras lesión de DAI alterarían a las mitocondrias y a la permeabilidad de la membrana nuclear, lo que induciría la activación de factores pro-apoptóticos y subsidiariamente la reacción en cadena de las caspasas (Krajewski, 1999).

La trascendencia del DAI en el ámbito de la medicina legal y forense está en el posible origen violento del mismo. Cuando aparece un cadáver en el que desconocemos las circunstancias de la muerte y hay ausencia de lesiones externas, o estas son leves, ¿Cómo saber que efectivamente estamos ante un caso de DAI? Disponemos de técnicas de IHQ fiables, al alcance de la mayoría de los institutos de medicina legal. Pero una vez que hemos demostrado inmunopositividad para DAI, ¿Cómo podemos acreditar el origen de esas lesiones, si como hemos visto diferentes circunstancias (diferentes etiologías medico legales) pueden ocasionar cuadros inmunohistoquímicos e histológicos tremendamente parecidos? ¿Es el DAI detectado de origen puramente traumático? Algunos autores han hecho un esfuerzo revisando y resumiendo los mecanismos de lesión que ocurren después de una isquemia y de un trauma sin llegar a conclusiones aplicables a la práctica diaria del médico forense (Bramlett, 2004).

Como el *daño axonal difuso*, definido por primera vez como un síndrome clínico patológico en el que se produce un daño axonal traumático generalizado en el encéfalo, con implicaciones forenses evidentes, también puede ser causado por otros procesos patológicos, en este estudio nos planteamos los siguientes objetivos.

Justificación y objetivos

Justificación

Hoy día se sabe que TCE cerrados e incluso traumatismos craneales con pocas lesiones superficiales pueden causar DAI y muerte de la persona. Es posible detectar el daño axonal producido por un traumatismo con supervivencias muy cortas como 2-3 h utilizando marcadores inmunohistoquímicos. Sin embargo, la positividad de estos marcadores de DAI solo indica una interrupción del transporte axonal anterógrado rápido lo cual es independiente de la etiología de la lesión. Desde el punto de vista forense es importante excluir otras causas de patología de la sustancia blanca que ocasionan y que producen un DAI patológico difícil de diferenciar del traumático. Entre estas causas se encuentran episodios previos de hipoxia, encefalitis virales, infarto cerebral isquémico/hemorrágico, incremento de la presión intracraneal de cualquier tipo, herniación cerebral y muchas más. Las dificultades son particularmente importantes para acreditar daño traumático en casos de supervivencia corta en los que, de forma práctica, el médico forense solo dispone de métodos diagnósticos basados en la IHQ.

Acreditar o excluir un daño traumático como causa de la muerte de una persona tiene una importancia trascendental desde el punto de vista médico legal, lo cual es obvio para todos. Este proyecto de investigación pretende avanzar en la búsqueda de criterios útiles que faciliten un diagnóstico más preciso sobre el origen del DAI.

Objetivos

General:

Profundizar en la etiopatogenia del DAI para lograr discriminar entre el daño axonal de origen traumático y no traumático.

Específicos:

-Desarrollar modelos murinos de lesión traumática y de lesión isquémica en ratas. Para su demostración se utilizarán técnicas inmunohistoquímicas en modelos experimentales murinos a los que se provocará un DAI similar al que aparece en patología humana.

-Realizar modificaciones al método original de Marmarou y Foda con objeto de disminuir la mortalidad de las ratas tras el impacto e incrementar el porcentaje de DAI secundario al traumatismo.

-Investigar la influencia de la presencia o ausencia del edema/tumefacción cerebral en la evolución del DAI.

-Estudiar el paralelismo entre los resultados experimentales y casos de DAI humanos investigados en el Instituto de Medicina Legal y se analizará la repercusión de los hallazgos en la práctica forense.

MATERIAL Y MÉTODOS

(Incluye contenido del artículo publicado con DOI: 10.1111/1556-4029.15276)

Experimentos con ratas

El proyecto metodológico empleado en esta tesis ha sido evaluado y ha recibido la aprobación del Comité de Ética de la Fundación Rof Codina, Lugo, Galicia, España (Ref: 03/16/LU-002). Para su realización se ha contado con la colaboración de un cirujano veterinario de la propia Fundación.

Utilizamos un total de 40 ratas macho Sprague-Dawley con un peso de 250-300 g. Los animales fueron asignados a dos grupos aleatoriamente, según el método: traumático o isquémico. Las ratas dentro de cada grupo fueron asignadas nuevamente, de forma aleatoria, en dos subgrupos: los que recibieron una trepanación craneal descompresiva y los que no la recibieron. De esa forma, cada subgrupo estaba formado por 9 casos y 1 control. Las ratas se anestesiaron en una cámara de inducción con isoflurano al 5%. Tras la pérdida de conciencia, la rata era sacada de la cámara de inducción y recibía el mismo gas anestésico a través de una mascarilla colocada en el hocico que permitió el mantenimiento de la anestesia durante la colocación del casco y durante el impacto traumático.

A continuación, el procedimiento fue diferente en cada grupo según el grupo:

Método traumático

El impacto traumático a las ratas fue realizado siguiendo el modelo de Marmarou (Marmarou, 1994; Foda, 1994) de aceleración por impacto. Al iniciar el procedimiento tuvimos problemas con el método por lo que realizamos una valoración de cada elemento del método, hicimos una revisión y algunas modificaciones. En la revisión del método usamos 20 ratas para el método original de Marmarou y Foda y 35 ratas para el método experimental modificado.

Una vez anestesiada la rata, se efectuó una incisión longitudinal en el vértex para colocar la pieza circular de acero inoxidable (denominado disco o casco) a modo de protección craneal frente a fracturas y a la vez facilitadora de la dispersión de la energía por el cráneo en lugar de centrarse esta en el punto de impacto. Se utilizó pegamento tisular para adherir el disco directamente sobre el periostio craneal entre las suturas lambda y bregma. Para recibir el impacto la rata se colocó sobre un bloque de espuma mientras continuaba respirando el anestésico a través de la mascarilla, la cual se retiró brevemente durante el impacto y se volvió a colocar de nuevo, permaneciendo sin recibir anestesia unos 3 segundos. A continuación, el animal se colocó en la mesa del quirófano, se practicó una intubación endotraqueal y se conectó a un ventilador mecánico para pequeños animales (Naarcobit. KN-472; Natsume Seisakusho Co., Ltd. Japan) ajustado a una frecuencia respiratoria de 50 inspiraciones/minuto, 5 cc de volumen de gas, regulando el caudalímetro a 2 l de oxígeno/minuto y se monitorizó el ritmo cardíaco. De esta manera, se mantuvo al animal ventilado durante 60 minutos o hasta que la recuperación de la respiración espontánea.

Las ratas control recibieron el mismo tratamiento descrito excepto que no recibían el impacto en la cabeza.

Columna

Siguiendo el modelo original de Marmarou y Foda se utilizó una columna vertical de metacrilato de 2 m de altura, con unos diámetros externo/interno de 25 y 21 mm respectivamente. Por el interior de la columna se dejó caer un cilindro de acero inoxidable de 20 mm de diámetro y 37,2 cm de longitud, con un peso de 450 gramos. De esta forma, el peso golpeaba directamente sobre la cabeza de la rata. La única aceleración era debida a la gravedad. Era necesario provocar un único traumatismo. Para asegurar un solo impacto del cilindro y evitar su retroceso, se intentó tirar de una cuerda de freno (cordón de seda) unida a la superficie superior del cilindro de acero, inmediatamente después del impacto. Tirar del cordón justo después del impacto en décimas de segundo requería mucha precisión y gran coordinación visomotriz por lo que en algunos casos no se pudo evitar el doble impacto, algo no deseado puesto que las lesiones fueron más graves y más difíciles de estandarizar. Resultó más fácil y eficaz empujar la columna lejos de la cabeza inmediatamente después del primer impacto, evitando así un segundo impacto en la rata.

Disco protector

Se iniciaron los experimentos traumáticos, como se ha mencionado siguiendo el método original de Marmarou y Foda y se utilizó un disco metálico con unas dimensiones de 10 mm de ancho y 3 mm de espesor el cual fue pegado directamente al cráneo después de retirar el cuero cabelludo y el periostio (Figura 6A). Posteriormente, con intención de reducir el daño focal craneal, se realizó una modificación del disco que consistió en incrementar la anchura de este hasta los 20 mm, conservando el mismo grosor (versión Marmarou modificada).

Espuma

Durante el impacto, las ratas tratadas siguiendo el modelo original de Marmarou se colocaron sobre el colchón de espuma descrito en el artículo original (cama tipo E, Foam to Size Inc). En el método modificado se utilizó una cama de espuma de poliuretano termoestable (densidad 30 Kg/m³, consistencia intermedia), de 12 cm de espesor, buscando mayor elasticidad que la utilizada en el método original (Lirón Sleeping Technology comprada en Lourín Descanso, SL, Teo, A Coruña). Para minimizar las lesiones de la articulación atlantoccipital, la cama de espuma era 1,5 cm más delgada desde la zona situada debajo del cuello y tronco, como en el modelo original. Además, se desbastó la espuma para crear un hueco en la superficie para asegurar el tronco de la rata, limitar el desplazamiento lateral y evitar que el animal saliera despedido por el impacto algo que ocurrió en ocasiones de forma imprevisible. La cabeza estuvo apoyada sobre la superficie no recortada de modo

que la columna cervical permaneció perfectamente alineada con el cuerpo (Figura 6B). Esto permitió el libre movimiento de la cabeza en la dirección de la caída del peso.

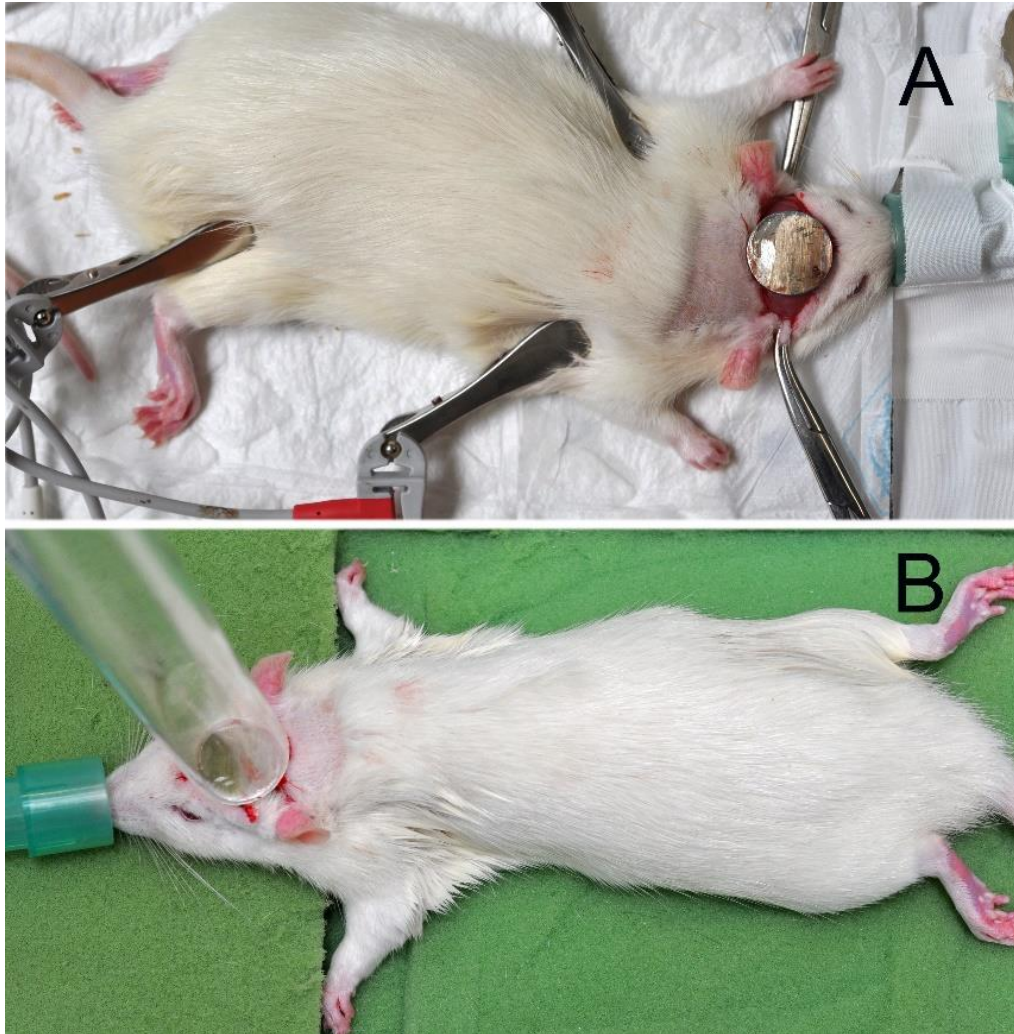


Figura 6: (A) Una vez anestesiada la rata, se realizó una incisión medial en el cuero cabelludo y se pegó al cráneo un disco metálico de 20 x 3 mm entre las suturas coronal y lambdaidea con adhesivo quirúrgico. (B) Durante el impacto, la cabeza de la rata queda un poco más alta que el cuerpo. En este momento, el plano del disco tiene una posición paralela con relación al del peso que cae. El diámetro interno del tubo de plexiglás tiene una anchura próxima a la del disco. (Figura de elaboración propia)

Método isquémico

Para ocasionar isquemia cerebral en las ratas empleamos el método de oclusión de cuatro vasos empleado por Pulsinelli (Pulsinelli, 1979; Pulsinelli 1988). De forma resumida, se practicó una incisión en la línea media dorsal del cuello y se disecaron los músculos cervicales hasta alcanzar la unión atlantoccipital. Se identificaron los forámenes alares por los que pasan las arterias vertebrales. Se introdujeron por ambos forámenes un microelectrodo monopolar y se activó la corriente. Con ello se

logró electrocoagular la arteria produciendo una oclusión de forma permanente. La contracción muscular ocasionada por el estímulo eléctrico era mínima. Posteriormente, se suturó la incisión inicial por planos y se abordó el plano ventral del cuello donde se realizó también una incisión en la línea media. Se aislaron las arterias carótidas de los planos tisulares adyacentes y se clamparon con una pinza hemostática atraumática que ocluía totalmente la circulación de la sangre durante 30 min. A continuación, se retiró la pinza y se suturó la incisión manteniendo la ventilación con oxígeno durante otros 3 minutos lo que aseguraba la eliminación del gas anestésico. Tras la retirada de la ventilación se esperó a que el animal recuperara la conciencia tras anestesia y se levantara por sí mismo antes de devolverlo a su jaula.

La rata estuvo permanentemente monitorizada con ECG desde el momento de la inducción de la anestesia hasta la recuperación total.

El método isquémico se aplicó a 18 ratas. Dos ratas utilizadas como controles fueron anestesiadas, se les realizaron los abordajes, pero no se les provocó la isquemia.

Craniectomía descompresiva

Una vez terminada la aplicación de la técnica traumática o isquémica según corresponda, las ratas, como se ha mencionado, fueron a su vez separadas de forma aleatoria en dos grupos.

En el caso de las ratas con traumatismo, a un subgrupo se les retiró el casco protector, se suturó la piel, se retiró la anestesia y se devolvieron a la jaula. Y al otro subgrupo, después de retirar el casco protector, recibieron una craniectomía descompresiva.

En el caso de las ratas asignadas al tratamiento isquémico, a un subgrupo después del clampaje de las arterias carótidas durante 30 min se les practicó la trepanación craneal. Y el otro grupo no recibió la trepanación.

Para la trepanación se utilizó el método de Levasseur modificado (Levasseur, 1975).

Siguiendo este método, y después de retirar el periostio de la calota, con un micromotor quirúrgico montado con una fresa metálica redonda se perforó suavemente ambos huesos parietales del cráneo manteniendo una irrigación continua de suero fisiológico sobre la zona. Los trépanos consistieron en dos ventanas ovales, una en cada hemisferio, respetando sin perforar la línea media de la bóveda craneal y así no alterar el flujo venoso del seno longitudinal superior (Fig. 7). A continuación, se disecó la duramadre retirando un fragmento ovalado siguiendo los bordes del trépano óseo. Después se suturó la piel, se suspendió la administración de gases anestésicos y, una vez recuperado el animal, se devolvió a su jaula.



Figura 7: Cráneo trepanado con micromotor en una rata anestesiada. Se realizaron dos perforaciones ovaladas en ambos huesos parietales. Se respetó, sin perforar la línea media (sutura parietal), para no causar artefactos en el seno longitudinal superior que se encuentra justo debajo. (Figura de elaboración propia)

Sacrificio y fijación de los órganos

Una vez concluidos los experimentos, se suturó el cuero cabelludo y las ratas supervivientes se mantuvieron con su habitual ciclo de luz-oscuridad de 12 horas alternantes y con acceso libre a comida y bebida. Transcurridas 24 horas las ratas se sacrificaron.

Para el sacrificio, las ratas fueron nuevamente anestesiadas con isoflurano en una cámara de inducción manteniendo la anestesia con mascarilla. Se realizó una incisión medial de tórax y abdomen, se inyectó 0,1 ml de heparina al 5% mediante punción en ventrículo izquierdo, y a continuación se introdujo una aguja en la aorta ascendente por la que perfundió suero fisiológico durante unos minutos hasta que la sangre que retornaba a la aurícula derecha, que previamente se había seccionado, se tornaba casi transparente. En ese momento se introdujo por la misma aguja de punción formaldehído al 4% durante 20 minutos para causar la fijación de todos los tejidos, lo cual era evidente por incrementar la dureza al tacto (Fig 8). Después del sacrificio, con unas tijeras finas se realizó una craniectomía estándar y la sección de las láminas de las primeras vértebras cervicales para la remoción del encéfalo y tronco encefálico en bloque. Estos órganos se sumergieron en formol durante 24 horas, y después en alcohol etílico de 70° hasta el momento del procesado histopatológico.

Se realizó necropsia a las ratas que habían muerto durante la primera hora posterior al impacto para determinar la causa de la muerte.

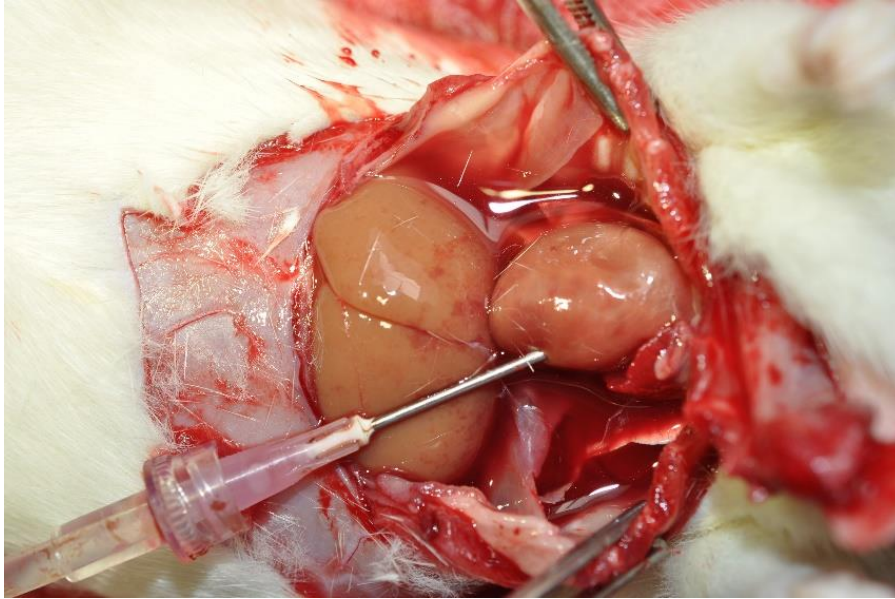


Figura 8: Sacrificio y fijación mediante perfusión de los órganos de las ratas con formol. La aorta ascendente de la rata anestesiada es puncionada a través del ventrículo izquierdo para perfundir formol. En las cavidades pleurales se observa el suero procedente de la aurícula derecha seccionada dos minutos antes. (Figura de elaboración propia)

Controles

En cada uno de los cuatro grupos creados se asignó 1 rata como control, de forma que al final tenemos 2 controles de método traumático, 2 controles de método isquémico y 2 controles de trepanación craneal, en las que se realizó exactamente el mismo proceso, pero sin traumatismo en el método traumático y sin ocasionar oclusión ni electrocauterización de los vasos sanguíneos en el método isquémico.

Tallado del encéfalo de la rata

Una vez fijados, empleamos una matriz para cerebros de ratas (Fig 9A) y cuchillas de corte “Valet” (Fig 9B).



Figura 9: (A) Matriz para cerebros de rata. (B) Cuchillas “Valet” para la realización de los cortes encefálicos. (Figura de elaboración propia)

Los encéfalos recibieron 3 cortes coronales de 5 mm de espesor, con lo que se obtuvieron 4 divisiones o secciones nombrados de A-D, (Figura 10):

- Sección A: Bloque de tejido situado entre los bulbos olfatorios y los pedúnculos cerebrales.
- Sección B: Bloque de tejido situado entre los pedúnculos cerebrales y la protuberancia en su tercio medio.
- Sección C: Bloque de tejido situado entre el tercio medio de la protuberancia hasta la médula espinal.
- Sección D: Representado por los polos frontales anteriores a la sección A y bulbos olfatorios

Tras observar que las lesiones y la inmunexpresión de las proteínas de interés aparecían mayoritariamente en los tejidos de la sección A (región supratentorial) y en la protuberancia de la sección C (región infratentorial) se eligieron estas zonas para focalizar nuestro estudio.

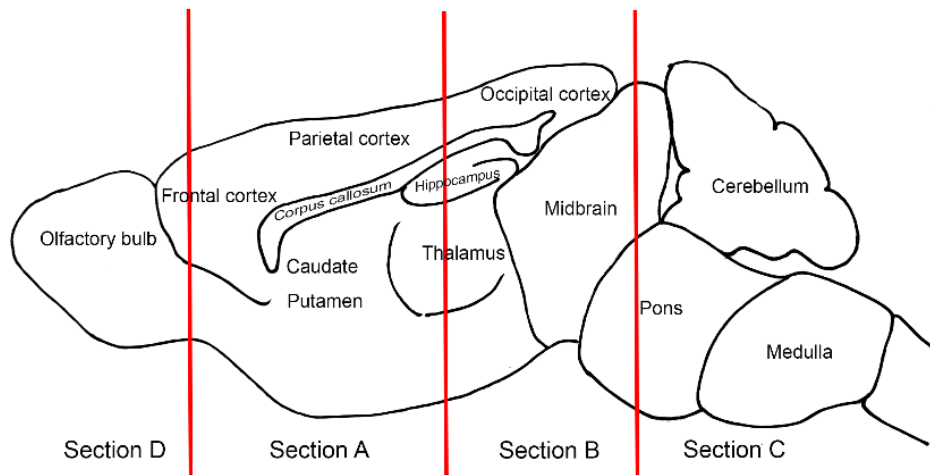


Figura 10. Esquema del cerebro de la rata desde el lado izquierdo en el que se muestran los tres cortes coronales (líneas rojas) realizados, resultando 4 secciones. Las secciones A y C mostraron la máxima expresión con el B-APP, por lo que fueron los escogidos para la cuantificación del DAI. (Figura de elaboración propia)

Las muestras fueron incluidas posteriormente en parafina. Se realizaron cortes de 4 μm de espesor que fueron montados en portaobjetos de microscopio FLEX IHC (Dako-Agilent, Carpinteria, CA). Se efectuaron tres cortes de cada bloque, uno de ellos se destinó a tinción con hematoxilina-eosina y los otros dos para la realización de la técnica inmunohistoquímica. Tras desparafinación y recuperación antigénica (durante 20 minutos a 97°C en EnVision FLEX solución Target Retrieval a pH elevado), se marcaron con anticuerpos para demostrar β -APP y fractina.

La inmunohistoquímica fue realizada de forma automática usando un AutostainerLink 48 inmunostainer (Dako-Agilent). Brevemente, las muestras fueron incubadas siguiendo los siguientes pasos:

- 1) Incubación de las secciones a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal anti β -amiloide de conejo (Invitrogen Cat# 51-2700, Waltham, MA) a una concentración de 1:100 durante 20 min o con el anticuerpo policlonal anti fractina de conejo (Millipore Cat# AB3150, Temecula, CA) a una concentración de 1:1000 durante 20 minutos.
- 2) Bloqueante de peroxidasa 10 minutos.
- 3) Incubación en EnVision Dual Link system-HRP (polímero de dextrano conjugado con peroxidasa de rábano picante e inmunoglobulinas de cabra anti-conejo y anti-ratón) durante 20 min.
- 4) Detección del complejo antígeno-anticuerpo utilizando 3,3'-diaminobencidina-tetrahidrocloruro-dihidrato (DAB) durante 10 min.
- 5) Tinción de contraste con hematoxilina EnVision FLEX durante 9 min.

Entre las distintas etapas se lava con tampón fosfato salino (PBS, pH 7.2) y después del paso 4 con agua destilada. Los cristales fueron estudiados al microscopio óptico y para cuantificar el marcaje inmunohistoquímico se utilizó el método de Johnson (Johnson, 2011) explicado en el apartado llamado "análisis de IHQ".

Análisis inmunohistoquímico

Para cuantificar el marcaje inmunohistoquímico se utilizó el sistema propuesto por Johnson en el año 2011 (Johnson, 2011) con una modificación como se comenta más adelante. Dicho sistema realiza un primer nivel de clasificación (negativo, focal y multifocal):

Negativo: ausencia de marcaje

Focal: Marcaje solamente en un área de la muestra

Multifocal: Marcaje en más de un área de la muestra, separadas al menos por un campo de 200x (en el artículo original el campo de separación se hacía a 100x)

Dentro de cada una de estas categorías se establecen tres niveles de clasificación (leve, moderado y severo):

Leve: 1-3 axones marcados por campo de 400x

Moderado: 3-10 axones por campo de 400x

Severo: Más de 10 axones marcados por campo de 400x

Combinando estos dos niveles de evaluación y asignando a cada combinación un número de menor a mayor expresión, obtuvimos un valor numérico de cada caso, lo que facilita las comparaciones.

Las valoraciones creadas en función del resultado fueron las siguientes:

- Negativo (NEG): 0 puntos
- Focal leve (FL): 1 punto
- Focal moderado (FM): 2 puntos
- Focal severo (FS): 3 puntos
- Difuso leve (DL): 4 puntos
- Difuso moderado (DM): 5 puntos
- Difuso severo (DS): 6 puntos

Esto nos permitió comparar cada uno de los cortes entre sí. Como de cada encéfalo hemos utilizado dos cortes para nuestra investigación, uno de la sección A (supratentorial) y otro de la sección C (infratentorial) hemos tomado la numeración más elevada para la conclusión final de ese caso. Así mismo dos resultados focales sumaron entre sí un resultado multifocal. A modo de ejemplo, si un corte fue DL y el otro de la misma rata fue DM, la conclusión del caso fue DM. Y si un corte fue FL y el otro fue FM, el caso se concluyó como DM.

Encéfalos humanos

Los casos seleccionados para este estudio fueron investigados en el Instituto de Medicina Legal de Galicia (Imelga) durante los años 2014-2021. Este estudio se presentó como un proyecto que recibió la aprobación del Comité de Ética de Investigación de Santiago-Lugo, de la Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia (Ref: 2014/217).

Se seleccionaron víctimas adultas con un mecanismo lesional compatible con DAI, con o sin TCE, con una supervivencia mínima de 4 horas. Los casos con TCE se asignaron al grupo denominado grupo "traumatismo". Por otra parte, se seleccionaron casos de individuos adultos con lesión encefálica cuyas lesiones tuvieron un origen isquémico sin ningún tipo de participación traumática. Estos casos se catalogaron como el grupo "isquemia".

En los casos seleccionados de ambos grupos, traumatismo e isquemia, las autopsias médico-legales se realizaron durante las primeras 24 h tras el fallecimiento. Los casos recogidos tienen las siguientes características recogidas en la tabla 2:

Tabla 2: Casos humanos provenientes de autopsias médico-legales

Lesión	Edad	Evento	Superviv.	Causa muerte
Traumática	54	Precipitación	4h 45 min	Trauma vasos sanguíneos abdomen
Traumática	27	Tráfico	9h	Fractura basilar compleja-Contusión cerebral
Traumática	74	Atropello	6d 12 h	Shock traumático
Isquémica	47	Ahorcadura	48 h	Encefalopatía anóxica
Isquémica	39	Crisis asmática	22 h	Encefalopatía anóxica
Isquémica	45	Ahorcadura	14d	Encefalopatía anóxica

Durante la autopsia y antes de extraer el encéfalo, se siguieron las recomendaciones propuestas por Kalimo et al. {{73 Kalimo,H. 2004;}}, que se focalizaron en una detallada inspección externa y una manipulación adecuada del tejido nervioso para documentar información relevante: hematomas intracraneales extradurales/intradurales, hemorragia subaracnoidea, contusión cerebral, edema focal, herniaciones, deformidad anatómica, cirugía previa, lesiones patológicas, anomalías congénitas y otras. A continuación, se retiró el encéfalo, y se sumergió en formaldehído al 4% durante 3 semanas para su fijación.

Tallado del encéfalo

El tronco del encéfalo y el cerebelo fueron separados de los hemisferios cerebrales mediante una sección a nivel del mesencéfalo. El tronco del encéfalo lo aislamos del cerebelo mediante sección de los pedúnculos cerebelosos y después fue seccionado en sentido axial a intervalos de 5 mm. Los hemisferios cerebelosos fueron cortados por la línea media y luego seccionados sagitalmente a intervalos de 1 cm a lo largo de cada hemisferio. Los hemisferios cerebrales se seccionaron mediante cortes coronales comenzando en los cuerpos mamilares y seguido de cortes a intervalos de 1 cm todo a lo largo de los hemisferios.

Muestreo

Se tallaron bloques de las siguientes regiones para el examen histopatológico:

- Sustancia blanca parasagital del lóbulo frontal
- Rodilla del cuerpo caloso
- Cuerpo del cuerpo caloso
- Ganglios basales
- Tálamo

- Tálamo con la extremidad posterior de cápsula interna
- Tálamo con el cuerpo mamilar
- Lóbulo parietal con la sustancia blanca profunda
- Rodete del cuerpo calloso
- Cerebelo con el pedúnculo cerebeloso medio
- Lóbulo temporal con el hipocampo
- Mesencéfalo
- Puente con el pedúnculo cerebeloso superior
- Bulbo cerebral
- Médula espinal
- Cualquier otra región con lesión traumática que pudiera ser relevante para el caso

Tras varias pruebas se escogieron para su procesamiento:

- Tálamo con la extremidad posterior de cápsula interna
- Cerebelo con el pedúnculo cerebeloso medio
- Lóbulo temporal con el hipocampo
- Puente con el pedúnculo cerebeloso superior

Tras la inclusión en parafina se realizaron cortes de 4 μm de espesor que fueron montados en portaobjetos de microscopio FLEX IHC (Dako-Agilent, Carpinteria, CA). Se realizaron dos cortes a cada bloque, uno para tinción con hematoxilina-eosina y otro para técnicas de inmunohistoquímica. En este último corte, tras desparafinación y recuperación antigénica (durante 20 minutos a 97°C en EnVision FLEX solución Target Retrieval a pH elevado), el procesado fue realizado de forma automática usando el AutostainerLink 48 inmunostainer (Dako-Agilent). Brevemente, las muestras fueron incubadas siguiendo cuatro pasos:

- 1) Incubación de las secciones a temperatura ambiente con anticuerpo policlonal de conejo contra β -amiloide (Invitrogen Cat# 51-2700, Waltham, MA) a una dilución de 1:100 durante 20

minutos o con anticuerpo policlonal de conejo anti-Fractina (Millipore Cat# AB3150, Temecula, CA) a una dilución de 1:1000 durante 20 minutos.

- 2) Bloqueante de la peroxidasa 10 minutos.
- 3) Incubación en EnVision Dual Link system-HRP (polímero de dextrano conjugado con peroxidasa de rábano picante e inmunoglobulinas de cabra anti-conejo y anti-ratón) durante 20 min.
- 4) Detección del complejo antígeno-anticuerpo utilizando 3,3'-diaminobencidina-tetrahydrocloruro-dihidrato (DAB) durante 10 min.
- 5) Tinción de contraste con hematoxilina EnVision FLEX durante 9 min

Entre los distintos pasos las secciones se lavan con PBS y después de la DAB con agua destilada. Las secciones histológicas fueron examinadas con el microscopio óptico y el marcaje inmunohistoquímico fue cuantificado según el método de Johnson (Johnson, 2011) idéntico al usado en los cerebros de rata mencionado más arriba, con la salvedad de que, en los casos multifocales, con más de un área marcada en la muestra, éstas deben estar separadas al menos por un campo de 100x (al igual que en el artículo original).

Para describir los resultados de los diferentes grupos con los distintos marcadores inmunohistoquímicos se utilizaron frecuencias absolutas (y porcentajes). Para comparar entre marcadores en diferentes situaciones se ha utilizado la prueba de Chi-cuadrado. En las representaciones gráficas hemos utilizado diagramas de cajas. Para el análisis de los datos hemos utilizado el programa estadístico SPSS para Windows, versión 22.

Resultados

(Incluye contenido del artículo publicado con DOI: 10.1111/1556-4029.15276)

Modificación del método de Marmarou

En el modelo Marmarou modificado, empleando el mismo tubo de plexiglás y el mismo cilindro, pero con un disco protector de 20 mm de ancho, una cama de espuma más elástica y modificando la posición de rata, la tasa de supervivencia a las 24 h subió al 80% (28 de 35 ratas) ($P = 0,02$). Esto fue significativamente mayor que la tasa de supervivencia del 50 % utilizando el modelo original de Marmarou.

En el modelo modificado se encontraron contusiones cerebrales corticales en 4 de las 35 ratas (2 de las cuales mostraron fractura craneal), por lo que el 11,4% de las ratas presentaron lesión local fatal. Las lesiones cervicales superiores letales aparecieron en 3 de los 35 casos (8,5%). Cabe destacar que 24 de las 28 ratas supervivientes (85,7%) mostraron DAI; un porcentaje significativamente mayor que el 20% obtenido utilizando el modelo original de Marmarou ($P < 0,001$) (Tabla 2).

Se identificaron daños menos graves generalmente asociados con DAI, que incluían hemorragia subaracnoidea difusa, pequeñas contusiones corticales y congestión vascular generalizada, con una frecuencia similar utilizando ambos modelos (72,2% con el modelo original de Marmarou versus 73,3% con nuestro modelo modificado) (Figura 11)

La necropsia de las ratas reveló que las causas de muerte antes de las 24 horas fueron muy similares en ambos modelos, sin embargo, las frecuencias fueron diferentes. La mayoría se debieron a lesión ósea y vascular en la unión atlanto occipital asociada a daño directo al tronco encefálico. Otras se debieron a contusiones cerebrales debajo de fracturas hundidas de cráneo.

Así, en la replicación del modelo original de Marmarou, 3 ratas mostraron algunas lesiones letales no intencionadas, como contusión cerebral cortical, y 4 ratas presentaron fracturas de cráneo hundidas con hemorragia intraparenquimatosa (Figura 11). Estas lesiones focales (clasificadas como “lesión local” en la tabla 2) aparecieron en el 35% de los casos. Otras lesiones no deseadas y letales en la articulación atlanto occipital, como dislocación y/o sangrado, aparecieron en 3 ratas (15%). Sin embargo, el hallazgo más preocupante fue que sólo 2 (20%) de las ratas supervivientes presentaron DAI (Tabla 3).

Tabla 3: Resultados obtenidos de los experimentos en nuestro laboratorio. El 80% de las ratas sobrevivió 24 h en el modelo de Marmarou modificado (columna derecha) en comparación con el 50% en el modelo original (columna izquierda).

	Nº Casos con el modelo original de Marmarou	Nº Casos con el modelo de Marmarou modificado
Número de ratas	20	35
Supervivencia a las 24 h	10/20 (50 %)	28/35 (80%)
Casos en los que se demostró DAI (en las ratas que sobrevivieron)	2/10 (20%)	24/28 (85.7%)
Lesión local letal cerebral	7/20 (35%)	4/35 (11.4%)
Lesión letal atlanto occipital	3/20 (15%)	3/35 (8.5%)

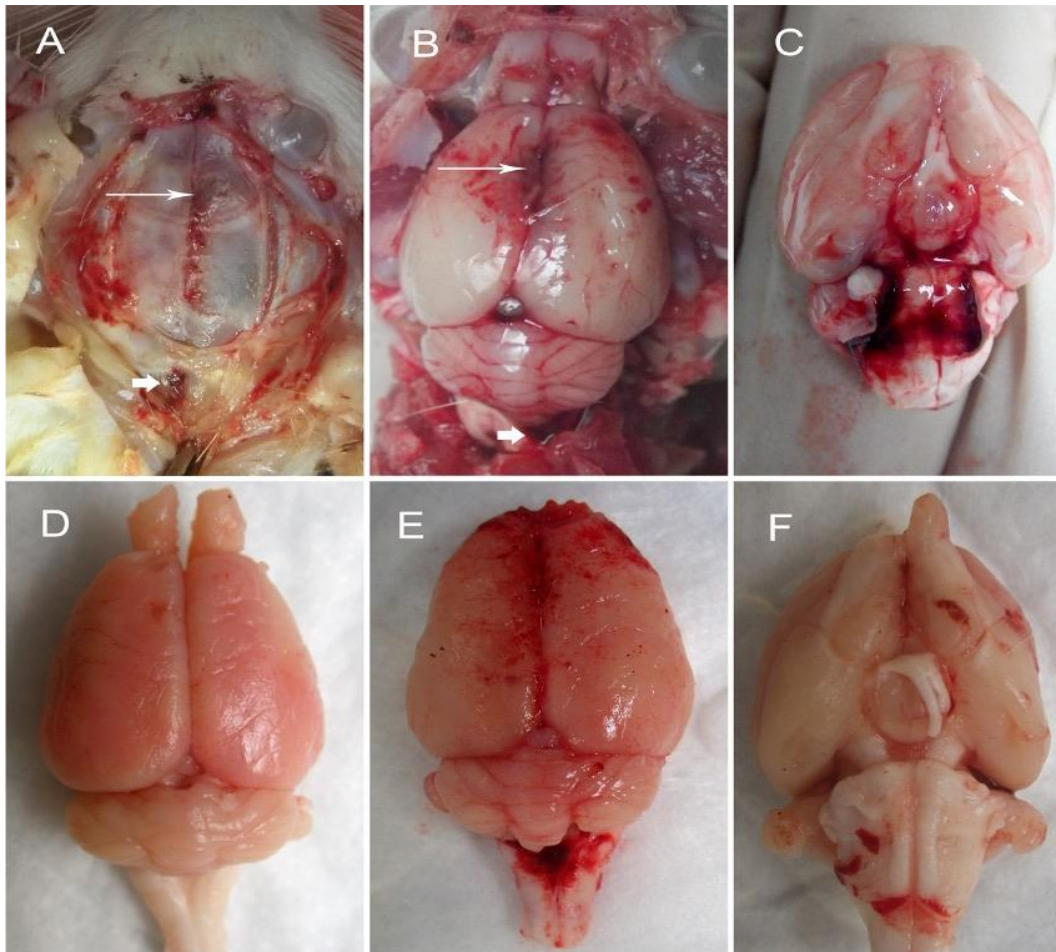


Figura 11: Aspecto macroscópico del cerebro de la rata tras el impacto. A, B y C pertenecen a la misma ratona en el grupo del método original de Marmarou. La ratona no recuperó la respiración espontánea 1 h después del impacto y murió. Al animal, que no se ha perfundido con formaldehído, tras la muerte se realizó una necropsia estándar. (A) En la imagen se observa una fractura de cráneo frontal deprimida (flecha delgada) y lesión cervical (flecha gruesa). (B) Vista superior del cerebro que muestra contusión frontal (daño local) (flecha delgada), hemorragia del tronco encefálico (flecha gruesa) y hemorragia subaracnoidea difusa. (C) La vista ventral del cerebro muestra una hemorragia subaracnoidea más intensa debajo del hipotálamo, pedúnculos cerebrales y hemorragia subdural en la protuberancia y signos de la médula que indican una lesión grave del tronco encefálico. D, E y F muestran cerebros de tres ratas en el grupo del método Marmarou modificado. Las ratas sobrevivieron 24 h, fueron anestesiadas y perfundidas con formaldehído y luego sacrificadas. Los cerebros muestran congestión vascular grave (D), hemorragia subaracnoidea difusa (E) y lesión leve de la médula espinal superior (E y F). Las tres ratas mostraron lesión axonal difusa. *(Figura de elaboración propia)*

Utilizando el modelo de Marmarou modificado, la mayoría de los cerebros de las ratas (79,16%) mostraron inmunotinción multifocal (difusa) para β -APP. Cinco casos (20,83%) presentaron positividad para β -APP en el punto focal de impacto o en la corteza cerebral basal (lesiones por contragolpe). En cuanto a la intensidad de expresión, la mayoría de los cerebros mostraron positividad severa (18 de 24 ratas), en menor medida moderada (5 de 24) y solo un caso se consideró leve (Tabla 4). Las dos únicas ratas en el grupo del modelo original de Marmarou que presentaron DAI mostraron una positividad severa para β -APP multifocal. Las características de DAI fueron similares en ambos grupos de estudio. Lamentablemente la comparación estadística no fue posible debido al número limitado de casos de DAI en el grupo modelo original de Marmarou.

Tabla 4. Expresión semicuantitativa de β -amiloide tras 24 horas de supervivencia en ratas con el modelo de Marmarou modificado.

Distribución	Resultado + (%)	Intensidad	Resultado (%)
Focal	5 (20.83%)	Leve	1 (4.16%)
		Moderado	0 (0%)
		Severo	4 (16.66%)
Multi-focal	19 (79.16%)	Leve	0 (0%)
		Moderado	5 (20.83%)
		Severo	14 (58.33%)

La inmunorreactividad para β -APP se detectó principalmente en la corteza cerebral dorsal (parietal) y el cuerpo calloso muy cerca del lugar del impacto, pero también en lugares más alejados como la corteza basal, el núcleo caudado, el putamen y la protuberancia (habitualmente la región rostral). Este patrón de distribución fue similar en ambos grupos de modelos (Figura 12).

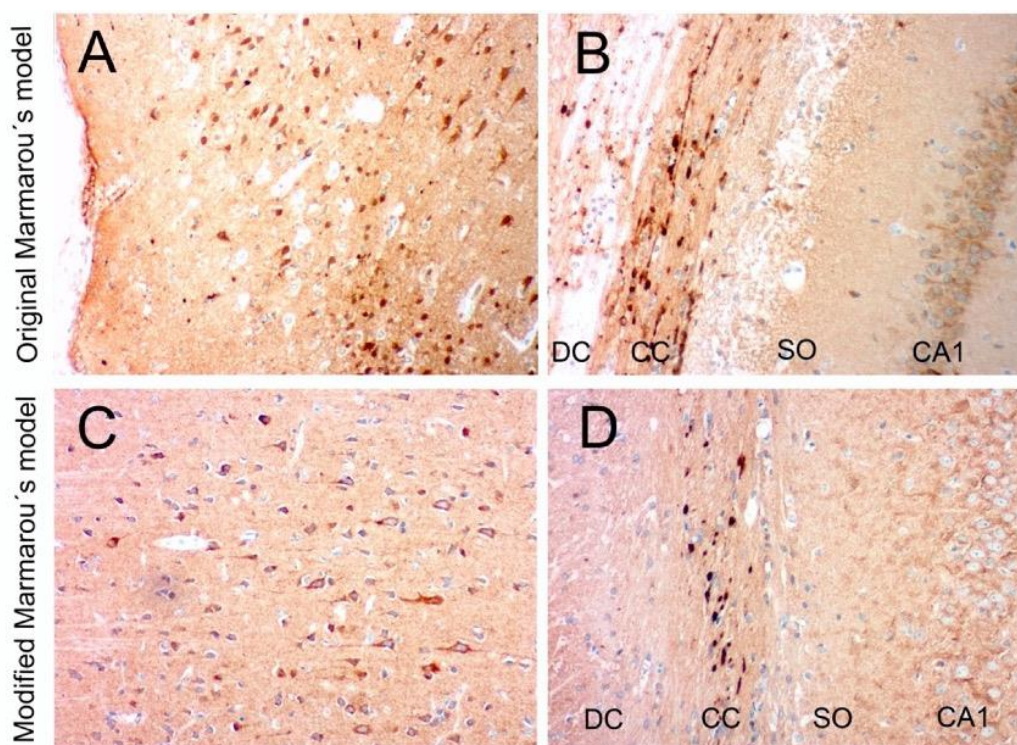


Figura 12: Tinción inmunohistoquímica con anticuerpos anti-precursor del β -amiloide (β -APP) en secciones de cerebro de ratas 24 horas después de un impacto craneal severo siguiendo el modelo de Marmarou (A-B), y con el modelo modificado (C-D). El marcaje inmunohistoquímico fue similar en ambos grupos. La β -APP se acumula positivamente en las neuronas después de un impacto severo en la corteza dorsal (A, C). Se identificó daño axonal en el cuerpo calloso mediante el anticuerpo anti β -APP con forma de bulbos y en algunas fibras (B, D). CD: corteza dorsal; CC: Cuerpo Calloso; SO: hipocampo del estrato Oriens; CA1: Campo CA1 Capa piramidal de la asta de Amón. Todas las imágenes se obtuvieron a 100 X. (Figura de elaboración propia)

Protocolo experimental

Con el protocolo experimental utilizado hemos obtenido una tasa de supervivencia a las 24 h del 80%. O lo que es lo mismo, una mortalidad del 20%. Eso significa que la mortalidad disminuye un 30% respecto del modelo original. Con las modificaciones realizadas se producen igualmente lesiones graves, encontrando DAI en un 85,7% de las ratas supervivientes. Este porcentaje es significativamente mayor ($p < 0,001$) del obtenido utilizando el modelo original de Marmarou (20%). Se identificaron, además, en nuestro modelo, daños menos graves que en el modelo original, generalmente asociados con DAI, incluida hemorragia subaracnoidea difusa, pequeñas contusiones corticales y congestión vascular generalizada.

La necropsia reveló que las causas de muerte antes de las 24 horas fueron muy similares en ambos modelos (el original y el modificado), sin embargo, las frecuencias fueron diferentes. La mayoría de las lesiones que aparecen se debieron a lesiones óseas y vasculares en la unión atlanto occipital asociadas con daño directo al tronco del encéfalo (Fig. 13). En algunos casos se debieron a contusiones cerebrales debajo de fracturas de cráneo hundidas.

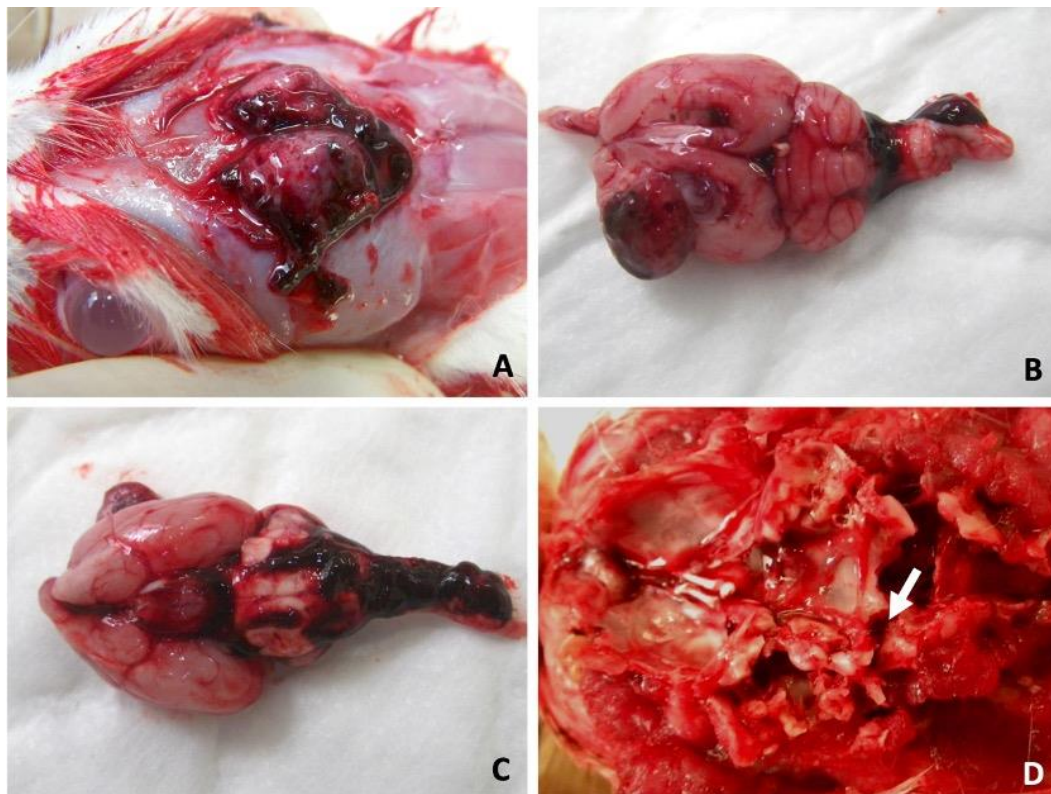


Figura 13: Imagen de una rata que, tras recibir el traumatismo, se le realizó una craniectomía descompresiva (A). La rata murió pesar de recibir ventilación asistida durante 60 min. Hay una gran tumefacción/edema que se hernia a través de la ventana de la craniectomía (B). La necropsia mostró hemorragia bulbo medular (C) y una fractura-luxación atlanto-occipital (flecha) (D). *(Figura de elaboración propia)*

Expresión de β -Amiloide en lesión traumática y en isquemia

La demostración inmunohistoquímica de β -APP reveló el daño axonal en el cerebro de las ratas lesionadas. Todas las ratas con lesión traumática fueron positivas, es decir 9 de los 9 casos de la muestra. De éstos, 7 casos fueron difusos (4 moderados y 3 severos) y 2 casos fueron focales severos. En el grupo de lesión traumática con craniectomía descompresiva, se observaron 8 positivos del total de 9 casos, siendo todos difusos severos.

En el grupo de isquemia, 5 casos fueron negativos para β - Amiloide del total de 9 casos. De los 4 casos positivos, 2 fueron difusos (1 moderado y 1 leve) y 2 fueron focales leves. En el grupo de isquemia más craniectomía descompresiva, de los 9 casos, 7 fueron negativos y 2 fueron positivos difusos leves (Tabla 5).

Tabla 5: Resultados generales obtenidos con la inmunotinción β -APP en los cuatro grupos de ratas realizados en el modelo experimental.

Marcador	Ensayo	Gravedad	Cuenta Rata
Amiloide	Isquemia	DL	1
		DM	1
		FL	2
		NEG	5
		Total Isquemia	9
	Isquemia Craniectomía	DL	2
		NEG	7
		Total Isquemia Craniectomía	9
	Trauma	DM	4
		DS	3
		FS	2
		Total Trauma	9
	Trauma Craniectomía	DS	8
		NEG	1
	Total Trauma Craniectomía	9	
Total Amiloide		36	

Áreas con una mayor positividad para β -APP

El 94,4% de los casos del grupo de traumatismo mostraron daño axonal β -APP positivo, frente al 33,3% observado en los casos del grupo con mecanismo lesional isquémico, una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$). En las ratas craniectomizadas, considerando juntos el mecanismo traumático y el vascular, el 55,6% mostraron lesiones inmunopositivas, frente al 44,4% de ratas que fueron negativas.

La inmunorreactividad para β -APP en los casos traumáticos apareció con mayor intensidad y de forma más frecuente en el cuerpo caloso, el tálamo y en las pirámides de la protuberancia. Pero también en otras áreas como el hipocampo, los pedúnculos cerebelosos, las capas V-VI de la corteza, la zona OS y los núcleos periolivares. (Fig. 13). En los casos isquémicos, las áreas más afectadas han sido el cuerpo

calloso y las capas V-VI de la corteza, aunque también apareció en caudado-putamen, pirámides y áreas adyacentes. Comparando los casos con y sin craniectomía, incluyendo el grupo traumatismo y el grupo de isquemia, el 72,2% de las ratas sin craniectomía mostraron lesión. En los casos que se le había realizado la craniectomía el porcentaje descendió al 55,6% (Tabla 6).

En los controles no se encontró inmunopositividad para β -APP en ninguna sección cerebral, en ninguno de los controles (trauma, isquemia o craniectomía).

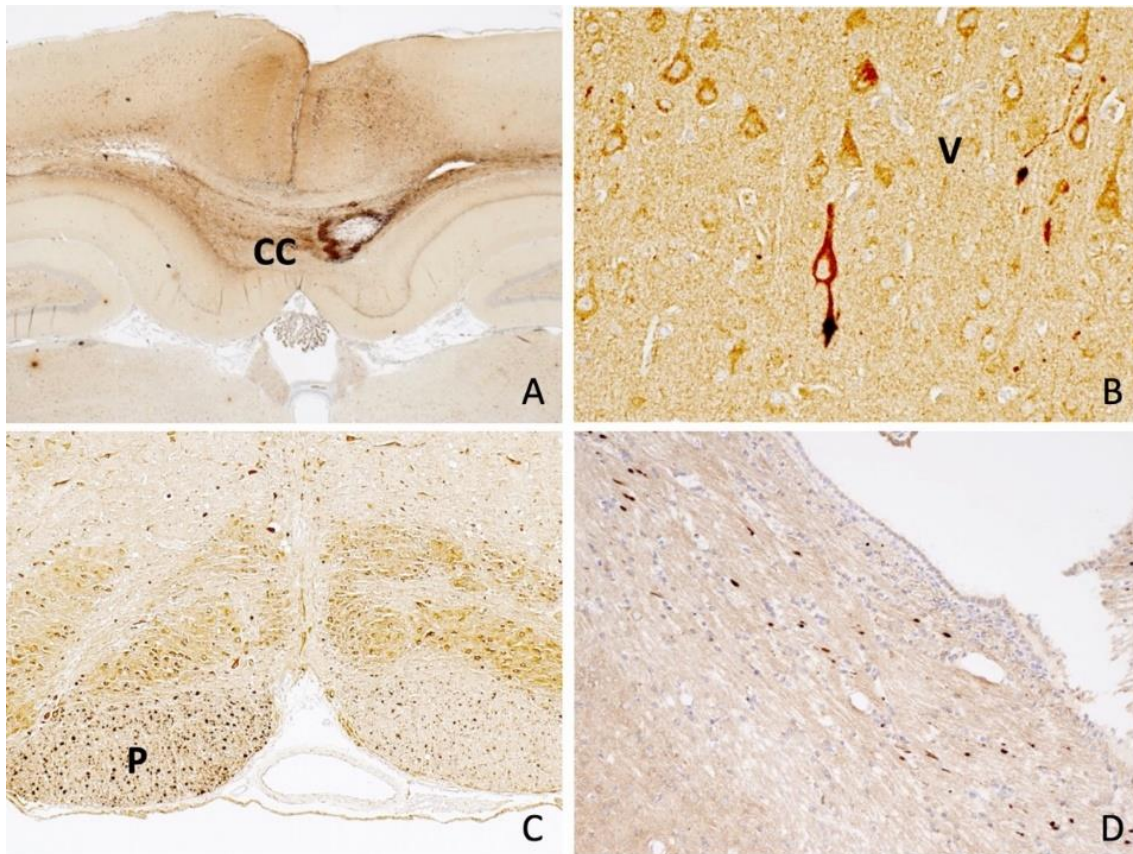


Figura 14: Secciones de encéfalo de rata con lesiones por traumatismo con craniectomía descompresiva marcadas con B-APP. Algunos axones del cuerpo calloso (CC) muestran intensa positividad (A, objetivo 1.25x). En la corteza cerebral se observa positividad en las neuronas piramidales de la capa V (B, objetivo 20x). Axones seccionados transversalmente en las pirámides cerebrales (P). Los axones tienen forma puntiforme debido al plano de corte. En este caso la lesión es más intensa en una de las pirámides que en la otra (C, objetivo 4x). Bulbos de retracción en el hipotálamo marcado con B-APP (D, objetivo 10x). (Figura de elaboración propia)

Tabla 6: Porcentajes de lesión usando el β -APP como marcador para los distintos grupos experimentales

Grupo	Marcador IHQ	Casos con lesión (%)	Craniectomía	Casos con lesión (%)
Isquemia	Amiloide	33,3	Sí	22,2
			No	44,4
Trauma	Amiloide	94,4	Sí	88,9
			No	100
Total (Isquemia + Trauma)	Amiloide	63,9	Sí	55,6
			No	72,2

El β -APP marcó selectivamente los axones lesionados, que tomaban como formas más habituales las de bulbos axonales (esferoides) y axones varicosos (filamentos gruesos) (Figura 14)

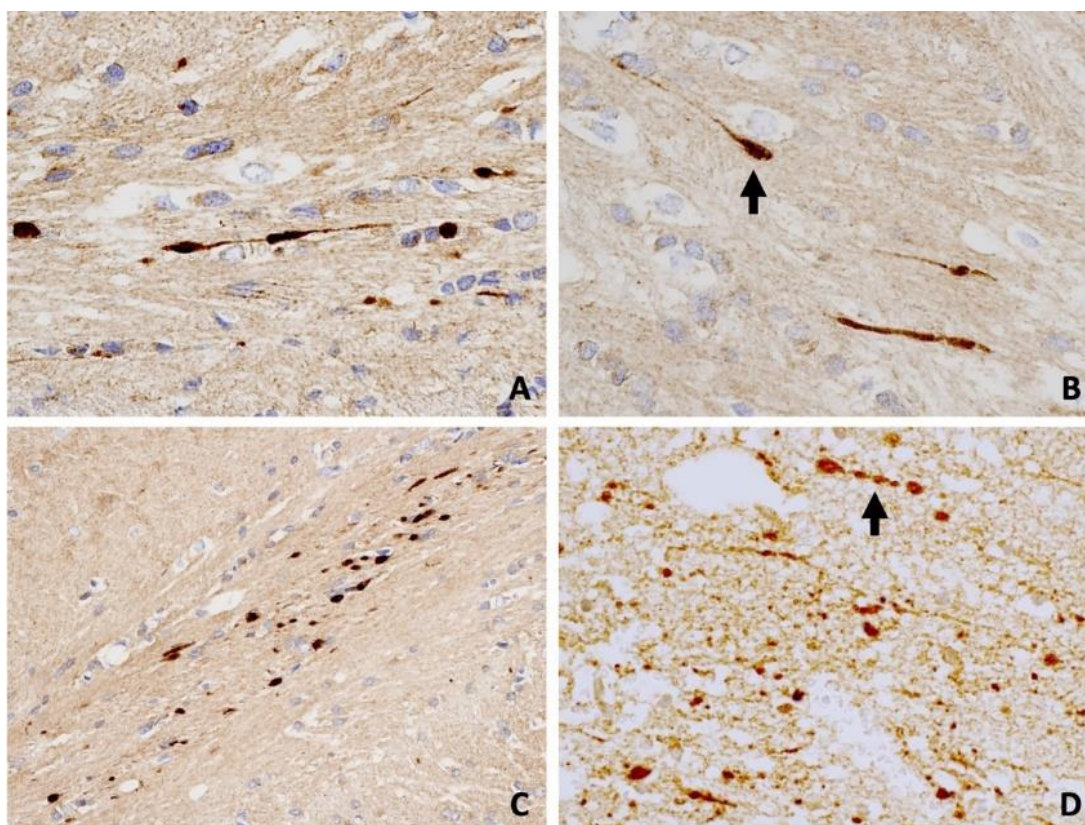


Figura 15: En las microfotografías teñidas con β -APP se observan las imágenes características de daño axonal. En esta imagen se ven dos bulbos axonales en un caso al que se le ha provocado un traumatismo sin craniectomía en un corte longitudinal del axón por lo que aparece con forma de “cometa” (A, B, objetivo 40x). Cuando la sección del axón es transversal, su forma es circular (C, objetivo 20x). Varicosidades o rosarios positivos a nivel de cuerpo calloso junto con punteado que se corresponde con secciones transversales de axones (D, 20x) (Figura de elaboración propia)

En los casos de afectación vascular isquémica, los casos positivos para β -APP son poco frecuentes. En este grupo las áreas marcadas fueron el cuerpo calloso y ocasionalmente las pirámides (aparece un caso únicamente), apareciendo positividad en áreas diferentes a las de daño traumático como el núcleo caudado-putamen, las capas V-VI de la corteza cerebral y los núcleos periolivares (un caso cada uno en estos dos últimos). Comparando los casos con y sin craniectomía, el 44,4% de los casos sin craniectomía mostraron lesión, frente a al 22,2% a los que si la tuvieron. Las áreas involucradas en estos casos de isquemia con craniectomía fueron las mismas que en los casos traumáticos, pero, además, en el grupo de traumatismo con craniectomía, apareció inmunomarcaje en las capas V-VI de la corteza, zona OS y núcleos periolivares, zonas que no se marcaban en los casos sin craniectomía y tampoco en los casos de craniectomía con lesión isquémica. Los casos de isquemia con craniectomía apenas tuvieron marcaje en ningún área, tan solo un caso en el cuerpo calloso y otro caso en el tálamo.

Inmunorreactividad para fractina

Con el uso del anticuerpo frente a fractina se detectó un total de 7 casos negativos para el grupo de trauma y 2 casos positivos (focales leves). En el grupo de traumatismo con craniectomía, fueron 4 los casos negativos y 5 los positivos (1 focal leve, 1 focal moderado, 1 difuso leve, 1 difuso moderado y 1 difuso severo). En los grupos de isquemia, aparecieron un total de 7 casos positivos (3 difusos moderados, 1 focal severo y 3 focales leves). En el grupo de isquemia con craniectomía se obtuvo un total de 7 casos positivos (2 difuso moderado, 2 difuso severo, 2 focales leves y 1 focal moderado) (Tabla 7).

El marcaje fue semejante y, por lo tanto, más fácilmente comparable a los observados con β -APP (Figura 15) de forma que pudimos aplicar el mismo método de evaluación de severidad y extensión del daño con ambos marcadores. En ocasiones se teñían algunas neuronas y de forma bastante habitual había marcaje de unos pequeños puntos dentro de la sustancia blanca, y ocasionalmente también en la gris.

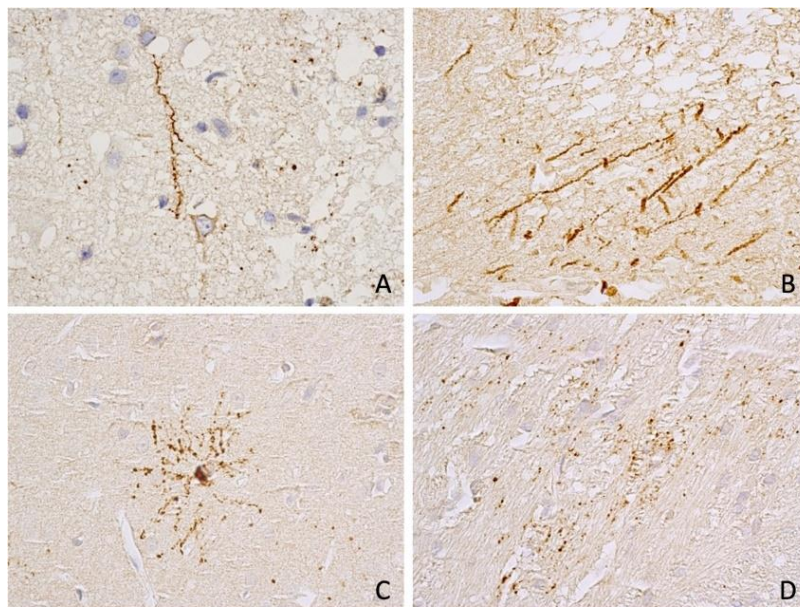


Figura 16: Secciones inmunohistoquímicas de cerebro de rata frente a fractina. Las fibras nerviosas marcadas pueden mostrar un aspecto varicoso semejantes a las que tiñe el β -APP (A), o dibujar líneas continuas (B) o mostrarse como ramificaciones alrededor del soma de la célula (C). Con mayor frecuencia el marcaje para fractina presenta un patrón de tipo punteado (D). (Figura de elaboración propia)

Tabla 7: Resultados obtenidos con la inmunotinción frente a fractina en los distintos grupos de ratas realizados en el modelo experimental.

Marcador	Ensayo	Gravedad lesión	Cuenta Rata
Fractina	Isquemia	DM	3
		FL	3
		FS	1
		NEG	2
		Total Isquemia	9
	Isquemia Craniectomía	DM	2
		DS	2
		FL	2
		FM	1
		NEG	2
	Total Isquemia Craniectomía	9	
	Trauma	FL	2
		NEG	7
	Total Trauma	9	
	Trauma Craniectomía	DL	1
		DM	1
		DS	1
		FL	1
		FM	1
	NEG	4	
	Total Trauma Craniectomía	9	
	Total Fractina		36

Áreas con mayor expresión de fractina

La positividad para fractina fue más frecuente en el cuerpo caloso y el hipocampo siendo también de mayor intensidad en estas zonas, aunque también se observó en otras áreas. En general, hubo pocos casos de origen traumático con marcaje y este aumentó en los casos de origen isquémico.

Solo el 38,9% de los casos traumáticos fueron positivos para fractina, frente al 77,8% de los que sufrieron isquemia. Englobando ambos grupos traumático e isquémico, el 66,7% de las ratas craniectomizadas mostraron lesiones, frente al grupo sin craniectomía, que sufrieron lesiones el 50% de los casos.

Desglosando por grupos, comparando los casos con y sin craniectomía, en el método isquémico mostró inmunomarcaje positivo el 77,8% de los casos sin craniectomía, e igual porcentaje en los sí se les realizó la craniectomía. En el método traumático muestran lesión el 22,2% de los casos sin craniectomía, frente al 55,6% de los casos con craniectomía (Tabla 8).

En los controles no se encontró inmunopositividad para fractina en ninguna sección cerebral, ni en los controles de trauma o isquemia ni en los de craniectomía.

Tabla 8: Porcentajes de lesión usando fractina como marcador para los distintos grupos experimentales

Grupo	Marcador IHQ	Casos con lesión (%)	Craniectomía	Casos con lesión (%)
Isquemia	Fractina	77,8	Sí	77,8
			No	77,8
Trauma	Fractina	38,9	Sí	55,6
			No	22,2
Total (Isquemia + Trauma)	Fractina	58,3	Sí	66,7
			No	50

En cuanto a la distribución de la expresión de fractina, en los casos traumáticos, el marcaje apareció en pocos casos en el cuerpo caloso y el pedúnculo cerebeloso (únicamente en un caso para cada área). Al añadir la craniectomía el cuerpo caloso resultó positivo en dos casos y el pedúnculo cerebeloso en otro caso. Se marcó, además, en dos casos las capas V-VI de la corteza, así como el hipocampo en un caso. En los casos de isquemia vascular, las áreas más lesionadas fueron, el hipocampo (4 casos), el cuerpo caloso y el caudado-putamen (2 casos cada uno de ellos). Aparecieron marcados también en un único caso el tálamo, los núcleos periolivares, el tallo infundibular y el núcleo reticular gigantocelular. Al realizar la craniectomía persistió marcado el cuerpo caloso (5 casos), el hipocampo y las capas V-VI de la corteza (2 casos), así como también el tálamo, el pedúnculo cerebral, el caudado-putamen y los núcleos periolivares en un caso cada área. Destaca el hecho de que en los casos en que apareció marcado el hipocampo, lo ha hecho también la corteza cerebral.

Patrón de marcaje

En muchas de las muestras tomadas en el estudio, tras marcaje con fractina, se observó un punteado en ocasiones multifocal, pero en ocasiones muy bien delimitado a un área o región concreta (Figura 16). Solo hemos considerado como positivos aquellos casos con un claro y manifiesto patrón patológico.

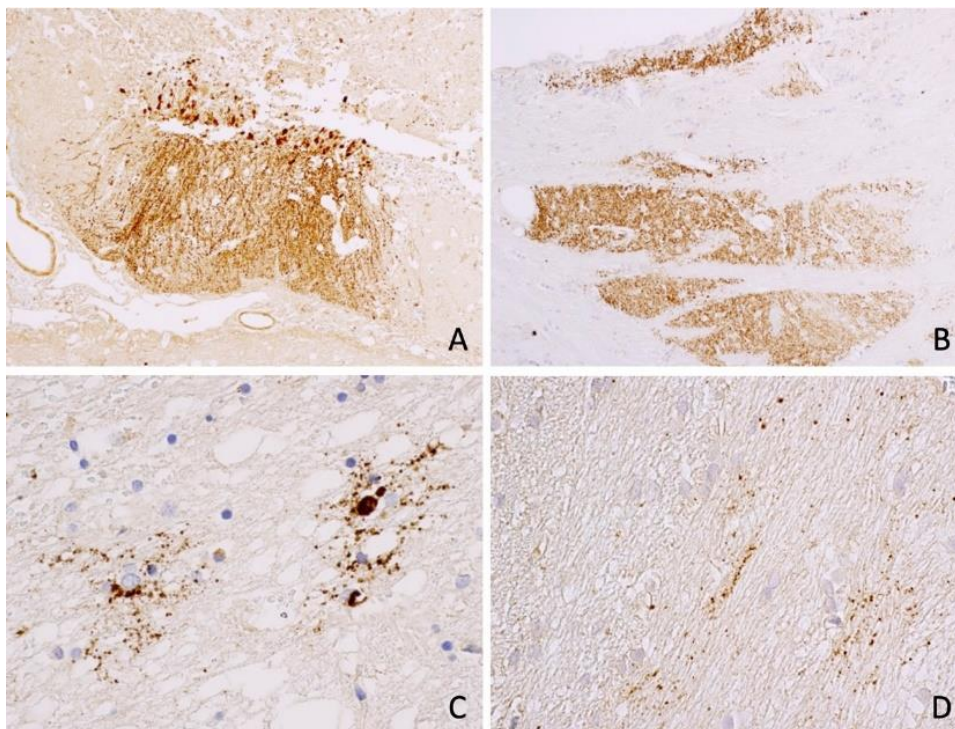


Figura 17: Secciones de cerebro de rata inmunomarcadas frente a fractina en varios casos pertenecientes al grupo de isquemia. En ocasiones el marcaje estaba muy bien delimitado como en el hipocampo (A) y en el tálamo óptico (B). Otras veces la distribución era focal manifestándose como un punteado irregular (C, D). (*Figura de elaboración propia*)

Comparación β -APP y fractina

Tanto la β -APP como la fractina marcan las fibras nerviosas lesionadas, lo que nos permite hacer una comparación entre marcadores utilizando un baremo de medición equivalente. Por lo que la evaluación de resultados de uno y de otro son fácilmente enfrentables. A priori, el β -APP se ha escogido en la literatura clásica como marcador de traumatismo y la fractina como marcador de la isquemia.

Siguiendo la metodología descrita en material y métodos para cuantificar la expresión IHQ obtuvimos los siguientes resultados:

Con β -APP se detectó un grado de positividad mucho mayor en los grupos de lesión provocada por traumatismo respecto a los grupos de la isquemia. El grupo de ratas con lesión traumática alcanzaron una puntuación promedio de 4,89. Las ratas con traumatismo más craniectomía obtuvieron una puntuación ligeramente superior, 5,33. Sin embargo, el grupo de isquemia obtuvo una puntuación de 1,22 y el grupo de isquemia más craniectomía alcanzaron 0,89. Si combinamos los grupos de trauma entre sí, y los de isquemia entre sí, se consiguió un resultado global para trauma de 5,11 y global para isquemia de 1,05.

Para la fractina la puntuación promedio del grupo de traumatismo fue de 0,22 frente a 2,33 para el grupo de isquemia. Si contemplamos los grupos con craniectomía descompresiva, las puntuaciones fueron de 2,00 para el grupo del traumatismo y 2,89 para el grupo de isquemia. Combinando los grupos de trauma y los de isquemia ambos entre sí, se alcanzó un valor global para traumatismo de 1,11 y global para isquemia de 2,61. (Tabla 9 Y figuras 17 y 18)

Tabla 9: Se muestran los promedios de valor (intensidad de expresión IHQ) de cada uno de los grupos estudiados tanto con el marcador B-APP como con la Fractina

Marcador	Ensayo	Promedio de Valor
β-APP	Isquemia	1,22
	Isquemia+Craniectomía	0,89
	Trauma	4,89
	Trauma+ Craniectomía	5,33
Fractina	Isquemia	2,33
	Isquemia+ Craniectomía	2,89
	Trauma	0,22
	Trauma+ Craniectomía	2,00

Usando como marcador el β-APP, la mediana en relación con la gravedad de la lesión da un resultado de 5 para el grupo de trauma y de 0 para el grupo de isquemia, una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$). Usando como marcador la fractina, la mediana del grupo traumático es 0 y 1 para el grupo de lesión vascular, una diferencia que no es estadísticamente significativa.

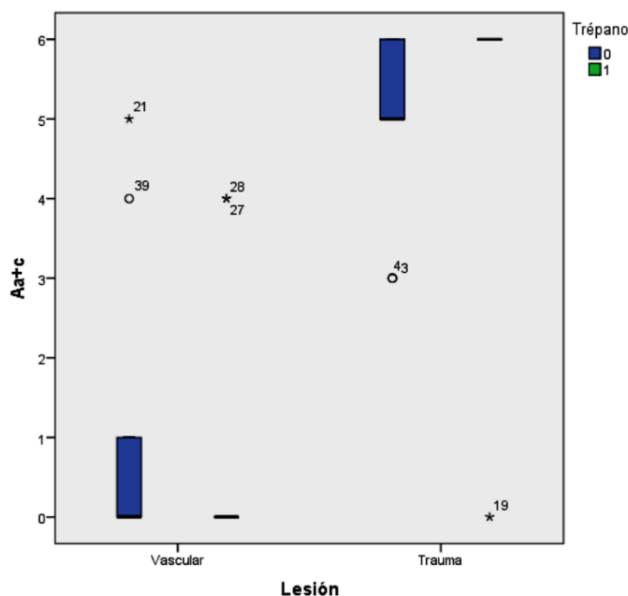


Figura 18: Diagrama de cajas en la que se observa la distribución de casos con el marcador B-APP con relación a la gravedad de los casos, puntuados de 0-6 según el método descrito. Observamos que los casos del grupo traumático están en la parte de mayor gravedad y los de lesión isquémica en los de menor gravedad. (Trépano/craniectomía: 0=No, 1=Si) (Figura de elaboración propia)

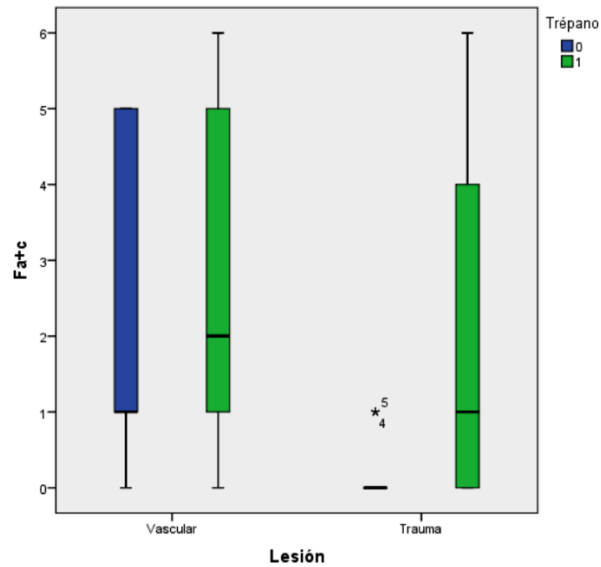


Figura 19: Distribución de casos con el marcador fractina en relación con la gravedad de los casos, puntuados de 0-6 según el método descrito. Observamos que la distribución de los casos se reparte de manera homogénea a lo largo de la escala de gravedad. (Trépano/craniectomía: 0=No, 1=Si). (Figura de elaboración propia)

Ambos marcadores, aún a pesar de sus patrones de marcaje similares, tenían dianas diferentes, por lo que marcaron daños distintos. En las siguientes imágenes se puede observar cómo la misma región anatómica en el mismo caso, según la lesión sufrida, se visualizó con un marcador de forma intensa y con el otro de forma leve o nula. Y al cambiar de región anatómica y/o el tipo de lesión, el marcaje era el opuesto (Figura 19).

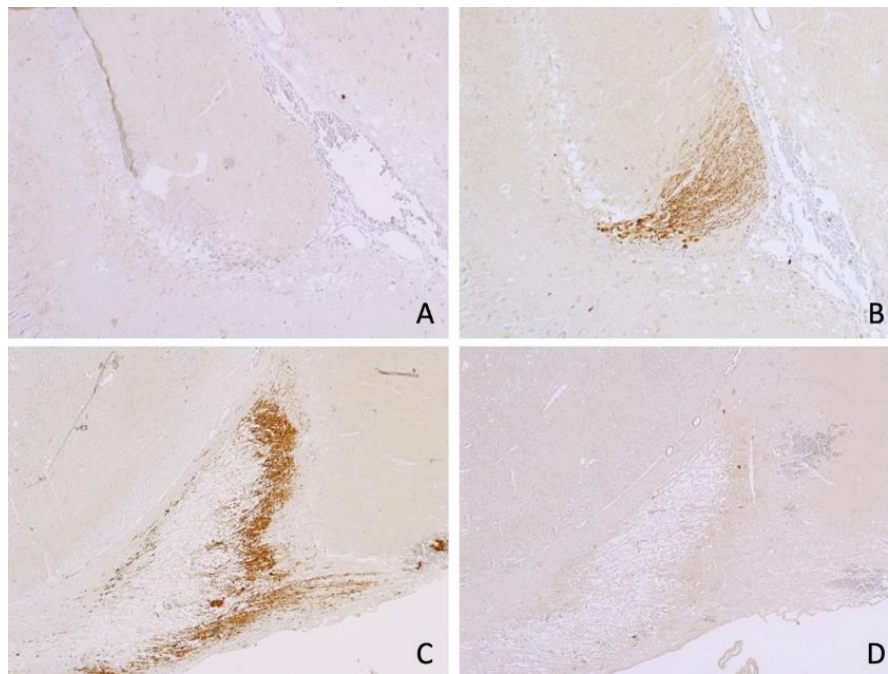


Figura 20: Secciones histológicas de la misma región anatómica (A, B) y de otra misma región (C, D) del mismo caso inmunoteñido con B-APP (A, C) y con Fractina (B, D). Podemos observar la eficacia de los marcadores siendo selectivos cada uno con un tipo de lesión en particular. (Figura de elaboración propia)

Patrón lesional

La distribución espacial de las lesiones nos permitió establecer dos patrones lesionales diferenciados.

Los grupos que recibieron traumatismo (patrón traumático) expresaron β -APP en el tálamo, el hipocampo y en las pirámides y sus áreas anexas mientras que la expresión de fractina fue muy discreta y en áreas no constantes.

Los grupos sometidos a isquemia (patrón isquémico) expresaron β -APP en la corteza cerebral (V y VI) y en el caudado putamen mientras que la expresión de fractina se localizó preferiblemente en el hipocampo y en el caudado putamen.

Patrón traumático	* β -APP	-Tálamo -Hipocampo -Pirámides y áreas anexas
	*Fractina	-Muy discreto y en áreas no constantes

Patrón isquémico	* β -APP	-Corteza capa V y VI -Caudado putamen
	*Fractina	-Hipocampo -Caudado-putamen

El cuerpo caloso no se ha tenido en cuenta a pesar de ser la región que más gravemente se lesionó sobre todo en los casos traumáticos porque aquí se marcaron axones tanto con β -APP como con fractina si bien con β -APP el marcaje era mucho más intenso.

Otros marcadores

Hemos ensayado el innumomarcaje con otros anticuerpos conocidos por ser útiles en la investigación del DAI. Los marcadores testados fueron los siguientes:

Marcadores gliales	Marcadores neuronales	Otros marcadores
S100	Sinaptofisina	CD15
GFAP	Neurofilamentos	VGF
CD45	Tau-L	HIF-1 α
Vimentina	NSE	Caspasa-3

En nuestro laboratorio ninguno de estos antisueros ha funcionado en tejido nervioso de rata. Destacar que este último marcador, la caspasa-3, de máximo interés en nuestro estudio por su proximidad

molecular a la fractina, a pesar de probar el anticuerpo procedente de diferentes laboratorios, de usar distintas técnicas de recuperación antigénica y/o diferentes diluciones, no obtuvimos positividad o esta era inespecífica o aparecía marcaje positivo idéntico tanto en los casos, como en los controles negativos. Todo esto ha imposibilitado el uso de caspasa-3 en este estudio.

Casos humanos

En el examen macroscópico de los casos traumáticos mostraron, como era esperable, focos contusivos y/o hemorrágicos, mientras que, en los casos isquémicos, solo había congestión generalizada (Figura 20).

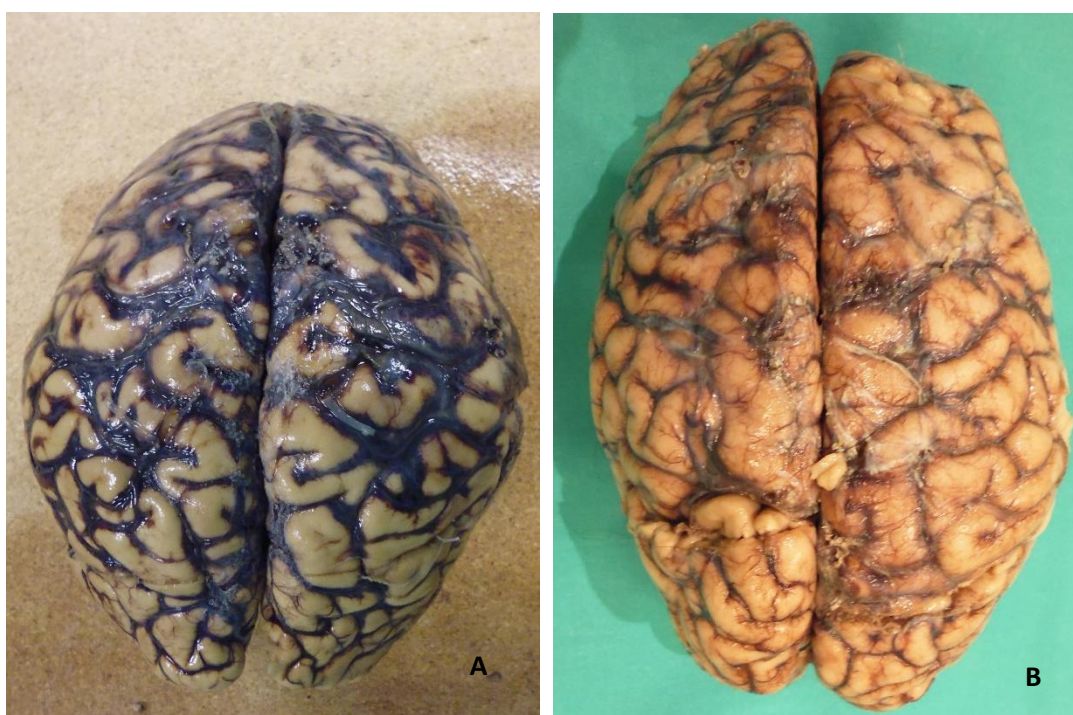


Figura 21: Cerebros humanos tras fijación en formol. Cerebro asignado al grupo de lesión traumática con una supervivencia de 6,5 días. Hay hemorragia subaracnoidea, hemorragia subdural, y edema cerebral (A). Cerebro asignado al grupo de isquemia con una supervivencia de 22 horas que muestra congestión cerebral difusa (B). *(Figura de elaboración propia)*

Los tres casos con lesión traumática mostraron positividad frente a β -APP. De éstos, 1 caso fue difuso moderado y 2 casos fueron difusos severos, involucrando tanto a la región supratentorial como a la infratentorial. La mayoría de las regiones examinadas mostraron daño difuso.

En los casos de isquemia con β -APP, 2 casos fueron positivos y difusos, uno moderado y el otro severo, y el tercer caso fue negativo. El caso difuso severo fue el del paciente que habían tenido una supervivencia de 14 días. No hubo ningún resultado positivo para el bloque de la región temporal/hipocampo (Figura 21).

El cálculo de la puntuación para cuantificar la intensidad del marcaje arrojó un promedio de valor de 5,33 para el grupo con lesión traumática y 3,66 para el grupo de isquemia.

La Inmunoexpresión de fractina en los fallecidos por lesión traumática fue positiva en un solo caso (difuso leve) y en los otros dos el resultado fue negativo. Ninguno de los casos ha mostrado marcaje en el bloque de la protuberancia.

En los casos de isquemia, 2 casos fueron positivos para fractina (ambos difusos moderados) y un caso fue negativo. Sólo uno de los 3 casos obtuvo un resultado positivo en el bloque de la zona temporal con hipocampo (Figura 21).

La puntuación para cuantificar la intensidad de marcaje arrojó un valor promedio de 1,33 para los casos con lesión traumática y 3,33 para el grupo de isquemia.

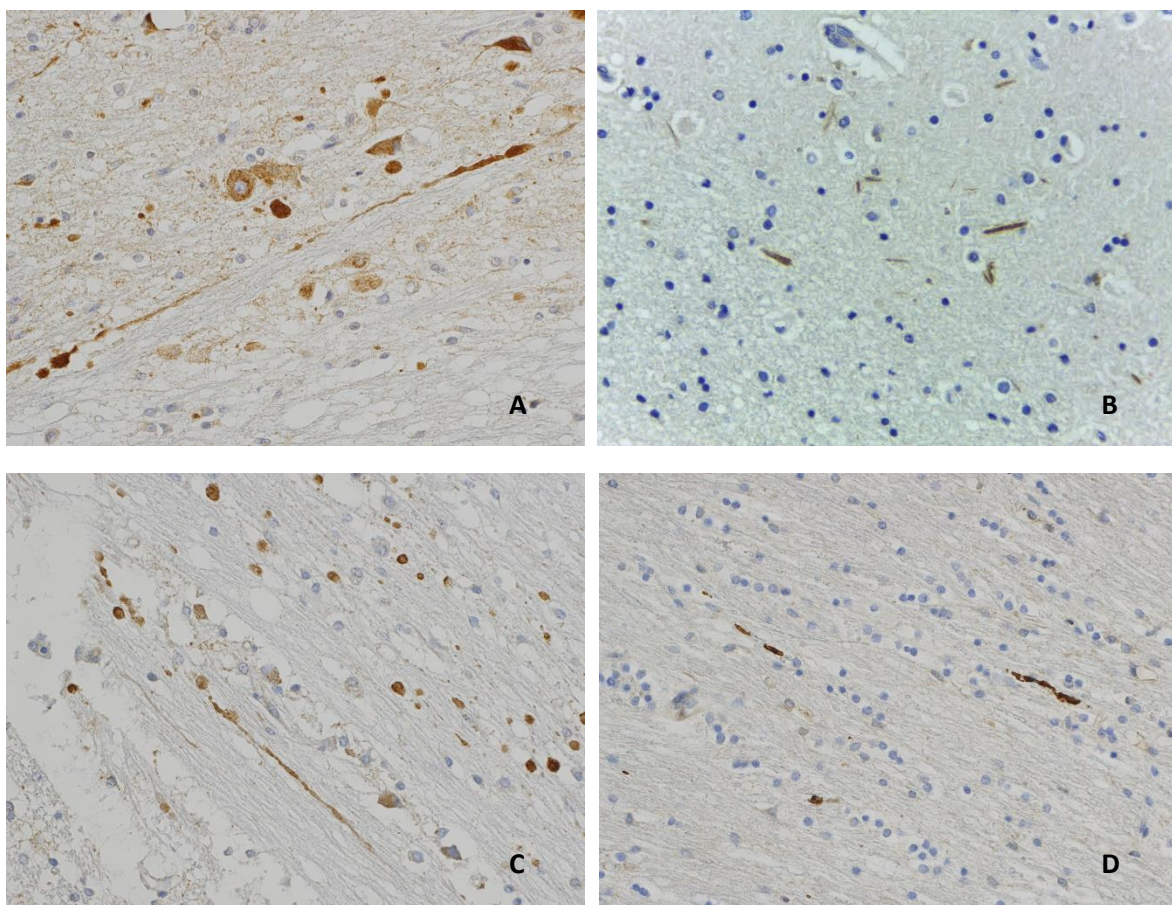


Figura 22: Inmunotinción con β -APP en cerebros humanos pertenecientes al grupo traumático (A) y al grupo isquémico (C) en el que pueden verse fibras longitudinales de aspecto varicoso y otras circulares en una sección de fibras transversal. En las imágenes de la derecha, ambas inmunoteñidas con fractina, observamos un caso traumático (B) y uno isquémico (D) con marcaje longitudinal más intenso indicando fibras lesionadas. (Figura de elaboración propia)

Discusión

(Incluye contenido del artículo publicado con DOI: 10.1111/1556-4029.15276)

Desde 1956 en que se describió el daño axonal difuso por primera vez, se han ido dando pasos lentamente y en ocasiones erráticos en el conocimiento de esta entidad nosológica. Su descripción inicial fue como una entidad de origen puramente traumática. Los estudios posteriores, con el paso del tiempo y a medida que se fue avanzando en su conocimiento se encontraron casos con idéntico cuadro morfológico, pero en los que no había ningún tipo de traumatismo. Se comenzaron a distinguir diferentes aspectos de esta patología, entre los que destaca el daño axonal primario, debido a la lesión, y secundario, el que sucede como consecuencia del edema, la hipertensión o la isquemia en el cerebro. El daño secundario se debe a la respuesta del cerebro que ocurre tras el daño, siendo una reacción inespecífica de nuestro organismo ante las agresiones. Por ello hemos considerado que estudiar la patología y aislar el daño primario del secundario podía ser interesante para el mundo forense en el que diferenciar el origen violento o natural de las lesiones es clave.

Hemos estudiado las consecuencias de una lesión traumática en ratas macho Sprague-Dawley. Se trata de una cepa albina universalmente utilizada en investigación lo que permite la reproducibilidad del experimento. Como el sexo de las ratas no es relevante para el resultado traumático o bien el sexo femenino sufre menor lesión con idéntico traumatismo (Gupte, 2019) se optó por ratas macho ya que en el experimento interesaba el mayor grado lesional siempre y cuando existiera supervivencia.

Modificación del método de Marmarou y Foda

En modelo original de Marmarou y Foda (Marmarou 1994; Foda, 1994) pequeños movimientos respiratorios ocasionaban variaciones en el plano del disco que protege el cráneo y lo desalinea por lo que el impacto inducía torsión cervical o hacía que el borde del disco aplastara el cráneo llegando incluso a fracturarlo. Por este motivo, una de las modificaciones que hemos realizado al respecto ha sido aumentar el diámetro del disco protector. Un disco de mayor diámetro (20 mm frente a 10 mm) se aproxima más al diámetro interior de la columna (21 mm) por lo que es más probable que el cilindro se encuentre en un plano paralelo con el del disco. Protege mejor al producir una mayor dispersión de la fuerza del impacto, por lo que minimiza las lesiones locales y la mayor parte de la fuerza aplicada se dirige a la aceleración. Además, dado que el impacto se produce siempre en el mismo lugar mejora la reproducibilidad del experimento.

El objetivo de este experimento era producir un desplazamiento (aceleración) del cerebro mediante un impacto, ya que el DAI en humanos es el resultado de fuerzas de aceleración angulares o rotacionales de alta magnitud. Por lo tanto, se buscó reducir el daño a la estructura ósea craneal (daño focal). En el modelo modificado, el daño local (contusión cerebral letal) disminuyó del 35% al 13,5%. Sin embargo, cuatro ratas presentaron una contusión cerebral fatal. Además, algunas ratas mostraron pequeñas contusiones corticales focales no letales. Estas lesiones pudieron deberse a un mínimo

movimiento y/o pequeños desniveles al colocar el tubo. Hubo que plantearse qué hacer con las ratas que no evidenciaban fractura de cráneo pero tenían una lesión cerebral focal justo debajo del cráneo impactado (es decir, contusiones graves de la corteza frontal/parietal). ¿Fueron causados por una deformación del cráneo debajo del disco o por un golpe del encéfalo debido a la aceleración? Como señalan algunos autores (Kilbourne, 2009), estas lesiones resultan de una percusión directa más que de un golpe, que en sentido estricto es causado por el impacto del cráneo acelerado y no deformado contra el cerebro. En consecuencia, se incluyeron estos casos en el estudio (5 ratas).

En cuanto a la espuma, el polímero utilizado es uno de los más comúnmente disponibles en el mercado, con una estructura celular abierta duradera. Es esponjoso, barato, lo suficientemente suave para la compresión y muy elástico para permitir una rápida recuperación de la forma original. Según el distribuidor local, se utiliza para cojines y se describe que tiene una rigidez intermedia. La espuma utilizada debe cumplir dos condiciones esenciales: en primer lugar, debe ser lo suficientemente resistente como para evitar el colapso y debe recuperar rápidamente su posición original para evitar que la rata sea arrastrada fuera del lecho de espuma. De no ser así, aplastaría la cabeza de la rata contra el suelo sin llegar a volver a su posición inicial de forma que se perdería parte del movimiento que le provoca la aceleración (el de retorno), o desplazaría la rata fuera de la esponja. La espuma tiene que permitir el mayor movimiento posible de la cabeza de la rata para optimizar el aprovechamiento de energía que le transmite el impacto, así la aceleración provocará un daño mayor y más difuso. Esto es debido a que, a menor libertad de movimiento craneal, mayor riesgo de lesión focal. La falta de concreción en las características de los lechos de espuma parece ser el factor que se encuentra detrás de la gran disparidad en los resultados publicados. La cama de espuma original utilizada por Marmarou no es fácil de conseguir. Existen muchos fabricantes de espumas y existe una amplia variedad de opciones en el mercado: espuma de células cerradas y de células abiertas; burbujas atrapadas en estado sólido o líquido; y una variedad de materiales que incluyen poliuretano, uretano, polietileno y poliéter. Además, existen también diferentes procesos de fabricación de la espuma que modifican las características físicas resultantes. A pesar de los intentos de varios autores que han reproducido el método, especialmente el estudio dedicado a las espumas de Piper (Piper, 1996), no existe ningún parámetro confiable para evaluar la rigidez y elasticidad de la espuma. Debemos tener en cuenta que las propiedades mecánicas dependen en gran medida de la densidad. Los parámetros más importantes de la cama de espuma son la resistencia a la compresión que se opone a la aceleración de la cabeza y la elasticidad responsable de la desaceleración. La compresión de la espuma bajo el impacto debería ser suficiente para permitir el mayor movimiento posible de la cabeza de la rata sin llegar al suelo. Es decir, la cama de espuma debe resistir el impacto del peso que cae desde 2 m de altura sin llegar al colapso por completo, porque el colapso total provocaría que el cráneo quedara atrapado entre el peso y la superficie sólida del suelo y provocaría un traumatismo indeseable. Por el contrario, si la espuma es demasiado blanda, la diferencia entre el movimiento de la cabeza y el cuerpo crea una tensión cervical que aumenta la mortalidad en la primera hora. Nuestro modelo modificado minimiza la lesión del tronco encefálico axonal y, en última instancia, reduce la mortalidad por lesión de la articulación atlantoccipital a casi la mitad (del 15% al 8,5%).

Otra de las debilidades atribuidas al método original de Marmarou es la inconsistencia entre ensayos cuando la cabeza no se coloca en el mismo lugar, es decir, hay un mal ajuste entre el tubo de plexiglás y el disco protector que provoca desplazamiento o hay excesiva distancia entre el tubo y el cráneo.

Estos problemas se deben al hecho de que la cabeza de la rata no está asegurada a la superficie de la cama de espuma. Durante nuestros experimentos, el tubo se colocó a una distancia de 0,5 cm de la cabeza de la rata. El dispositivo fue colocado sobre ruedas para mantener la distancia antes mencionada y poder apartarlo fácilmente para evitar un segundo impacto. Se excavó un hueco en la superficie del lecho de espuma para asegurar el tronco de la rata, limitar el desplazamiento lateral y evitar que el animal saliera despedido por el impacto.

Con el método que proponemos se incrementa significativamente la supervivencia de las ratas a las 24 horas (del 50% al 80%), así como la frecuencia e intensidad del DAI (del 20% al 85,7%) con modificaciones sencillas y fáciles de llevar a la práctica. Al implementar las modificaciones planteadas: aumentar el tamaño del disco y controlar adecuadamente las propiedades de la espuma, mejora significativamente los resultados originales. Se podría plantear si estos cambios tienen tal entidad como para considerar que el método ya no se puede considerar el mismo. Y es que la modificación de los resultados es importante. Pero el mecanismo de producción de la lesión se mantiene y las lesiones producidas también. Únicamente hemos mejorado la protección frente al traumatismo directo y el movimiento de la rata para optimizar la lesión resultante. Por todo ello entendemos que el método sigue siendo el mismo.

Respecto a los marcadores inmunohistoquímicos, la inmunotinción con β -APP se reconoce actualmente como el procedimiento más sensible para detectar el daño axonal difuso (DAI). El anticuerpo contra β -APP permite demostrar su acumulación (por interrupción del transporte rápido anterógrado) en los axones lesionados. Éstos adquieren la forma de bulbos axonales (esferoides) y axones varicosos (filamentos gruesos). El transporte axonal requiere una gran cantidad de energía, por lo que su presencia indica la supervivencia del animal (Hortobagyi, 2007; Gentleman, 1995), aunque la intensidad del marcador no está directamente relacionada con el tiempo de supervivencia (Sherriff, 1994). Diversos autores demostraron que la expresión de β -APP comienza a las 2-3 h tanto en humanos como en ratas, aumenta hasta alcanzar el máximo a las 24 horas y luego comienza a disminuir a los niveles iniciales a los 10 días (Zhu, 2005; Geddes 2000). Para maximizar la expresión β -APP hemos mantenido con vida a las ratas durante 24 h lo que, además, facilitó la comparación entre los grupos. Hemos detectado un aumento de 65 puntos en la frecuencia de DAI, que podría ser debido a las modificaciones realizadas al modelo de Marmarou.

En cuanto a la localización de la expresión de β -APP, los bloques A (anterior) y C (protuberancia y cerebelo) fueron las regiones más dañadas. Como el bregma es el punto de impacto más central y está situado en el bloque A, era predecible un alto nivel de daños en esta zona. La expresión de β -APP se encontró en la corteza, la mayor parte del cuerpo calloso y otras regiones más distantes como los núcleos de la base. En las regiones occipitales (bloque C), la protuberancia en su porción rostral y los pedúnculos cerebelosos también mostraron una amplia positividad axonal de β -APP. Este patrón de distribución es muy similar al encontrado en cerebros humanos después de una lesión cerebral traumática en el que las áreas más comúnmente afectadas incluyen los axones en el tronco del encéfalo, la sustancia blanca parasagital cerca de la corteza cerebral y el cuerpo calloso (Su E, 2016). El hecho de que se haya encontrado expresión de β -APP en los mismos lugares que en el cerebro humano es valioso ya que implica que este método experimental (el modelo de Marmarou modificado) es un buen modelo para el estudio de la DAI traumática en humanos.

La inmunexpresión semicuantitativa de β -APP en las secciones A y C mostró una distribución multifocal en casi el 80% de las ratas. Además, la intensidad de la expresión fue mayoritariamente (casi el 80%) grave/moderada. Esto es de gran interés para nosotros, ya que el patrón de distribución y el elevado número de axones marcados son también similares a los que muestran los cadáveres humanos en casos de daño cerebral traumático. Las únicas dos ratas con DAI en el grupo modelo original de Marmarou presentaron la misma distribución e intensidad de β -APP (Figura 12). Desafortunadamente, no fue posible hacer comparaciones con otros autores (Baranova, 2008) que utilizaron el método original porque no informaron la distribución y/o intensidad de la inmunotinción con β -APP.

Modelo experimental en ratas

Ya se ha mencionado que tras un impacto con aceleración o una isquemia aguda cerebrales, se produce tanto en ratas como en las personas, un daño primario (DAI) y posteriormente, si hay supervivencia aparece con frecuencia un daño secundario en relación con el edema y la inflamación cerebral. Las craniectomías en nuestro diseño experimental estarían orientadas a minimizar (o evitar) ese daño secundario, al permitir que el cerebro se expanda hacia arriba a través de las perforaciones del cráneo y la duramadre. Los agujeros eran bastante grandes para el tamaño del cráneo de una rata y permitió que, tanto en el modelo traumático como en el isquémico, gran parte de los lóbulos frontales y parietales inflamados tuviesen la posibilidad de proyectarse hacia afuera evitando el aumento de la presión intracraneal y la compresión de otras zonas cerebrales. En las ratas no craniectomizadas, al daño primario (traumático o isquémico) se le sumó, como no podía ser de otra manera, el daño secundario. Después, analizando las diferencias entre los dos grupos tendríamos más información acerca de las características daño axonal primario y secundario. El planteamiento tiene cierta originalidad puesto que en la revisión de la literatura no hemos encontrado ningún otro diseño experimental de estas características.

En realidad, los patrones lesionales derivados de lesiones traumáticas y/o isquémicas se solapan, al menos en parte. El daño traumático no solo rompe los axones, también rompe vasos sanguíneos, se produce hemorragia, edema y finalmente hay hipoxia/isquemia en las zonas circundantes. Todo esto, a su vez induce apoptosis celular. Desde el punto de vista forense deberíamos poder distinguir un patrón lesional puramente traumático de uno isquémico. Asimismo, una vez que se ha desarrollado la patología isquémica en un contexto circunstancial de traumatismo deberíamos poder identificar el patrón traumático primario para poder determinar el origen de la lesión. La importancia forense de esto es esencial puesto que la conclusión puede inculpar o excluir de responsabilidad a un investigado. La hipoxia/isquemia, al igual que el traumatismo, acaba produciendo daño axonal y es casi imposible determinar cuál es la medida en que uno afecta al otro (Oehmichen, 2008).

Ensayo experimental. Inmunomarcaje β -APP

En nuestro estudio experimental precursor β del amiloide (β -APP) como indicador de DAI ha proporcionado muy buenos resultados en los casos traumáticos al ocasionar DAI a 17 de 18 (94,4%) ratas que recibieron el impacto y, además, la mayoría mostraron una distribución multifocal/difusa.

Esto son unos resultados superiores a los obtenidos por otros autores que utilizaron el método Marmarou, asunto que hemos comentado previamente. En cuanto al grupo de isquemia, la expresión β -APP como marcador de DAI apareció en 6 de 18 (33,3%) ratas sometidas a isquemia una diferencia estadísticamente significativa. Aunque esperado, llama la atención que en el grupo de isquemia más craniectomía aparecieran solo dos casos β -APP positivos. Esperado, porque el impacto por aceleración causa fuerzas de cizallamiento que rompen axones y la isquemia lesiona los axones por un mecanismo compresivo y esperado, además, por coincidir con lo publicado por otros investigadores del campo (Reichard, 2005; Oehmichen, 2003; Graham, 2004; Geddes, 2000; Davceva, 2012; Davceva, 2015).

Localización del inmnomarcaje con β -APP

En el grupo de traumatismo, las áreas que aparecieron marcadas con más frecuencia y mayor intensidad fueron el cuerpo calloso, el tálamo y el hipocampo (también en el hipocampo, los pedúnculos cerebelosos, las capas V-VI de la corteza, la zona OS y los núcleos periolivares); áreas similares a las detectadas por otros investigadores (Wang, 2010; Davceva, 2015; Geddes, 1997; Adams, 1989). Además de estas zonas también se encontró un marcaje frecuente en las pirámides de la protuberancia, unas áreas apenas reportadas por otros autores, aunque sí están descritas. Realmente, se trata de un gran haz de fibras nerviosas situado próximo a la región cervical, una región que sufre un movimiento muy intenso durante el impacto y por lo tanto estas fibras pueden romperse. En el grupo de isquemia además del cuerpo calloso (similar al grupo de traumatismo) las áreas con expresión β -APP más frecuente fueron el núcleo caudado-putamen y la corteza (capas V y VI). *Reichard et al.* también encontraron marcaje β -APP en la cabeza del núcleo caudado y como nosotros, no encontraron marcaje en el hipocampo, algo que es llamativo ya que la región CA1 del hipocampo es tradicionalmente muy sensible a la isquemia (Reichard, 2005; Oehmichen, 2003).

En nuestro estudio hemos encontrado daño en las capas V-VI de la corteza, lo cual es congruente con lo encontrado por *Harris et al.* que demostraron disrupción axonal funcional en la capa V en casos que sufrieron concusión. La disrupción axonal se debería a una disfunción de los canales de sodio o bien a que la axotomía se haya producido muy próxima al soma neuronal (Harris, 2023). Ocasionalmente hemos observado también afectadas las capas IV y VI lo que coincide con lo publicado por *Michaud et al.* que encontraron neuronas globiformes β -APP positivas entre las capas IV y VI de la corteza. De nuevo los autores lo explican como un signo de daño axonal proximal a la neurona y, aunque lo habitual es detectar lesiones axonales en la sustancia blanca, también pueden aparecer en estas regiones de la corteza ya que las fuerzas de cizallamiento también actúan sobre tejidos con diferentes densidades como son la sustancia blanca y sustancia gris (Michaud, 2023).

No hemos observado en nuestros casos experimentales un patrón vascular isquémico similar al descrito por *Geddes et al.* en el que observaba un área completa marcada positivamente con β -APP sin límite anatómico claro o el patrón en zig-zag (Geddes, 2001). En algunos casos de DAI en nuestro estudio se observaron áreas concretas positivas para β -APP, incluso algunas con forma triangular, que sugieren una base isquémica en la lesión, pero fueron la excepción y de todos modos no encajaría en el patrón vascular que proponen.

Ensayo experimental. Inmunomarcaje con fractina

La inmunopositividad para fractina fue positiva 7 de 18 (38,9%) ratas del grupo de traumatismo y en 14 de 18 (77,8%) ratas del grupo de isquemia. Las diferencias entre los grupos tomados globalmente son evidentes. El efecto de las craniectomías en estos grupos fue sorprendente: el grupo de traumatismo más craniectomía mostró 5 de 9 casos positivos (y sin craniectomía, 2 positivos de 9), mientras que el grupo de isquemia más craniectomía mostró 7 de 9 casos positivos (y sin craniectomía, también 7 de 9).

La valoración de las preparaciones inmunoteñidas con fractina en nuestro laboratorio no fue sencilla. Con frecuencia se observó un marcaje muy evidente, en forma de unos pequeños puntos más o menos agrupados, aunque no siempre de la misma forma. En ocasiones el punteado es abundante y ocupa un área muy bien definida, por lo que no hay duda de que se corresponde con daño. En otras ocasiones se dibuja una célula con las fibras alrededor (Figura 15) que podría ser una neurona, y en otras ocasiones simplemente se observa un grupo de puntos, siendo este marcaje similar al obtenido por *Sokolowski et al.*, (Sokolowski, 2014). El anticuerpo utilizado es muy específico por lo que las fibras teñidas identifican fibras dañadas. Delimitar qué nivel marcaje es suficiente como para considerarlo un resultado positivo ha sido un verdadero desafío. En la evaluación de daños hemos sido conservadores de manera que el hallazgo de unos puntos diseminados en un área pequeña no lo hemos interpretado como un resultado positivo. De haberlo hecho, habríamos tenido bastantes más casos positivos, especialmente en los casos de los grupos de isquemia.

Localización del inmnomarcaje con fractina

En los casos traumáticos la expresión de fractina se localizó en varias regiones poco constantes: cuerpo calloso, pedúnculo cerebeloso, capas V y VI de la corteza e hipocampo. En el grupo de isquemia sin embargo las áreas con más frecuencia lesionadas fueron el cuerpo calloso, el hipocampo y el núcleo caudado putamen.

Analizando las diferencias entre los distintos grupos, el núcleo caudado-putamen sólo se ha marcado en casos de isquemia (con β -APP y con fractina) y las pirámides de la protuberancia y sus áreas adyacentes sólo se han marcado en casos de traumatismo con β -APP (excepto 1 caso de isquemia y amiloide). Si además analizamos solo los casos sin craniectomía, podemos encontrar otras diferencias interesantes como que el tálamo y el hipocampo sólo se marcan en los casos de traumatismo con β -APP y en los casos de isquemia solo con fractina. Estas diferencias tan acentuadas pueden ser útiles para el diagnóstico diferencial etiopatogénico. A eso se une el valor de gravedad o levedad de sumar la puntuación en cada preparación y el promedio de valor para el caso. Estos hallazgos permiten una aproximación más fiable y objetiva al origen de la lesión al menos en ratas.

En los casos a los que realizamos una craniectomía lo esperado, en general, era que el marcaje disminuyera de forma notable ya que evitar la compresión del cerebro evita el daño secundario. Sin embargo, esto se ha visto en el grupo de isquemia marcado con β -APP. La explicación razonable para esto varía según los casos. En ocasiones, la inflamación y edema del cerebro fue tan prominente que se formó una hernia externa (*fungus cerebri*). Las craniectomías eran del mayor tamaño posible pero,

aun así, si el tejido cerebral se hernia, se produce localmente una necrosis del encéfalo extruido por la compresión del cerebro saliente contra los bordes óseos, o contra la duramadre a pesar de que las craniectomías rebanaban el cráneo y duramadre para dejar forámenes del mismo tamaño. Otra posibilidad sería que la lesión traumática pudo ser tan grave que los agujeros de la trepanación hayan sido insuficientes para evitar el edema y el aumento de presión dentro del cráneo. Tampoco se puede descartar un defecto de técnica en la ejecución de alguna de las craniectomías al tratarse de un fresado delicado en un cráneo pequeño que precisa la utilización de lentes de ampliación quirúrgicas. Sin embargo, los controles no han tenido ningún resultado positivo. Y todo ello en el contexto de que son pocos casos.

Cuantificación de la expresión de β -APP y fractina

Utilizamos un método de cuantificación del marcaje inmunohistoquímico basado en el sistema propuesto por *Johnson et al.* (Johnson, 2011) al que añadimos un número ascendente correlativo a la intensidad creciente de las lesiones. De cada caso se obtiene un número valor que es más alto cuanto mayor intensidad de marcaje (y por lo tanto de lesión). El sistema es simple y se puede aplicar por igual a cerebros de animales o de seres humanos.

En el grupo de traumatismo obtuvimos un promedio de valor de 4,89 con β -APP y 0,22 con fractina, frente al grupo de isquemia, que obtuvimos un promedio de valor de 1,22 con β -APP y 2,33 con fractina. Las diferencias entre los grupos son muy notorias y creemos que estos valores pueden ser útiles en el diagnóstico etiológico del DAI. Un resultado elevado para β -APP y bajo para fractina sugiere origen traumático y un resultado bajo para β -APP y alto para fractina sugiere origen isquémico. Lamentablemente, debido al tamaño de la muestra los test estadísticos no nos permitieron determinar un promedio valor de corte que discriminara entre ambos grupos.

Por último, mencionar que en nuestro estudio las ratas en general mostraban más expresión (más daño) en un lado del cerebro que en el otro, aunque el mecanismo lesional fuera bilateral, tanto en los casos de traumatismo como en los de isquemia. Carecemos de una explicación para ese suceso, aunque Sharma et al. también observó este fenómeno en sus casos (Sharma, 2023)

Otros marcadores

Hemos ensayado más antisueros que han dado resultados diversos y, en general, poco útiles para nuestro fin. Bien porque su expresión fue excesiva y no se distinguen adecuadamente diferencias entre las zonas lesiones y el cerebro normal, o bien por la ausencia de marcaje. La vimentina en cerebros de rata muestra positividad en zonas lesionadas y en zonas sanas por lo que no es posible diferenciarlas.

Sería interesante tener un marcador de necrosis, pero actualmente no existe. La necrosis, al no ser un fenómeno activo, es un mecanismo que no ocasiona ningún proceso molecular por lo que no existe ninguna proteína (antígeno) que pueda funcionar como marcador.

Pusimos mucho interés en la Caspasa-3. Se trata de un marcador muy conocido y de uso habitual en la práctica clínica hospitalaria y con mucha literatura científica que lo respalda. En nuestras muestras de cerebros de rata y en nuestro laboratorio el marcaje resultó positivo en todos los casos, independientemente del grupo lesional que estudiemos y su patrón de expresión era semejante en los dos grupos.

DAI en cerebros humanos

El número de casos seleccionados para este estudio fue de n=6. Tres casos fallecieron a consecuencia de un traumatismo capaz de provocar un daño axonal difuso: una precipitación, un accidente de tráfico, y un atropello por un coche con supervivencias de 5 h, 9 h y 6,5 d. Otros tres casos fueron asignados al grupo de isquemia, dos ahorcaduras y una crisis asmática con supervivencias de 22 h, 48 h y 14 días (Tabla 2).

El marcaje combinado de β -APP y fractina ha sido rentable, ya que el marcaje ha sido intenso con β -APP y negativo con la fractina. Usando el mismo sistema de puntuación concebida para este estudio y que utilizamos en las ratas, el grupo inmunoteñido con el precursor β del amiloide arrojó un resultado valor de 5,33 (sobre 6 puntos), mientras que el grupo marcado con fractina obtuvo una puntuación de 1,33 (sobre 6 puntos). Ello sugiere que puede ser una herramienta diagnóstica útil para el diagnóstico diferencial del origen de la lesión en casos con supervivencia de pocas horas. En estudios futuros sería interesante poder observar algunas otras áreas cerebrales, quizá de forma bilateral y ampliar el número de casos objeto de estudio.

Con relación a los casos cuyo origen del fallecimiento fue la isquemia, llama poderosamente la atención el hecho de que para el bloque de temporal con hipocampo solo haya dado resultado positivo uno de los bloques de uno de los casos, cuando el hipocampo es una de las regiones que tradicionalmente sufre la isquemia de forma más precoz.

Correlación del DAI en cerebros humanos y murinos

Estableciendo una comparación entre el experimental realizado con los animales murinos y los casos recogidos de las autopsias forenses que cumplían requisitos, encontramos diferencias, pero también algunas similitudes interesantes que pasamos a reseñar.

El tálamo ha obtenido un buen rendimiento en la rata pero no en el humano.

El hipocampo ha tenido un rendimiento bajo en el humano, a diferencia de los resultados habituales en la literatura.

El diagnóstico de las lesiones isquémicas ha sido difícil ya que los marcadores, en especial la fractina, ha dado un resultado menor en cuanto a intensidad de lo esperado, tanto en ratas como en humanos.

Se han encontrado diferencias destacadas usando el β -APP y la fractina en los casos murinos y humanos de origen traumático. En ambos los resultados de severidad de la lesión son altos para β -APP y bajos para fractina, por lo que la combinación de estos dos marcadores inmunohistoquímicos pueden ser una herramienta útil para hacer el diagnóstico etiopatogénico de la lesión.

El problema de la valoración de las preparaciones teñidas para fractina en humanos ha sido el mismo al hallado en las ratas. De manera que persiste el problema de la interpretación de las observaciones. Los pequeños puntos inmunopositivos observados, ciertamente marcaje positivo y no un artefacto, son a veces minúsculos y están repartidos por un área no bien definida; es difícil basarse en un conteo de los mismos y saber si el caso realmente tiene trascendencia clínica-patológica. Con los casos humanos hemos seguido los mismos criterios en la evaluación que utilizamos en las ratas, tomando una actitud conservadora.

En cuanto al patrón vascular como el descrito por *Geddes et al.* ya comentado previamente en el caso de las ratas, en los cerebros humanos tampoco lo hemos observado. Los diferentes focos que encontramos no cumplían el ser un área completa, triangular ni el patrón en zig-zag.

Mencionar entre los marcadores inmunohistoquímicos probados, las pruebas realizadas con la Caspasa-3. Al igual que en el caso de las ratas, no ha permitido dar ningún paso adelante en la diferenciación de las distintas entidades etiopatogénicas. El marcaje resulta negativo en todos los casos, independientemente del grupo lesional que estudiemos.

Una limitación en la comparación entre ratas y humanos es que no hemos visto la misma cantidad de regiones anatómicas en los encéfalos humanos que en las ratas. Un bloque de un encéfalo murino incluye una sección coronal completa. En el encéfalo humano tenemos que ser mucho más selectivos. Ello implica que corremos con el riesgo de no tomar muestra de la región adecuada y también que no vamos a descubrir ninguna región afectada que no hayamos planificado previamente.

Conclusiones

- 1- Modificaciones del método de Marmarou y Foda como son: el incremento del diámetro del disco protector del cráneo de 10 a 20 mm, la colocación de la cabeza de la rata más elevada en el momento del impacto y la selección de una base de poliuretano más elástica, dio como resultado un incremento en la supervivencia de las ratas de 30 puntos comparado con el modelo original (80% versus 50%). Además, hubo un incremento en la frecuencia del DAI del 20% al 85,7% tras 24 h de supervivencia.
- 2- El uso combinado de los marcadores inmunohistoquímicos β -APP y fractina tiene utilidad en el diagnóstico etiopatogénico del DAI. Los casos con un alto valor promedio de lesión con β -APP y bajo con fractina sugieren un origen traumático. Este patrón se ha observado también en los casos de DAI estudiados en cerebros humanos lo que demuestra su utilidad en patología forense.
- 3- Las áreas afectadas en las ratas con DAI son diferentes según el origen de la lesión. El marcaje inmunopositivo del hipocampo y tálamo frente a β -APP sugiere un origen traumático mientras que si son positivos frente a fractina sugiere un origen isquémico. El marcaje del caudado-putamen es sugerente de un origen lesional isquémico independientemente del marcador utilizado, β -APP o fractina.

Bibliografía

- Adamec E, Yang F, Cole GM, Nixon RA. 2001. Multiple-label immunocytochemistry for the evaluation of nature of cell death in experimental models of neurodegeneration. . 7(3):193–202
- Adams H, Mitchell DE, Graham DI, Doyle D. 1977. Diffuse brain damage of immediate impact type. Its relationship to “primary brain-stem damage” in head injury. . 100(3):489–502
- Adams JH, Doyle D, Ford I, Gennarelli TA, Graham DI, McLellan DR. 1989. Diffuse axonal injury in head injury: definition, diagnosis and grading. . 15(1):49–59
- Adams JH, Graham DI, Murray LS, Scott G. 1982. Diffuse axonal injury due to nonmissile head injury in humans: an analysis of 45 cases. . 12(6):557–63
- Adams JH, Jennett B, Murray LS, Teasdale GM, Gennarelli TA, Graham DI. 2011. Neuropathological findings in disabled survivors of a head injury. . 28(5):701–9
- Armstrong RC, Mierzwa AJ, Marion CM, Sullivan GM. 2015. White matter involvement after TBI: Clues to axon and myelin repair capacity
- Asahi M, Hoshimaru M, Uemura Y, Tokime T, Kojima M, et al. 1997. Expression of interleukin-1 beta converting enzyme gene family and bcl-2 gene family in the rat brain following permanent occlusion of the middle cerebral artery. . 17(1):11–18
- Bain AC, Meaney DF. 2000. Tissue-level thresholds for axonal damage in an experimental model of central nervous system white matter injury. . 122(6):615–22
- Baranova AI, Wei EP, Ueda Y, Sholley MM, Kontos HA, Povlishock JT. 2008. Cerebral vascular responsiveness after experimental traumatic brain injury: the beneficial effects of delayed hypothermia combined with superoxide dismutase administration. . 109(3):502–9
- Barzó P, Marmarou A, Fatouros P, Corwin F, Dunbar J. 1996. Magnetic resonance imaging—monitored acute blood-brain barrier changes in experimental traumatic brain injury. . 85(6):1113–21
- Bayly PV, Dikranian KT, Black EE, Young C, Qin Y-Q, et al. 2006. Spatiotemporal evolution of apoptotic neurodegeneration following traumatic injury to the developing rat brain. . 1107(1):70–81
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. 1986. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. . 17(3):472–76
- Berry C, Ley EJ, Tillou A, Cryer G, Margulies DR, Salim A. 2009. The effect of gender on patients with moderate to severe head injuries. . 67(5):950–53
- Bisht A, Garg K, Agarwal D, Singh PK, Satyarthee GD, et al. 2013. Histological changes in thalamus in short term survivors following traumatic brain injury: an autopsy study. . 61(6):599–605
- Bittigau P, Sifringer M, Felderhoff-Mueser U, Hansen HH, Ikonomidou C. 2003. Neuropathological and biochemical features of traumatic injury in the developing brain. . 5:475–90
- Blennow K, Hardy J, Zetterberg H. 2012. The neuropathology and neurobiology of traumatic brain injury. . 76(5):886–99
- BLUMBERGS PC, SCOTT G, VIS JM, WAINWRIGHT H, SIMPSON DA, McLEAN AJ. 1995. Topography of axonal injury as defined by amyloid precursor protein and the sector scoring method in mild and severe closed head injury. . 12(4):565–72
- Bodnar CN, Roberts KN, Higgins EK, Bachstetter AD. 2019. A systematic review of closed head injury models of mild traumatic brain injury in mice and rats. . 36(11):1683–1706
- Bodnar CN, Roberts KN, Higgins EK, Bachstetter AD. 2019. A systematic review of closed head injury models of mild traumatic brain injury in mice and rats
- Bramlett HM, Dietrich WD. 2004. Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences. . 24(2):133–50

- Bredesen DE. 1995. Neural apoptosis. . 38(6):839–51
- Brody DL, Benetatos J, Bennett RE, Klemenhagen KC, Mac Donald CL. 2015. The pathophysiology of repetitive concussive traumatic brain injury in experimental models; new developments and open questions
- Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. 2009. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. . 40(5):e331-9
- Browne KD, Chen X-H, Meaney DF, Smith DH. 2011. Mild traumatic brain injury and diffuse axonal injury in swine. . 28(9):1747–55
- Büki A, Povlishock JT. 2006. All roads lead to disconnection?—Traumatic axonal injury revisited. . 148(2):181–94
- Byard RW, Blumbergs P, Scott G, Kennedy JD, Riches KJ, et al. 2006. The Role of β -Amyloid Precursor Protein (β -APP) Staining in the Neuropathologic Evaluation of Sudden Infant Death and in the Initiation of Clinical Investigations of Subsequent Siblings. . 27(4):340–44
- Calikoglu C, Aytekin H, Akgul O, Akgul MH, Gezen AF, et al. 2015. Effect of pregabalin in preventing secondary damage in traumatic brain injury: an experimental study. . 21:813–20
- Campbell GR, Ohno N, Turnbull DM, Mahad DJ. 2012. Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis: an update. . 25(3):221–30
- Carré E, Cantais E, Darbin O, Terrier J-P, Lonjon M, et al. 2004. Technical aspects of an impact acceleration traumatic brain injury rat model with potential suitability for both microdialysis and P t i O 2 monitoring. . 140(1):23–28
- Cassidy JD, Carroll L, Peloso P, Borg J, Von Holst H, et al. 2004. Incidence, risk factors and prevention of mild traumatic brain injury: results of the WHO Collaborating Centre Task Force on Mild Traumatic Brain Injury. . 36(0):28–60
- Cernak I. 2005. Animal models of head trauma. . 2(3):410–22
- Cernak I, Chapman SM, Hamlin GP, Vink R. 2002. Temporal characterisation of pro-and anti-apoptotic mechanisms following diffuse traumatic brain injury in rats. . 9(5):565–72
- Cernak I, Vink R, Zapple DN, Cruz MI, Ahmed F, et al. 2004. The pathobiology of moderate diffuse traumatic brain injury as identified using a new experimental model of injury in rats. . 17(1):29–43
- Chen Q, Chen X, Xu L, Zhang R, Li Z, et al. 2022. Traumatic axonal injury: neuropathological features, postmortem diagnostic methods, and strategies. . 18(4):530–44
- Clark RS, Kochanek PM, Watkins SC, Chen M, Dixon CE, et al. 2000. Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats. . 74(2):740–53
- Coronado VG, McGuire LC, Sarmiento K, Bell J, Lionbarger MR, et al. 2012. Trends in traumatic brain injury in the US and the public health response: 1995–2009. . 43(4):299–307
- Corrigan F, Pham CL, Vink R, Blumbergs PC, Masters CL, et al. 2011. The neuroprotective domains of the amyloid precursor protein, in traumatic brain injury, are located in the two growth factor domains. . 1378:137–43
- Corrigan F, Vink R, Blumbergs PC, Masters CL, Cappai R, van den Heuvel C. 2012. Characterisation of the effect of knockout of the amyloid precursor protein on outcome following mild traumatic brain injury. . 1451:87–99
- Crooks DA. 1991. A method to quantitate axonal injury. . 17(5):421–24
- Davceva N, Basheska N, Balazic J. 2015. Diffuse Axonal Injury-A Distinct Clinicopathological Entity in Closed Head Injuries
- Davceva N, Janevska V, Ilievski B, Petrushevska G, Popeska Z. 2012. The occurrence of acute subdural haematoma and diffuse axonal injury as two typical acceleration injuries. . 19(8):480–84
- Davceva N, Janevska V, Ilievski B, Spasevska L, Popeska Z. 2012. Dilemmas concerning the diffuse axonal injury as a clinicopathological entity in forensic medical practice. . 19(7):413–18

- Davceva N, Sivevski A, Basheska N. 2017. Traumatic axonal injury, a clinical-pathological correlation. . 48:35–40
- de Lanerolle NC, Kim JH, Bandak FA. 2015. Neuropathology of traumatic brain injury: comparison of penetrating, nonpenetrating direct impact and explosive blast etiologies. . 35(1):12–19
- Dempsey RJ, Baskaya MK, Dogan A. 2000. Attenuation of brain edema, blood-brain barrier breakdown, and injury volume by ifenprodil, a polyamine-site N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, after experimental traumatic brain injury in rats. . 47(2):399–404; discussion 404-6
- Dikranian K, Cohen R, Mac Donald C, Pan Y, Brakefield D, et al. 2008. Mild traumatic brain injury to the infant mouse causes robust white matter axonal degeneration which precedes apoptotic death of cortical and thalamic neurons. . 211(2):551–60
- Dolinak D, Smith C, Graham DI. 2000. Global hypoxia per se is an unusual cause of axonal injury. . 100(5):553–60
- Dressler J, Hanisch U, Kuhlisch E, Geiger KD. 2007. Neuronal and glial apoptosis in human traumatic brain injury. . 121(5):365–75
- Dubois-Dauphin M, Pfister Y, Vallet PG, Savioz A. 2001. Prevention of apoptotic neuronal death by controlling procaspases? A point of view. . 36(2):196–203
- Eierud C, Craddock RC, Fletcher S, Aulakh M, King-Casas B, et al. 2014. Neuroimaging after mild traumatic brain injury: review and meta-analysis. . 4:283–94
- El Sayed T, Mota A, Fraternali F, Ortiz M. 2008. Biomechanics of traumatic brain injury. . 197(51):4692–4701
- Elibol B, Söylemezoglu F, Ünal I, Fujii M, Hirt L, et al. 2001. Nitric oxide is involved in ischemia-induced apoptosis in brain: a study in neuronal nitric oxide synthase null mice. . 105(1):79–86
- Farace E, Alves WM. 2000. Do women fare worse: a metaanalysis of gender differences in traumatic brain injury outcome. . 93(4):539–45
- Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. 1997. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. . 120(3):393–99
- Fijalkowski RJ, Stemper BD, Pintar FA, Yoganandan N, Crowe MJ, Gennarelli TA. 2007. New rat model for diffuse brain injury using coronal plane angular acceleration. . 24(8):1387–98
- Finnie JW. 2014. Pathology of traumatic brain injury. . 38(4):297–305
- Flierl MA, Stahel PF, Beauchamp KM, Morgan SJ, Smith WR, Shohami E. 2009. Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. . 4(9):1328–37
- Foda MA, Marmarou A. 1994. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. . 80(2):301–13
- Fрати A, Cerretani D, Fiaschi AI, Frati P, Gatto V, et al. 2017. Diffuse Axonal Injury and Oxidative Stress: A Comprehensive Review. . 18(12):2600. doi: 10.3390/ijms18122600
- Friess SH, Ichord RN, Owens K, Ralston J, Rizol R, et al. 2007. Neurobehavioral functional deficits following closed head injury in the neonatal pig. . 204(1):234–43
- Fujita M, Wei EP, Povlishock JT. 2012. Intensity- and interval-specific repetitive traumatic brain injury can evoke both axonal and microvascular damage. . 29(12):2172–80
- Furlow, T.W., Jr. 1982. Cerebral ischemia produced by four-vessel occlusion in the rat: a quantitative evaluation of cerebral blood flow. . 13(6):852–55
- Geddes JF, Hackshaw AK, Vowles GH, Nickols CD, Whitwell HL. 2001. Neuropathology of inflicted head injury in children. I. Patterns of brain damage. . 124(Pt 7):1290–98
- Geddes JF, Vowles GH, Beer TW, Ellison DW. 1997. The diagnosis of diffuse axonal injury: implications for forensic practice. . 23(4):339–47
- Geddes JF, Vowles GH, Hackshaw AK, Nickols CD, Scott IS, Whitwell HL. 2001. Neuropathology of inflicted head injury in children. II. Microscopic brain injury in infants. . 124(Pt 7):1299–1306
- Geddes JF, Whitwell HL, Graham DI. 2000. Traumatic axonal injury: practical issues for diagnosis in medicolegal cases. . 26(2):105–16

- Gennarelli TA. 1994. Animate models of human head injury. . 11(4):357–68
- Gennarelli TA, Adams JH, Graham DI. 1981. Acceleration induced head injury in the monkey.I. The model, its mechanical and physiological correlates. . 7:23–25
- Gennarelli TA, Thibault LE, Adams JH, Graham DI, Thompson CJ, Marcincin RP. 1982. Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate. . 12(6):564–74
- Gentleman SM, Roberts GW, Gennarelli TA, Maxwell WL, Adams JH, et al. 1995. Axonal injury: a universal consequence of fatal closed head injury? . 89(6):537–43
- Ginet V, Pittet MP, Rummel C, Osterheld MC, Meuli R, et al. 2014. Dying neurons in thalamus of asphyxiated term newborns and rats are autophagic. . 76(5):695–711
- Giometto B, An SF, Groves M, Scaravilli T, Geddes JF, et al. 1997. Accumulation of β -amyloid precursor protein in HIV encephalitis: relationship with neuropsychological abnormalities. . 42(1):34–40
- Gleckman AM, Bell MD, Evans RJ, Smith TW. 1999. Diffuse axonal injury in infants with nonaccidental craniocerebral trauma. . 123(2):146
- Grorie C, Dufloy J, Brown J, Waite PM. 1999. Fatal head injury in children: a new approach to scoring axonal and vascular damage. . 15(6–7):322–28
- Graham DI, Adams JH, Nicoll J, Maxwell WL, Gennarelli TA. 1995. The nature, distribution and causes of traumatic brain injury. . 5(4):397–406
- Graham DI, Clark JC, Adams JH, Gennarelli TA. 1992. Diffuse axonal injury caused by assault. . 45(9):840–41
- Graham DI, Smith C, Reichard R, Leclercq PD, Gentleman SM. 2004. Trials and tribulations of using beta-amyloid precursor protein immunohistochemistry to evaluate traumatic brain injury in adults. . 146(2–3):89–96
- Greer JE, McGinn MJ, Povlishock JT. 2011. Diffuse traumatic axonal injury in the mouse induces atrophy, c-Jun activation, and axonal outgrowth in the axotomized neuronal population. . 31(13):5089–5105
- Gupte RP, Brooks WM, Vukas RR, Pierce JD, Harris JL. 2019. Sex differences in traumatic brain injury: what we know and what we should know. . 36(22):3063–91
- Hall ED, Gibson TR, Pavel KM. 2005. Lack of a gender difference in post-traumatic neurodegeneration in the mouse controlled cortical impact injury model. . 22(6):669–79
- Hånell A, Greer JE, McGinn MJ, Povlishock JT. 2015. Traumatic brain injury-induced axonal phenotypes react differently to treatment. . 129(2):317–32
- Harrington D, Ruddy GN, Timperley WR. 2000. Beta -Amyloid Precursor Protein Positive Axonal Bulbs may Form in Non-Head-Injured Patients. . 7(1):19–25
- Harris ACJ, Sun J, Jacobs K. 2023. Concussive head trauma deranges axon initial segment function in axotomized and intact layer 5 pyramidal neurons
- Hausmann R, Biermann T, Wiest I, Tübel J, Betz P. 2004. Neuronal apoptosis following human brain injury. . 118(1):32–36
- Hausmann R, Vogel C, Seidl S, Betz P. 2006. Value of morphological parameters for grading of brain swelling. . 120(4):219–25
- Hayashi T, Ago K, Ago M, Ogata M. 2009. Two patterns of β -amyloid precursor protein (APP) immunoreactivity in cases of blunt head injury. . 11:S171–73
- Hayashi T, Ago K, Nakamae T, Higo E, Ogata M. 2015. Two different immunostaining patterns of beta-amyloid precursor protein (APP) may distinguish traumatic from nontraumatic axonal injury. . 129(5):1085–90
- Haynes RL, Billiards SS, Borenstein NS, Volpe JJ, Kinney HC. 2008. Diffuse axonal injury in periventricular leukomalacia as determined by apoptotic marker fractin. . 63(6):656–61
- Hortobagyi T, Wise S, Hunt N, Cary N, Djurovic V, et al. 2007. Traumatic axonal damage in the brain can be detected using β -APP immunohistochemistry within 35 min after head injury to human adults. . 33(2):226–37

- Huh JW, Widing AG, Raghupathi R. 2008. Midline brain injury in the immature rat induces sustained cognitive deficits, bihemispheric axonal injury and neurodegeneration. . 213(1):84–92
- Huh JW, Widing AG, Raghupathi R. 2011. Differential effects of injury severity on cognition and cellular pathology after contusive brain trauma in the immature rat. . 28(2):245–57
- Iino M, Nakatome M, Ogura Y, Fujimura H, Kuroki H, et al. 2003. Real-time PCR quantitation of FE65 a β -amyloid precursor protein-binding protein after traumatic brain injury in rats. . 117(3):153–59
- Iino M, Nakatome M, Ogura Y, Fujimura H, Kuroki H, et al. 2003. Real-time PCR quantitation of FE65 a β -amyloid precursor protein-binding protein after traumatic brain injury in rats. . 117(3):153–59
- Injury NCDP on R of P with TB. 1999. Rehabilitation of persons with traumatic brain injury. . 282:974–83
- Jalloh I, Helmy A, Howe DJ, Shannon RJ, Grice P, et al. 2018. A Comparison of Oxidative Lactate Metabolism in Traumatically Injured and Control Brains
- Jensen LL, Banner J, Byard RW. 2014. Does beta-APP staining of the brain in infant bed-sharing deaths differentiate these cases from sudden infant death syndrome? . 27:46–49
- Jensen LL, Banner J, Ulhøi BP, Byard RW. 2014. β -Amyloid precursor protein staining of the brain in sudden infant and early childhood death. . 40(4):385–97
- Johnson MW, Stoll L, Rubio A, Troncoso J, Pletnikova O, et al. 2011. Axonal Injury in Young Pediatric Head Trauma: A Comparison Study of β -amyloid Precursor Protein (β -APP) Immunohistochemical Staining in Traumatic and Nontraumatic Deaths*. . 56(5):1198–1205
- Johnson VE, Stewart JE, Begbie FD, Trojanowski JQ, Smith DH, Stewart W. 2013. Inflammation and white matter degeneration persist for years after a single traumatic brain injury. . 136(Pt 1):28–42
- Johnson VE, Stewart W, Smith DH. 2013. Axonal pathology in traumatic brain injury. . 246:35–43
- Johnson VE, Stewart W, Weber MT, Cullen DK, Siman R, Smith DH. 2016. SNTF immunostaining reveals previously undetected axonal pathology in traumatic brain injury. . 131(1):115–35
- Jorge RE, Starkstein SE. 2005. Pathophysiologic aspects of major depression following traumatic brain injury. . 20(6):475–87
- Jullienne A, Salehi A, Affeldt B, Baghchechi M, Haddad E, et al. 2018. Male and female mice exhibit divergent responses of the cortical vasculature to traumatic brain injury. . 35(14):1646–58
- Kalimo H, Saukko P, Graham D. 2004. Neuropathological examination in forensic context. . 146(2–3):73–81
- Kaur B, Ruttly GN, Timperley WR. 1999. The possible role of hypoxia in the formation of axonal bulbs. . 52(3):203–9
- Khormi YH, Gosadi I, Campbell S, Senthilselvan A, O'Kelly C, Zygun D. 2018. Adherence to Brain Trauma Foundation guidelines for management of traumatic brain injury patients and its effect on outcomes: systematic review
- Kilbourne M, Kuehn R, Tosun C, Caridi J, Keledjian K, et al. 2009. Novel model of frontal impact closed head injury in the rat. . 26(12):2233–43
- Kita H, Marmarou A. 1994. The cause of acute brain swelling after the closed head injury in rats. Springer. 4 pp.
- Knickmeyer RC, Gouttard S, Kang C, Evans D, Wilber K, et al. 2008. A Structural MRI Study of Human Brain Development from Birth to 2 Years. . 28:12176–82
- Krajewski S, Krajewska M, Ellerby LM, Welsh K, Xie Z, et al. 1999. Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. . 96(10):5752–57
- Kraus JF, McArthur DL. 1996. Epidemiologic aspects of brain injury. . 14(2):435–50
- Krupinski J, Lopez E, Marti E, Ferrer I. 2000. Expression of caspases and their substrates in the rat model of focal cerebral ischemia. . 7(4):332–42

- Kunz A, Dirnagl U, Mergenthaler P. 2010. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. . 24(4):495–509
- Kupina NC, Detloff MR, Bobrowski WF, Snyder BJ, Hall ED. 2003. Cytoskeletal protein degradation and neurodegeneration evolves differently in males and females following experimental head injury. . 180(1):55–73
- Laborde A. 2000. NIH consensus development panel on rehabilitation of persons with traumatic brain injury. . 15(1):761–63
- Lambri M, Djurovic V, Kibble M, Cairns N, Al-Sarraj S. 2001. Specificity and sensitivity of betaAPP in head injury. . 20(6):263–71
- Lankiewicz S, Marc Luetjens C, Truc Bui N, Krohn AJ, Poppe M, et al. 2000. Activation of calpain I converts excitotoxic neuron death into a caspase-independent cell death. . 275(22):17064–71
- Laurer HL, Lenzlinger PM, McIntosh TK. 2000. Models of traumatic brain injury. . 26(3):95–110
- Laurer HL, McIntosh TK. 1999. Experimental models of brain trauma. . 12(6):715–21
- Lebel C, Walker L, Leemans A, Phillips L, Beaulieu C. 2008. Microstructural maturation of the human brain from childhood to adulthood. . 40(3):1044–55
- Levasseur JE, Wei EP, Raper AJ, Kontos AA, Patterson JL. 1975. Detailed description of a cranial window technique for acute and chronic experiments. . 6(3):308–17
- LEVINE S. 1960. Anoxic-ischemic encephalopathy in rats. . 36(1):1–17
- Lindgren S, Rinder L. 1965. Experimental studies in head injury. I. Some factors influencing results of model experiments. . 2(5):320–29
- Liu G, Wang T, Wang T, Song J, Zhou Z. 2013. Effects of apoptosis-related proteins caspase-3, Bax and Bcl-2 on cerebral ischemia rats. . 1(6):861–67
- Ljungqvist J, Zetterberg H, Mitsis M, Blennow K, Skoglund T. 2017. Serum neurofilament light protein as a marker for diffuse axonal injury: results from a case series study. . 34(5):1124–27
- Love S, Barber R, Wilcock GK. 2000. Neuronal death in brain infarcts in man. . 26(1):55–66
- MacKenzie JM. 2015. Axonal Injury in Stroke: A Forensic Neuropathology Perspective. . 36(3):172–75
- Mahad DJ, Ziabreva I, Campbell G, Lax N, White K, et al. 2009. Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. . 132(Pt 5):1161–74
- Majdan M, Rusnák M, Brazinova A, Mauritz W. 2015. Severity, causes and outcomes of traumatic brain injuries occurring at different locations: implications for prevention and public health. . 23(2):142
- Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. 1994. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. . 80(2):291–300
- Marmarou CR, Walker SA, Davis CL, Povlishock JT. 2005. Quantitative analysis of the relationship between intra-axonal neurofilament compaction and impaired axonal transport following diffuse traumatic brain injury. . 22(10):1066–80
- Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kirsch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C. 1998. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. . 46(4):281–309
- Martin LJ, Kaiser A, Price AC. 1999. Motor neuron degeneration after sciatic nerve avulsion in adult rat evolves with oxidative stress and is apoptosis. . 40(2):185–201
- Maxwell WL. 2012. Traumatic brain injury in the neonate, child and adolescent human: an overview of pathology. . 30(3):167–83
- Maxwell WL, MacKinnon M-A, Stewart JE, Graham DI. 2010. Stereology of cerebral cortex after traumatic brain injury matched to the Glasgow Outcome Score. . 133(1):139–60
- MAXWELL WL, POVLISHOCK JT, GRAHAM DL. 1997. A Mechanistic Analysis of Nondisruptive Axonal Injury: A Review. . 14(7):419–40

- McIntosh TK, Smith DH, Meaney DF, Kotapka MJ, Gennarelli TA, Graham DI. 1996. Neuropathological sequelae of traumatic brain injury: relationship to neurochemical and biomechanical mechanisms. . 74(2):315–42
- Medana IM, Esiri MM. 2003. Axonal damage: a key predictor of outcome in human CNS diseases. . 126(Pt 3):515–30
- Meythaler JM, Peduzzi JD, Eleftheriou E, Novack TA. 2001. Current concepts: diffuse axonal injury-associated traumatic brain injury. . 82(10):1461–71
- Michaud J, Plu I, Parai J, Bourgault A, Tanguay C, et al. 2023. Ballooned neurons in semi-recent severe traumatic brain injury. . 11(1):37
- Mondello S, Schmid K, Berger RP, Kobeissy F, Italiano D, et al. 2014. The challenge of mild traumatic brain injury: role of biochemical markers in diagnosis of brain damage. . 34(3):503–31
- Morales DM, Marklund N, Lebold D, Thompson HJ, Pitkanen A, et al. 2005. Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? . 136(4):971–89
- Morgan R, Kreipke CW, Roberts G, Bagchi M, Rafols JA. 2007. Neovascularization following traumatic brain injury: possible evidence for both angiogenesis and vasculogenesis. . 29(4):375–81
- Mori I, Goshima F, Mizuno T, Imai Y, Kohsaka S, et al. 2005. Axonal injury in experimental herpes simplex encephalitis. . 1057(1–2):186–90
- Morrison C, MacKenzie JM. 2008. Axonal injury in head injuries with very short survival times. . 34(1):124–25
- Mu J, Li M, Wang T, Li X, Bai M, et al. 2019. Myelin damage in diffuse axonal injury. . 13:217
- Mu J, Song Y, Zhang J, Lin W, Dong H. 2015. Calcium signaling is implicated in the diffuse axonal injury of brain stem. . 8(5):4388
- Najafipour H, Siahposht Khachaki A, Khaksari M, Shahouzehi B, Joukar S, Poursalehi HR. 2014. Traumatic brain injury has not prominent effects on cardiopulmonary indices of rat after 24 hours: hemodynamic, histopathology, and biochemical evidence. . 18(4):225–31
- Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, et al. 1998. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. . 18(10):3659–68
- Newcomb JK, Zhao X, Pike BR, Hayes RL. 1999. Temporal profile of apoptotic-like changes in neurons and astrocytes following controlled cortical impact injury in the rat. . 158(1):76–88
- Newcombe VF, Williams GB, Outtrim JG, Chatfield D, Abate MG, et al. 2013. Microstructural basis of contusion expansion in traumatic brain injury: insights from diffusion tensor imaging. . 33(6):855–62
- Niess C, Grauel U, Toennes SW, Bratzke H. 2002. Incidence of axonal injury in human brain tissue. . 104(1):79–84
- Nilsson P, Hillered L, Ponten U, Ungerstedt U. 1990. Changes in cortical extracellular levels of energy-related metabolites and amino acids following concussive brain injury in rats. . 10(5):631–37
- Northington FJ, Chavez-Valdez R, Martin LJ. 2011. Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. . 69(5):743–58
- Northington FJ, Ferriero DM, Graham EM, Traystman RJ, Martin LJ. 2001. Early Neurodegeneration after Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rat Is Necrosis while Delayed Neuronal Death Is Apoptosis. . 8(2):207–19
- Obreja C. 1999. The stereotactical phenomena in traumatic brain injury biomechanics-diffuse axonal injury and brain concussion. . 16(3–4):310–11
- Obreja CT. 2000. The stereotactical phenomena in traumatic brain injury biomechanics—what long-term consequences? . 21:148
- O'Connor WT, Smyth A, Gilchrist MD. 2011. Animal models of traumatic brain injury: a critical evaluation. . 130(2):106–13
- Oehmichen M. 1994. Brain death: neuropathological findings and forensic implications. . 69(3):205–

- Oehmichen M, Meissner C, Schmidt V, Pedal I, König HG. 1999. Pontine axonal injury after brain trauma and nontraumatic hypoxic-ischemic brain damage. . 112(4):261–67
- Oehmichen M, Meissner C, Schmidt V, Pedal I, König HG, Saternus KS. 1998. Axonal injury--a diagnostic tool in forensic neuropathology? A review. . 95(1):67–83
- Oehmichen M, Meissner C, von Wurmb-Schwark N, Schwark T. 2003. Methodical approach to brain hypoxia/ischemia as a fundamental problem in forensic neuropathology. . 5(4):190–201
- Oehmichen M, Schleiss D, Pedal I, Saternus KS, Gerling I, Meissner C. 2008. Shaken baby syndrome: re-examination of diffuse axonal injury as cause of death. . 116(3):317–29
- Oehmichen M, Theuerkauf I, Meissner C. 1999. Is traumatic axonal injury (AI) associated with an early microglial activation? Application of a double-labeling technique for simultaneous detection of microglia and AI. . 97(5):491–94
- Oo TF, Siman R, Burke RE. 2002. Distinct nuclear and cytoplasmic localization of caspase cleavage products in two models of induced apoptotic death in dopamine neurons of the substantia nigra. . 175(1):1–9
- Parker JC, Overman JC. 1990. Intracranial diffuse axonal injury at autopsy. . 20(3):220–24
- Pfister Y, Savioz A, Vallet PG, Dubois-Dauphin M. 2003. Permanent cerebral ischemia induces sustained procaspase 9L increase not controlled by Bcl-2. . 966(1):26–39
- Pike BR, Zhao X, Newcomb JK, Posmantur RM, Wang KK, Hayes RL. 1998. Regional calpain and caspase-3 proteolysis of α -spectrin after traumatic brain injury. . 9(11):2437–42
- Piper IR, Thomson D, Miller JD. 1996. Monitoring weight drop velocity and foam stiffness as an aid to quality control of a rodent model of impact acceleration neurotrauma. . 69(2):171–74
- Povlishock JT. 1992. Traumatically induced axonal injury: pathogenesis and pathobiological implications. . 2(1):1–12
- Povlishock JT, Christman CW. 1995. The pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and humans: a review of current thoughts. . 12(4):555–64
- Povlishock JT, Marmarou A, McIntosh T, Trojanowski JQ, Moroi J. 1997. Impact acceleration injury in the rat: evidence for focal axolemmal change and related neurofilament sidearm alteration. . 56(4):347–59
- Pulera MR, Adams LM, Liu H, Santos DG, Nishimura RN, et al. 1998. Apoptosis in a neonatal rat model of cerebral hypoxia-ischemia. . 29(12):2622–30
- Pulsinelli WA, Brierley JB. 1979. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. . 10(3):267–72
- Pulsinelli WA, Buchan AM. 1988. The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. . 19(7):913–14
- Pulsinelli WA, Levy DE, Duffy TE. 1983. Cerebral blood flow in the four-vessel occlusion rat model. . 14(5):832–34
- Radojevic N, Radnic B, Vucinic J, Cukic D, Lazovic R, et al. 2016. Mathematical model in post-mortem estimation of brain edema using morphometric parameters
- RAGHUPATHI R, GRAHAM DI, McINTOSH TK. 2000. Apoptosis after traumatic brain injury. . 17(10):927–38
- Rami A, Sims J, Botez G, Winckler J. 2003. Spatial resolution of phospholipid scramblase 1 (PLSCR1), caspase-3 activation and DNA-fragmentation in the human hippocampus after cerebral ischemia. . 43(1):79–87
- Ramlackhansingh AF, Brooks DJ, Greenwood RJ, Bose SK, Turkheimer FE, et al. 2011. Inflammation after trauma: microglial activation and traumatic brain injury. . 70(3):374–83
- Reeves TM, Phillips LL, Povlishock JT. 2005. Myelinated and unmyelinated axons of the corpus callosum differ in vulnerability and functional recovery following traumatic brain injury. . 196(1):126–37

- Reichard RR, Smith C, Graham DI. 2005. The significance of beta-APP immunoreactivity in forensic practice. . 31(3):304–13
- Reichard RR, White Iii CL, Hladik CL, Dolinak D. 2003. Beta-amyloid precursor protein staining of nonaccidental central nervous system injury in pediatric autopsies. . 20(4):347–55
- Reichard RR, WHITE III CL, Hladik CL, Dolinak D. 2003. Beta-Amyloid Precursor Protein Staining in Nonhomicidal Pediatric Medicolegal Autopsies. . 62(3):237–47
- Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, Lee VM, Neugebauer E, McIntosh TK. 1995. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. . 147(6):1575–83
- ROOF RL, HALL ED. 2000. Estrogen-related gender difference in survival rate and cortical blood flow after impact-acceleration head injury in rats. . 17(12):1155–69
- Ross MH, Pawlina W. 2007. Sistema nervioso. Ed. Médica Panamericana
- Rossiter JP, Anderson LL, Yang F, Cole GM. 2002. Caspase-3 activation and caspase-like proteolytic activity in human perinatal hypoxic-ischemic brain injury. . 103(1):66–73
- Rothig W, Schaarschmidt W. 1977. Linear relationship between body length and brain weight. . 123(2):208–13
- Russo T, Faraonio R, Minopoli G, De Candia P, De Renzis S, Zambrano N. 1998. Fe65 and the protein network centered around the cytosolic domain of the Alzheimer's β -amyloid precursor protein. . 434(1):1–7
- Schalomon PM, Wahlsten D. 1995. A precision surgical approach for complete or partial callosotomy in the mouse. . 57(6):1199–1203
- Shahim P, Tegner Y, Wilson DH, Randall J, Skillbäck T, et al. 2014. Blood biomarkers for brain injury in concussed professional ice hockey players. . 71(6):684–92
- Shannon P, Smith CR, Deck J, Ang LC, Ho M, Becker L. 1998. Axonal injury and the neuropathology of shaken baby syndrome. . 95(6):625–31
- Sharma M, Subramaniam A, Sengar K, Suri V, Agrawal D, et al. 2023. Pathological Spectrum and β -APP Immunoreactivity as a Diagnostic Tool of Diffuse Axonal Injury following Traumatic Brain Injury: A Novel Classification
- Sherriff FE, Bridges LR, Sivaloganathan S. 1994. Early detection of axonal injury after human head trauma using immunocytochemistry for beta-amyloid precursor protein. . 87(1):55–62
- Shreiber DI, Bain AC, Ross DT, Smith DH, Gennarelli TA, et al. 1999. Experimental investigation of cerebral contusion: histopathological and immunohistochemical evaluation of dynamic cortical deformation. . 58(2):153–64
- Siedler DG, Chuah MI, Kirkcaldie MT, Vickers JC, King AE. 2014. Diffuse axonal injury in brain trauma: insights from alterations in neurofilaments. . 8:429
- Siman R, Giovannone N, Hanten G, Wilde EA, McCauley SR, et al. 2013. Evidence that the blood biomarker SNTF predicts brain imaging changes and persistent cognitive dysfunction in mild TBI patients. . 4:190
- Simpson RH, Berson DS, Shapiro HA. 1985. The diagnosis of diffuse axonal injury in routine autopsy practice. . 27(4):229–35
- Singleton RH, Povlishock JT. 2004. Identification and characterization of heterogeneous neuronal injury and death in regions of diffuse brain injury: evidence for multiple independent injury phenotypes. . 24(14):3543–53
- Smith C, Graham DI, Geddes JF, Whitwell HL. 2003. The interpretation of beta-APP immunoreactivity: a response to C. Neiss et al., *Acta Neuropathol* (2002) 104:79. . 106(1):97–98
- Smith DH. 2016. Neuromechanics and Pathophysiology of Diffuse Axonal Injury in Concussion. . 46(1):79–84
- Smith DH, Hicks R, Povlishock JT. 2013. Therapy development for diffuse axonal injury. . 30(5):307–

- Smith DH, Johnson VE, Stewart W. 2013. Chronic neuropathologies of single and repetitive TBI: substrates of dementia? . 9(4):211–21
- Smith DH, Meaney DF. 2000. Axonal Damage in Traumatic Brain Injury. . 6(6):483–95
- Smith DH, Meaney DF, Shull WH. 2003. Diffuse axonal injury in head trauma. . 18(4):307–16
- Snyder VS, Hansen LA. 2016. A conceptual overview of axonopathy in infants and children with allegedly inflicted head trauma. . 6(4):608–21
- Staal JA, Dickson TC, Gasperini R, Liu Y, Foa L, Vickers JC. 2010. Initial calcium release from intracellular stores followed by calcium dysregulation is linked to secondary axotomy following transient axonal stretch injury. . 112(5):1147–55
- Staal JA, Vickers JC. 2011. Selective vulnerability of non-myelinated axons to stretch injury in an in vitro co-culture system. . 28(5):841–47
- Stadelman C, Mews I, Srinivasan A, Deckwerth TL, Lassmann H, Bruck W. 2001. Expression of cell death-associated proteins in neuronal apoptosis associated with pontosubicular neuron necrosis. . 11(3):273–81
- Statler KD, Jenkins LW, Dixon CE, Clark RS, Marion DW, Kochanek PM. 2001. The simple model versus the super model: translating experimental traumatic brain injury research to the bedside. . 18(11):1195–1206
- Stein DG. 2011. Progesterone in the treatment of acute traumatic brain injury: a clinical perspective and update. . 191:101–6
- Stocchetti N. 2014. Traumatic brain injury: problems and opportunities. . 13(1):14–16
- Stone JR, Singleton RH, Povlishock JT. 2000. Antibodies to the C-terminus of the β -amyloid precursor protein (APP): a site specific marker for the detection of traumatic axonal injury. . 871(2):288–302
- Stone JR, Singleton RH, Povlishock JT. 2001. Intra-axonal neurofilament compaction does not evoke local axonal swelling in all traumatically injured axons. . 172(2):320–31
- STRICH SJ. 1956. Diffuse degeneration of the cerebral white matter in severe dementia following head injury. . 19(3):163–85
- Su E BM. 2016. Diffuse Axonal Injury. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor and Francis Group
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, et al. 1999. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. . 397(6718):441–46
- Suurmeijer AJ, van der Wijk J, van Veldhuisen DJ, Yang F, Cole GM. 1999. Fractin immunostaining for the detection of apoptotic cells and apoptotic bodies in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue. . 79(5):619–20
- Takizawa Y, Takashima S, Itoh M. 2006. A histopathological study of premature and mature infants with pontosubicular neuron necrosis: neuronal cell death in perinatal brain damage. . 1095(1):200–206
- Tamnes CK, Ostby Y, Fjell AM, Westlye LT, Due-Tønnessen P, Walhovd KB. 2010. Brain maturation in adolescence and young adulthood: regional age-related changes in cortical thickness and white matter volume and microstructure. . 20(3):534–48
- Tamura A, Nagayama K, Matsumoto T, Hayashi S. 2007. Variation in nerve fiber strain in brain tissue subjected to uniaxial stretch
- Tang-Schomer MD, Johnson VE, Baas PW, Stewart W, Smith DH. 2012. Partial interruption of axonal transport due to microtubule breakage accounts for the formation of periodic varicosities after traumatic axonal injury. . 233(1):364–72
- Tang-Schomer MD, Patel AR, Baas PW, Smith DH. 2010. Mechanical breaking of microtubules in axons during dynamic stretch injury underlies delayed elasticity, microtubule disassembly, and axon degeneration. . 24(5):1401–10
- Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. . 281(5381):1312–16

- Thornton E, Vink R, Blumbergs PC, Van Den Heuvel C. 2006. Soluble amyloid precursor protein α reduces neuronal injury and improves functional outcome following diffuse traumatic brain injury in rats. . 1094(1):38–46
- Towfighi J, Zec N, Yager J, Housman C, Vannucci RC. 1995. Temporal evolution of neuropathologic changes in an immature rat model of cerebral hypoxia: a light microscopic study. . 90(4):375–86
- Troy CM, Stefanis L, Prochiantz A, Greene LA, Shelanski ML. 1996. The contrasting roles of ICE family proteases and interleukin-1 β in apoptosis induced by trophic factor withdrawal and by copper/zinc superoxide dismutase down-regulation. . 93(11):5635–40
- Trump BE. 1982. The cellular and subcellular characteristics of acute and chronic injury with emphasis on the role of calcium
- Ucar T, Tanriover G, Gurer I, Onal MZ, Kazan S. 2006. Modified experimental mild traumatic brain injury model. . 60(3):558–65
- Viancour TA, Kreiter NA. 1993. Vesicular fast axonal transport rates in young and old rat axons. . 628(1):209–17
- Wang HC, Duan ZX, Wu FF, Xie L, Zhang H, Ma YB. 2010. A new rat model for diffuse axonal injury using a combination of linear acceleration and angular acceleration. . 27(4):707–19
- Wang J, Fox MA, Povlishock JT. 2013. Diffuse traumatic axonal injury in the optic nerve does not elicit retinal ganglion cell loss. . 72(8):768–81
- Wang Y, Chen Q, Dang X, Lu W, Zhang X, et al. 2023. A bibliometric analysis on traumatic brain injury in forensic medicine of a half-century (1972–2021). . 14:913855
- Whitwell H, Milroy C, du Plessis D. 2021. Forensic neuropathology. CRC Press
- Wilkinson AE, Bridges LR, Sivaloganathan S. 1999. Correlation of survival time with size of axonal swellings in diffuse axonal injury. . 98(2):197–202
- Xiao-Sheng H, Sheng-Yu Y, Xiang Z, Zhou F, Jian-ning Z. 2000. Diffuse axonal injury due to lateral head rotation in a rat model. . 93(4):626–33
- Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. 2013. Animal models of traumatic brain injury. . 14(2):128–42
- Yakovlev AG, Knoblach SM, Fan L, Fox GB, Goodnight R, Faden AI. 1997. Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. . 17(19):7415–24
- Yallampalli R, Wilde EA, Bigler ED, McCauley SR, Hanten G, et al. 2013. Acute white matter differences in the fornix following mild traumatic brain injury using diffusion tensor imaging. . 23(2):224–27
- Yang F, Sun X, Beech W, Teter B, Wu S, et al. 1998. Antibody to caspase-cleaved actin detects apoptosis in differentiated neuroblastoma and plaque-associated neurons and microglia in Alzheimer's disease. . 152(2):379–89
- Yang T, Zhuang L, Terrando N, Wu X, Jonhson MR, et al. 2011. A clinically relevant model of perinatal global ischemic brain damage in rats. . 1383:317–23
- Yates AJ, Thelmo W, Pappius HM. 1975. Postmortem changes in the chemistry and histology of normal and edematous brains. . 79(3):555–64
- Yoganandan N, Gennarelli TA, Zhang J, Pintar FA, Takhounts E, Ridella SA. 2009. Association of contact loading in diffuse axonal injuries from motor vehicle crashes. . 66(2):309–15
- Zhang J, Yoganandan N, Pintar FA, Gennarelli TA. 2006. Role of translational and rotational accelerations on brain strain in lateral head impact. . 42:501–6
- Zhu JL, Zhu SH, Ren L. 2005. Expression of beta-amyloid precursor protein in diffuse axonal injury of rats. . 21(3):165–68
- Zohar O, Rubovitch V, Milman A, Schreiber S, Pick CG. 2011. Behavioral consequences of minimal traumatic brain injury in mice. . 71(1):36–452.

Declaración: Conflicto de intereses

El autor declara no tener ningún conflicto de interés en relación con la tesis doctoral.

Anexo 1: Publicación realizada

- Año: 2023
- Autores:
 - Alberto Fernández-Liste MD¹
 - Antonio González-Cantalapiedra PhD²
 - José L. Cascallana PhD, MD³
 - Tomás García-Caballero PhD, MD⁴
 - Rosalía Gallego PhD, MD⁴

1-Forensic Pathology Service, Institute of Legal Medicine, A Coruña, Spain

2-Department of Anatomy, Animal Production and Veterinary Clinical Sciences, School of Veterinary, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

3-Forensic Pathology Service, Institute of Legal Medicine, Lugo, Spain

4-Department of Morphological Sciences, School of Medicine and Dentistry, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

- DOI: 10.1111/1556-4029.15276
- Datos revista:
 - Impact factor (2022):1.6
 - Journal Citation Reports (Clarivate, 2023): 10/17 (Medicine, Legal (Science))
 - Online ISSN:1556-4029
 - Print ISSN:0022-1198
- Se reproducen contenidos de la publicación en:
 - Introducción
 - Material y métodos
 - Resultados
 - Discusión
- El doctorando ha sido el desarrollador y trabajador principal del material publicado


A continuación se adjunta:

-El artículo titulado *Modification of the Marmarou and Foda model of diffuse axonal injury (DAI) improves percentage survival of rats at 24 h and increases the amount of DAI identified* publicado en Journal of Forensic Sciences

ORIGINAL PAPER

Pathology/Biology

Modification of the Marmarou and Foda model of diffuse axonal injury (DAI) improves percentage survival of rats at 24 h and increases the amount of DAI identified

Alberto Fernández-Liste MD¹  | Antonio González-Cantalapiedra PhD² |
José L. Cascallana PhD, MD³ | Tomás García-Caballero PhD, MD⁴ | Rosalía Gallego PhD, MD⁴

¹Forensic Pathology Service, Institute of Legal Medicine, A Coruña, Spain

²Department of Anatomy, Animal Production and Veterinary Clinical Sciences, School of Veterinary, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

³Forensic Pathology Service, Institute of Legal Medicine, Lugo, Spain

⁴Department of Morphological Sciences, School of Medicine and Dentistry, University of Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, Spain

Correspondence

Alberto Fernández-Liste, Institute of Legal Medicine, Capitán Juan Varela s/n, 15007 A Coruña, Spain.

Email: alberto.fernandez.liste@xunta.gal

Abstract

More than two decades ago, Marmarou published a valid model for producing diffuse axonal injury (DAI) in rats. Since then, both mild and severe injuries have been obtained by researchers using the original method and a weight of 450g. However, the diffuse brain injuries produced in rats were only similar to those seen in humans when the rats sustained severe brain injuries. In these cases, rat mortality in the original article was around 50%, and the cause of death was prolonged apnea post-impact. Rat survival after impact is critical for studying the progression of DAI. In order to explain the cause of death in human victims with cranial trauma who do not show gross brain injury, testing for the presence of DAI is essential. Thus, in order to minimize local and cervical injuries to increase rat survival, attention should be paid to the following aspects: a wider head protector disc should be used, the head of the rat should be elevated at the time of impact, and the foam bed should be soft enough to allow the movement caused by acceleration. With our modified method, rat survival increased by 30% compared to the original model (80% versus 50%). Moreover, 85.7% of rats demonstrated DAI after 24 h of survival. With these modifications, injuries appear in the same locations as in humans; thus, the method is suitable for the study of traumatic DAI in humans.

KEYWORDS

diffuse axonal injury, foam bed, forensic pathology, impact acceleration, Marmarou model, method modification, neuropathology, rat model, traumatic brain injury

Highlights

- The Marmarou model is the standard method for producing diffuse axonal injury (DAI) in rats.
- However, producing DAI similar to that in humans results in severe injuries which reduce rat survival.
- Increasing rat survival increases the usefulness of the model and is ethically advisable.
- To reduce non-DAI injury, we modified the foam bed, head protector disc, and rat head position.
- Our Modified Marmarou model reduced rat mortality at 24h to 15.4% and increased the amount of DAI.



1 | INTRODUCTION

In 1994, Marmarou and Foda described a new rat model for Diffuse Axonal Injury (DAI) [1, 2]. Since that time, the model has been used by many authors [3–13]. It is an easy and cheap method that works on rats – the most common research animal – with a high degree of reproducibility that has made it very popular. Using this method, cranial acceleration is generated by the impact of a 450-g brass weight dropped down a plexiglas tube from a height of 1 or 2 m, pushed only by the force of gravity. The rodent's head is protected by a 10mm-wide metal disc, used as a “helmet”, which allows the energy to reach the brain while minimizing focal injuries. The force of the initial impact should not be strong enough to cause skull fractures, but should still be capable of producing a diffuse brain injury [14] that is similar to DAI in humans.

In the original publication, dropping the weight from 1 meter high caused axonal injury without producing mortality (mild injury). Dropping the weight from 2 meters high produced severe cranial injury with DAI but also caused 50% mortality among rats. Subsequent research tested several variations, leading to very different outcomes (Table 1).

Rat death typically happens in the first 20–30min after impact, usually due to prolonged apnea and transient hypertension. Beyond this point, sudden death rarely occurs [5]. Seeing as apnea and secondary hypoxia are the main complications, the use of mechanical ventilation reduces mortality in cases of severe injury [2]. Mechanical ventilators for small laboratory animals are expensive and require trained professionals to operate, but they are essential for avoiding immediate apnea after impact. These devices reduced mortality in the original article [2] and substantially improved rat survival in other studies [2, 5, 9].

Direct head impact, with or without cranial protection, leads to a wide range of clinical outcomes: from no change to severe lesions. This is due to the rat skull's extremely steep injury tolerance curve [10]. Moreover, subtle respiration movement during impact can dramatically modify the severity of injury [10].

It should be emphasized that the aim of the Marmarou model was to generate diffuse brain injury (and DAI) from linear acceleration in regions remote from a protective disc. Therefore, focal brain injury under the vertex usually requires the case to be discarded. Consequently, vertex skull fractures should be prevented as much as possible. In this sense, the metal disc works as a helmet.

In order to increase survival, Fujita et al. [7] tried modifying the original method to decrease the kinetic energy of the impact. These researchers employed 450g from a maximum height of 1 m and obtained the best results by means of two impacts at an interval of 3 h. Nevertheless, when they used a single impact from 1 m high and waited 4 h post-impact to euthanize, no axonal change was observed.

Other authors modified the original model by decreasing weight and adding lubricant into the inner tube [12] to minimize the friction effect. Foam stiffness was not described by these authors; however, unlike the original Marmarou study, the rat's head was placed in the middle of the foam and not at the edge. These factors might explain why, from a fixed high of 1 m, Ucar et al. obtained a mortality rate of 78.4% with a weight of 450g, 42.8% with 350g, and 7.1% with 300g. These authors also tied a non-elastic rope to the weight to prevent a second impact. In every group, there were isolated cases of apnea, even in the control group, which is not easy to understand. It should be noted that measures to prevent the lubricant from spilling into the rat's open scalp ought to be taken to prevent inflammatory or allergic reactions.

Decreasing kinetic energy is not the only change that has been tried by researchers. For example, Baranova et al. [3] used the Marmarou model with 450g from 2 m high. Unlike Marmarou et al., however, these authors did not consider the resulting injuries to be severe, but instead found them to be moderate in terms of vascular response to trauma. As they did not make histopathological examination to determine DAI, the two studies are not fully comparable. No quantification of foam stiffness was reported in either study.

The aim of our research was to improve the Marmarou method to produce diffuse axonal injury (DAI) in rats while improving rat survival.

TABLE 1 Variations in studies using Marmarou and Foda model.

Author (year)	Objective	Method	Results
Marmarou (1994) [1]	Trauma level to get 50% mortality	450y 500g – 2 m 450g – 1 m	450g – 2 m → Severe injury 450g – 1 m → Mild injury
Carré (2004) [5]	Monitoring O ₂ before, during and after traumatism	430g – 2 m	Trauma severity not classified
Ucar (2006) [12]	Trauma level to get moderate injury	450g, 350g & 300g – 1 m Oil in tube	450/350g – 1 m → Severe injury (mortality 78.5/42.8%) 300g – 1 m → Moderate injury (mort. 7.1%)
Baranova (2008) [3]	Study vascular reaction to (moderate) traumatism	450g – 2 m	Vascular changes identified
Fujita (2012) [7]	Microvascular damage by trauma	450g – 1 m	1 impact → No injury 2 impacts → Intense injury (no IHC)
Calikoglu (2015) [4]	Pregabalin effect by trauma	450g – 2 m (40 cases)	7 respiratory arrest, 4 dilated papilla, 2 deaths, 8 no histopathological injury

2 | MATERIALS AND METHODS

Animal and surgical procedures used in our research were approved by the Ethical Committee for Animal Research in Galicia (Exp. 03/15/LU-002). The experiments were carried out on 60 male Sprague-Dawley rats weighing 250–300 g (five of them were used as controls). Of these, 20 rats were assigned to the original Marmarou model group and 35 to the modified model group. They were anesthetized with 5% isoflurane, first in an induction chamber and then through a mask to allow medial vertex incision and placement of disc to the skull between lambda and bregma. During impact, rats breathed normally without interference. At time of impact, no tube is in the trachea to avoid interference with head movement. After impact, rats in both study groups were endotracheal intubated and mechanically ventilated with O₂ for 60 min or until spontaneous respiration was recovered. Mechanical ventilation was performed using a ventilator for small laboratory animals (Narcobit. KN-472; Natsume Seisakusho Co., Ltd., Japan). Heart rate was measured by ECG continuous monitoring. Rat controls did not receive an impact.

2.1 | Skull impact injury device

We set up a 2-m-high vertical plexiglass tube with an inner diameter of 21 mm and outer diameter of 24 mm. Except in the control group, rats received the impact of a 20-mm-wide stainless steel cylinder weighing 450 g. The tube was placed over the rat's head and the cylinder was accelerated by force of gravity only. The rats received a single impact. For the original Marmarou model group, we used a 10-mm-wide and 3-mm-thick metallic disc. For the modified model group, we used a 20-mm-wide and 3-mm-thick disc.

In both groups, discs were glued directly to the skull between the coronal and lambdoid sutures after removing scalp and periosteum (Figure 1A). To avoid a second impact, the column was immediately pushed aside so that the cylinder fell away from the rat.

During impact, rats in the original Marmarou model group were placed on the original foam (Type E bed, Foam to Size Inc). In the modified group, we used a 12-cm-thick foam bed made of thermo-stable polymer polyurethane (density 30 kg/m³, hard), similar to the one used in the original method (Lirón Sleeping Technology bought in Lourín Descanso, SL, Teo, A Coruña). In order to minimize atlanto-occipital joint injury, the foam bed was 1.5 cm thinner from the neck down, as in the original model. A hollow was cut into the foam bed surface to secure the trunk of the rat, limit lateral displacement, and prevent the animal being thrown off by impact. The head lay on the untrimmed surface, so that the cervical spine remained perfectly aligned with the body (Figure 1B). This allowed free movement of the head in the direction of the weight's fall.

After the impact, the disc was removed and the scalp was closed with a continuous silk suture and the surviving rats were kept in standard laboratory conditions for 24 h. Subsequently, they were anesthetized again in an induction chamber and then with a mask. The chest was opened to reveal the heart and the ascending aorta was

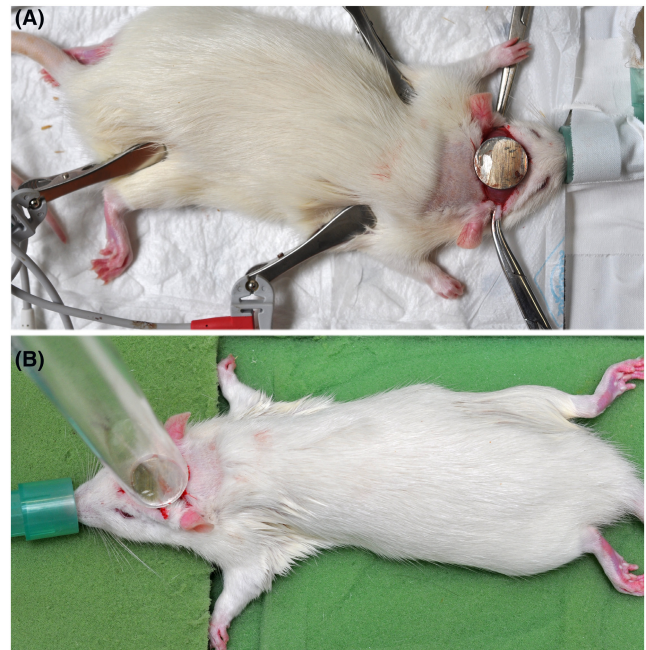


FIGURE 1 (A) Once the rat was anesthetized, a medial incision was made in the scalp and a 20 × 3 mm metal disc was attached to the skull between the coronal and lambdoid sutures with surgical glue. (B) In the course of impact, the rat's head lies a little higher than the body on the foam. At this instant, the disc has a flat position. The inner diameter of the plexiglas tube has the same width as the disc.

cannulated and a 10% formaldehyde solution applied with a dropper until death. After euthanasia, the brain was removed. Necropsy was performed on rats that had died during the first-hour post-impact in order to determine the cause of death. In the control groups, we performed the same procedures without head impact.

2.2 | Histology and immunohistochemistry

Rat brains were fixed directly after removal and fixation in 10% neutral buffered formalin for 24 h. For sampling, three coronal blocks were made in order to obtain four trimmed specimens from each brain (Figure 2): block A (between olfactory bulbs and cerebral peduncles), block B (between cerebral peduncles and pons), block C (containing the cerebellum and brain stem) and block D (containing frontal cortex and olfactory bulbs). Afterward, specimens were embedded in paraffin using standard techniques.

Brain tissue was cut into a thickness of 4 μm and mounted onto FLEX IHC microscope slides (Dako-Agilent, Carpinteria, CA). After deparaffination and epitope retrieval (for 20 min at 97°C in EnVision FLEX target retrieval solution at high pH), immunohistochemistry was automatically performed using an AutostainerLink 48 immunostainer (Dako-Agilent). Briefly, slides were incubated at room temperature in (1) beta-amyloid rabbit polyclonal antibody (Invitrogen Cat# 51-2700, Waltham, MA, USA) at 1:100 for 20 min; then, (2)

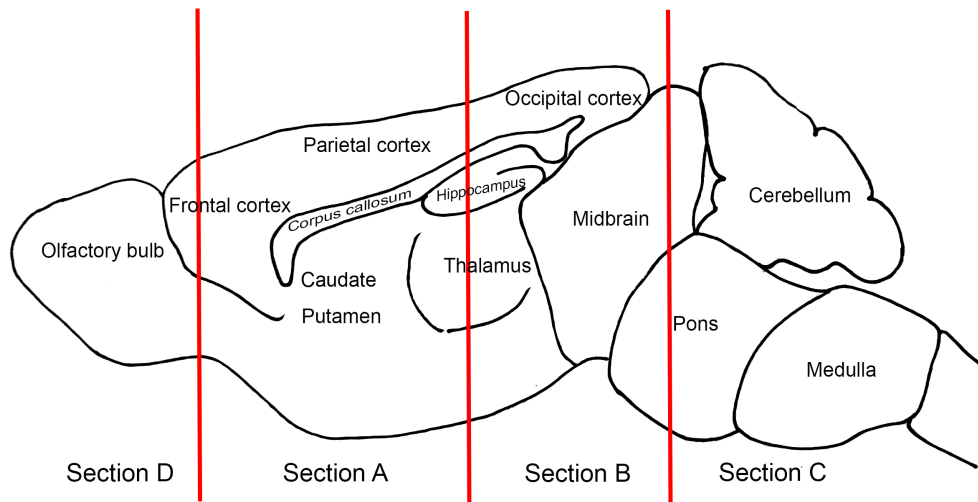


FIGURE 2 Schematic drawing showing left view of rat brain. For sampling, three coronal cuts (red lines) were made, resulting in four sections. Blocks A and C showed the highest β -APP expression, and they were used for DAI quantification.

EnVision + Dual Link system-HRP (dextran polymer conjugated with horseradish peroxidase and affinity-isolated goat anti-rabbit and anti-mouse immunoglobulins) for 20 min; (3) substrate working solution (mix) (3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride chromogen solution) for 10 min; and (4) EnVision FLEX hematoxylin for 9 min. Negative controls omitted the primary antibodies.

For immunohistochemical interpretation of beta-amyloid precursor protein (β -APP), we followed the method described by Johnson et al. [15]. It consists of labeling each slide as negative, focally (mild/moderate/severe) positive or multifocally (mild/moderate/severe) positive. Focally positive was defined as staining within a single area of the slide, whereas multifocally positive involved multiple areas of the same microscopic slide separated by more than a 200 \times power field. Mild was defined as 1–3 axonal profiles per high powered field (hpf) (400 \times), moderate as 4–10 profiles per hpf, and severe as greater than 10 profiles per hpf.

Regarding immunohistochemical quantification and group comparison, brain block A (dorsal) and block C (occipital) were examined in each animal, since β -APP expression was clearly much more intense in those regions. Immunoanalysis focused on the corpus callosum, cortex, basal nuclei (containing caudate nucleus and putamen) and pons. To be classified as diffuse, the minimum injury was either a multifocal result in one block or a focal result both above and below the tentorium (A and C).

Statistical analyses were performed using independent-samples t-test. Statistical significance was defined as $p < 0.05$. Analysis was conducted using SPSS software (v.18).

3 | RESULTS

Utilizing the original Marmarou model, the survival rate at 24 h was 50% (10 out of the 20 rats). Some unintended lethal injuries such as cortical cerebral contusion were found in three rats and depressed

skull fractures with intraparenchymal hemorrhage occurred in four rats (Figure 3). These focal injuries (classified as "local damage" in Table 2) appeared in 35% of cases. Other unwanted and lethal injuries in the atlanto-occipital joint such as dislocation and/or bleeding appeared in three rats (15%). Nevertheless, the most disturbing finding was that only 2 (20%) of the surviving rats presented DAI (Table 2).

In the modified Marmarou model with the same plexiglas tube and the same cylinder, but with a 20-mm-wide protective disc, a less elastic foam bed and modified rat position, the survival rate at 24 h went up to 80% (28 out of 35 rats). This was significantly higher than the 50% survival rate using the original Marmarou model ($p = 0.02$). Cortical cerebral contusions were found in 4 of the 35 rats (2 of them presented cranial fracture); thus, 11.4% of the rats showed fatal local damage. Lethal upper cervical injuries appeared in 3 of the 35 cases (8.5%). Interestingly, 24 of the 28 surviving rats (85.7%) showed DAI; a significantly higher percentage than the 20% obtained using the original Marmarou model ($p < 0.001$) (Table 2). Less serious damage usually associated with DAI including diffuse subarachnoid hemorrhage, small cortical contusions and generalized vascular congestion was identified with similar frequency using both models (72.2% with original Marmarou model versus 73.3% with our modified model) (Figure 3).

Necropsy revealed that causes of death before 24 h were very similar in both models; however, frequencies were different (Table 2). Most were due to bone and vascular injury at the atlanto-occipital junction associated with direct damage to the brainstem. A handful of deaths resulted from cortical cerebral contusion below depressed skull fractures.

β -APP-immunopositivity was detected mainly in the dorsal (parietal) cerebral cortex and corpus callosum very close to place of impact but also in more remote locations such as basal cortex, caudate nucleus, putamen and pons (usually rostral region). This distribution pattern was similar in both model groups (Figure 4).

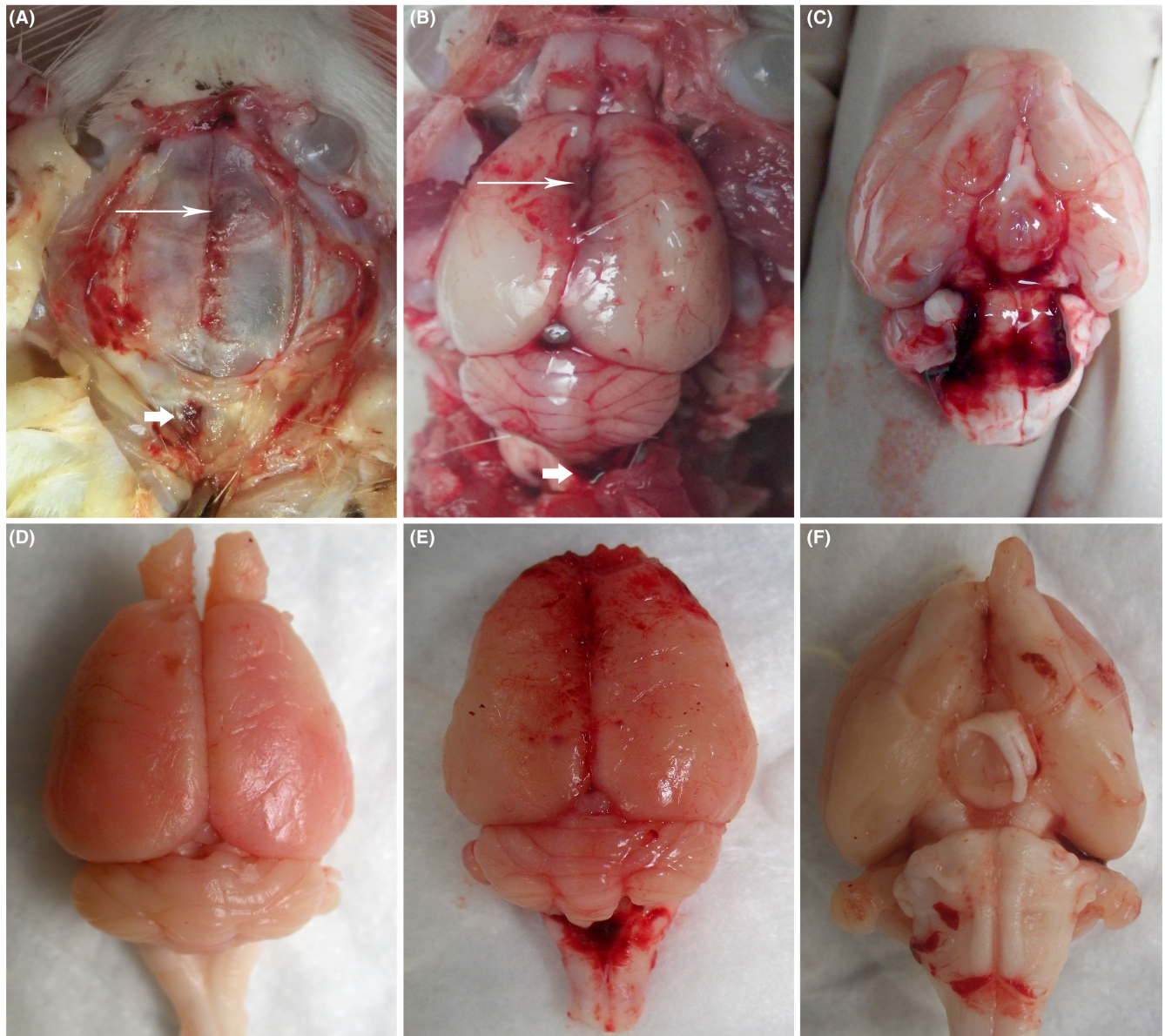


FIGURE 3 Gross appearance of rat brains upon impact. (A–C) pertain to the same rat in the original Marmarou method group. The rat did not recover spontaneous respiration 1 h after impact and died. The animal was not perfused with formaldehyde, which explains the normal white color of the cerebral parenchyma. A standard necropsy was immediately done. (A) There was frontal depressed skull fracture (thin arrow) and cervical injury (thick arrow). (B) Upper view of the brain showing frontal contusion (local damage) (thin arrow), brain stem hemorrhage (thick arrow), and diffuse subarachnoid hemorrhage. (C) Ventral view of the brain shows more intense subarachnoid hemorrhage below the hypothalamus, cerebral peduncles, and subdural hemorrhage at pons and medulla signs indicative of severe brainstem injury. (D–F) show brains of three rats in the modified Marmarou method group. The rats survived 24 h, were anesthetized and perfused with formaldehyde and then euthanized. The brains show severe vascular congestion (D), diffuse subarachnoid hemorrhage (E), and mild upper spinal cord injury (E, F). All three rats displayed diffuse axonal injury.

Using the modified Marmarou model, most of the brains (79.16%) displayed multifocal (diffuse) β -APP immunostaining, whereas five brains (20.83%) presented β -APP-immunopositivity at focal points under the impact sites (*coup* injuries) or in the basal cerebral cortex (*contrecoup* injuries). Regarding expression intensity, the vast majority of brains showed severe immunopositivity (18 of 24 rats), a few moderate (5 of 24) and only one case was considered mild (Table 3).

The only two rats with DAI in the original Marmarou model group had severe multifocal β -APP positivity. DAI characteristics were similar in both study groups, but statistical comparison was not possible because of the limited number of DAI cases in the original Marmarou model group.

No β -APP-immunopositivity was found in brain sections of control cases.

TABLE 2 Results obtained from the experiments in our laboratory. 80% of the rats survived 24 h in the modified Marmarou model (right column) compared to the 50% in the original model (left column).

	Marmarou model used in our lab with our rats	Modified Marmarou's model
Number of rats used	20	35
Survival rate at 24h	10/20 (50%)	28/35 (80%)
DAI rate (in the surviving rats)	2/10 (20%)	24/28 (85.7%)
Local damage rate (lethal cerebral contusion)	7/20 (35%)	4/35 (11.4%)
Lethal atlanto-occipital injury	3/20 (15%)	3/35 (8.5%)

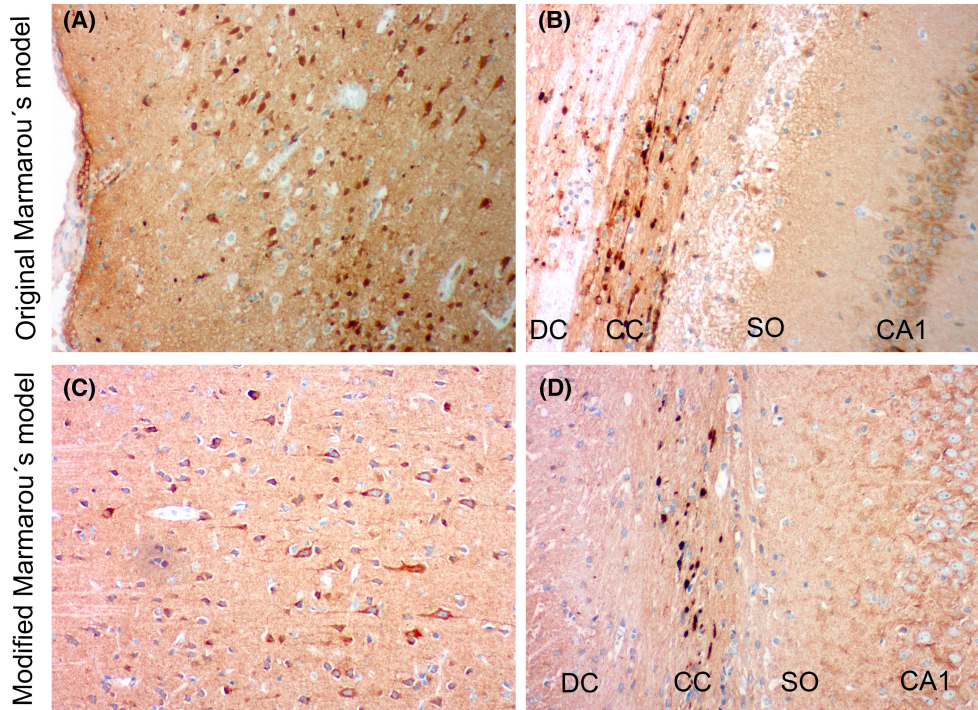


FIGURE 4 Immunohistochemical staining of β -amyloid protein precursor (β -APP) of brain sections from rats 24h after a severe cranial impact following the Marmarou model (A, B) and our modified model (C, D). Immunolabeling was similar in both groups. β -APP is upregulated in neurons after severe impact in dorsal cortex (A, C). Axonal damage was identified in the corpus callosum by β -APP antibody in both bulbs and some fibers (B, D). CA1, Field CA1 Ammon's horn pyramidal layer; CC, Corpus Callosum; DC, Dorsal Cortex; SO, Stratum Oriens hippocampus. All images were obtained at 100x.

TABLE 3 Semi-quantitative β -amyloid immunoexpression in 24 surviving rats in the modified Marmarou model.

Distribution	Result + (%)	Intensity	Result (%)
Focal	5 (20.83%)	Mild	1 (4.16%)
		Moderate	0 (0%)
		Severe	4 (16.66%)
Multifocal	19 (79.16%)	Mild	0 (0%)
		Moderate	5 (20.83%)
		Severe	14 (58.33%)

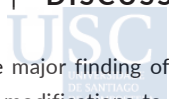
4 | DISCUSSION

The major finding of the present study is that making a few simple modifications to the Marmarou method significantly increases rat survival at 24h (from 50% to 80%) as well as increasing the

frequency and intensity of DAI (from 20% to 85.7%). We have found that implementing the following modifications together significantly improves the original results.

4.1 | Protective disc size

A wider disc (20mm vs. 10mm) is more protective of the cranium because it provides better dissipation of impact forces throughout the skull. It also helps to ensure that the metal cylinder hits a flat position, which is aided by the fact that the internal diameter of the plexiglass tube is the same as the diameter of the disc. Moreover, reproducibility is also improved because impact occurs in the same place. By using a wider protective disc, local effects are minimized and part of the applied force is redirected toward acceleration. The aim was to produce a primary brain traumatic injury by means of



brain movement since DAI in humans is the result of angular or rotational high-magnitude forces of acceleration. Therefore, we sought to reduce the damage to the cranial bone structure which often results in focal cerebral injury. In our model, local damage (lethal cerebral contusion) decreased from 35% to 13.5%. Nonetheless, four rats still showed fatal brain contusions. In addition, some rats showed small non-lethal focal cortical contusions. These injuries may have been the result of minimal respiratory movement and/or unevenness when placing the plexiglass tube. The question was what to do with cases that had no skull fracture but had focal injury just below the impacted skull (i.e. gross contusions of the frontal/parietal cortex). Were they caused by skull deformation under the disc or by coup? As some authors point out [8], these injuries result from direct percussion rather than from coup, which strictly defined, is caused by the un-deformed accelerated skull striking the brain. Consequently, we included these cases in the study (5 rats).

4.2 | Sole impact

To ensure only one impact by the cylinder and prevent recoil, at first we tried pulling a brake line attached to the upper surface of the weight cylinder immediately after impact. However, we found this method very difficult to perform successfully because of the great visual-motor coordination required to pull the line precisely at the right moment. It turned out to be easier and more effective to push the column away from the head immediately after the first impact, thus preventing a second impact on the rat.

4.3 | Foam bed

Marmarou's original model has certain limitations in terms of reproducibility. In particular, the lack of consistency in foam bed characteristics seems to be the factor behind the great disparity in published results. The original foam bed used by Marmarou is not easy to obtain. Many foam manufacturers exist and there are a wide variety of options in the marketplace: closed-cell and open-cell foam; bubbles trapped in a solid or liquid state; and a variety of materials including polyurethane, urethane, polyethylene, and polyether. As if that were not enough, there are also different foam manufacturing processes that modify the resulting physical characteristics. Despite attempts by several authors [11], no reliable parameter exists to assess foam stiffness and elasticity. We should keep in mind that mechanic properties are highly dependent on density. The most important parameters of the foam bed are the compressive strength that opposes head acceleration and the elasticity responsible for deceleration. Foam compression under the impact should be enough to allow as much movement of rat's head as possible without reaching the floor. That is, the foam bed should resist the impact of the weight falling from 2m high without completely collapsing, because total collapse would cause the skull to hit the solid surface and result in undesirable artifactual trauma. Conversely, if the foam is too soft, the difference between head and

body movement creates cervical tension that increases mortality in the first hour. Our modified model minimizes axonal brainstem injury and ultimately reduces mortality from atlanto-occipital injury by almost half (from 15% to 8.5%). The polymer we used is one of the most commonly available with a durable open-cellular structure. It is spongy, cheap, soft enough for compression, and highly elastic to allow for quick recovery of the original shape. According to the local manufacturer, it is used for cushions and described as having intermediate stiffness. We consider that the foam utilized should meet two essential conditions: first, it should be strong enough to avoid collapse and, second, it should recover its original position quickly to avoid the rat being dragged off the foam bed.

4.4 | Animal position

One of the weaknesses attributed to the original Marmarou method is the inconsistency between trials when the head is not placed in the same location, that is, there is a poor fit between the plexiglass tube and the protective disc that leads to displacement or there is excessive distance between the tube and the cranium. These pitfalls are due to the fact that the rat's head is not secured to the surface of the foam bed. During our experiments, the tube was set at a distance of 0.5 cm away from the rat's head. As the width of the disc in the modified method and the inner diameter of the plexiglass tube are complementary, it allows a perfect fit and makes it easy to place rat's head just under the middle of the plexiglass tube. The device was placed on wheels to maintain the aforementioned distance and be able to easily move it aside in order to prevent second impact. A hollow was cut into the foam bed surface to secure the trunk of the rat, limit lateral displacement, and prevent the animal being thrown off by impact.

4.5 | Experimental animals

Our experiment did not include female rats because it is well known that the neuroprotective effect of estrogens and progesterone [16, 17] can cause neurodegenerative gender differences [18]. Particularly with this method, female rats tend to have better outcome following DAI [19]. Several more recent studies have also found gender differences between after 7 days post-injury [18, 20]; while other authors have found no such differences [21]. In order to obtain the most human-like DAI, we used male rats with more severe injury and worse prognosis. Moreover, the fact that the female hormonal cycle was not an issue simplified the handling of the experiments in terms of rat transport, quarantine times and operating room availability.

4.6 | Axonal injury

B-APP immunostaining is currently recognized as the most sensitive procedure for detecting DAI. In this technique, APP antibody is used

to reflect the accumulation of fast transport APP in an injured section of an axon. This marker selectively labels injured axons, which take the form of axonal bulbs (spheroids) and varicose axons (thick filaments). Because it is an active process that requires a large amount of energy, the presence of axonal transport indicates animal survival [22, 23], although marker intensity is not directly related to survival time [24]. According to many authors, β -APP expression begins at 2–3 h in both humans and rats, increases until it reaches a maximum at 24 h and then begins to decrease to baseline levels at 10 days [25, 26]. Thus, we and many other researchers aim for 24-h rat survival in order to obtain good β -APP expression and enable intergroup comparisons. Surprisingly, our rat study group presented an astonishing 65% increase in DAI frequency, and this was undoubtedly due to the modifications we made to the Marmarou model.

Regarding the location of β -APP expression, blocks A and C proved to be the most damaged regions. As bregma was the most central point of impact and is located just above block A, a high level of damage in this area was predictable. β -APP expression was found in the dorsal parietal and frontal cortex, most of the corpus callosum, and other more distant regions such as the basal nuclei. In occipital regions (block C), pons and medulla also showed extensive β -APP axonal positivity. This distribution pattern is very similar to that found in humans after traumatic brain injury in which the most commonly affected areas include axons in the brainstem, parasagittal white matter near the cerebral cortex, and corpus callosum [27]. The fact that β -APP expression was found in the same locations as in human brains is valuable since it implies that this experimental method (the modified Marmarou model) is a good model for the study of traumatic DAI in humans.

Semi-quantitative β -APP immunorexpression in blocks A and C showed a multifocal distribution in almost 80% of the rats. Furthermore, the intensity of expression was mostly (almost 80%) severe/moderate. This is of great interest to us, since the distribution pattern and the high marking intensity are also similar to those shown by human brains in cases of fatal traumatic damage. The only two rats with DAI in the original Marmarou model group presented the same β -APP distribution and intensity (Figure 3). Unfortunately, it was not possible to make comparisons with other authors who used the original method because they did not report the distribution and/or intensity of β -APP immunostaining.

In summary, by making minimal changes to the original Marmarou model, it is possible to obtain a 30% increase in survival at 24 h as well as a 65% improvement in DAI amount. We believe that these statistically significant improvements can help future researchers, especially in the current environment that requires the use of the fewest experimental animals possible.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors report there are no competing or conflicts of interest to declare.



ORCID

Alberto Fernández-Liste  <https://orcid.org/0000-0003-4718-8461>

REFERENCES

- Marmarou A, Foda MA, van den Brink W, Campbell J, Kita H, Demetriadou K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: pathophysiology and biomechanics. *J Neurosurg.* 1994;80(2):291–300. <https://doi.org/10.3171/jns.1994.80.2.0291>
- Foda MA, Marmarou A. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: morphological characterization. *J Neurosurg.* 1994;80(2):301–13. <https://doi.org/10.3171/jns.1994.80.2.0301>
- Baranova AI, Wei EP, Ueda Y, Sholley MM, Kontos HA, Povlishock JT. Cerebral vascular responsiveness after experimental traumatic brain injury: the beneficial effects of delayed hypothermia combined with superoxide dismutase administration. *J Neurosurg.* 2008;109(3):502–9. <https://doi.org/10.3171/JNS/2008/109/9/0502>
- Calikoglu C, Aytakin H, Akgul O, Akgul MH, Gezen AF, Akyuz F, et al. Effect of pregabalin in preventing secondary damage in traumatic brain injury: an experimental study. *Med Sci Monit.* 2015;21:813–20. <https://doi.org/10.12659/MSM.893887>
- Carré E, Cantais E, Darbin O, Terrier J, Lonjon M, Palmier B, et al. Technical aspects of an impact acceleration traumatic brain injury rat model with potential suitability for both microdialysis and PtIQ2 monitoring. *J Neurosci Methods.* 2004;140(1):23–8. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.04.037>
- Corrigan F, Vink R, Blumbergs PC, Masters CL, Cappai R, van den Heuvel C. Characterisation of the effect of knockout of the amyloid precursor protein on outcome following mild traumatic brain injury. *Brain Res.* 2012;1451:87–99. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.02.045>
- Fujita M, Wei EP, Povlishock JT. Intensity- and interval-specific repetitive traumatic brain injury can evoke both axonal and microvascular damage. *J Neurotrauma.* 2012;29(12):2172–80. <https://doi.org/10.1089/neu.2012.2357>
- Kilbourne M, Kuehn R, Tosun C, Caridi J, Keledjian K, Bochicchio G, et al. Novel model of frontal impact closed head injury in the rat. *J Neurotrauma.* 2009;26(12):2233–43. <https://doi.org/10.1089/neu.2009.0968>
- Meythaler JM, Peduzzi JD, Eleftheriou E, Novack TA. Current concepts: diffuse axonal injury-associated traumatic brain injury. *Arch Phys Med Rehabil.* 2001;82(10):1461–71. <https://doi.org/10.1053/apmr.2001.25137>
- O'Connor WT, Smyth A, Gilchrist MD. Animal models of traumatic brain injury: a critical evaluation. *Pharmacol Ther.* 2011;130(2):106–13. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.01.001>
- Piper I, Thomson D, Miller J. Monitoring weight drop velocity and foam stiffness as an aid to quality control of a rodent model of impact acceleration neurotrauma. *J Neurosci Methods.* 1996;69(2):171–4. [https://doi.org/10.1016/S0165-0270\(96\)00046-5](https://doi.org/10.1016/S0165-0270(96)00046-5)
- Ucar T, Tanriover G, Gurer I, Onal MZ, Kazan S. Modified experimental mild traumatic brain injury model. *J Trauma.* 2006;60(3):558–65. <https://doi.org/10.1097/01.ta.0000209172.75637.db>
- Zohar O, Rubovitch V, Milman A, Schreiber S, Pick CG. Behavioral consequences of minimal traumatic brain injury in mice. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2011;71(1):36–45.
- Frati A, Cerretani D, Fiaschi AI, Frati P, Gatto V, La Russa R, et al. Diffuse axonal injury and oxidative stress: a comprehensive review. *Int J Mol Sci.* 2017;18(12):2600. <https://doi.org/10.3390/ijms18122600>
- Johnson MW, Stoll L, Rubio A, Troncoso J, Pletnikova O, Fowler DR, et al. Axonal injury in young pediatric head trauma: a comparison study of β -amyloid precursor protein (β -APP) immunohistochemical staining in traumatic and nontraumatic deaths. *J Forensic Sci.* 2011;56(5):1198–205. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2011.01814.x>
- Roof RL, Hall ED. Estrogen-related gender difference in survival rate and cortical blood flow after impact-acceleration head injury in rats. *J Neurotrauma.* 2000;17(12):1155–69. <https://doi.org/10.1089/neu.2000.17.1155>

17. Roof RL, Hall ED. Gender differences in acute CNS trauma and stroke: neuroprotective effects of estrogen and progesterone. *J Neurotrauma*. 2000;17(5):367–88. <https://doi.org/10.1089/neu.2000.17.367>
18. Kupina NC, Detloff MR, Bobrowski WF, Snyder BJ, Hall ED. Cytoskeletal protein degradation and neurodegeneration evolves differently in males and females following experimental head injury. *Exp Neurol*. 2003;180(1):55–73. [https://doi.org/10.1016/s0014-4886\(02\)00048-1](https://doi.org/10.1016/s0014-4886(02)00048-1)
19. Gupte RP, Brooks WM, Vukas RR, Pierce JD, Harris JL. Sex differences in traumatic brain injury: what we know and what we should know. *J Neurotrauma*. 2019;36(22):3063–91. <https://doi.org/10.1089/neu.2018.6171>
20. Jullienne A, Salehi A, Affeldt B, Baghchechi M, Haddad E, Avitua A, et al. Male and female mice exhibit divergent responses of the cortical vasculature to traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2018;35(14):1646–58. <https://doi.org/10.1089/neu.2017.5547>
21. Hall ED, Gibson TR, Pavel KM. Lack of a gender difference in post-traumatic neurodegeneration in the mouse controlled cortical impact injury model. *J Neurotrauma*. 2005;22(6):669–79. <https://doi.org/10.1089/neu.2005.22.669>
22. Hortobagyi T, Wise S, Hunt N, Cary N, Djurovic V, Fegan-Earl A, et al. Traumatic axonal damage in the brain can be detected using β -APP immunohistochemistry within 35 min after head injury to human adults. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2007;33(2):226–37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2006.00794.x>
23. Gentleman SM, Roberts GW, Gennarelli TA, Maxwell WL, Adams JH, Kerr S, et al. Axonal injury: a universal consequence of fatal closed head injury? *Acta Neuropathol*. 1995;89(6):537–43. <https://doi.org/10.1007/bf00571509>
24. Sherriff FE, Bridges LR, Sivaloganathan S. Early detection of axonal injury after human head trauma using immunocytochemistry for beta-amyloid precursor protein. *Acta Neuropathol*. 1994;87(1):55–62. <https://doi.org/10.1007/bf00386254>
25. Zhu JL, Zhu SH, Ren L. Expression of beta-amyloid precursor protein in diffuse axonal injury of rats. *Fa Yi Xue Za Zhi*. 2005;21(3):165–8.
26. Geddes JF, Whitwell HL, Graham DI. Traumatic axonal injury: practical issues for diagnosis in medicolegal cases. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2000;26(2):105–16. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.2000.026002105.x>
27. Su E, Bell M. Diffuse axonal injury. In: Laskowitz D, Grant G, editors. *Translational research in traumatic brain injury*. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor and Francis Group; 2016. p. 41–84.

How to cite this article: Fernández-Liste A, González-Cantalapiedra A, Cascallana JL, García-Caballero T, Gallego R. Modification of the Marmarou and Foda model of diffuse axonal injury (DAI) improves percentage survival of rats at 24 h and increases the amount of DAI identified. *J Forensic Sci*. 2023;68:1228–1236. <https://doi.org/10.1111/1556-4029.15276>

JOHN WILEY AND SONS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Sep 16, 2023

This Agreement between Alberto Fernández Liste ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License Number	5630691019175
License date	Sep 16, 2023
Licensed Content Publisher	John Wiley and Sons
Licensed Content Publication	Journal of Forensic Sciences
Licensed Content Title	Modification of the Marmarou and Foda model of diffuse axonal injury (DAI) improves percentage survival of rats at 24 h and increases the amount of DAI identified
Licensed Content Author	Rosalía Gallego, Tomás García-Caballero, José L. Cascallana, et al
Licensed Content Date	May 12, 2023
Licensed Content Volume	68
Licensed Content Issue	4
Licensed Content Pages	9
Type of use	Dissertation/Thesis



Requestor type Author of this Wiley article

Format Print and electronic

Portion Full article

Will you be translating? Yes, including English rights

Number of languages 1

Title MARCADORES HISTOQUÍMICOS NO DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DO DANO AXONAL DIFUSO

Institution name Universidade de Santiago de Compostela

Expected presentation date Nov 2023

Specific Languages Spanish, English

Alberto Fernández Liste
Imelga.Capitán Juan Varela, Edf judicial


Requestor Location
A Coruña, other 15007
Spain
Attn: Mr. Alberto Fernández Liste

Publisher Tax ID EU826007151

Total 0.00 EUR

Terms and Conditions

TERMS AND CONDITIONS

 This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright

Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the [STM Permissions Guidelines](#) only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,** You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.
- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR

A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.

- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.
- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions,

these terms and conditions shall prevail.

- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License \(CC-BY-NC-ND\)](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library
<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com.

Anexo 2: Comités de ética

Este anexo incluye:

- Dictamen de autorización de proyecto de experimentación animal, Xunta de Galicia (animales)
- Dictamen Comité de bioética de USC (animales)
- Dictamen Comité de ética de la Investigación Santiago-Lugo (Sergas) (personas)



XUNTA DE GALICIA
DELEGACIÓN TERRITORIAL
DE LUGO
Xefatura Territorial da Consellería
do Medio Rural e do Mar

Ronda da Muralla, 70
LUGO

galicia

MR110250

M^a del Mar García Ramil
CITT-Edificio Cactus, Campus de Lugo
27002 Lugo

Asunto: Comunicación de autorización de proxecto.

Remítolle Resolución de autorización do proxecto "**Marcadores histoquímicos no diagnóstico diferencial do dano axonal difuso**", do que é responsable o investigador Antonio González Cantalapiedra e que se vai a realizar no centro usuario de experimentación animal da RIAIDT da USC, Campus de Lugo (AE-LU-002).

Lugo, 24 de maio de 2016

O xefe do servizo provincial de Gandería

Manuel Corujo González



REXISTRO XERAL DA XUNTA DE GALICIA
REXISTRO DO EDIFICIO ADMINISTRATIVO DE LUGO
LUGO

Data: 24/05/2016 10:36:54

SAÍDA 59565 / RX 717593



USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA



RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Expediente núm.:03/16/LU-002

Interesado:Antonio González Cantalapiedra

Procedemento: RESOLUCIÓN DE AUTORIZACIÓN DE PROXECTOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL

Data de inicio: 30 de maio de 2016

Forma de inicio: solicitude do interesado

ANTECEDENTES

O interesado, como responsable do proxecto **Marcadores histoquímicos no diagnóstico diferencial do dano axonal difuso**, presentou con data 19 de maio de 2016, rexistro de entrada 62181/RX 1364447 de 19 de maio de 2016, solicitude para a realización do proxecto de experimentación animal cuxos datos detállanse a continuación:

- Denominación do proxecto: **Marcadores histoquímicos no diagnóstico diferencial do dano axonal difuso**.
- Nome do centro usuario:Animalario de investigación do Campus de Lugo (AE-LU-002).
- Persoa responsable do proxecto: Antonio González Cantalapiedra
- Establecemento onde se realizarán os procedementos do proxecto (ou lugar xeográfico no caso de traballos de campo): Animalario do Campus de Lugo.
- Clasificación do proxecto : **Tipo III**

CONSIDERACIÓNS LEGAIS E TÉCNICAS

- I. Real decreto 53/2013, de 1 de febreiro (B.O.E. nº 34, do 8 de febreiro), polo que se establecen as normas básicas aplicables para a protección dos animais utilizados en experimentación e outros fins científicos, incluíndo a docencia, establece no seu artigo 33 as condicións de autorizacións dos proxectos con animais de experimentación.
- II. Artigo 89 da Lei 30/1992, de 26 de novembro, do réxime xurídico das Administracións Públicas e do procedemento administrativo común (B.O.E. núm. 285, 27 de novembro de 1992), modificada pola Lei 4/1999, de 14 de xaneiro, establece que a resolución que poña fin o procedemento decidirá todas as cuestións expostas polos interesados e aquelas outras derivadas do mesmo.



XUNTA DE GALICIA

DELEGACIÓN TERRITORIAL
DE LUGO

Xefatura Territorial da Consellería
do Medio Rural e do Mar

Ronda da Muralla, 70
LUGO

galicia

Esta xefatura territorial é competente para ditar resolución de conformidade co artigo 11 do Decreto 245/2009 de 3/ de abril, polo que se regulan as delegacións territoriais da Xunta de Galicia e o Decreto e o Decreto 166/2015, de 13 de novembro, polo que establece a estrutura orgánica da Consellería do Medio Rural.

Revisada por parte do Servizo Provincial de Gandería de Lugo a documentación achegada na solicitude e e visto o informe **favorable** da avaliación do proxecto, de data 23 de setembro de 2015 emitido polo órgano habilitado Comité de Ética do Hospital Veterinario Rof Codina, este Departamento Territorial resolve, **AUTORIZAR** o proxecto solicitado.

O citado proxecto deberá someterse a unha AVALIACIÓN RETROSPECTIVA que deberá realizarse no prazo de **dous meses** contados a partir da data de concesión desta autorización.

A autorización deste proxecto terá unha **duración de 5 ANOS**, transcorridos os cales, deberá renovar a autorización do mesmo.

A autorización é unicamente válida nas condicións que figuran no expediente. Ante calquera cambio significativo no proxecto que poida ter efectos negativos sobre o benestar dos animais, deberá solicitar a confirmación da autorización ao Servizo Provincial de Gandería.

Esta autorización poderá ser suspendida no caso de que o proxecto non se leve a cabo de acordo coas condicións de autorización e retirala previo expediente tramitado ao que se lle dará audiencia.

Contra a presente resolución, que non pon fin á vía administrativa, poderá interpor **recurso de alzada** ante o conselleiro de Medio Rural da Xunta de Galicia no prazo **dun mes** contado a partir da recepción da notificación da presente resolución, conforme coa Lei 30/1992, do 26 de novembro, (B.O.E. núm. 285, 27 de novembro de 1992), de Réxime Xurídico das Administracións Públicas e do Procedemento Administrativo Común na súa redacción dada pola Lei 4/1999, do 13 de xaneiro.

Lugo, 24 de maio de 2016

O xefe do Departamento Territorial de Medio Rural e do Mar de Lugo

Asdo.: José Ramón Losada Fernández



Lugo, 18 de maio de 2016

En relación ao procedemento con animais de experimentación denominado: "*Marcadores histoquímicos no diagnóstico diferencial do dano axonal difuso*", código: AELU001/15/INVMED02/NERV(02)/AGC/08, do que é investigador principal D. Antonio González Cantalapiedra, DNI09280718B, e vista a avaliación favorable emitida polo órgano habilitado HVU Fundación Rof Codina con data 23/09/2015, onde o animalario de investigación do Campus de Lugo será o centro usuario nunha das fases do procedemento experimental, manifesta que cumpre os requisitos esixidos pola normativa vixente.



Asdo:

Sonia Vázquez Rodríguez

Supervisora veterinaria dos animalarios da USC

Visto e Prace:



D. Andrés Barreiro Lois

Vicerreitor de Desenvolvemento Científico e Tecnolóxico do Campus de Lugo da Universidade de Santiago de Compostela



DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Juan M. Vázquez Lago, Secretario del Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo

CERTIFICA:

Que este Comité evaluó en su reunión del día 19/05/2014 el estudio:

Título: Marcadores histoquímicos no diagnóstico diferencial do dano axonal difuso

Promotor: Universidade de Santiago de Compostela

Tipo de estudio: Outros

Version:

Código del Promotor:

Código de Registro: 2014/217

Y, tomando en consideración las siguientes cuestiones:

- La pertinencia del estudio, teniendo en cuenta el conocimiento disponible, así como los requisitos legales aplicables, y en particular la Ley 14/2007, de investigación biomédica, el Real Decreto 1716/2011, de 18 de noviembre, por el que se establecen los requisitos básicos de autorización y funcionamiento de los biobancos con fines de investigación biomédica y del tratamiento de las muestras biológicas de origen humano, y se regula el funcionamiento y organización del Registro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, la ORDEN SAS/3470/2009, de 16 de diciembre, por la que se publican las Directrices sobre estudios Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, y el la Circular nº 07 / 2004, investigaciones clínicas con productos sanitarios.
- La idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio, justificación de los riesgos y molestias previsibles para el sujeto, así como los beneficios esperados.
- Los principios éticos de la Declaración de Helsinki vigente.
- Los Procedimientos Normalizados de Trabajo del Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para la realización del estudio por el/la investigador/a del centro:

Centros	Investigadores Principales
Instituto de Medicina Legal	Alberto Fernández Liste

Se recomienda al investigador que la comunicación entre el equipo investigador y el/la juez/a quede reflejado en un documento o procedimiento.

En Santiago de Compostela, a 26 de mayo de 2014
El Secretario

Juan M. Vázquez Lago



Los TCE cerrados, incluso con pocas lesiones superficiales pueden causar DAI y la muerte. Es posible detectar el daño axonal producido utilizando marcadores inmunohistoquímicos pero el marcaje es independiente de la etiología de la lesión. Este proyecto de investigación establece criterios que faciliten un diagnóstico más preciso sobre el DAI. Se han utilizado modelos experimentales murinos a los que se les provocó un DAI e isquemia global difusa similares a los humanos, consiguiendo un patrón de afectación de áreas cerebrales en rata y una evaluación de la gravedad del cuadro que indica el posible origen etiopatogénico de las lesiones. También analizamos el paralelismo entre los resultados experimentales y varios casos procedentes de autopsias forenses para comprobar su utilidad.