



**Universidad de Santiago de Compostela
Departamento de Ciencias Morfológicas**

Tesis Doctoral

**DATACIÓN DE TRAUMATISMOS
CRANEOENCEFÁLICOS MEDIANTE TÉCNICAS
INMUNOHISTOQUÍMICAS**

M^a Ángeles Romero Tirado
Santiago de Compostela, 2015





Los Dres. José Blanco Pampín, Jefe de Servicio de Patología Forense del Instituto de Medicina Legal de Galicia, y Rosalía Gallego Gómez, Profesora Titular de Histología de la Universidad de Santiago de Compostela,

HACEN CONSTAR:

Que la tesis que lleva por título “DATACIÓN DE TRAUMATISMOS CRANEOENCEFÁLICOS MEDIANTE TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS”, fue realizada bajo su dirección por la Licenciada en Medicina M^a de los Ángeles Romero Tirado, y reúne todos los requisitos para ser presentada y defendida para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Santiago de Compostela.

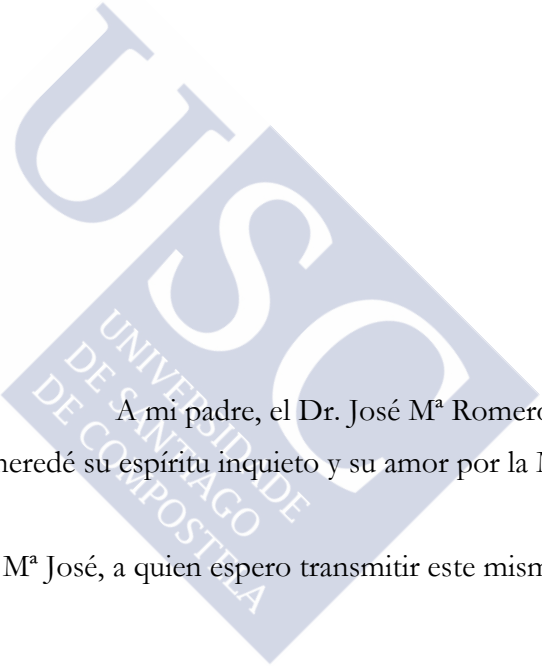
Santiago de Compostela, 25 de septiembre de 2015

Dr. J. Blanco Pampín

Dra. R. Gallego Gómez

M. A. Romero Tirado



A large, light blue watermark of the USC logo is centered on the page. The logo consists of the letters 'U', 'S', and 'C' in a stylized font, with the 'S' being the largest. Below the letters, the text 'UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA' is written in a smaller, sans-serif font, following the curve of the 'S'.

A mi padre, el Dr. José M^a Romero Roldán,
de quien heredé su espíritu inquieto y su amor por la Medicina.

Y a mi hija M^a José, a quien espero transmitir este mismo legado



AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi gratitud al Dr. José Blanco Pampín, mi Jefe, mi Mentor y mi amigo, porque sin conocerme me creyó capaz de hacer este trabajo y me ha enseñado grandes cosas sobre Patología Forense, sobre investigación y sobre la vida. Gracias por tu apoyo incondicional en todo momento y circunstancia.

A la Dra. Rosalía Gallego, Profesora titular de Histología, una excelente persona de inteligencia y capacidad de trabajo extraordinarias; que me dedicó tantas horas de su tiempo fuera de las horas de trabajo para enseñarme neurohistología y neuropatología prácticamente desde cero, y que se entusiasmó tanto como yo con este trabajo.

A los técnicos de Anatomía Patológica. A José Luis, por ayudarme tanto con la obtención y conservación de las muestras y a Patricia y a Roberto porque siempre estuvieron dispuestos a hacer un corte y una tinción más.

Al Profesor Xosé Luis Otero Cepeda, Profesor Titular de Estadística de la Universidad de Santiago de Compostela, quien me reconcilió con el análisis estadístico, e incluso consiguió que me pareciera bonito y divertido.

A Ángel Vázquez Boquete, que me ayudó con la presentación de este trabajo, consiguiendo fuera mucho mejor de lo que yo sola hubiera podido hacerla nunca. Porque de nada sirve hacer un buen trabajo si no puedes transmitirlo.

A mis compañeros de la Subdirección de Pontevedra del Instituto de Medicina Legal, por acordarse de mí, siempre que caía en sus manos un caso interesante, y en especial al Dr. Juan González Fontán y la Dra. Tamara Ramos Paradelo por cubrirme tantas horas de guardia para que yo pudiera ir a investigar a la Facultad de Medicina.

A mi marido, Javier, por su infinita paciencia que sólo puede ser fruto de un amor sincero e incondicional.

A mis hermanas mayores Candi, M^a José y Asun, que fueron mi inspiración cuando era niña y quienes, aún desde la distancia, me apoyan y me animan en todo lo que hago.





GLOSARIO





GLOSARIO

APAF-1:	Factor Pro-apoptótico Activado-1
ATG	Conjugado de proteínas autofágicas
ATP:	Adenosin Tri-Fosfato
BACE:	Beta-site-APP cleaving enzyme
Bcl-2:	Gen Productor de la Leucemia B tipo 2
bFGF:	Factor básico de crecimiento de fibroblastos.
BHE	Barrera hematoencefálica
Brd-U:	Bromodesoxiuridina
CCA:	Caspase-mediated cleavage of APP
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CS:	Condroitinsulfato
DAI	Daño axonal difuso
Daxx:	Proteína asociada a la muerte celular
DED:	Dominio efector de la muerte
DGKζ:	Diacilglicerolquinasa
Dnmt-1:	DNA metiltransferasa-1
DS:	Dermatánsulfato
EMAP	Polipéptido endotelial activador de los monocitos
FADD:	Dominio de la proteína mortal asociada a Fas

FAP-1:	Fosfatasa asociada a Fas-1
HiF-1 α :	Factor inducible por hipoxia 1 α
HSP 72:	Proteína de choque térmico 72
ICE:	Enzima convertidor de IL-1
IFN:	Interferón
IGF-1:	Factor de crecimiento similar a la insulina
IGFR-1:	Receptor del IGF-1
IL:	Interleukina
IL-1ra	Antagonista del receptor de la Interleukina 1
KS:	Queratánsulfato
LFB:	Luxol fast blue
LCA:	Antígeno común linfocitario
LPS	Lipopolisacárido
MAP-2:	Proteína asociada a los microtúbulos.
MDM-2:	Murine double minute-2
MMPs:	Metaloproteasas
NCAM:	Molécula de adhesión neuronal
NeuN:	Marcador de núcleo neuronal
NGF:	Factor de Crecimiento Neuronal
NF:	Neurofilamento
NSE	Enolasa neuroespecífica
OMS:	Organización Mundial de la Salud

PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR:	Reacción de la Polimerasa en Cadena
PGFA:	Proteína Glial Fibrilar Ácida
PIC	Presión intracraneal
Pro-EMAPII	Precursor del polipéptido II de activación endotelial y monocítico
PS-1:	Presenilina-1
RM014:	Anticuerpo antineurfilamentos
SBDP 145:	Producto de 145kDa de la degradación de la α -II-espectrina
TCE	Traumatismo craneoencefálico
TGF- β 1:	Factor de crecimiento tumoral β 1
TGF- β 1:	Factor transformador de crecimiento β 1
TNF:	Factor de Necrosis Tumoral
TNFR:	Receptor de TNF
TNFRAF:	Factor asociado al receptor de TNF
TUNEL:	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling
UCHL-1:	Carboxi Terminal Ubiquitina Esterasa-1
VIH:	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
β - APP:	Proteína Precursora del Beta-Amiloide





ÍNDICE



ÍNDICE

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	27
1.- Introducción.....	27
1.A.- Tipos de lesiones craneales.....	28
1.B.- Concepto de daño axonal difuso.....	31
1.C.- Concepto de apoptosis y su relación con el DAI.....	33
2.- Data microscópica de los traumatismos craneoencefálicos mediante técnicas clásicas.....	35
3.- Marcadores biológicos de neovascularización.....	41
3.A.- Tenascina.....	41
3.B.- Laminina y colágeno tipo IV.....	42
3.C.- Trombomodulina.....	42
3.D.- Factor VIII.....	42
4.- Marcadores de gliosis.....	43
4.A.- Astrocitos.....	43
4.A.a.- PGFA.....	43
4.A.b.- Vimentina.....	45
4.A.c.- alfa-1-antiquimiotripsina.....	46
4.A.d.- Proteoglicanos: condroitínsulfato, queratansulfato y dermatansulfato.....	47

4.B.-Macrófagos y microglía.....	48
4.B.a.- Interleukina 1.....	50
4.B.b.- Interleukina 6.....	53
4.B.c.- Factor de necrosis tumoral alfa.....	54
4.B.d.- Factor asociado al receptor TNF alfa.....	55
4.B.e.- Pro EMAP II.....	56
4.B.f.- OX 6 y OX 42.....	56
4.B.g.- CD 68.....	57
4.B.h.- CD 163.....	58
4.C.- Marcadores leucocitarios.....	59
4.C.a.- Antígeno leucocitario común (LCA) y UHCL-1.....	59
4.C.b.- CD 3.....	60
4.C.c.- CD 15.....	60
5.- Marcadores de lesión neuronal.....	61
5.A.- NCAM.....	61
5.B.- Enolasa neuronal específica.....	62
6.- Marcadores biológicos de daño axonal difuso.....	64
6.A.- β -APP.....	64
6.B.- Proteína FE 65.....	75
6.C.- Destrucción del citoesqueleto neuronal.....	76
6.C.a.- Neurofilamentos.....	76

6.C.b.- Microtúbulos.....	78
7.- Marcadores de proliferación celular.....	79
7.A.- Nestina.....	79
7.B.- BrdU.....	80
7.C.- DNA metiltransferasa.....	82
8.- Estudio de la apoptosis.....	83
8.A.- Técnicas moleculares.....	83
8.A.a.- TUNEL (fragmentación de DN).....	83
8.A.b.- Hibridación in situ.....	84
8.B.- Inmunohistoquímica.....	85
8.B.a.- Caspasa 3.....	85
8.B.b.- Citocromo C.....	87
8.B.c.- Factor inductor de la apoptosis (AIF).....	87
8.B.d.- Genes de la familia Bcl-2.....	88
8.B.e.- p53.....	92
8.B.f.- Fas (CD95) y Fas L (CD 95 L).....	94
8.B.g.- Proteínas asociadas a Fas (Daxx, DED, FADD y FAP-1).....	95
9.- Otros marcadores.....	95
9.A.- Citoquinas.....	95
9.B.- Metaloproteinasas.....	96
9.C.- Proteínas inductoras de las metaloproteinasas (EMMPRIN o CD147).....	96

9.D.- Diacilglicerolquinasa.....	97
9.E.- Conjugados de proteínas autofágicas (ATG 12 y ATG 5).....	97
9.F.- Proteína asociada al crecimiento(GAP 43) y sinaptosina.....	98
9.G.- Factor neutrofílico ciliar.....	98
9.H.- Progranulina.....	98
9.I.- Proteína de choque térmico 72 (HSP 72).....	99
9.J.- Factor inducible por hipoxia 1 (HiF 1).....	100
9.K.- Caveolinas.....	100
9.L.- Factor de crecimiento similar a la insulina (IGFA-1).....	101
9.M.- AMPc.....	102
9.N.- Molécula de integración estromal oligomerizada 1 (STIM 1).....	102
9.O.- Acuaporina 9 (AQP 9).....	103
9.P.- Prohibitina 2 (PHB2).....	103
9.Q.- Ubiquitina.....	104
10.- Casos de especial relevancia médico legal.....	105
10.A.- Shaken baby syndrome (síndrome del niño sacudido).....	105
10.B.- Lesiones por arma de fuego.....	108
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO.....	113
MATERIAL Y METODO.....	99
1.- Material.....	117

1.A.- Selección de los casos.....	118
2.- Métodos.....	120
2.A.- Autopsia encefálica y procedimiento de obtención de secciones de tejido cerebral.....	120
2.B.- Preparación de los bloques tisulares.....	120
2.C.- Procesamiento de los bloques tisulares.....	122
2.D.- Técnicas histológicas.....	123
2.D.a.- Hematoxilina-Eosina.....	123
2.D.b.- Técnica inmunohistoquímica.....	124
2.E.- Estudio de las muestras.....	125
2.F.- Cuantificación de la inmunirreactividad.....	125
2.G.- Análisis estadístico.....	127
RESULTADOS.....	131
1.- Hallazgos macroscópicos.....	131
2.- Hematoxilina-Eosina.....	138
3.- Técnicas inmunohistoquímicas.....	149
3.A.- Grupo control.....	149
3.B.- Grupo 1 (supervivencia inferior a dos horas).....	157
3.C.- Grupo 2 (supervivencia entre 2 y 24 horas).....	169
3.D.- Grupo 3 (supervivencia entre 24 horas y 30 días).....	180
3.E.- Grupo 4 (supervivencia superior a 30 días).....	196

4.- Análisis estadístico.....	204
4.A.- PGFA.....	204
4.A.a.- Sustancia gris.....	204
4.A.b.- Sustancia blanca.....	206
4.B.- CD68.....	209
4.B.a.- Sustancia gris.....	209
4.B.b.- Sustancia blanca.....	211
DISCUSIÓN.....	217
1.- Consideraciones generales.....	217
2.- Utilidad de los marcadores inmunohistoquímicos.....	219
3.- Consideraciones técnicas.....	224
4.- Interpretación de los resultados.....	225
5.- Expresión de los marcadores seleccionados.....	226
5.A.- Neurofilamentos.....	226
5.B.- PGFA.....	228
5.C.- CD68.....	232
5.D.- Bapp.....	235
5.E.- Genes de apoptosis: Bcl-2 y p53.....	239
5.F.- Vimentina.....	240
6.- Casos de especial mención.....	242
7.- Consideraciones finales.....	243

CONCLUSIONES.....	247
BIBLIOGRAFÍA.....	251









**REVISIÓN
BIBLIOGRÁFICA**





REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.- INTRODUCCION

Los traumatismos craneoencefálicos son unas de las primeras causas de morbimortalidad, en especial en edades inferiores a los 45 años en los países industrializados, debido fundamentalmente al incremento del uso de vehículos a motor. Según la OMS en su informe del año 2004 para la prevención de las lesiones por accidente de tráfico, en el año 2020 los accidentes de tráfico serán una de las tres primeras causas de muerte por delante del VIH y de la tuberculosis. De hecho, en la actualidad alrededor de la cuarta parte de las muertes de origen violento se deben a traumatismos que asientan sobre la cabeza. (Morganti-Kossmán, 2007)

La neuropatología forense ha incrementado notablemente su importancia dentro del campo de la Medicina Legal, habiendo experimentado considerables avances en su área de conocimiento. En lo relativo a los traumatismos craneales, con la introducción de técnicas inmunohistoquímicas y de detección de apoptosis se abren nuevas posibilidades diagnósticas y pronósticas tanto en niños como en adultos. La patología molecular forense presenta dos vertientes: una consistente en la investigación genética de las enfermedades (importante para poder dar consejos genéticos e incluso tratar de forma precoz determinadas patologías hereditarias), y otra se centra en el estudio molecular de la fisiopatología de las enfermedades y de los traumas que conducen a la muerte, observando cambios en el ARNm y en las proteínas mediante técnicas bioquímicas e inmunohistoquímicas, especialmente de los

mediadores de inflamación, de apoptosis y de marcadores de vitalidad. Por ejemplo, en el caso de los traumatismos del SNC la PGFA puede indicar daño astrocitario tras la hipoxia, la proteína S100 es un buen marcador sérico de daño neuronal y la ubiquitina sugiere stress neuronal por diversas causas. Es cierto que este tipo de estudios presentan ciertas limitaciones debido a la interferencia con los fenómenos de autólisis del cadáver, pero dichas limitaciones se minimizan con una buena técnica de obtención de muestras (Maeda y cols, 2010).

1.A.- TIPOS DE LESIONES PRODUCIDAS POR TRAUMATISMO CRÁNEO ENCEFÁLICO

Lesiones de partes blandas:

- Contusiones
- Heridas

Lesiones óseas:

- Fisuras
- Fracturas conminutas
- Fracturas con depresión-hundimiento
- Fracturas con pérdida de sustancia

Lesiones intracraneales (Castellano Arroyo, 2000):

- **Conmoción cerebral** (daño neuronal difuso): respuesta inespecífica a los traumatismos. Se produce una pérdida de conciencia inmediata al traumatismo, pero transitoria. En ocasiones se produce la muerte por una afectación neuronal que produciría lesión tisular y hemorragias microscópicas. El daño es neuronal por lo que las

lesiones no son apreciables en la autopsia y requieren estudio histológico que, incluso en algunas ocasiones, resulta negativo.

- **Contusión cerebral:** Se produce una pérdida de conciencia superior a 6 horas. El tejido cerebral se destruye, acompañándose de extravasaciones o pequeñas hemorragias localizadas en la zona afectada que se rodean de ligero edema perifocal. Las células afectadas liberan sustancias que licúan el tejido circundante, formando pequeñas cavidades quísticas que son invadidas por microglía, dando lugar a los cuerpos granulosos. A los 3 días la astrogliosis da lugar a su cicatrización.
- **Edema cerebral:** Se produce por el aumento de la permeabilidad capilar y la disminución de la presión osmótica del plasma, lo que hace que pase agua y sodio al tejido cerebral, dando lugar a un aumento de la presión intracraneal. El diagnóstico de certeza debe ser microscópico, aunque signos macroscópicos evidentes pueden ser la turgencia y el brillo de la masa encefálica, el borrado de las circunvoluciones y surcos, herniaciones y la aparición del enarenado hemorrágico en la sustancia blanca al corte.
- **Hemorragias cerebrales:**
 - **Extradurales**
 - **Subdurales:** aguda, con un periodo de latencia inferior a 24 h, subaguda con latencia de entre 24 h y 3 meses, y crónica con más de 3 meses de margen temporal para su aparición.
 - **Subaracnoideas:** Las hemorragias subaracnoideas son el hallazgo intracraneal más común como consecuencia de un traumatismo craneal, pudiendo ser difusas, focales o parcheadas. También pueden ser causadas por lesión de las arterias

vertebrales o la arteria basilar como consecuencia de la hiperextensión del cuello o, en el caso de la arteria vertebral, por traumas laterales en el cuello

- **Intraparenquimatosas:** localizadas con mayor frecuencia en las regiones frontal y temporal, normalmente asociadas a fracturas craneales. Su aparición puede ser diferida horas o días tras el traumatismo

- **Daño axonal difuso**

En la actualidad se empieza a poner de manifiesto la correlación entre un traumatismo cráneo-encefálico de baja-media intensidad y la aparición de secuelas diferidas, incluso con la aparición de enfermedades neurodegenerativas tales como el Alzheimer o el Parkinson.

El estudio simple de las lesiones encefálicas es complejo y la información obtenida del estudio macroscópico es pobre y por supuesto, insuficiente. Como puede deducirse, el proceso de daño y reparación tisular sufrido por el encéfalo ante cualquier agente es más complejo que un simple proceso inflamatorio. Además, en la actualidad, dichos procesos bioquímicos no son conocidos en su totalidad, si bien son similares en todas las posibles etiologías (hipoxia, epilepsia, toxinas, traumatismos...), en parte por la especialización de sus células, y en parte porque en todas las situaciones, la respuesta macroscópica es similar. Es decir, cualquier noxa produce inflamación, que a su vez produce edema, y ésta provoca problemas de espacio en la cavidad cerrada que es el cráneo (Castellano Arroyo, en Medicina legal y toxicológica. Capítulo 33 (2000)).

1.B.- CONCEPTO DE DAÑO AXONAL DIFUSO (*Diffuse Axonal Injury*)

Las lesiones asociadas con traumatismos cráneo-encefálicos se pueden clasificar en focales o difusas. Las focales incluyen las fracturas de cráneo, hematomas y contusiones. Las lesiones difusas hacen referencia a isquemia generalizada, edema cerebral y daño axonal traumático, el cual se produce por interrupción del flujo axonal. El diagnóstico de daño axonal requiere la identificación microscópica de axones edematosos y bulbos axonales (Reichard y cols, 2005).

Cuanto más severo es el traumatismo, mayor es la frecuencia de lesiones en la cápsula interna, el cerebelo y el tallo cerebral, así como en la sustancia blanca hemisférica. Por tanto podría definirse como daño axonal **difuso** (DAI) aquel que se detecta en hemisferios cerebrales, cuerpo caloso y tallo cerebral (Geddes y cols, 1997). Es decir, supone lesiones en lugares específicos supra e infratentoriales, aunque la distribución e intensidad de las lesiones varía según los casos, dependiendo del tipo y la severidad del impacto. De este modo el daño axonal traumático puede ser multifocal y en otros muchos casos, difuso.

Hay que señalar que el daño axonal difuso no sólo se produce por traumatismos, sino también por isquemia, hipoglucemia y otros trastornos metabólicos, inflamación, drogas y alcohol e incluso por envejecimiento. En general, todas aquellas circunstancias en las que se produce un aumento de la presión intracraneal pueden dar lugar a daño axonal (Orthobagyi y cols, 2007).

No obstante, los cambios morfológicos secundarios a isquemia han sido bien definidos en distintos estudios (Tatlisumak y cols, 2009), presentando ligeras diferencias con los cambios sufridos tras un traumatismo, tanto en su expresión morfológica como temporal:

	1,5 h	3h	6h	12h	24h	72h
Edema y granulación citoplasma	+	+	+	+	+	
Edema axonal				+	+	
Eosinofilia				+	+	
Necrosis total						+
Neuronas fantasmas						+
Edema de células gliales	+	+	+	+	+	
Acumulación de glía junto a infarto					+	+
Infiltrado de PMN				+	+	+

Cambios morfológicos en tejido cerebral tras tranamantismo (Tatlisumak y cols, 2009)

En casos de etiología traumática la presencia de células inflamatorias como neutrófilos, mononucleares y macrófagos parece estar implicada en el daño cerebral secundario, contribuyendo a alteraciones en el flujo sanguíneo cerebral, edema, hipertensión intracraneal y en última instancia, a la muerte neuronal (Hausman y cols, 1999).

El diagnóstico de este tipo de lesión neuronal se hizo clásicamente con hematoxilina-eosina y tinciones argénticas; sin embargo, la frecuencia en su diagnóstico ha aumentado (demostrando su importancia en la morbimortalidad

subsecuente a un traumatismo cráneo-encefálico) debido al empleo de técnicas inmunohistoquímicas (Graham y cols, 2004), principalmente mediante el estudio de la acumulación de la proteína β -Amiloide y su precursor β -APP.

1.C.- CONCEPTO DE APOPTOSIS Y SU RELACIÓN CON EL DAÑO AXONAL DIFUSO

Después de un traumatismo se ponen en marcha dos tipos de neurodegeneración: la excitotóxica y la apoptótica. Mientras que la primera presenta un tiempo de evolución rápido, la apoptosis se presenta de forma diferida y afecta a áreas del encéfalo distantes del lugar del impacto. La respuesta apoptótica depende de la edad. Los desencadenantes son múltiples: lesiones de ADN, privación de factores de crecimiento, producción de citoquinas, etc. Además, se ejecuta por distintas vías bioquímicas aunque todas confluyen en la activación de las caspasas (Felderhoff-Muesner y cols, 2002).

La muerte por neurotoxicidad (necrosis) se debe a la liberación de aminoácidos excitotóxicos con la consecuente entrada de calcio a la célula, que provoca una estimulación enzimática que dará lugar a productos de metabolismo (como lactato) que constituyen factores de daño secundario, productos de degradación de fosfolípidos (ácido araquidónico), peroxidación de lípidos, proteólisis del citoesqueleto, etc. Todo ello conduce a una pérdida de integridad de las membranas con el consiguiente daño irreparable de las organelas y edema celular (Dong y cols, 2001).

Una consecuencia inmediata de la elevación de la concentración del calcio intracelular es la activación de las proteasas calcio dependientes (calpaínas), que conduce a la proteólisis de proteínas intracelulares incluyendo las del citoesqueleto. El estudio de los mecanismos de muerte celular *in vitro* ha llevado a la conclusión de que concentraciones bajas de calcio conducirían a una muerte

por apoptosis, mientras que concentraciones altas llevarían a la necrosis (Raghupathi, 2004).

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico que resulta crítico en el desarrollo del sistema nervioso central, su homeostasis y en la eliminación de células potencialmente peligrosas. Ocurre en ausencia de respuesta inflamatoria en los tejidos circundantes y puede ser iniciada por distintos estímulos. No sólo ha sido reconocida como un fenómeno esencial en la homeostasis del tejido nervioso sino que también juega un papel crucial en eventos neuropatológicos, tales como el traumatismo craneo encefálico, la isquemia cerebral, y varias enfermedades neurodegenerativas (Cernak y cols, 2002). Por ello, se ha propuesto que la apoptosis neuronal tras un accidente isquémico o traumático, podría representar un mecanismo de protección para el cerebro; por ejemplo, podría constituir un mecanismo para eliminar las células dañadas o muertas sin afectar a las células sanas (Raghupathi, 2004).

No obstante, su función es mucho más amplia y compleja ya que sus mecanismos bioquímicos conservan la integridad de las membranas, provocan la condensación del citoplasma y las organelas y forman vesículas (apoptosomas). El mecanismo general puede resumirse en un receptor que activa la cascada de las caspasas, que activan las proteinkinasa con la consiguiente liberación del citocromo C del espacio intramembrana de la mitocondria, el cual provocaría en última instancia la fragmentación de ADN (Gao-Xiang Dong y cols, 2001).

Los mecanismos bioquímicos que conducen a la muerte celular programada aún no se conocen en su totalidad, si bien se relacionan con un grupo de genes proapoptóticos (p53, Bax, Bid, Bik, Bak, Bim y Bcl-X) y antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-Xl y Mcl-1), descritos en relación con el linfoma de células B (BCL-2, *B cell leukemia-2 gene product*). Los desencadenantes incluyen privación de factor de crecimiento, daños en el ADN, producción de citocinas y activación de receptores. Todo ello converge en la activación de las caspasas:

- **Vía extrínseca:** La vía extrínseca o mitocondrial de la apoptosis es el resultado de la desaparición de estímulos de supervivencia, esto provoca un aumento en la permeabilidad de las membranas mitocondriales que libera al citoplasma algunas proteínas como el citocromo C que actúa como cofactor de las proteínas activadoras de la apoptosis (Apaf-1) y en último término activando la caspasa 9.
- **Vía intrínseca:** Consiste en la activación de receptores como el FAS (que pertenece a la familia del TNF- α). La unión de FAS a una proteína adaptadora y a la forma inactiva de la caspasa 8, forma un complejo inductor que a su vez transforma la pro-caspasa 8 en caspasa 8 activa iniciando la cascada hasta activar la caspasa 3 (Felderhoff-Muessner y cols, 2002).

2.- DATA MICROSCÓPICA DE LOS TRAUMATISMOS CRÁNEO ENCEFÁLICOS MEDIANTE TÉCNICAS CLÁSICAS

La técnica básica para el estudio de la data de los traumatismos es la observación del estado del coágulo del hematoma: la organización de membranas de fibrina y el estado de las células que lo conforman. De este modo obtendríamos los resultados que se reflejan en el siguiente cuadro (Di Maio, 2003):

Periodo de tiempo tras la lesión	Estado del coagulo	Hallazgos microscópicos	
		Lado de la membrana en contacto con la duramadre	Lado de la membrana entre coagulo y aracnoides
24 horas	Eritrocitos frescos	Fina capa de fibrina entre la dura y el coágulo	
24-72 h	Eritrocitos frescos	Escasos fibroblatos (fusiformes) en la interfase	Solo fibrina
4-5 días	Comienzan a romperse los eritrocitos	Capa de fibroblastos de 2-5 células	Células fusiformes ocasionales entre fibrina
5-10 días	Eritrocitos en islotes, Los fibroblastos pueden extenderse dentro del coágulo Formación capilar temprana	Capa de fibroblastos de 3-14 células Pequeños capilares ocasionales Macrófagos cargados de pigmento.	Capa con predominio de fibrina con algunos fibroblastos
10-20 días	Quedan pocos eritrocitos La formación capilar continúa	Capa de fibroblastos de 1/3 a 1/2 del espesor de la duramadre Capilares Macrófagos cargados de pigmento	Membrana fibroblástica temprana evidente
3-4 semanas	Casi licuado	Membrana de espesor igual a la duramadre Macrófagos cargados de pigmento	Membrana fibroblástica de 1/2 de espesor de la duramadre Ocasionales macrófagos cargados de pigmento
5 semanas	Grandes capilares	Membrana bien formada	Membrana bien formada
1-3 meses	Puede haber grandes capilares (gigantes) Puede haber hemorragia secundaria	Hialinización de la membrana	Hialinización de la membrana
3-6 meses		Membrana hialinizada	Membrana hialinizada

Cambios evolutivos en el coágulo de una hemorragia intracraneal (Di Maio, 2003)

También puede observarse el infiltrado inflamatorio como en cualquier otra lesión. Así los PMN son observables a los 150 min, en regiones perivasculares, extendiéndose por todo el tejido pudiendo permanecer hasta un mes y medio. Los eritrocitos se hacen visibles en el tejido a las 20 horas y permanecen hasta 4 meses (Walter y cols, 2009).

Desde el punto de vista morfológico las neuronas que sufren necrosis presentan una serie de cambios morfológicos: citoplasma eosinófilo, condensaciones nucleares, núcleo picnótico y por último cariorrexis (Kaya y cols, 1999). Todo ello como consecuencia de la condensación, fragmentación y destrucción del ADN. Todos estos productos de deshecho se eliminan en forma de acúmulos de lipofusina, los cuales son fáciles de detectar mediante técnicas de tinción convencionales. Como es lógico la tinción será siempre mayor alrededor de la zona de contusión (región donde existen más células necróticas) y disminuirá conforme nos alejemos de este foco. Se hacen evidentes a las tres horas postraumatismo en la región penumbra y se hace mucho más visible a las 24 horas.

La pérdida de neuronas tras un traumatismo se observa a partir de las 48 horas evidenciándose cada vez más hasta las 2 semanas. En la zona del impacto aparecen también eritrocitos y se observa un incremento del número de células gliales. La pérdida aparente de neuronas y el adelgazamiento de la capa interna del giro dentado homolateral al impacto, se hace evidente al mismo ritmo. Además, las células apoptóticas superan en número a las necróticas en el hipocampo, en especial en el cíngulo y la zona CA3, aunque no se conoce la causa de la predilección por esta zona de la apoptosis. También se ha demostrado que el córtex motor y el giro dentado son las zonas menos susceptibles al daño axonal difuso, y además no muestra predilección por ningunos de los hemisferios (el contundido o el contralateral), por eso se trata de un daño difuso. Todo esto explica ciertas características clínicas de los

traumatismos cráneo-encefálicos (amnesia y trastornos cognitivos). En cualquier caso, no cabe duda de que, gracias a la apoptosis, el daño generado por un traumatismo excede los límites de la zona directamente contundida. Las células apoptóticas presentan una morfología redondeada con condensaciones en su citoplasma conocidos como cuerpos apoptóticos. También es característica la condensación de la cromatina en regiones marginales del núcleo (Tashlykov y cols, 2007). Estos hallazgos morfológicos no son evidentes hasta una semana tras el traumatismo, y perduran otra semana más, siendo la estirpe celular más afectada la neuronal (Kaya y cols, 1999).

Los traumatismos dan lugar a pequeñas roturas del axón lo que provoca la entrada de calcio, proteasas y otras sustancias, que dan lugar a una pérdida de la integridad fisiológica del mismo. Este proceso es conocido como axotomía secundaria. Como resultado, el axón dañado sufre una serie de cambios morfológicos volviéndose cada vez más irregular, ondulado y grueso dando lugar a un aspecto arrosariado; y por último, cuando la desconexión axonal es total, se produce un aspecto de bulbo (bulbos de retracción). Este proceso no es inmediato, sino que conlleva una serie de procesos bioquímicos, cuyo estudio puede ser útil para determinar la cronología de un traumatismo (Dolinak y cols, 2006).

El daño axonal se considera una consecuencia del traumatismo cráneo-encefálico cerrado mortal. Ha sido demostrado 24 horas tras el traumatismo en el 90% de los casos con un pico de daño axonal entre 10 y 15 horas tras la producción de la lesión (Ohemichen y cols, 1998).

El edema axonal y las varicosidades son probablemente reversibles mientras la estructura mitocondrial permanezca intacta. Las tinciones con hematoxilina-eosina y las técnicas argentícas permiten observar axones dañados a las 24, 15-18 horas respectivamente, tras el traumatismo (Orthobagyi y cols, 2007).

Aunque algunos autores describen cambios morfológicos relacionados con DAI mediante técnicas convencionales a partir de las 8 horas (células redondeadas, edema y ondulación axonal) siendo más obvios con el tiempo ya que a los dos días detectan también bulbos axonales (Kubo y cols, 1998). Morio y cols (2003) sin embargo, refieren que los cambios asociados al daño axonal difuso como la retracción axonal y los bulbos axonales, son difíciles de observar con las tinciones histológicas habituales antes de las 12-15 horas de supervivencia. Las técnicas inmunohistoquímicas disminuyen el tiempo de diagnóstico pero aun así, se requiere un periodo mínimo de supervivencia de 1,5 a 2 horas. Las técnicas clásicas son útiles a largo plazo para observar los cambios crónicos de DAI: a los 5 meses aún son visibles la gliosis, las vacuolas grasas y los gránulos de mielina, pero ya han desaparecido los bulbos axonales y los restos de las neuronas muertas (Shin-ichi Kubo y cols, 1998).

Para identificar el edema axonal mediante tinciones clásicas son necesarias entre 12 a 24 h de supervivencia (Gleckman y cols, 2004). No obstante, en zonas muy sensibles a este proceso como las zonas C1 y C3 del hipocampo, las técnicas argénticas demuestran el daño axonal difuso al cabo de unas 5 horas tras el traumatismo. Incluso características no específicas del traumatismo pero sí de muerte celular, como la eosinofilia y el daño vascular, pueden detectarse mediante hematoxilina-eosina a las 2-5 horas (Ogata, 2007).

Tiempo de supervivencia	Ondulación de axones	Elongación axonal	Bulbos axonales
0,5 horas	+	+	-
1 hora	+	+	-
3 horas	+++	-	-
6 horas	+++	+	-
12 horas	++++	++++	++
24 horas	+++	+++	+
48 horas	++++	+	+

Cambios axonales observados con tinción de Bodian (proteinato de Ag) (Morio y cols, 2003).

La demostración de acúmulos de células de la microglía alrededor de bulbos individuales representa una ayuda adicional para determinar la vitalidad de la lesión, lo cual es visible con tinciones convencionales entre las 24 y las 48 horas tras el traumatismo (Vanezis y cols, 1997). Aunque referencias clásicas establecen la demostración de esta reacción celular a las 15 horas tras la lesión. (Oppenheimer, 1968). Este fenómeno es difícil de detectar, siendo más evidente la reacción difusa de la microglía que incluye la presencia de macrófagos con restos necróticos (Ohemichen y cols, 1998).

Los bulbos y edemas axonales desaparecen al cabo de 1 mes y con supervivencias mayores sólo se observa gliosis difusa inespecífica. (Dolinak y cols, 2006).

La fagocitosis, la destrucción de la mielina y la gliosis no son exclusivos de los traumatismos, pero en cualquier caso son responsables de las secuelas crónicas del traumatismo (disminución de la sustancia blanca y dilatación ventricular) (Onaya, 2002).

La tinción con fluorojade delimita patrones de neurodegeneración de forma similar a las tinciones argénticas, sólo que es más simple y adaptable a técnicas complementarias que permitan el análisis de ARNm (genes pro-y anti-apoptóticos). De esta manera se comprueba la distribución del daño neuronal según la severidad del traumatismo. Comienza a observarse a las 2 horas. El número de células afectadas es similar dentro de cada grupo (clasificados por severidad del traumatismo) tanto a las 4 como a las 24 horas. Lo que no se puede asegurar es que sea un daño estable, es decir, si las células detectadas en la segunda medición son las mismas que en la primera, o si éstas ya desaparecieron y comenzó la apoptosis en otras. La aparición de células apoptóticas queda relacionada con el aumento en la activación de la caspasa 3 y con una mayor expresión de su ARNm, cuanto más severo era el traumatismo; y con la elevación del Bcl-2, el cual permanece positivo incluso hasta el 4º día, relacionándose con el descenso de células apoptóticas que ocurre entre las 48h y el 4 día tras la lesión. (Hellmich y cols, 2005).

3.- MARCADORES BIOLÓGICOS DE NEOVASCULARIZACIÓN

3.A.- TENASCINA

Es una glicoproteína extracelular involucrada en funciones de adhesión, migración, crecimiento neuronal y angiogénesis. Además es producida por los astrocitos inmaduros durante el desarrollo del sistema nervioso central. En procesos de recuperación tras una lesión es detectable 36 horas tras el traumatismo sólo en los vasos que rodean la lesión. A partir de la primera semana se detecta en regiones distantes de la lesión junto con estructuras neovasculares que comienzan a colonizar el tejido dañado. También se detecta en la astrogliá entre 4 a 7 días tras el traumatismo (Hausman y cols, 2000).

3.B.- LAMININA Y COLAGENO TIPO IV

Ambos son componentes de la membrana basal de los vasos sanguíneos, por lo que se localizan tanto en vasos en proliferación como en los ya maduros. Por ello resultan unos marcadores poco específicos a la hora de estudiar lesiones en el tejido encefálico ya que en sujetos sanos también están presentes. No obstante, durante las semanas siguientes a un traumatismo (de 1 a 4) se observan capilares en formación adyacentes a la lesión, en los cuales la tinción para estos marcadores es más intensa que en el resto de los vasos sanguíneos (Hausman y cols, 2000).

3.C.- TROMBOMODULINA

Es una glicoproteína transmembrana que funciona como cofactor para activación fisiológica de la proteína C. Posee mayor especificidad que los anteriores ya que no se expresa en tejidos sanos. Tras una contusión cortical se expresa a partir de los 7 días y sigue presente 2 semanas en los vasos perilesionales (Hausman y cols, 2000).

3.D.- FACTOR VIII

Representa un marcador específico y representativo de las células endoteliales. Es cierto que en tejidos sanos existe tinción el factor VIII, pero 3 horas después del traumatismo su intensidad es significativamente mayor. El aumento de la expresión de dicho marcador comienza a las 24 horas y se incrementa en los 6 primeros días. A partir de entonces y hasta la 4ª semana, los vasos sanguíneos perilesionales (proliferativos o maduros) muestran una tinción muy llamativa de factor VIII (Hausman y cols, 2000).

4.- MARCADORES DE GLIOSIS

4.A.- ASTROCITOS

4.A.a.- PROTEINA GLIAL FIBRILAR ACIDA (PGFA)

Las reacciones de los astrocitos al daño traumático e isquémico se acompañan de la acumulación de la proteína glial fibrilar ácida que es la proteína de los filamentos intermedios del citoesqueleto de los astrocitos (Korzhevskii, 2006).

En las zonas de contusión los astrocitos exhiben cambios morfológicos por hipertrofia consistentes en un aumento de tamaño, mayor intensidad de tinción citoplasmática y mayor número de procesos. También aumenta la densidad celular por hiperplasia (Ronchao, 2012).

En circunstancias experimentales, no se observaron cambios en los astrocitos (con PGFA) en zonas lejanas al traumatismo antes del 5° día. Después del 8° día se aprecia astrogliosis reactiva pero no agregación astrocitaria alrededor de los bulbos axonales. A los 3 meses, la astrogliosis es generalizada y difusa por toda la sustancia blanca, pero no se apreciaban características que pudieran asociarse al daño axonal difuso (es decir, es un marcador de gliosis pero no de daño axonal difuso) (Geddes y cols, 1997).

No obstante, en regiones más sensibles a los traumatismos, como el hipocampo (debido al edema y la posible hemorragia) se reduce el periodo “ventana”, apareciendo en periodos agudos (entre 3 horas y 2 días). Por ejemplo, en la región C4 del hipocampo se puede observar a las 12 horas; sin embargo en la región C1 (que es más sensible a la hipoxia) casi no se expresa.

Un dato significativo es que la expresión de PGFA y el patrón de la misma no varían con la edad (Li y cols, 2009).

Comparando su expresión en distintas estructuras se observa que de forma precoz (en las primeras 24 h) aumenta la expresión de PGFA en el córtex, el hipocampo y en la cápsula externa del hemisferio afectado, manteniendo este patrón durante los 3 primeros días. Al cabo de una semana los niveles bajan en el hipocampo y aumentan en el tálamo. Este patrón regional coincide con el daño microvascular secundario a la alteración de la BHE (Ekmark-Lewén y cols, 2013).

Otros autores han detectado una expresión más precoz en la sustancia blanca subcortical: sólo 4 horas después del traumatismo (Tashykov y cols, 2007) prolongándose durante dos semanas, debido a la acumulación de astrocitos alrededor de los axones dañados (Bye y cols, 2011).

En estudios forenses sobre daño secundario debido al edema y al aumento de la presión intracraneal se observó un comportamiento particular de PGFA, dependiendo principalmente de la presencia de hemorragias y de la intensidad del traumatismo. En muertes inmediatas con fracturas abiertas, en las que la lesión cerebral era evidente a simple vista, no se aprecia una disminución del número de neuronas en el córtex, pero sí una disminución de la expresión de la PGFA por los astrocitos. La sustancia blanca no mostró alteraciones de su citoarquitectura. No se observaron tampoco cambios en los astrocitos del hipocampo y de la corteza no afectados por el traumatismo (siempre y cuando no se hubiera producido herniación del hipocampo). La situación es similar en periodos de supervivencia inferiores a 12 horas. Estos cambios en la expresión del PGFA indican la disfunción de toda la sustancia blanca que comienza inmediatamente tras el traumatismo, aun cuando no se observa edema axonal. El córtex contralateral al traumatismo tarda más en expresar estos cambios dependiendo de los múltiples factores que determinan la supervivencia neuronal.

En muertes con un tiempo de supervivencia entre 12 h y 3 días, la PGFA comienza a disminuir en el hipocampo y en la sustancia blanca no afectada por el traumatismo en los casos que presentaban compresión por aumento de la presión intracraneal (PIC). En estos casos, el córtex intacto ya comienza a mostrar pérdida de masa neuronal. En casos de supervivencia prolongada (más de tres días) sin hemorragia subdural, se acentúan los cambios anteriormente descritos (Wang y cols, 2012).

También se ha observado un comportamiento paralelo entre la expresión de la PGFA y los depósitos de hierro: ambos son claramente positivos una semana tras el traumatismo tanto en el tálamo como en la cápsula interna ipsilateral, con un patrón punteado; con la particularidad de que los depósitos de hierro tienen su origen en la degradación celular, mientras que la PGFA es signo de la activación de los astrocitos. Quizá este comportamiento paralelo se deba a que los depósitos de hierro originan inflamación crónica perpetuando las reacciones de gliosis (Onyszchuck y cols, 2009). En cualquier caso, no resulta extraña la presencia de astrocitos en estas regiones (hipocampo, tálamo basal y cuerpo caloso), dado que es ahí donde se producen de novo a partir de neuroblastos, pudiendo permanecer en ellas hasta 7 días tras un traumatismo (Bye y cols, 2011).

4.A.b.- VIMENTINA

Es el mayor componente del citoesqueleto de la glía inmadura. En el tejido nervioso adulto es sustituida por la proteína glial fibrilar ácida (PGFA). Cuando se produce una lesión, los astrocitos maduros recuperan la capacidad de producirla de forma simultánea a la PGFA. Las células gliales del tejido sano no muestran reacción positiva a vimentina. Sin embargo, en contusiones corticales, la glía adyacente al foco de lesión expresa este marcador siendo visible a partir

de las 22 horas, resultando francamente positivo entre los 6 días y las 4 semanas. En modelos experimentales, se ha demostrado que la expresión de vimentina comienza en la sustancia blanca subcortical (de la zona contundida) y en el hipocampo. A los tres días se extiende a toda la sustancia blanca subcortical, incluyendo el cuerpo calloso y la cápsula externa. A los siete días persiste en el tálamo y en la cápsula interna, pero en este punto la expresión de esta proteína ha disminuido drásticamente en el córtex y en el hipocampo (Ekmark-Lewén y col. 2013).

Janeczko K. (1993) observó la expresión simultánea de este marcador junto con la PGFA y sus resultados fueron que la coexpresión de estos marcadores era insignificante en las primeras 24 horas. A los dos días encontró un pico máximo de expresión de ambos marcadores, descendiendo gradualmente hasta el octavo día (punto en el que concluía su observación). En el segundo día el 67.2% de los astrocitos marcados con PGFA, resultaron también positivos a vimentina. Esta proporción disminuyó al 50,7% y 38,5% en el cuarto y octavo día respectivamente. Así mismo, sonstató una distribución geográfica de los astrocitos positivos a vimentina, siendo más próximos a la región lesionad, aquellos que sólo expresaban la vimentina, después los que expresaban los dos marcadores y por último, los más alejados de la lesión eran aquellos que sólo expresaban PGFA.

4.A.c.- ALFA-1-ANTIQUIMIOTRIPSINA

Esta proteína constituye uno de los principales reactantes de fase aguda en procesos inflamatorios y degenerativos del sistema nervioso central, habiendo sido demostrado que su síntesis corre a cargo de los astrocitos, así como su presencia en las placas de β -amiloide presentes en enfermedades como el Alzheimer o la corea de Huntinton. Resulta obvio que, en condiciones

normales no se produce reacción positiva a este marcador, comenzando a ser visible a partir de las 3 horas tras una lesión traumática, aunque no es hasta las 24 horas que se hace francamente positiva, perdurando hasta 13 días en las regiones perilesionales (Hausman y cols, 2001).

4.A.d- PROTEOGLICANOS: CONDROITÍNSULFATO, QUERATÁN-SULFATO Y DERMATÁNSULFATO:

Los proteoglicanos son proteínas unidas a polisacáridos ácidos con múltiples funciones en todos los tejidos, pero en el SNC inhiben el crecimiento axonal y la regeneración celular y forman parte de la cicatriz tras un insulto tisular. En condiciones normales las células no expresan estas proteínas, pero tras un traumatismo se libera TGF β -1 que induce la producción de bFGF por la microglía, el cual estimula la producción de TGF β -1 en los astrocitos, cerrando así un círculo de retroalimentación positivo. La simple presencia de este factor no determina la producción de proteoglicanos, sino que es necesario que los astrocitos expresen un receptor específico (ErbB1), el cual no se expresa a no ser que haya existido un antecedente traumático. De este modo se ha demostrado la presencia de condroitínsulfato (CS) y queratínsulfato (KS) y de las enzimas que intervienen en su síntesis en células de la microglía 12 h después de que se haya determinado la existencia de TGF β -1. En resumen, el TGF β -1 favorece la actividad de la microglía para la formación de una cicatriz mediante la liberación de citoquinas y de CS y KS, lo cual activa a su vez al sistema mayor de histocompatibilidad tipo II (Yin y cols, 2009).

El CS puede dar lugar a distintos proteoglicanos (dermatínsulfato, versicansulfato, neurocamsulfato, agregansulfato y fosfocansulfato) variando la proteína central y sobre todo la longitud de las cadenas sulfatadas asociadas, lo que modifica su capacidad de adhesión y algunas de sus funciones. Estos

proteoglicanos se expresan principalmente en astrocitos, oligodendrocitos inmaduros y neuronas, si bien en condiciones normales su presencia se limita al espacio extracelular. El distinto comportamiento de los proteoglicanos se relaciona con los brotes axonales tras un traumatismo, es decir, algunos disminuyen la cicatriz y fomentan la regeneración celular así como la formación de sinapsis (Harris y cols, 2009). No obstante otros como el dermatánsulfato se expresan también por el estímulo del TGF β -1 sobre los fibroblastos de las meninges, favoreciendo la formación de la cicatriz fibrosa, dado que el dermatánsulfato fija el colágeno (Li, 2013).

Todos los proteoglicanos disminuyen a partir de las 24 horas hasta el 7º día tras el traumatismo permaneciendo sus niveles bajos durante dos semanas en el córtex. En la sustancia blanca subyacente aumenta a los 7 días a cargo de los astrocitos. No se han observado cambios en el hemisferio contralateral. El único que presenta un patrón de comportamiento distinto es el agregánsulfato aumentando entre las primeras 24 horas y los 14 días, pudiendo deberse este aumento a una mayor producción o bien a la pérdida del tejido en el córtex, lo que daría lugar a una aumento relativo de su densidad (Harris y cols, 2009).

4.B.- MACRÓFAGOS Y MICROGLÍA

Con microscopía convencional los macrófagos son visibles a los 3 días abundantemente en el tejido contundido, alrededor de los axones dañados y grandes vasos sanguíneos, así como en tejido dañado no adyacente a los vasos sanguíneos (Uryu y cols, 2007).

En el SNC, tras un traumatismo, la microglía activada y los macrofágos tienen como función la eliminación del material necrótico, aunque también secretan factores de crecimiento para la regeneración tisular, si bien, dependiendo de las moléculas quimiotácticas liberadas, pueden tener efectos

destructivos. Tanto los macrófagos como la microglía cambian su morfología, expresan proteínas de membrana y citoquinas que pueden contribuir a la inflamación, la pérdida de tejido y la formación de una cicatriz glial (Perry y cols, 2010).

Cuando se produce una lesión, la microglía entra en un estado de equilibrio dinámico entre la activación clásica y la alternativa, dando lugar a procesos celulares contradictorios. Señales muy discretas en el microambiente, inducen la activación clásica de la microglía cuya principal misión es la fagocitosis, lo que conduce a una mayor pérdida de masa neuronal. La activación alternativa promueve la neuroplasticidad, la regeneración axonal y la formación de nuevas sinapsis. Morfológicamente la microglía activada muestra citoplasma más amplio, procesos más numerosos, más ramificados y más gruesos. Si bien esta morfología va normalizándose a partir de la primera semana, no así los marcadores que demuestran esa activación ($\text{TNF}\alpha$ y CD 45 para la activación clásica; $\text{TGF}\alpha 1$ y $\text{TGF}\alpha \text{RII}$ para la desactivación adquirida y arginasa 1 para la activación alternativa), los cuales pueden permanecer durante meses (Cao y cols, 2012).

Los macrófagos también son sensibles a cambios en el microambiente, por lo que sus fenotipos vendrán determinados por las restantes células inflamatorias vecinas, así como por el tiempo transcurrido desde el traumatismo. Así, los macrófagos M1 se activan por la vía clásica gracias a los lipopolisacáridos y el interferón γ , y producen citoquinas proinflamatorias, como $\text{TNF}\alpha$. El fenotipo M2 es activado por la IL-4 e IL-13 y presentan funciones reparadoras y regeneradoras del SNC. Su comportamiento y distribución son similares a las de la microglía tras un TCE (Turtzo y cols, 2014).

4.B.a.- INTERLEUKINA 1

En el caso del Sistema Nervioso Central es secretada por la microglía y los astrocitos. También es expresada por mononucleares, macrófagos y células endoteliales. Las funciones de este mediador en casos de lesión del tejido nervioso consisten en estimular el crecimiento y diferenciación de los astrocitos; estimular la producción en estos últimos del óxido nítrico, otras interleukinas y factores de estimulación del crecimiento de distintas estirpes celulares, rescatar neuronas en las primeras fases de la inflamación; favorecer la diferenciación neuronal y activar intracerebralmente a los linfocitos T. También presenta un mecanismo de retroalimentación positivo sobre sí misma. (Yan y cols, 1992). En el foco de lesión actúa principalmente sobre la microglía, mientras que a distancia (daño axonal difuso) lo hace sobre neuronas y astrocitos. Es detectable a las pocas horas tras el traumatismo pudiendo perdurar durante meses a cargo del daño secundario.

La microglía activada produce IL-1, por lo que también sería un buen marcador de inflamación y por tanto de daño axonal (Gentleman y cols, 2004). De hecho, el grado de activación de la microglía que, en último término depende de la severidad del traumatismo o de las circunstancias isquémicas, puede ser determinado mediante la concentración de marcadores como la IL-1, y el TNF- α , los cuales presentan distintas funciones dependiendo del grado de activación, actuando a veces como proinflamatorios y en otras ocasiones como elementos reparadores y estimuladores del trofismo celular. Estos grados de activación dependen de los mediadores celulares liberados por las neuronas dañadas y su concentración (Lai y cols, 2008). Además, se ha demostrado que el tipo de traumatismo determina la cantidad de genes inflamatorios que se expresan. Así, el producido por chorro a presión moviliza 6,5 veces más genes proinflamatorios que el causado por contusión directa (Redel y cols, 2013).

En los casos de gran activación, que es cuando resultan proinflamatorios, estimula la liberación de moléculas de oxígeno y de nitrógeno reactivas, aumenta los niveles de glutamato hasta rangos tóxicos, dificulta la retirada de potasio por parte de las células de la glía y compromete la integridad de la barrera hematoencefálica, atrayendo más inflamación hacia el cerebro (Atkins y cols, 2007).

Dada su implicación en los procesos inflamatorios encefálicos, también puede ser útil para datar casos de traumatismo cráneo-encefálico (TCE), aunque su presencia no exclusiva de esta causa de inflamación neuronal. Se ha demostrado que la producción de IL-1 precede a la producción de IL-6 (Folkersma y cols, 2008) siendo detectable a partir de las 6 horas tras el traumatismo (Harting y cols, 2008; Folkersma y cols, 2008), si bien algunos autores hablan incluso de un periodo de 4 horas (Knobloch y cols, 2000). IL-1 se mantiene positiva hasta las 24 h, momento a partir del cual comienza a disminuir su expresión desapareciendo entre el tercer y quinto día (Knobloch y cols, 2000; Holmin y cols, 2004). En el área de “penumbra” alrededor de la zona contundida, donde las ILs tienen una función paracrina (Holmin y cols, 2004), la expresión sigue una cronología similar pero con menor intensidad, no detectándose en regiones control alejadas del foco de contusión (Harting y cols, 2008). Este patrón muestra una correlación con la clínica inicial: un paciente que ingrese con un Glasgow bajo y que sobreviva poco tiempo, es decir, que presente un traumatismo severo, presentará en el estudio postmórtem una mayor concentración de ILs (Holmin y cols, 2004; Chiaretti y cols, 2005).

Yan y cols (1992) refieren una cronología más rápida, la IL-1 y su receptor, además de la IL-6 son positivos a las 2 horas, presentan un pico máximo a las 4 horas y desaparecen totalmente a las 24 horas. También se observaron diferencias en los patrones de distribución, dependiendo de la forma

de provocar la lesión (chorro a presión, contusión directa, rafia de alguna estructura concreta del SNC, etc).

De forma más concreta, se ha estudiado la expresión de su subunidad beta (la cual tiene mayores implicaciones inflamatorias) y su receptor específico. Ambos se hacen visibles a las 6 horas de supervivencia, permaneciendo positivas hasta los 7 días, sólo que la IL-1 β se expresa en microglía y macrófagos junto al hematoma y en regiones contralaterales al traumatismo y el IL-1ra se expresa en los astrocitos de la zona lesionada y de forma diferida (a los 3 días) en astrocitos de la región contralateral.

También se puede tener en cuenta la actividad de su enzima convertidor (ICE), la cual comienza poco después de observarse la presencia de IL-1 y desaparece a los 7 días de supervivencia (Wasserman y cols, 2007).

Otros autores estudiaron estos mismos marcadores, pero en vez de emplear técnicas de tinción, emplearon el estudio de las concentraciones en microdializados neuronales, obteniendo resultados positivos incluso antes de la primera hora de supervivencia y un pico máximo de dos días, descendiendo su concentración hasta el 5º día (Fassbender y cols, 2000). Con esta técnica se han observado diferencias entre sexos en la expresión de esta IL-1 e IL-6 (con una mayor expresividad en mujeres) y también según las consecuencias del traumatismo apreciándose mayor concentración en casos con hemorragia subaracnoidea. En cualquier caso la IL-1 y la IL-6, al ser citoquinas proinflamatorias se relacionan con un peor pronóstico que la presencia de IL-10, la cual inhibe la actividad de los linfocitos B y T, así como la de las células presentadoras de antígenos, y es frecuente encontrarla en casos de hemorragia subaracnoidea en mayor concentración que la IL-1 (Mellegard y cols, 2011).

4.B.b.- INTERLEUKINA 6

La interleukina 6 es sintetizada y secretada por la microglía y, en menor medida, por los astrocitos. Entre sus funciones se encuentran estimular la producción del NGF (neural growth factor), y proteger de la acción estresante del glutamato y del estrés oxidativo. También promueve la neovascularización y la quimiotaxis por lo que constituye uno de los más importantes reactantes de fase aguda (Kradly y cols, 2008). Entre sus efectos se encuentra el aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica y la quimiotaxis de células inmunológicas en el SNC (Chiaretti y cols, 2005).

Se ha demostrado que la IL-6 aparece poco después de la secreción de IL-1 (retroalimentación positiva) y a su vez estimula la secreción de otros mediadores celulares tales como TNF- α y COX-2 (Kradly y cols, 2008).

Su patrón cronológico es similar al de la IL-1 detectándose a partir de 6h de supervivencia, permaneciendo a lo largo de las primeras 24h y desapareciendo totalmente entre los 3 y los 5 días (Wasserman y cols, 2007; Holmin y cols, 2004). Estudios más recientes sin embargo, demuestran su expresión en la primera hora y su pico máximo a las 2-8 horas en el foco de lesión. En regiones de daño secundario se ha demostrado a las 2 horas manteniéndose durante dos semanas (Kradly y cols, 2008).

El estudio del ARNm de la IL-6 en casos de daño axonal difuso tras un traumatismo directo, demuestra dos áreas de mayor expresión, que son el hipocampo y el giro dentado (posiblemente por mayor sensibilidad de estas regiones a la hipoxia secundaria). También se observa una mayor expresión de este ARNm en las regiones de hemorragia, pero probablemente, en estas zonas sea de origen macrofágico (Rhodes y cols, 2002).

4.B.c.-. TNF- α

El TNF- α al igual que la IL-6 es sintetizado y secretado principalmente por las células de la microglía, pero también por los astrocitos. Se encarga de aumentar la permeabilidad endotelial y la expresión de moléculas de adhesión permitiendo el paso de monocitos, neutrófilos y linfocitos al córtex cerebral. Estimula la producción de otras citoquinas y factores de estimulación de crecimiento celular en los astrocitos, inhibiendo el recambio de los mismos y la regeneración celular. Induce la apoptosis en oligodendrocitos e induce la desmielinización. Sin embargo, en las neuronas favorecen la axonogénesis, aunque su función proapoptótica o regeneradora depende de las condiciones y la presencia de otras citoquinas, todo lo cual vendrá determinado por la severidad del traumatismo. En resumen, se trata de una citoquina pleiotópica que transduce señales de supervivencia o muerte tras cualquier daño agudo en el SNC como infecciones, neurodegeneración, neurotóxicos, etc (Kita y cols, 2000; Oshima y cols, 2009).

El TNF- α se relaciona directamente con la presencia de IL-1 e IL-6 con un patrón de distribución y cronología similares, pero en unas concentraciones sensiblemente menores que las de estas interleukinas (Wasserman y cols, 2007). También se ha estudiado su expresión cronológica en distintos tipos celulares. Así, aunque en condiciones experimentales (mediante traumatismo por chorro a presión), su concentración mediante ELISA no se demuestra hasta la primera hora; mediante inmunohistoquímica, se observa en la microglía (sobre todo en el cuerpo calloso y en el tallo cerebral) a partir de los 30 minutos postimpacto. Al cabo de una hora se observa inmunoreactividad en microglía, astrocitos perivasculares y oligodendrocitos de la zona del impacto, en el cuerpo calloso y en el tallo cerebral. Su pico máximo se alcanza entre las 3 y las 6 h y persiste hasta las 24 h (Kita y cols, 2000).

Al igual que con las ILs, también se ha estudiado la expresión de TNF- α en todas sus fases, mediante la expresión de ARNm de TNF- α 1 y 2, encontrando que el ARNm del TNF- α se observa a las 6 horas tanto en el hemisferio contundido como en el contralateral, aunque sus receptores se expresan a partir de la primera hora postraumatismo y permanecen durante una semana en ambos hemisferios (Oshima y cols, 2009).

Como ocurre con la IL-1 su enzima conversor (TACE) comienza su actividad poco después de la que se pueda demostrar la presencia de TNF- α y desaparece a los 7 días (Wasserman y cols, 2007).

4.B.d.- FACTOR ASOCIADO AL RECEPTOR TNF (TNFRAF)

Es un transductor de señales de los factores de necrosis tumoral y de las interleukinas en caso de neurotrauma con muerte neuronal y posterior activación de la microglía para la formación de cicatriz astrocítica. Posee un extremo C terminal que se asocia a proteínas efectoras o a otros receptores, y un extremo N terminal que sufre ubiquitinización al activarse.

Existen siete tipos de TNFRAF que regulan la muerte celular o su supervivencia ante circunstancias de estrés.

El TNFRAF 6 induce la muerte celular programada mediante la activación de la caspasa 8 y comienza a ser detectable por inmunohistoquímica a los 7 días en la región ipsilateral al trauma (su expresión en la región contralateral es mucho menor). Se expresa en neuronas y en astrocitos. Si paralelamente observamos la proliferación celular (mediante el marcador NeuN), constatamos que el pico máximo de este marcador es a los cinco días, si bien su coexpresión junto con el TNFRAF 6 no es hasta los 7 días, que es el momento en que comenzó a objetivarse la expresión de este marcador. Por otro

lado, también se observó que los astrocitos que expresaban este factor asociado al TNF coexpresaban el PCNA, es decir, se trata de astrocitos neoformados. También se demostró por inmunofluorescencia la colocalización del TNFRA1F 6 con la caspasa 3, demostrándose que estamos ante un factor proapoptótico (Chen y cols, 2011).

4.B.e.- PRO-EMAP-II:

El EMAP-II es considerado un marcador de células gliales e interviene en el proceso de apoptosis, activándose en condiciones de inflamación (ya sean traumáticas o no), activando monocitos y microglía. El comportamiento de su precursor permite diferenciar el origen de la inflamación (isquémico versus traumático): En casos de isquemia disminuye en la zona perilesional entre las 6 y 72 horas tras el insulto; sin embargo en este intervalo de tiempo aumenta en la zona que circunda una lesión traumática.

Antes de 24 horas, se expresa en las neuronas intactas, en las primeras 24 horas en las células de la glía, entre las 24 y 48 horas en neuronas dañadas (células oscuras, triangulares o redondas); y entre las 48 y 72 horas lo expresan las células fagocíticas. Probablemente la diferencia del comportamiento se deba a la presencia o no de hemorragia. En cualquier caso, el descenso del pro-EMAP II tiene un efecto proangiogénico y activador de las kinasas con la consiguiente activación de la metaloproteinasa-9. En cambio, su aumento es antiangiogénico y activa una kinasa que determina la apoptosis de las células endoteliales (Yao y cols, 2009).

4.B.f.- OX 6 y OX 42

Son marcadores de microglía y macrófagos/polimorfonucleares emigrados al sistema nervioso central. OX6 marca el receptor del complejo

mayor de histocompatibilidad tipo II de la microglía activada y el OX42 el receptor C3bi del complemento (Zhengwei, 2000; Maslinska, 2004). Mediante estos marcadores se detectan células inflamatorias desde el 6º día tras lesiones tóxicas manteniéndose la inmunoreactividad hasta 3 semanas más tarde (Kaur, 1990).

En casos experimentales de hipoxia/isquemia los polimorfonucleares se detectan con esta técnica (OX6-OX42) en una hora y perduran hasta 6 días (Kostulas, 2002). En etiologías traumáticas de lesión cerebral se observa actividad fagocítica desde el primer día y perdura durante una semana. (Schwab, 2001). Con respecto a la localización de estas células se hace evidente su mayor presencia en zonas perihemorrágicas (Prunell, 2005).

De forma general, se observa microglía con OX en la sustancia gris lesionada en los primeros momentos, sin que haya diferencias entre el hemisferio contralateral y animales sanos (daño agudo). El daño secundario hace que la microglía activada aumente su densidad en la sustancia blanca tanto ipsilateral como contralateral, pudiendo ser objetivado dicho aumento desde la octava semana postraumatismo hasta varios meses después. De forma paralela, se observa una disminución del número de células del hipocampo homolateral junto con una disminución de la proliferación celular en los nichos de las zonas subventricular y subgranular (Acosta y cols, 2013).

4.B.g.- CD 68

Walter y cols (2009) demuestran la presencia de polimorfonucleares extravasculares a partir de las 2,5 h de supervivencia, siendo al principio sólo visibles en regiones perivasculares, posteriormente invaden la región hemorrágica y perduran durante al menos 1,5 meses. Pero no es hasta las 12 h que observan macrófagos CD68 positivos. Por otro lado, Gentleman y cols

(2004) observan positividad para CD68 en macrófagos y microglía activada a las 48-72 h en sustancia blanca, así como en las de lugares distantes del traumatismo y continúa siendo positivo hasta 4 años después. Oehmichem y cols (2009) aúnan estas dos observaciones. Así en casos de TCE severo con hemorragia subaracnoidea se observa un patrón de expresión de CD68 doble. En la zona hemorrágica, se han demostrado a partir de las 3 horas, con un pico máximo a los 10 días y permanece positiva hasta 1 año. Sin embargo, en la sustancia blanca no se expresa hasta las 12 horas, presentando un pico máximo y una durabilidad similar a la que presentaba en el córtex.

La agregación de la microglía alrededor de los bulbos axonales se ve por primera vez a los 5 días de supervivencia. A los 10-11 días se observan agregados de células de la microglía en un número elevado y continúa a las 2 semanas, no apareciendo más allá de los 5 meses. En ocasiones su presencia se ve enmascarada por macrófagos que pueden ser signo de una degeneración secundaria. (Geddes y cols, 1997).

Smith y cols (2013) concuerdan con el momento de aparición de microglía activada inmunorreactiva para CD68 con distintas morfologías (desde células estrelladas a células fagocíticas redondeadas), pero estos autores refieren que su pico máximo se produce a los tres meses y permanece activa incluso durante años. Desde el punto de vista regional, la activación de la microglía no presentaba relación con el daño neuronal (identificadas mediante la expresión de proteína Tau anormal), pero a pesar de ello, es innegable que participa en la cascada inmunológica que conduce a la neurodegeneración secundaria.

4.B.h.- CD163

Se expresa principalmente en monocitos y macrófagos y funciona como receptor del complejo Hb-Hp para retirar la hemoglobina libre de la circulación.

La expresión del CD163 es inducida por las interleukinas 10 y 6 y los glucocorticoides, mientras que es inhibido por los LPS y el IFN γ . En el cerebro normal se encuentran macrófagos CD 163 positivos en el espacio perivascular, en las meninges y en los plexos coroideos. Su expresión en el resto del parénquima se ha demostrado en otras patologías como el VIH, encefalitis, astrocitomas y esclerosis múltiple. Tras un traumatismo aparecen macrófagos positivos para CD 163 en las zonas perilesionales en las que comienza el daño secundario. Éste es visible a partir de 18 horas de supervivencia, llegando a su pico máximo a los 4 días, aunque su expresión se prolonga durante semanas. Los macrófagos también se observan en la zona perivascular, pero se vuelven hipertróficos y con procesos más largos y gruesos (Zhang y cols, 2012).

4.C.- MARCADORES LEUCOCITARIOS

4.C.a.- LCA (antígeno común leucocitario, CD 45) y UCHL-1, *ubiquitine carboxyl-terminal esterase L-1*)

Es un marcador de leucocitos. Este antígeno es una glicoproteína de alto peso molecular que se encuentra en la superficie de los macrófagos e histiocitos. El UCHL-1 reconoce la isoforma de bajo peso molecular del CD 45 presente en timocitos y células T activadas.

El LCA no es específico de la etiología traumática, pero el número de células marcadas por campo microscópico es muy inferior en otras causas de muerte (cardiovasculares, intoxicación por monóxido de carbono, isquemia/hipoxia cerebral, muerte súbita, etc.). Por ello, la lesión cerebral se considera de origen traumática cuando el número de leucocitos marcados es superior a 5 por campo microscópico. Esta celularidad aparece en traumatismos cráneo-encefálicos con una primera positividad a las 24 h , si bien no es hasta

los 9 y 21 días siguientes que la positividad no es clara, y perdura positivo por encima de las 4 semanas (Hausman y cols, 1999).

En casos control (causas de muerte distintas a la traumática) el número de células positivas para UCHL-1 es muy escasa y sólo aparecen en espacio subaracnoideo y perivascular; sin embargo, en contusiones corticales la primera positividad aparece alrededor de los 4 días, siendo realmente estable entre 10-19 días, hasta un máximo de 3 semanas (Hausman y cols, 1999).

4.C.b.- CD 3

Es un antígeno de superficie de linfocitos T (tanto CD4 como CD8 periféricos activados, así como células NK). En causas de muerte no traumáticas se detectan en pocas ocasiones y en número inferior a 4 células por campo y sólo en regiones perivasculares. Sin embargo, en casos de traumatismo se observan a los 2 días con un pico máximo entre el día 9 al 19 desapareciendo a las 22 semanas (Hausman y cols, 1999).

4.C.c.-CD 15

Es el único marcador linfocítico que es completamente negativo en casos de muerte no traumática por lo que podría ser el más fiable para el trabajo forense. Es específico de los polimorfonucleares neutrófilos.

Se observa una primera positividad a los 10 minutos, pero realmente se considera positivo entre las 14 h y los 1,6 días y sigue siendo visible a las cuatro semanas. Además no se detecta en zonas perivasculares o en el espacio subaracnoideo, sino en las zonas de contusión por lo que puede resultar útil para el diagnóstico y datación de traumatismos craneo-encefálicos dependiendo de la zona en la que se detecta, ya que fenómenos agónicos (inespecíficos para

cualquier causa de exitus) pueden producir reacciones inflamatorias en el espacio subaracnoideo y perivascular, pero sólo los traumatismos hacen que aparezcan infiltrados en el parénquima. (Hausman y cols, 1999).

5.- MARCADORES DE LESIÓN NEURONAL

Mediante técnicas inmunohistoquímicas se hace evidente que las primeras células afectadas son las neuronas tanto por el traumatismo, como por el daño axonal difuso, ya que los primeros cambios morfológicos como la ondulación de axones (observable a los 30 min) y los axones elongados (visibles a los 60-120 min) se hacen evidentes mucho antes que la astrogliosis (Tashykov, 2007).

5.A.- NCAM

La molécula de adhesión celular neuronal (NCAM) es una proteína de membrana que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Entre ellas la NCAM 180 se expresa sólo en neuronas, la NCAM 140 tanto en neuronas como en glía y la NCAM 120 sólo en glía.

La restitución del tejido nervioso tras una lesión necesita la generación, supervivencia y migración de nuevas neuronas provenientes de los nichos postnatales. La NCAM es necesaria en todo este proceso para garantizar la correcta diferenciación y migración celular. De hecho, en los estudios experimentales no se observan cambios en su expresión en zonas distantes a la contusión, es decir, no se relaciona con el daño axonal secundario, sino que tan sólo tiene que ver con el intento de regeneración del tejido nervioso y aún en estas circunstancias muestra un comportamiento diferente según la intensidad

del traumatismo. Así, cuando el traumatismo es de mayor intensidad, su expresión disminuye demostrando una menor posibilidad de recuperación funcional. En casos de traumatismo medio aumenta su expresión con un pico máximo a las 24h, desciende entre 24 y 48h y posteriormente asciende de forma gradual manteniéndose al menos 3 semanas después del traumatismo (Budinich, 2012).

5.B.- ENOLASA NEURONAL ESPECÍFICA

La enolasa neuronal específica (NSE) es una forma característica de la enzima glicolítica enolasa presente en las neuronas, siendo una de las proteínas más abundantes del tejido nervioso. Se localiza en cuerpos neuronales y sus prolongaciones pero no en células de la glía (Ogata y cols, 2007).

El acúmulo de proteínas en axones dañados se produce por una alteración de su citoesqueleto y del transporte neuronal, por aumento de la entrada de calcio dentro de la neurona. El β -APP tiene un transporte rápido por lo que en caso de lesión, se acumula también a gran velocidad. La enolasa tiene un transporte más lento pero su abundancia hace que se acumule en niveles similares al β -APP.

En comparación con tinciones más o menos convencionales como el azul rápido de luxol para la mielina que permite detectar axones dañados a los dos días tras un traumatismo, la inmunohistoquímica para enolasa neuronal específica permite observar axones dañados con una supervivencia mínima de 1,5 a 3,5 horas (aunque otros autores la detectan incluso en tiempos inferiores a 1 hora (Tashykov y cols, 2007). El patrón de distribución y el tiempo mínimo de positividad es idéntico al del β -APP, tal y como muestra la siguiente tabla (Ogata y cols, 1999):

Caso	Supervivencia	Tinción argéntica		LFB	Enolasa	β -APP
		Axones retraídos	Axones varicosos	Mielina globoide	Bulbos axonales	Bulbos axonales
1	80 días	+	+	+	++	++
2	80 días	-	-	+	-	-
3	7 días	+	+	+	++	++
4	3 días	+	+	-	++	++
5	2 días	+	+	++	++	++
6	17 horas	-	+	++	++	+
7	9 horas	-	+	++	++	++
8	9 horas	-	+	++	++	++
9	9 horas	-	+	+	+	+
10	8,5 horas	-	+	++	++	++
11	5 horas	-	+	++	++	++
12	3,5 horas	-	-	++	++	++
13	1,5 horas	-	-	++	++	++
14	1,5 horas	-	-	++	++	++
15	Muy corto	-	-	+	+	-
16	Muy corto	-	-	-	-	No test
17	Muy corto	-	-	+	+	-
18	Muy corto	-	-	+	+	+
19	Muy corto	-	-	-	-	No test

Comparación de los hallazgos histológicos de los axones y la mielina del cuerpo calloso con distintas técnicas (Ogata y cols, 1999)

6.- MARCADORES BIOLÓGICOS DE DAÑO AXONAL DIFUSO

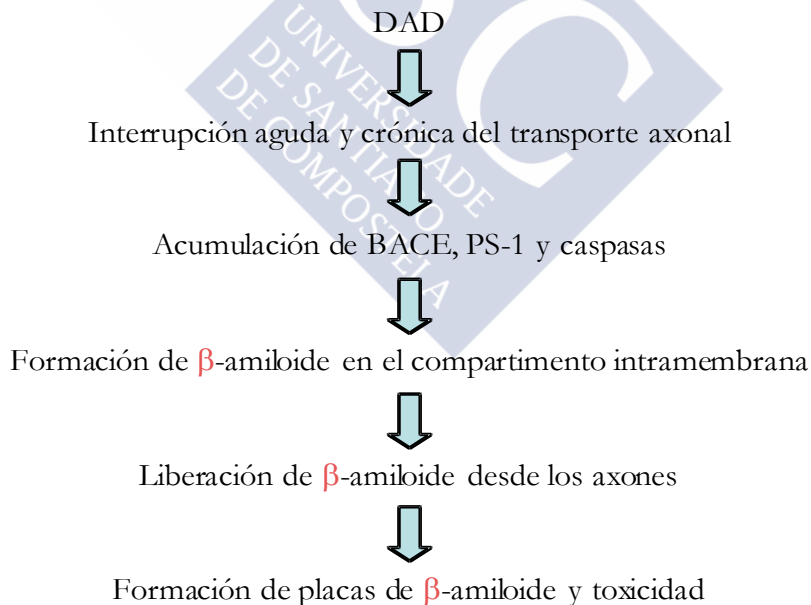
6.A.- PROTEÍNA PRECURSORA DEL BETA-AMILOIDE (β -APP)

El β -APP es una glicoproteína de membrana y un constituyente normal de la neurona. Sus funciones no están del todo descritas pero parece intervenir en la adhesión y crecimiento celular en respuesta a los traumatismos. Se transporta por transporte axonal rápido anterógrado y se acumula tras la alteración del citoesqueleto axonal (Mckenzie y cols, 1996; Itoh y cols, 2009). Así, se ha demostrado en el soma neuronal de la zona contundida una vez que se ha producido la lesión axonal. En estudios forenses, la presencia de bulbos axonales no se observa en supervivencias menores de 6 h, momento en el que también se produce el acúmulo de β -APP y NF en el soma (Bisht, 2013). Lejos de la zona traumatizada, a partir del 3-7 días post-trauma se observan axones varicosos y edematosos (mediante anticuerpos anti APP y NF) disminuyendo su número a partir de los 6 meses. Sin embargo, β -APP se ha demostrado a las 3 horas tras la lesión (antes de que aparezcan alteraciones morfológicas del axón), y a los 6 meses permanece positivo en el parénquima y junto a los vasos (Uryu y cols, 2007). Las primeras regiones donde se detecta son el tracto parasagital y las estructuras de la línea media encefálica, incluyendo la parte caudal del cuerpo calloso, pero no en las cápsulas interna y externa (Li y cols, 2013). Otros autores, lo detectan a las primeras 24 h postraumatismo en neuronas edematosas y con distrofia de sus fibras (Itoh y cols, 2009).

En casos de traumatismos leves se observa un comportamiento temporal del β -APP característico: es positivo entre 1,5 horas y 3 horas tras la producción de la lesión, pero después el número de axones que expresan esta proteína aumenta hasta alcanzar su pico máximo a las 10-15 horas, estabilizándose tras este momento (McKenzie y cols, 1996).

Además se demostró inmunoreactividad para todos los mediadores y marcadores de la lisis de β -APP (BACE, PS-1, CCA, Caspasa 3) y kinesina en las contusiones persistiendo hasta 6 meses. De hecho, su expresión en los axones dañados es anterior a la del β -APP. Estos precursores se demostraron en un número limitado de neuronas de córtex, hipocampo, cerebelo y en células de la glía en la sustancia blanca a los 3 y 7 días y 6 meses (Uryu y cols, 2007).

Los axones dañados son una fuente de β -amiloide tras un trauma encefálico. Se cree que la acumulación conjunta de BACE, PS-1, caspasa 3 activada y CCA con β -APP en los axones dañados, es debida a un único mecanismo de producción de beta amiloide, secundario a la alteración de la permeabilidad de la membrana que daría lugar a su acumulación patológica (Chen y cols, 2004).



Mecanismo de formación de placas de β -amiloide (Chen y cols, 2004)

Este proceso se observa de forma clara a las 24 horas, presenta una meseta de actividad a los 10-14 días, a partir de los cuales comienza a disminuir. Mediante inmunohistoquímica los primeros cambios en el tránsito del β -APP (en axones edematosos) se demostraron a los 30 minutos y duran hasta semanas. Se puede considerar positivo a la primera hora, y no solo en la zona contundida, sino también en zonas lejanas al punto de impacto. El pico máximo se produce a las 48 horas y continúa hasta dos semanas en la sustancia blanca bilateral, hipocampo y córtex. En el tallo cerebral permanece durante una semana (Pierce y cols, 1996; Ekmark-Lewén y cols, 2013).

Este marcador no sólo se observa en neuronas. Se ha observado su presencia en astrocitos (marcados mediante MAP-2) y también, aunque en menor cantidad, en microglía (marcada con CD11b) cuando su presencia en neuronas comienza a disminuir. Sin embargo, dicha expresión se interpretó que es secundaria a la fagocitosis de axones y no debida a que las células inmunes lo expresen por sí mismas (Itoh y cols, 2009).

Es importante señalar que el DAI no es específico del traumatismo craneoencefálico, sino del daño axonal de distintas causas como hipoxia, alteraciones metabólicas y todas aquellas circunstancias en las que existan edema y/o aumento de la presión intracraneal. Por ello, algunos autores (Graham y cols, 2004; Ortobágyi y cols, 2007) han intentado encontrar características que permitan diferenciar las distintas causas. El patrón de distribución de β -APP puede resultar útil para evitar falsos positivos, etiquetando de traumática una muerte. Así podemos encontrar tres grandes patrones de distribución:

- *Patrón difuso multifocal*: representan edemas axonales en la región traumatizada, y a distancia por lesiones de contragolpe y por el edema cerebral en traumatismos craneales severos.

- *Patrón en zig-zag o Z*: se produce en regiones perivasculares limítrofes a una región de isquemia o infarto.

- *Patrón mixto*: Son grupos de axones con trauma difuso y otras zonas en Z por la hipoxia secundaria al aumento de la presión intracraneal (típica de alteraciones metabólicas y crisis convulsivas).

Estos patrones se encuentran sobre todo en las estructuras de la línea media encefálica, especialmente en el cuerpo caloso y en el puente, aunque pueden observarse también en el córtex.

En los casos de hipoxia/isquemia y en aquellos en los que se produce una muerte cerebral aislada los resultados son similares. Es decir, el daño axonal difuso es un mecanismo vital que necesita mecanismos bioquímicos que consumen energía. No son específicos de un solo agente causal, si no que constituye una respuesta del tejido cerebral a cualquier agente de estrés de cierta entidad. Esto no nos sorprende teniendo en cuenta el mecanismo molecular que provoca el acúmulo de β -APP. La alteración del citoesqueleto por proteólisis junto con la alteración de las kinasas y las fosfatasas, aumenta la permeabilidad de la membrana; ésta altera el flujo de calcio y la actividad de la calmodulina y altera el transporte axonal debido a la desestructuración y colapso del citoesqueleto por la compactación de los neurofilamentos, la pérdida de los microtúbulos y la fragmentación de la espectrina. Como consecuencia los materiales transportados se acumulan en lugares de máximo daño axonal y los axones sufren una axonotomía secundaria. (Oehmichen y cols, 1998; Kelley y cols, 2006). En este sentido, los estudios de Staal y cols, demuestran el paralelismo entre el acúmulo de calcio en la célula y la aparición del β -APP, ya que demostraron que su concentración en los axones aumentaba de forma significativa a las 2 h siguientes tras el traumatismo, presentaba un pico máximo a las 24 h y vuelve a niveles normales a las 48 h posttrauma (Staal y cols, 2010).

La hipoxia *per se* no es causa de daño axonal, sino que lo produce de forma secundaria a complicaciones vasculares causadas por el aumento de la presión intracraneal y la herniación del cerebro. Dado que el transporte de β -APP es activo (proceso dependiente de energía), es razonable asumir que se acumula en casos de compromiso metabólico grave tales como hipoglucemia, hipoxia global, infección y/o edema cerebral (Ortobágyi y cols, 2007).

De este modo, el estudio de la β -APP permite diagnosticar la existencia de aumento de la presión intracraneal (incluso cuando sus niveles no han sido tan elevados como para causar herniaciones). El último matiz del diagnóstico, sería el origen de la hipoxia (cardíaco, intoxicación por CO o epilepsia), o de la alteración metabólica (hipo o hiperglucemia), el cual puede ser determinado por los antecedentes clínicos del sujeto (Reichard y cols, 2005).

De forma generalizada se acepta que en los casos de daño traumático (a partir de un año de edad), el daño axonal difuso no se puede detectar antes de las 1,5 post-traumatismo (Oehmichen y cols, 1998).

Existe correlación entre la positividad para β -APP y el tiempo transcurrido entre el traumatismo y la muerte. No se detecta reactividad significativa de esta proteína por debajo de los 30 minutos ya se produzca la muerte por un traumatismo o por otras causas. En cualquier caso se debe ser cauto para no sobreinterpretar las positividads al β -APP sin otras características sugerentes del traumatismo, como por ejemplo hemorragias en el tallo cerebral y/o en el cuerpo caloso. Además el intervalo de tiempo en el que podemos detectar la inmunohistoquímica disminuye conforme mayor es la severidad del traumatismo (Ortobágyi y cols, 2007).

Según estos autores, y siempre en casos en los que se haya demostrado el traumatismo, podemos establecer su severidad según la expresividad de esta proteína: son los grados de DAI (daño axonal difuso) de Adams:

I: No existe evidencia visible morfológica de daño axonal pero se observa un patrón difuso de tinción de β -APP.

II: Se observan hemorragias intraparenquimatosas en el cuerpo caloso y un patrón difuso de β -APP

III: Hemorragias en cuerpo caloso, en cara dorsal del tallo cerebral y tinción difusa de β -APP (Omalu, 2004).

Esta clasificación, aunque simple, es útil en casos en los que estemos seguros del antecedente traumático, pero se puede afinar más la severidad del daño axonal, comparando patrones de tinción en casos con un tiempo de supervivencia similar. Así en estudios de casos de corta supervivencia (no superior a 2 horas) se describen distintos grados de tinción en relación a la severidad del traumatismo (Onyszchuk y cols, 2009):

- 0.- No tinción
- 1.- Tinción de somas neuronales
- 2.- Leve tinción axonal
- 3.- Tinción de axones arrosariados
- 4.- Tinción de axones edematosos
- 5.- Tinción de esferoides
- 6.- Tinción muy abundante de esferoides

En los tres primeros grados, la expresión puede ser muy débil y su origen puede ser isquémico. El tiempo de supervivencia determina la evolución del daño axonal, y por tanto, el grado de tinción, siendo casi imposible detectar más de un grado 2 en casos con una supervivencia inferior a 35 minutos. La tinción positiva a β -APP debe ser interpretada con cautela: en estudios realizados sobre casos con escasa supervivencia, sólo se apreció presencia de esta proteína en 1% de los casos y en todos ellos había historia de isquemia y/o

edema cerebral. En resumen, la positividad a β -APP no es dato inequívoco de traumatismo, pero sí de daño axonal, por lo que en ningún caso debe ignorarse, sino más bien interpretarse dentro de un contexto clínico y forense concreto (Morrison y cols, 2008).

Es importante la realización de un muestreo amplio, observando simultáneamente otros cambios morfológicos que sugieran un origen isquémico, tales como la mayor afectación de la zona C1 del hipocampo (que es la región del encéfalo más vulnerable a la hipoxia), la destrucción de neuronas y su eosinofilia (por necrosis) entre las 2 y 5 horas tras el incidente y constatar la existencia de la proteína asociada a microtúbulos-2, (la cual desaparece en casos de TCE severo). También son observables pequeñas hemorragias en especial en zonas paracentrales y zonas anteriores del lóbulo frontal y temporal (Ogata, 2007). Por todo ello, no se puede hacer el diagnóstico de daño axonal difuso con un solo bloque tisular con reactividad para β -APP; son necesarios, al menos, 6 bloques para llegar al diagnóstico (y deben abarcar los dos hemisferios), es decir, para diagnosticar un traumatismo mediante la observación de daño axonal difuso por positividad a β -APP, es necesario contar con la historia clínica previa y un muestreo adecuado y suficiente de bloques tisulares. (Smith y cols, 2003).

Estos grados pueden relacionarse cronológicamente con la morfología de los axones, a medida que van desestructurándose. Kelley y cols (2006) estudiaron cómo se altera el transporte axonal, observando el comportamiento del β -APP en el núcleo talámico (que es la estructura más sensible a la hipoxia y por tanto, al daño axonal secundario) tras producir una lesión por axotomía:

- A los 15 minutos observan inmunoreactividad para esta proteína en el núcleo talámico, en axones que presentan un ligero aumento de su

diámetro, si bien la distribución es homogénea tanto proximal como distal del marcaje, demostrando la continuidad del axón.

- A los 30 minutos la localización es similar pero los axones presentan un mayor diámetro, mayor intensidad de la tinción y comienzan a observarse la ruptura de algunos axones en los que la tinción se observa sólo en la región proximal

- Entre los 60 y los 180 minutos el diámetro de los axones es aún mayor (comenzando la aparición de bulbos) y la desaparición de la tinción distal se generaliza debido a la desconexión de los axones, comenzando la degeneración waleriana. (Kelley y cols, 2006).

La distribución más frecuente de la inmunoreactividad del β -APP es en el tallo cerebral (95% de los casos), la cápsula interna y el tálamo (80% de los casos) el cuerpo calloso y la sustancia blanca parasagital (70% de los casos). La distribución y cantidad de β -APP es mayor que la presencia de hemorragias, por lo que se ha sugerido que no depende de la existencia de la misma para su acumulación, si bien su presencia corrobora la etiología traumática (McKenzie y cols, 1996).

De forma macroscópica, el daño axonal difuso se produce como consecuencia de fuerzas rotacionales a las que se ven sometidos los axones en un traumatismo. En el puente, la positividad para β -APP no es evidenciable antes de 3h de supervivencia (lo cual demostraría la vitalidad de la lesión), independientemente de si ha existido o no hematoma subdural y/o hemorragia cortical, incluso se produce en casos de trauma no mecánico. En casos de hipoxia/isquemia la positividad es más tardía (8-24h) y su expresión es mucho menor que en causas traumáticas.

El daño axonal puede demostrarse en el puente empleando como marcador el β -APP sin diferencias significativas según la etiología. Muchas

veces, simplemente es una consecuencia tardía de cambios complejos del citoesqueleto debido a un episodio traumático, lo que conduce a un colapso del transporte axoplasmático anterógrado. Esto evoluciona a edema axonal, varicosidades y bulbos y por último a la desconexión tal y como ya se ha expuesto. No obstante, la distribución topográfica del daño axonal a lo largo de las estructuras de la línea media del cerebro probablemente nos oriente en lo que al diagnóstico del tipo de mecanismo lesional se refiere (Oehmichen y cols, 1999).

Además hay que tener en cuenta que la expresión a distancia de esta proteína no sólo corre a cargo de las neuronas, sino que las células de la glía también la expresan, por lo que existen dos tipos de inmunoreactividad: la adyacente a la lesión, perteneciente a axones cuyo flujo se ha visto interrumpido, y la de las células gliales. La primera comienza a observarse media hora tras la producción de la lesión mostrando un pico máximo a las 15 horas. Las células inflamatorias muestran esta reacción a partir de las 6 horas y son principalmente astrocitos. La evolución del aumento de la expresión del β -APP sería tal y como se expresa en la siguiente tabla (Otsuka y cols, 1991):

Horas tras la lesión	Edema axonal	Células gliales
0	-	-
0,5	+	+
1	+	-
3	++	-
6	+++	+
15	+++	+
26	+++	++
40	++	++
50	++	++
65	+	++
72	+	+++

El diámetro de los axones edematosos depende de diversos factores:

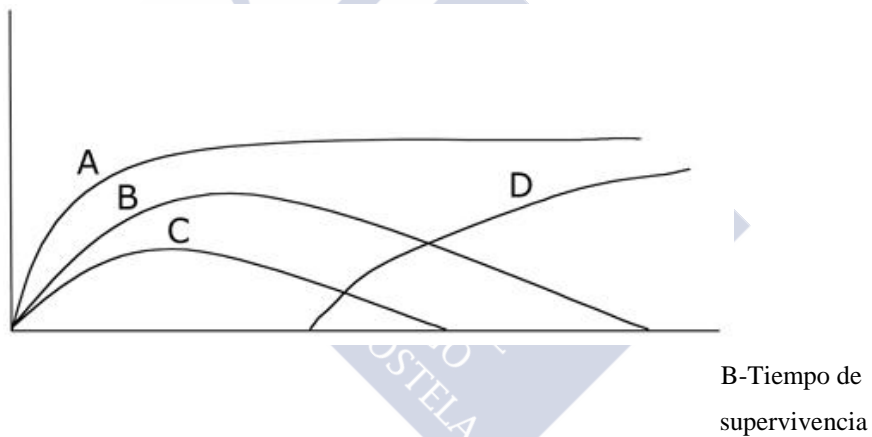
- El tiempo transcurrido desde el impacto
- El tamaño original del axón
- El tiempo de acción de los efectos secundarios
- El tiempo que puede tomar cualquier mecanismo potencial de regeneración

No obstante, no se ha demostrado una correlación entre los niveles de β -APP y la expresión clínica del traumatismo, al menos en los primeros

momentos, especialmente si se toma como referencia la escala de Glasgow al ingreso (Willemsee-van Son, 2007).

Por último, el daño axonal puede comenzar incluso 84 horas después del traumatismo, lo que refleja un daño continuo secundario. Además la inmunoreactividad positiva continúa meses tras el agente causal (pudiendo llegar a provocar enfermedades neurodegenerativas), lo que indicaría un mantenimiento persistente del flujo axonal rápido. También es observable un periodo de regeneración significativa, de lo que se deduce que, hasta cierto punto y en casos leves, el daño axonal leve puede ser reversible.

Diámetro axonal



Modelo esquemático del daño axonal tras un traumatismo (Wilkinson y cols, 1996):

A: el edema axonal alcanza una meseta cuando los axones adquieren un diámetro máximo

B y C: el edema es reversible después de alcanzar un pico máximo. Los efectos de los factores secundarios como la hipoxia y el edema causan una ola de daño diferida.

D: el tiempo de supervivencia depende del diámetro medio de los axones, de la severidad y la forma del traumatismo

La expresión del β -APP presenta ciertas variaciones dependiendo del diámetro de los axones. Zakaria y cols (2012) estudiaron su comportamiento en el quiasma óptico y en el cuerpo caloso, observando que el pico máximo de expresión se producía a las 8 h en el quiasma y a las 28 h en el cuerpo caloso, cuyos axones son de menor calibre y más ricos en microtúbulos, mientras que los primeros tienen mayor diámetro y poseen mayor densidad de neurofilamentos.

La inmunoreactividad se mantiene una semana más tarde y no mostraba variaciones una vez alcanzado el pico máximo (Zakaria y cols, 2012).

6.B.- PROTEINA FE 65

La proteína FE 65 es una proteína adaptadora de un complejo asociado al dominio intracelular de β -APP, expresada en los tejidos cerebrales y ganglionares, por lo que está directamente relacionada con la acumulación de β -APP en casos de daño axonal difuso.

La inducción significativa de ARNm de FE 65 se observa como mínimo a la media hora, alcanzando un pico máximo en la primera hora, tras lo cual va disminuyendo, hasta alcanzar el nivel de los controles a las 12 horas después del traumatismo. Vuelve a elevarse a las 24 horas y retorna a los niveles básicos a las 48 horas (Morio y cols, 2003).

6.C. DESTRUCCIÓN DEL CITOESQUELETO NEURONAL

6.C.a.- NEUROFILAMENTOS

Los neurofilamentos constituyen los filamentos intermedios del citoesqueleto de la neurona. Se componen de tres tipos de cadenas proteicas:

- NF -L (ligera) de 68-70 kDa
- NF-M (media) cadenas intermedias en alrededor de 145-160 kDa
- NF-H (pesada) de 200-220 kDa

Los NF H y M tienen dominios C terminales muy largos, que se unen a los filamentos vecinos, generando estructuras lineales con un espacio uniforme entre filamentos. Durante el crecimiento axonal se incorporan nuevas subunidades, de neurofilamentos a lo largo del axón en un proceso dinámico que implica la unión de nuevas subunidades tanto a lo largo del filamento, como en sus extremos. Después que el axón haya crecido y haya conectado con la célula diana, el diámetro del axón puede aumentar hasta 5 veces. Parece que el nivel de expresión del neurofilamentos está directamente controlado por el diámetro axonal, que a su vez se relaciona con la velocidad de conducción del axón.

Cuando una neurona se lesiona y muere, los neurofilamentos se degradan en distintas subunidades. La subunidad de 68 KDa es fácil de detectar en los axones dañados (ondulados o arrosariados) del hemisferio homolateral a la contusión, a partir de las primeras 24 horas (Dunn-Meynell y cols, 1997).

En el tallo cerebral, la agregación de NF en los axones se observa 1-2 h tras el traumatismo, éste muestra deformidad a las 6 h y presenta agregación

granular y edema obvio a las 72 h. Todo este proceso termina con la lesión axonal (Ronchao y cols, 2012). Cuando el axón ya se ha roto y se forma el bulbo axonal, éste consiste en una esfera cuya parte externa está compuesta por precursor del beta amiloide y un núcleo central de NF, por lo que en casos de una supervivencia suficiente, este último marcador puede ser más útil para determinar la extensión del daño axonal difuso (Li y cols, 2013).

La compactación de neurofilamentos se hace patente mediante el anticuerpo anti-neurofilamentos **RM014** el cual se hace patente con distinta cronología en las distintas regiones del encéfalo:

	Cuerpo calloso	Cíngulo	Sustancia blanca	Córtex
6 h	RM014 – (APP+)	RM014+ con edema y elongación de axones (APP +)	RM014- (APP+)	RM014+ (APP-)
24 h	RM014+ (APP+)	RM014+ (APP+)	RM014+ (APP-)	RM014+ Con edema y elongación de axones (APP-)
72 h	RM014+ con patrón puntiforme y extenso de degeneración axonal. (APP-)	RM014 en descenso (APP-)	RM014 en descenso (APP-)	RM014- (APP-)

Cronología de la expresión del Ac RM-014 (DiLeonardi y cols, 2009).

Este proceso tiene lugar en axones distintos a los que presentan positividad para el APP, ya que éste marcador presenta una cronología y ubicación distintas (DiLeonardi y cols, 2009).

En cualquier caso, no es posible detectar ovillos de neurofilamentos antes de las 6 horas de supervivencia dado que mecanismo de transporte es lento.

6.C.b.- MICROTÚBULOS

La **proteína asociada a los microtúbulos (MAP-2)** tiene como función el ensamblaje de los microtúbulos durante la neurogénesis y en la neurona adulta estabiliza los microtúbulos uniéndolos entre sí.

Esta proteína es detectable en las neuronas a las 48 horas de un traumatismo en el hipocampo homolateral, sobre todo en regiones sensibles a hipoxia (Kubo y cols, 1998).

En casos de TCE muy severo, estas proteínas no se detectan, quizás porque en estos casos también sufran degradación (Ogata, 2007). En las regiones de contusión directa se observa una disminución de la MAP-2 al mismo tiempo que la destrucción del núcleo de la célula (Rhodes y cols, 2002), es decir, puede ser un marcador de destrucción neuronal en la región directa de contusión y de regeneración en casos de daño difuso.

Las **Tau** son proteínas microtubulares que abundan en las neuronas, siendo mucho menos frecuentes fuera del sistema nervioso central. Su principal función es la estabilización de los microtúbulos axonales a través de la interacción con la tubulina.

Sin embargo, cuando la cinesina se adhiere a las tiras de la proteína Tau, el motor tiende a desprenderse completamente del microtúbulo. De esta forma, la proteína Tau ayuda a regular el equilibrio del tráfico de células nerviosas, lo que puede explicar que las alteraciones de tau se asocien con las patologías neurodegenerativas.

La **proteína α -Syn** se encuentra principalmente en el tejido nervioso constituyendo el 1% de todas las proteínas citosólicas. Se expresa predominantemente en el córtex, el hipocampo, la sustancia negra, el tálamo y el cerebelo, sobre todo en neuronas, aunque también es posible encontrarla en células gliales. Es secretada en terminales presinápticos en determinados momentos de reagrupación de sinapsis. Interactúa con la tubulina y tiene una acción similar a la proteína Tau (Alim y cols, 2002)

Ambas proteínas (Tau y Syn) no están presentes en casos control, mientras que se expresan en axones, y algunos cuerpos neuronales, en casos de traumatismos craneoencefálicos con una supervivencia superior o igual a 5 semanas. Es posible detectar la proteína Tau también en astrocitos aunque en menor medida que en neuronas (Uryu y cols, 2007).

La **SBDP 145** se observa sobre todo en axones dañados, pero también en algunos somas neuronales. Es posible objetivarla a partir de las 3 horas posteriores a un traumatismo en el córtex y la sustancia blanca, llegando incluso ligeramente a tálamo e hipocampo. El pico máximo de expresión se produce entre las 24 y 48 horas y a las 72 horas desaparece del córtex aunque permanece en tálamo e hipocampo (McGinn y cols, 2009).

7.- MARCADORES DE PROLIFERACIÓN CELULAR

7.A.- NESTINA

Este es un marcador de precursores neuronales. Se ha demostrado la presencia de células positivas para nestina desde las 8h postraumatismo hasta las 48h, con un pico máximo a las 24 h, en las zonas donde se encuentran los precursores neuronales (principalmente en la región subventricular) y en el

córtex dañado (como consecuencia de la migración de dichos precursores activados) (Kaneko, 2012).

7.B.- BROMODESOXIURIDINA (BrdU)

En caso de lesión del tejido encefálico, y en líneas generales, la inflamación comienza con la presencia de macrófagos provenientes del torrente sanguíneo que tratan de retirar los productos necróticos, posteriormente la microglía se activa en la zona adyacente a la lesión y por último los astrocitos reactivos forman una barrera perilesional hasta que rellenan el espacio desvitalizado para dar lugar a la correspondiente cicatriz.

La bromodesoxiuridina es un análogo de la timidina que se incorpora al ADN de las células en proliferación (en este caso precursores de los oligodendrocitos, astrocitos, neuronas y microglía/macrófagos). Por supuesto, para diferenciar en concreto la estirpe celular es necesario marcarla con algún antígeno específico, es decir, es preciso realizar una doble tinción.

En las primeras 24 horas el número de células positivas para BrdU es muy escasa. Al segundo y tercer día aumenta mucho alrededor de la región afectada llegando a su máximo al séptimo día. Se demostró que la estirpe celular que proliferaba eran oligodendrocitos (mediante proteoglicano del condroitin sulfato NG2), observándose que éstos mostraban un patrón similar a las células positivas para BrdU, por lo se interpretó que los precursores de los oligodendrocitos en proliferación son los que se encargaban del proceso de reparación tisular en este periodo. Sin embargo, el número de astrocitos (positivos para PGFA) marcados con BrdU es significativo a partir del día 14 y con una expresión mucho más difusa. Dado que las células precursoras de oligodendrocitos pueden diferenciarse tanto en oligodendrocitos como en

astrocitos, se demuestra así que estos precursores son los primeros en activarse ante un insulto tisular (Tatsumi y cols, 2005).

Algunos autores (Rola, 2006) no encontraron neuronas positivas para BrdU en las zonas lesionadas. La inyección de BrdU a ratas en desarrollo demostró que al cabo de 1-3 semanas las neuronas son la estirpe celular más afectada tras un traumatismo, mientras que la microglía activada se encuentra aumentada tanto en el hemisferio contundido como en el contralateral (Rola, 2006). No obstante, existen estudios realizados sobre enfermedades neurodegenerativas que demuestran, mediante el marcaje con PGFA y β III-tubulina, la proliferación de neuronas y de células gliales en el estrato subpendimario (Curtis, 2003). Tal vez, ante los traumatismos cráneo encefálicos de larga evolución, y dado que éstos pueden inducir también la aparición de ciertas enfermedades neurodegenerativas, tales como el Alzheimer, se producen reacciones similares.

La capacidad de regeneración neuronal es posible que dependa del tipo o severidad del traumatismo. En principio, no existen diferencias en la neurogénesis entre los controles y los individuos afectados por un traumatismo durante las primeras 8 semanas, pero si existen diferencias en cuanto a maduración y supervivencia neuronal entre los afectados por un traumatismo focal y los que presentaron daño difuso. Estas nuevas neuronas provienen de los neuroblastos presentes en las regiones subventriculares y giro dentado, si bien, la mayoría de estos precursores se diferencian en astrocitos. En cualquier caso, la supervivencia de estas nuevas células suele ser escasa (Bye y cols, 2011).

Kernie y cols (2001) han demostrado el distinto comportamiento de la proliferación celular en el lugar del impacto y en el hemisferio no contundido. A los 60 días tras el impacto, en la región afectada, la mayoría de los precursores celulares se diferencian en astrocitos, dando lugar a la cicatriz glial; pero en áreas distantes se produce neurogénesis (cinco veces mayor que en los casos control).

Todo esto demuestra la puesta en marcha de la neoproliferación celular tras un traumatismo, en un intento de recuperación funcional cerebral, y además este proceso continúa mucho tiempo después del traumatismo .

Existen otros marcadores de proliferación celular con los que se han obtenido datos más o menos similares en lo que a estirpe celular se refiere, pero que, en cualquier caso, demuestran la proliferación celular a partir de los precursores celulares de la región subventricular y de la zona subyacente al núcleo dentado; como por ejemplo el Ki-67 (Zheng y cols, 2013)

7.C- DNA METILTRANSFERASA-1

Se trata de una enzima presente en condiciones normales en los astrocitos periventriculares, pero a los 4 días tras un traumatismo es posible observarla también en el citoplasma y el núcleo de las células perilesionales, aunque no aparece en el hemisferio contralateral. A partir del 7º día comienza a disminuir y a las dos semanas vuelve a niveles normales. Las células que la expresan son también positivas para nestina (marcador de precursores neuronales y astrocitarios) y para PGFA, de lo que se deduce que se trata de astrocitos activados que han emigrado a la región lesionada (Lundberg y cols, 2009).

8.- ESTUDIO DE LA APOPTOSIS

8.A.- TÉCNICAS MOLECULARES

8.A.a.- TÉCNICA TUNEL (ADN FRAGMENTADO)

Mediante la técnica de TUNEL, las primeras células apoptóticas se detectan a los 45 minutos tras la lesión en la zona de contusión y continúan a las 2 semanas. El pico máximo se produce a las 24 horas y persisten hasta 22 semanas. De todas formas los modelos experimentales muestran variaciones según el traumatismo empleado:

- Impacto cortical:

Se detectan células apoptóticas a las 6 horas, 24 horas y 2 semanas

- Impacto por objeto contundente:

Se detectan células apoptóticas desde las 3 horas a 10 días

- Percusión por fluido a presión:

Pico máximo en el córtex dañado a las 24-48 horas postrauma con un decremento desde los 2 a los 14 días posteriores.

Estas diferencias pueden deberse al comportamiento bifásico de la lesión: una primera lesión directa y un daño secundario por mecanismos como la isquemia o el edema cerebral (Raghupathi y cols, 2002; Hausman y cols, 2004).

La intensidad del traumatismo (tal y como se verá al hablar de genes pro y antiapoptóticos) determina variabilidad en la cronología y distribución de las células positivas para esta técnica, Así, en casos de traumatismo de intensidad media, las células positivas con la técnica TUNEL son evidentes en la zona

lesionada en todo momento, aunque no aparecen ni en el córtex ni en el hipocampo contralaterales. El número de células positivas tiene un pico máximo a las 24 horas y desciende con el tiempo. La mayoría de estas células presentan una morfología necrótica, mientras que en zonas perilesionales, las células TUNEL positivas presentan morfología apoptótica, encontrando entre un 10 - 16% de estas células en cualquier tiempo post lesión. La mayoría de las células apoptóticas eran neuronas, algunos mononucleares y escasísimos astrocitos en las primeras 48 horas. A los 4-10 días se aprecian neuronas positivas con la técnica TUNEL en la región perilesional y en el hipocampo (Wennersten y cols, 2003).

Es importante tener en cuenta el factor del envejecimiento, es decir, a partir de cierta edad (80 años) se admite como fisiológico la presencia de un 2% de células apoptóticas, si bien dados los niveles de fragmentación observados en casos de traumatismo, y a efectos prácticos, podemos considerar que no existe relación entre la edad y la fragmentación del ADN (Dressler, 2007).

8.A.b.- HIBRIDACIÓN IN SITU

Mediante esta técnica podemos observar el comportamiento de los genes pro y antiapoptóticos. En condiciones normales se encuentran en equilibrio, pero ante un traumatismo comienzan a expresarse todos ellos. La muerte celular programada se producirá dependiendo de cuáles de estos genes presenten una mayor expresión, y es el gen p53 quien determina este extremo.

Así, se ha demostrado la inducción del ARNm del gen p53 en el córtex dañado a las 6 horas tras el traumatismo, a las 24 horas descienden sus niveles y desaparecen a los 3 días. En el hipocampo, los núcleos talámicos ipsilaterales siguen un patrón similar, si bien a las 24 horas ya ha desaparecido, siendo completamente negativo en los contralaterales. Las células que lo expresan son

sólo neuronas, quedando patente la mayor sensibilidad de la estirpe neuronal a la muerte celular programada (Napieralski y cols, 1999).

Del mismo modo, se ha observado que en las mismas circunstancias, el ARNm del gen Bax presenta una amplia replicación a partir de las 2-3 horas tras un impacto de alta intensidad, prolongándose durante una semana (Tweedie y cols, 2007).

Mediante esta técnica también podemos detectar **ADN monocatenario**, el cual puede ser un signo de apoptosis. En casos de isquemia y posterior reperfusión es detectable a los 60 segundos permaneciendo visible hasta 16 horas, pero en casos de traumatismos su expresión depende de la vulnerabilidad de la zona a estudiar; por ejemplo, en el núcleo pálido es detectable a los 30 minutos, mientras que en la sustancia negra no se observa hasta transcurridas 24 horas (Michiue y cols, 2008). Estas diferencias locales hacen que no resulte práctico su estudio para nuestro propósito.

8.B.- INMUNOHISTOQUÍMICA

8.B.a.- CASPASA 3

La caspasa 3 fragmenta una serie de proteínas que regulan la apoptosis, la fragmentación del ADN y a integridad del citoesqueleto (actina, espectrina, proteinquinasasa ATP dependientes, laminina, etc). También tiene una función positiva o conservadora gracias a la escisión de la poli ADP ribosa polimerasa, lo que evita la depleción de energía celular (Robert y cols, 1999).

El paso de pro-caspasa 3 a caspasa 3 activada depende en gran medida de la severidad del traumatismo y del tiempo transcurrido desde el mismo, detectándose niveles mínimos de caspasa 3 activada a las 8 y a las 72 horas tras

el impacto, especialmente en casos de traumatismo de baja intensidad. Estos valores mínimos coinciden con los de máxima expresión del gen proapoptótico Bax demostrados por hibridación *in situ* (Tweedie y cols, 2007).

Estos resultados, complementan los obtenidos del estudio de la pro-caspasa 3, la cual presenta niveles altos de actividad a las 4 horas tras el impacto. Entre las 48 horas y los 4 días, se aprecia un pico máximo de su actividad, simultáneo con la máxima actividad de caspasa 3 activada. A partir del quinto día se hace evidente la disminución de la actividad de ambos marcadores (Cernak y cols, 2002). Otros estudios demuestran diferencias en el comportamiento temporal de esta enzima, según su expresión en los dos grandes grupos celulares que conforman el tejido nervioso (neuronas y glía). En las neuronas se demuestra caspasa 3 a partir de 80 minutos tras la lesión, manteniendo niveles altos durante 4 días, tras lo cual disminuye. En las células gliales comienza a detectarse a las 5 horas pero permanece hasta 18 días, en especial en las células de la microglía que parecen ser las más afectadas por la muerte celular programada. Estas diferencias entre la glía y las neuronas, especialmente a partir del 4º día, sugieren que el mecanismo apoptótico es diferente en las dos estirpes celulares y que la glía es más resistente a este proceso sobreviviendo más tiempo. (Dessler y cols, 2007; 2009).

También se ha demostrado que previamente a la activación de la cascada apoptótica, el tejido nervioso presenta un intento de neuroregeneración. Sin embargo, este intento es insuficiente en casos de TCE con clínica evidente, y la cascada apoptótica y la necrosis conducen a las consecuencias neurológicas ya conocidas (Kaneko 2012).

8.B.b.- CITOCROMO C

Se trata de un complejo proteico transmembrana de la mitocondria imprescindible para la respiración celular. En casos de estrés se libera al citoplasma, dando lugar junto con el factor de apoptosis 1 (dependiente de ATP), al “apoptosoma” que al unirse con la caspasa 9 dará lugar al inicio de una cascada enzimática (vía intrínseca de las caspasas) para la apoptosis. Se detecta hasta 72 horas tras el traumatismo con un pico máximo entre las 6 y las 24 horas. (Büki y cols, 2000; Tweedie, 2007). Sin embargo, la inmunoreactividad de su fracción citosólica está aumentada a las 2 horas tras la lesión siendo más intensa a las 4 horas, momento en el que todavía no es visible por técnicas convencionales la neurodegeneración (Felderhoff-Muesner y cols, 2002).

Büki y cols (2000) encontraron células positivas para citocromo C en la región del traumatismo 15 minutos después del mismo, aumentando su presencia en todas las regiones, conforme aumenta el tiempo de supervivencia. En los primeros momentos este marcador se acompaña de la expresión de calpaína y más tarde (entre la 1ª y la 6ª hora) se acompaña de caspasas y proteasas de la cisteína (Büki y cols, 2000).

8.B.c.- FACTOR INDUCTOR DE LA APOPTOSIS (AIF)

Es una flavo- proteína que, una vez en el citosol, puede trasladarse al núcleo y promover la fragmentación del ADN y la muerte celular por apoptosis de una forma completamente independiente de las caspasas. Se eleva de forma precoz tras la lesión y continúa positiva al menos, 72 horas después (Tweedie y cols, 2007).

En ausencia de Apaf-1, el p53 activa el AIF dando lugar a una vía apoptótica al margen de las caspasas.

El AIF parece estar bajo el control de la familia Bcl-2, y de hecho, tanto la liberación de AIF como de citocromo C, están inhibidas si los genes de esta familia están bloqueados (Cahill y cols, 2006).

8.B.d.- GENES DE LA FAMILIA Bcl-2

Como ya se ha dicho anteriormente, es un familia extensa de genes, unos pro-apoptóticos (p53, Bax, Bid, Bik, Bak, Bim y Bcl-X) y otros antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-XL y Mcl-1). La proteína de expresión del gen Bax aumenta a partir de las 24 horas y continúa en ascenso hasta el 3º día con un pico máximo a las 48 horas (coincidiendo con la actividad máxima de la caspasa 3). Al mismo tiempo también se aprecia un aumento de la actividad de los genes antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-X, es decir que ante una noxa se ponen en marcha ambos mecanismos buscando un equilibrio. La muerte o recuperación de la célula dependerá de cuál de las dos vías se expresa con mayor fuerza, por eso no todo daño axonal difuso es irreversible (Cernak y cols, 2002).

La familia del Bcl-2 también es responsable de la inhibición del segundo activador mitocondrial de la caspasa (Cahill y cols, 2006).

La expresión del Bcl-2 y del Bcl-XL (antiapoptóticos) ante un traumatismo severo (tanto de su ARNm, como de sus proteínas) disminuye drásticamente en el tálamo, córtex cingular y el núcleo estriado a partir de las 2 horas tras el traumatismo, y se elevan a partir de las 48 horas hasta recuperar niveles casi normales. (Felderhoff-Mueser y cols, 2002).

Si observamos por inmunohistoquímica el comportamiento de Bcl-2 y Bax en córtex, veremos que el primero disminuye a las 2 horas mientras que el segundo permanece sin cambios y a las 6 horas, el Bcl-2 ha desaparecido y el Bax disminuye. Esta disminución del Bcl-2 precede a la máxima pérdida neuronal a las 24 horas tras el agente traumático.

La severidad del traumatismo determina la extensión del daño secundario en zonas no afectadas directamente por el agente traumático. En traumatismos de baja intensidad, el córtex presenta células con morfología apoptóticas, (cromatina condensada, lo que hace que la tinción nuclear sea más intensa, ruptura y vacuolización de la membrana citoplasmática y formación de esferoides apoptóticos o apoptosomas en el citoplasma) a partir de las 12 horas hasta una semana con un pico máximo a las 24 horas, más allá de la corteza sólo se afecta la sustancia blanca inmediatamente inferior con un comienzo y pico máximo similares, pero con una duración máxima de 72 días. El hipocampo y el tálamo, tanto contra como ipsi laterales, no se ven afectados.

En caso de una fuerza traumática media, el córtex se ve afectado de igual manera y su afectación dura hasta un mes, igual que la sustancia blanca subyacente, si bien, el área afectada de la misma es mucho mayor que en el caso anterior. Del mismo modo, el hipocampo ipsilateral muestra células con morfología apoptótica a partir de las 12 horas hasta 2 semanas con pico máximo a la semana. La afectación talámica es más tardía, comenzando al cabo de una semana, un pico máximo a las 2 semanas y la negativización al cabo de un mes (Raghupathi y cols, 2002).

En los 10 primeros días se objetivan células con expresión del gen Bax, pero jamás en las regiones contralaterales, se incrementan con el tiempo y alcanzan un pico máximo a los 6 días. Declinan hasta el 10 día. La expresión de su ARNm es paralela, sin embargo, a partir del día 10 comienza a elevarse la expresión del Bcl-2 y nunca alcanza niveles tan significativos; es decir, los mecanismos de protección tras un trauma directo comienzan tarde y de forma lenta (Wennersten y cols, 2003).

Las zonas afectadas por la apoptosis no afectadas por la contusión, sufren fenómenos de isquemia e inflamación que son los que pueden determinar la activación de la cascada apoptótica, lo cual fue demostrado de forma empírica

mediante terapia hiperbárica, que produce la disminución de la expresión de genes pro apoptóticos (Bax) y el aumento de la expresión de los genes conservadores (Bcl-2 y Bcl XL) (Vlodavsky y cols, 2005). Posteriormente, mediante técnicas inmunohistoquímicas se evidencia la relación entre los genes apoptóticos y la pérdida de neuronas. Así, en la región C3 del hipocampo, tras un traumatismo, el gen Bax expresa un pico máximo a las 48 horas tras el traumatismo, mientras que la caspasa 3 alcanza dicho pico máximo a las 72 horas y el gen Bcl-2 comienza a disminuir su expresión a partir de las 12 horas tras la lesión. Del mismo modo el porcentaje de células apoptóticas alcanza su pico máximo al mismo tiempo que la caspasa 3 (Chen, 2013).

En modelos experimentales de traumatismo controlado se observa aumento del Bax y disminución del Bcl-2 a las 4 horas posteriores en las capas III, IV y V del córtex cerebral, siendo también inmunorreactivas para p53 en las mismas localizaciones. Esta situación continúa a las 24 horas y comienza a disminuir a los 3 días (Lu y cols, 2000). Comparando el comportamiento de los distintos genes de la familia junto con la activación del p53, se demuestran estos resultados (Martín y cols, 2001):

	Bax	Bak	BAD	Caspasa3
1° día	> 200% que controles en la fracción mitocondrial	= controles	Aumento de ambas fracciones	= controles
4° día	~ a los controles	Fracción citoplásmica = controles aumento de la fracción mitocondrial	Aumento de ambas fracciones	Niveles de pro-caspasa = controles Caspasa activada >
5° día	≈ a los controles	Aumento de ambas fracciones	Aumento de la fracción mitocondrial y disminución de la soluble	Sigue aumentando la activada y disminuye los niveles de la pro-caspasa
6° día	Comienza a disminuir	Continúa aumentada la fracción citoplásmica y disminuye la mitocondrial	Igual que el anterior	Pico máximo de caspasa activa

Comparación del comportamiento cronológico de los genes de la familia del Bcl-2 y la caspasa3

En cualquier caso, el estudio inmunohistoquímico de estos genes disminuye significativamente el periodo “ventana” para detectar muerte celular si lo comparamos con técnicas histológicas clásicas. Así, en las tinciones con azul de toluidina no se observan cambios hasta transcurridas 6 horas tras el traumatismo y la tinción irá disminuyendo durante las primeras 24 horas. Sin embargo, con el estudio inmunohistoquímico de los genes Bax y Bcl-2, se comienza a observar a las dos horas una disminución en la expresión del Bcl-2 a favor del Bax y a las 24 horas la región que presenta menos expresión de Bcl-2 coincide con la de menor tinción de toluidina y a los 7 días ya no se aprecia

expresión de ninguno de los dos genes, mientras que la tinción histológica sólo demuestra cambios de gliosis. Esto demuestra la utilidad de las técnicas inmunohistoquímicas para el diagnóstico precoz del DAD (Raghupathi y cols, 2003).

Es importante tener en cuenta que el proceso de muerte celular mediante apoptosis en el cerebro adulto tras una lesión isquémica o traumática dura unos 14 días con un pico máximo de células muertas a los 7 días, si embargo en el cerebro inmaduro de los neonatos dura dos días gracias a la gran plasticidad de los tejidos en este caso (Martin y cols, 2001).

8.B.e.- p53

También conocido como el guardián del genoma, es un factor de transcripción nuclear que se relaciona con la oncogénesis. Contiene un dominio aminoterminal de transactivación, otro dominio carboxiterminal de oligomerización y un dominio central de unión al ADN. Una de sus dianas principales es la familia de genes del Bcl-2. Según la intensidad de la señal expresará en mayor o menor medida los genes proapoptóticos o los antiapoptóticos, determinando así si la célula muere o no.

El p53 pasa del núcleo al citosol donde permanece en concentraciones muy bajas por su gran inestabilidad, lo que hace que sea degradado rápidamente. Por ello, la salida del núcleo está muy regulada y ocurre cuando la murine double minute 2 (MDM2) ubiquitina el p53 y luego es fosforilado en la serina 46. Así sale al citosol, activando la cascada de la apoptosis. Para ello rompe la pro-caspasa 8 en caspasa 8 activa, la cual transforma el gen Bid en su forma truncada y facilita la salida del citocromo C al citosol, una vez allí se une al factor proapoptótico 1 activado (Apaf-1), formando el apoptosoma que transforma la pro-caspasa 9 en caspasa 9 activa y así mediante la cascada de las caspasas hasta

llegar a la caspasa 3. Todo esto tiene lugar cuando la lesión del ADN es irreparable y por tanto letal.

En cambio, si se fosforila en las serinas 15 y 20 cuando aún está en el núcleo, se estabiliza y da lugar al arresto del ciclo celular permitiendo la reparación del ADN y por tanto, la supervivencia de la célula.

Este proceso requiere gasto energético, es decir, ATP. En circunstancias en las que no exista ATP, se pondría en marcha la vía extrínseca: la pro-caspasa 8 es capaz de activarse por sí misma y de esta forma comenzaría la cascada hasta la caspasa 3. (Cahill y cols, 2006).

En casos de traumatismo medio, el p53 presenta un pico máximo de expresión a las 10 horas mientras que en circunstancias experimentales en las que la lesión cortical se produce por inyección de chorro a presión, presenta un pico máximo a las 48 horas, lo que confirma que el tipo de traumatismo así como su intensidad, determina que las señales que provocaran la muerte celular sean de un tipo o de otro e incluso si estas mismas van a determinar o no la muerte celular. En traumatismos de mayor intensidad, el gen p53 es demostrable incluso en las 2 horas posteriores, presentando un pico máximo a las 24-48 horas y permaneciendo visible hasta una semana. Una vez más se confirma que el equilibrio entre apoptosis y regeneración celular vendrá determinado por la severidad del traumatismo (Kaya y cols, 1999).

El gen p53 no sólo activa genes de la familia Bcl-2 sino que también se relaciona con genes que controlan la reducción y oxidación mediante especies reactivas del oxígeno, lo cual sugiere que pueden existir otras vías de muerte celular (Napieralski y cols, 1999).

La ablación experimental del córtex occipital, induce la activación de mecanismos apoptóticos mediante la detección del p53 en las neuronas. Se hace obvio al 4º día post-lesión, presenta un pico máximo al 5º día y al 6º día se

extiende a la glía de la lesión y a las neuronas del núcleo dentado contralateral a la lesión. La actividad de las caspasas se comporta de una forma paralela no hallándose cambios significativos el primer día entre los niveles de pro-caspasa3 y caspasa 3 activada. Al 4º día están elevadas las dos y al 5º día se aprecia el pico máximo de caspasa3 mientras que los niveles de pro-caspasa vuelven a los límites basales. Los picos máximos de actividad apoptótica coinciden con la fase de cromatolisis del núcleo, estableciendo así la relación causa-efecto entre la activación de estos genes con el comienzo de la muerte celular. Del mismo modo, también se ha demostrado que la muerte celular programada no puede ocurrir sin gen Bax, ya que en sujetos en los que dicho gen ha sido suprimido, aunque se activa el p53 no se produce apoptosis (Martin y cols, 2003).

8.B.f.- Fas (CD95) y FasL (CD95L)

Fas es una proteína de superficie de 36 kDa con un dominio citoplasmático de "muerte celular" conservado. El **ligando Fas** (FasL o Apo-1) es una proteína de membrana tipo II de 40 kDa miembro de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF).

Como se especificó antes, la vía extrínseca de la apoptosis se desencadena tras la unión de ligandos a receptores de apoptosis presentes en la superficie. Uno de estos receptores es Fas (CD95) y su ligando, FasL. Este ligando (FasL) se une a Fas en la misma célula o células adyacentes, formándose grupos de tres o más moléculas de Fas. A causa de esta agregación, los dominios intracelulares de estos receptores agrupados por Fas se unen a una proteína adaptadora que contiene un dominio citosólico (FADD), que determina la muerte celular fijándose a la forma inactiva de la caspasa-8 la cual experimenta una autoactivación catalítica y activa otras caspasas efectoras desencadenando la apoptosis.

El equilibrio entre la expresión del Fas y FasL y sus formas solubles o de membrana es crucial para iniciar o suprimir la muerte celular, si bien no son marcadores exclusivos de daño traumático, sino que también aparecen en enfermedades neurodegenerativas.

Estos marcadores se expresan tanto en neuronas como en los astrocitos y en las células de la microglía, presentando un pico máximo de expresión a las 24 horas (coincidiendo con el pico de apoptosis) y persisten a los 7 días aunque en menor concentración (Grosjean y cols, 2007).

8.B.g.- PROTEÍNAS ASOCIADAS A Fas (Daxx, DED, FADD y FAP1)

Estas proteínas no se expresan en células sanas. Aumentan al cabo de una hora tras un traumatismo y alcanzan el pico máximo a las 3 horas, disminuyendo a partir de las 12 horas para desaparecer por completo a las 24h. Esto demuestra que la apoptosis es un proceso activo que requiere la síntesis de novo de proteínas. De todas formas, pueden tener una función pro o antiapoptótica según si su concentración aumenta en el citoplasma o disminuye en el núcleo, respectivamente. En concreto la FP-1 regula la señal inducida por Fas, regulando el equilibrio entre supervivencia y muerte celular (Bi y cols, 2008).

9.- OTROS MARCADORES

9.A.- CITOQUINAS

Se han estudiado múltiples citoquinas como la IL-10 (que presenta un pico máximo de expresión a las 6 horas y desaparece en 7 días), TNF- β , IFN- γ , IL-8, factores de crecimiento de los granulocitos y monocitos, moléculas de adhesión,

etc. con distintos resultados, si bien no resultan de especial utilidad en lesiones traumáticas por su gran inespecificidad y baja sensibilidad (Aschner, 1998).

9.B.- METALOPROTEINASAS

Las **metaloproteinasas** de la matriz (MMPs) son una extensa familia de enzimas proteolíticas (dependientes de Zn) que se encargan del remodelado de la matriz extracelular y que pueden degradar todos los constituyentes de la misma, es decir que juegan un papel importante en la muerte neuronal, alteración de la barrera hemato-encefálica (BHE) (daño microvascular) y la formación de la cicatriz glial. Así, la MMP-9 es detectable en la región adyacente a la contusión a partir de las 24 horas postraumatismo y presenta un pico máximo de expresión a las 48 horas. (Hayashi y cols, 2009). Sin embargo, en la zona directamente afectada por el traumatismo se observa un incremento significativo a las 6 h, si bien el pico máximo coincide en el tiempo con el de las regiones adyacentes (Wei y cols, 2014). Otros estudios demuestran su presencia en regiones ipsilaterales susceptibles a cambios inflamatorios tales como el hipocampo (Hayashi y cols, 2009). La MMP-12 es también detectable a las 24 horas, pero mantiene su expresión al menos una semana y se demuestra tanto en astrocitos, como en neuronas (Wasserman y cols, 2007).

9.C.- PROTEÍNA INDUCTORA DE LAS METALOPROTEINASAS (EMMPRIN o CD147)

La **proteína inductora de las metaloproteinasas (EMMPRIN o CD147)** es una glicoproteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas que estimula la producción de las metaloproteinasas mediante mecanismos autocrinos y paracrinos. Se expresa en distintas estirpes celulares tanto en condiciones normales como en situaciones de inflamación. Se ha relacionado

también con el desarrollo embrionario de la BHE, con el crecimiento y la angiogénesis de determinados tumores malignos, con la destrucción de tejido en casos de infarto cerebral y con enfermedades como el Alzheimer y la esclerosis múltiple. En los traumatismos se observa un aumento significativo de su expresión en la zona contundida a las 6 horas postraumatismo y alcanza su pico máximo a las 48 horas. Las células que lo expresaban eran células endoteliales, astrocitos, neutrófilos y macrófagos (Wei y cols, 2014)

9.D.- DIACILGLICEROLQUINASA

La **diacilglicerolquinasa** es una enzima de la clase de las transferasas que cataliza la fosforilación de un diacilglicerol para formar un fosfatidato (ambos segundos mensajeros), usando ATP como donador de fosfato. Tiene funciones en el metabolismo neuronal en condiciones fisiológicas, pero en condiciones patológicas deja de expresarse en estas células para hacerlo en las células fagocíticas. Por eso, tras un traumatismo craneoencefálico, se observa una disminución de su expresión en neuronas al cabo de una hora y un aumento significativo de su actividad 7 días más tarde en la microglía activada y en fagocitos sanguíneos que provienen del SNC debido a la alteración de la barrera hematoencefálica. El tipo celular que expresaba esta enzima queda demostrado mediante marcajes múltiples ya que las células DGKz positivas son PGFA negativas y glucosa transferasa positivas (Nakano y cols, 2009).

9.E.- CONJUGADOS DE PROTEÍNAS AUTOFÁGICAS (ATG12 y ATG5)

Los **conjugados de proteínas autofágicas** (ATG12 y ATG5) inducen la formación del fagosoma, sin permanecer como elemento constitutivo del mismo, sino reciclándose después. Dado que son elementos necesarios en el metabolismo celular, su expresión es normal en condiciones fisiológicas, pero

ante circunstancias adversas, su expresión disminuye (4 horas tras un traumatismo) y vuelven a niveles normales varios días después (Liu y cols, 2008).

9.F.- PROTEÍNA ASOCIADA AL CRECIMIENTO (GAP 43) Y SINAPTOSINA

La **proteína asociada al crecimiento (GAP43)** y la **sinaptosina** han sido tomadas como marcadores de plasticidad glial, mostrando intervalos de expresión que varían entre las 48 horas y los 7 días dependiendo de la terapia a la que sea sometido el individuo (Loncarevic-Vasiljkovic y cols, 2009).

9.G.- FACTOR NEUTROFÍLICO CILIAR (CNTF)

El **factor neurotrófico ciliar (CNTF)** es una citokina que tiene efectos tróficos sobre neuronas sensitivas y motoras, ya que modifica su expresión génica y afecta a su supervivencia ejerciendo una acción inhibitora sobre la actividad de la COX-2 y aumentando la del factor neurotrófico de las células gliales. Es producido por la microglía, en especial por los oligodendrocitos (Kradny y cols, 2008).

9.H.- PROGRANULINA

La **progranulina** es una proteína de 68,5 kDa rica en cisteína que es secretada de forma glicosilada en una forma de 88kDa. Como resultado de su proteólisis por medio de proteasas extracelulares, se forman péptidos activos de 6kDa, cada uno de los cuales contiene de 10 a 12 residuos de cisteína. La PGRN favorece la supervivencia y el crecimiento neuronal en cultivos celulares. En modelos experimentales de lesión del SNC (causadas mediante axotomía), la expresión de PGRN aumenta a las 3 horas, presenta su pico máximo a los 7 días

y vuelve a límites normales a los 7 días. Este aumento de expresión corre a cargo de las células de la microglía, mientras que en las neuronas disminuye (Moisse y cols, 2009).

Sin embargo, el gen de la progranulina (PGRN) no es exclusivo de las neuronas y se expresa también en células epiteliales y hematopoyéticas. Está implicada en muchos procesos como carcinogénesis, cicatrización de heridas y procesos inflamatorios (He y cols, 2003; Eriks y cols, 2008). Tras un traumatismo, la progranulina es producida en fibroblastos y células endoteliales promoviendo la neovascularización (He y cols, 2003).

9.I.- PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 72 (HSP72)

La **proteína de choque térmico 72 (HSP72)** es una proteína muy ubicua asociada a la supervivencia celular y resistencia a los estresantes. La expresión intra o extracelular de esta proteína tiene distintas funciones. La proteína intracelular confiere protección a diferentes circunstancias de estrés, mientras que la porción extracelular juega un papel de presentación de antígenos en los mecanismos inmunológicos. En casos de traumatismos craneoencefálicos, esta proteína es detectable en neuronas alrededor de la zona contusa, en sustancia blanca y tálamo ipsilateral, a las 24 horas subsiguientes (Dunn-Meynell y cols, 1997). Más específicamente en la región C3 del hipocampo homolateral es detectable antes de las 48 horas y perdura varios días, entre otros motivos porque esta región del encéfalo es una de las más resistentes a los procesos postmórtem (Kubo y cols, 1998).

9.J.- FATOR INDUCIBLE POR HIPOXIA 1 (HiF 1)

El **factor inducible por hipoxia 1 (HiF-1)** es una proteína que sirve de marcador de hipoxia tisular así como el pimonidazol y el TGF-1 β . Su expresión durante los tres primeros días tras un traumatismo (con un pico máximo a las 24 horas) en las células gliales, demuestra que un traumatismo directo genera hipoxia tisular. La expresión de TGF-1 β en el citoplasma neuronal y el núcleo de las células gliales corrobora este hecho, ya que Klempt y cols (1992) demostraron su aumento a los 15 minutos tras la oclusión de la arteria cerebral media, si bien la expresión de este último marcador depende de genes como el Bcl-2 y el Bcl-x, por lo que los resultados cuantitativos pueden ser muy variables. Del mismo modo, el HiF-1 α induce la liberación del factor de crecimiento de vasos sanguíneos (VEGF), lo cual reduce el daño isquémico secundario al traumatismo (Huang y cols, 2010).

9.K.- CAVEOLINAS

Las caveolas son invaginaciones de la membrana citoplasmática ricas en proteínas y lípidos de las células del sistema inmune. En el caso del SNC se encuentran en células de la microglía. Sus funciones van desde la transducción de señales a la homeostasis del colesterol y la supresión tumoral. Se forman y mantienen gracias a unas proteínas transmembrana llamadas **caveolinas**. Cuando estas proteínas se fosforilan en la tirosina 14 se produce la fisión de la caveola dando lugar a la transcitosis de la misma. En circunstancias fisiológicas, el 20% de las células endoteliales vasculares en el SNC son positivas a la caveolina, pero negativas a la fibronectina, lo que demuestra la integridad de la barrera hematoencefálica. Tras un traumatismo aumenta la expresión de esta proteína desde las 12 horas posteriores (momento del pico máximo) aumentando progresivamente hasta el 2º día. Posteriormente su expresión va

disminuyendo hasta el 4° día. Al 6° día se detecta en macrófagos, que también son positivos a la fibronectina, debido a la fagocitosis secundaria (Nag y cols, 2008).

9.L.- FACTOR DE CRECIMIENTO SIMILAR A LA INSULINA 1 (IGF 1)

El **IGF-1** es un factor mitogénico importante durante las fases de desarrollo del encéfalo. Promueve la supervivencia neuronal, la maduración de los oligodendrocitos, la mielinización, el crecimiento axonal, la maduración de las dendritas y la sinaptogénesis. Su receptor (IGFR-1) se expresa en neuronas, células madre y células de la glía.

A partir de la 1ª hora tras un traumatismo se observa tinción positiva para IGF-1 en el neuropilo y en algunas neuronas salteadas en la zona del impacto, pero lo que más se observa en esta región son neuronas picnóticas y edematosas que van aumentando en número entre las 24 y 72 horas postraumatismo, formándose una cavidad en el córtex contundido. Alrededor de esta cavidad se aprecian células IGF-1 positivas durante las primeras 24-48 horas, las cuales son principalmente PGFA positivas, es decir astrocitos. A las 72 horas el factor similar a la insulina ha vuelto a niveles normales.

En la sustancia blanca subyacente comienza a aumentar a las 24 horas y alcanza su pico máximo a las 48 horas.

El receptor para este factor se expresa alrededor de la cavidad entre las 24 y 48 horas tras la contusión, a las 72 horas aparecen en los vasos sanguíneos adyacentes a la cavidad, en la sustancia blanca subyacente a las 24 horas y en tálamo homolateral, es decir, en regiones profundas, a las 72 horas.

En los bordes de la contusión se produce una alteración del flujo de calcio y de la barrera hemato-encefálica, así como astrogliosis. La expresión

del IGF-1 limita la progresión de la muerte celular y promueve la diferenciación de células progenitoras y el crecimiento neuronal (Madathill y cols, 2010).

9.M.- AMPc

El **AMPc** es uno de los segundos mensajeros más conocidos y con más funciones descritas, la principal de ellas es activar la proteinkinasa A, que a su vez fosforila distintas proteínas como CREB (*AMPc-responsive element binding protein*) y el factor nuclear K-B (NF-KB) p50. Estos contribuyen a la supervivencia de la célula, porque el CREB fosforilado estimula al transcripción de genes de supervivencia celular tales como el Bcl-2, y el NF-KBp50 fosforilado suprime los genes que codifican citoquinas proinflamatorias tales como el TNF- α y la IL-1 β .

El cAMP sufre una disminución a los 15 minutos tras un traumatismo en la región del hipocampo, a las 24-48 horas en el córtex parietal y no sufre cambios en el tálamo. La proteinkinasa disminuye también a los 15 minutos en las neuronas del córtex parietal y permanece así unas 48 horas antes de recuperar sus cifras normales (Atkins y cols, 2007).

9.N.- MOLÉCULA DE INTEGRACIÓN ESTROMAL OLIGOMERIZADA 1 (STIM1)

Cuando el retículo endoplasmático libera calcio, **la molécula de interacción estromal oligomerizada 1 (STIM1)** se acumula en la membrana de esta organela y en las uniones plasmáticas de membrana y activa los canales de calcio operados el acúmulo de este mismo ión. La STIM1 se considera un sensor de la concentración de calcio en el RE. Las alteraciones en la entrada de calcio operada por su propio acúmulo modifican la homeostasis del calcio pudiendo llegar a producir patologías como corea de Huntington o Alzheimer.

Además algunos estudios demuestran que la liberación de calcio desde sus almacenes intracelulares tienen lugar en las primeras fases del daño axonal postraumático. La expresión de STIM1 se incrementa de forma significativa en los cuerpos neuronales (en el citoplasma y en las membranas) del córtex cerebral a las 6 h. postraumatismo, alcanza su pico máximo a las 12 h., y a los dos días sus niveles vuelven a la normalidad. Este comportamiento puede estar en relación con la degeneración neuronal prematura y con la ruptura secundaria de los axones (Li y cols, 2013).

9.O.- ACUAPORINA 9

La **acuaporina 9 (AQP9)** es parte de la familia de los canales de agua y está implicada en la homeostasis del agua y en el metabolismo energético del cerebro, por lo que puede colaborar en la regulación del edema postisquémico. Tras un traumatismo su expresión en el córtex tiene un pico a las seis horas, después desciende hasta las 12 horas y luego vuelve a elevarse gradualmente alcanzando su pico máximo entre las 48 y 72 h, permaneciendo por encima de su presencia basal hasta una semana. A las tres horas también se observa en las neuronas del hipotálamo, donde también alcanza su pico máximo a las 48-72 h. En el hipocampo aparece a las seis horas e incluso a las 72 h. pero su expresión no es tan fuerte como en el resto de estructuras (Liu y cols, 2012).

9.P.- PROHIBITINA 2

La **prohibitina 2 (PHB2)** es una proteína muy ubicua que forma parte del complejo prohibitina y comprende principalmente dos subunidades (PHB1 y PHB2). La PHB2 está presente en distintos compartimentos de la célula, entre ellos el núcleo y la mitocondria. Entre sus funciones se encuentra la de controlar la proliferación celular, la apoptosis, la morfogénesis de cristales y preservar la

integridad funcional de la mitocondria. En casos de traumatismo esta proteína incrementa su expresión, al principio en neuronas, pero 5 días tras el traumatismo comienzan a observarse también niveles elevados en astrocitos, siendo un factor fundamental en la proliferación de esta estirpe celular. También se ha observado que esta proteína se localizaba en células que expresaban al mismo tiempo caspasa 3, indicando una relación directa con la apoptosis, pero dado que el incremento de la expresión de este marcador precede al aumento de la expresión de los genes Bcl-2 y Bclxl, su papel en este proceso es neuroprotector. En líneas generales podemos decir que la expresión de esta proteína comienza a las 12 h. tras el traumatismo, alcanza su pico máximo a los cinco días y luego decrece progresivamente hasta alcanzar niveles basales (Xu, 2014).

9.Q.- UBIQUITINA

Es una proteína de 76 aminoácidos reguladora de la actividad, estabilidad y localización de otras proteínas uniéndose a ellas de forma covalente. La ubiquitinización consiste en la unión de esta proteína a otras a través de la lisina y del grupo carboxilo terminal. Dado que la ubiquitina posee varias lisinas, es capaz de unirse a una o varias o estructuras de forma múltiple. Todo ello conduce a la formación del proteosoma encaminado a la degradación de las proteínas implicadas o bien, para la reparación de las mismas. Cuando ocurre en el ADN puede dar lugar a la muerte celular, si la lesión del mismo es irreparable, tanto por vía excitotóxica como endocítica (Millard y cols, 2006).

Su autofagia se asocia a distintas patologías como tumores, enfermedades neurodegenerativas, daño isquémico, desórdenes cognitivos y enfermedades neuromusculares. También se observa en axones afectados por daño axonal difuso.

En casos de TCE la inmunoreactividad para ubiquitina se observa tanto en neuronas como en células gliales. Su incremento comienza a partir de 1 hora tras el traumatismo, sobre todo en las regiones directamente contundidas, y siguen siendo distinguibles hasta 7 meses tras el traumatismo (Sakai y cols, 2014).

10.- CASOS DE ESPECIAL RELEVANCIA MÉDICO FORENSE

10.A.- SHAKEN BABY SYNDROME (Síndrome del niño sacudido)

Los traumatismos infantiles merecen un estudio aparte, por las dificultades a la hora de extrapolar los resultados obtenidos en adultos a los niños, dado que su anatomía, histología y fisiología tienen características especiales. Por ejemplo, su cabeza es, en proporción a su cuerpo, mayor que la de un adulto. Además, la musculatura del cuello es mucho más débil y sus facetas articulares vertebrales son más planas. Todo esto les hace susceptibles a unos tipos de traumatismos muy raros en el adulto, como ser lanzados o agitados. Por otro lado la citoestructura del encéfalo inmaduro es diferente del adulto. Sus axones están menos mielinizados, y su cerebro y su médula espinal son más frágiles. Estas características condicionan una respuesta característica a agentes traumáticos y/o hipóxicos/isquémicos (Dolinak y cols, 2006). Por ello, para provocar daño axonal difuso en los niños, que puede incluso llevar a la muerte debido a la afectación de centros bulbares vitales, no es necesario un traumatismo de alta energía. La severidad del traumatismo no viene determinada por su energía sino por sus consecuencias por lo que la existencia de daño axonal difuso en estos casos conlleva el diagnóstico de traumatismo severo (Geddes y cols, 2001).

Históricamente, el concepto de *shaken baby syndrome* describía un mecanismo traumático que tenía como resultado hemorragias subdurales, subaracnoideas y retinianas en niños que frecuentemente presentan fracturas en huesos largos. Teóricamente el mecanismo lesional se debería a fuerzas que se transmiten a través del torso, que provoca el balanceo brusco de la cabeza hacia delante y atrás. Conforme la cabeza se agita, el cerebro rota dentro de la cavidad craneal causando roturas de las venas corticales del seno sagital que dan lugar a las hemorragias subaracnoideas y subdurales. Del mismo modo, la fuerza rotacional rompe axones cerebrales dando lugar al daño axonal difuso (Dolinak y cols, 2006). Las lesiones más severas suele aparecer en la cápsula interna, el mesencéfalo, el puente y la médula espinal, mientras que las zonas de menor severidad se observan en la sustancia blanca subcortical.

La inmunohistoquímica para β -APP es una técnica altamente sensible para identificar el daño axonal difuso en niños menores de un año, dando unos resultados idénticos a los obtenidos en adultos. Dadas las circunstancias en las que ocurren este tipo de incidentes, esta técnica resulta de gran utilidad ya que en los niños no solo se produce lesión por torsión y elongación de los axones por los movimientos rotacionales que el encéfalo sufre dentro de la cavidad craneal, sino que también se asocian lesiones contusas y por isquemia/hipoxia, circunstancias en las que también expresa el β -APP. Además, en los casos de hipoxia se observó que esta proteína se acumula en el soma neuronal, posiblemente porque la anoxia severa provoca una interrupción total del transporte axonal, haciendo que los productos sintetizados en el soma no puedan salir de él.

Sin embargo, y dada la inespecificidad de la acumulación de β -APP en casos de traumatismo, la presencia de axones inmunorreactivos para β -APP no se pueden interpretar como signo patognomónico de abuso si no se evidencian otras lesiones como hemorragias, infartos y/o contusiones (Gleckman, 1999). El

empleo de este marcador es útil en otro de los elementos de la triada típica que conforma este síndrome, las lesiones en el nervio óptico, en el cual además se observan las alteraciones morfológicas en los axones (arrosariamiento, fragmentación y edema) y las hemorragias retinianas. La expresión de β -APP se ha demostrado en el segundo par craneal a partir de las 2 horas de supervivencia, teniendo en cuenta que para que sea valorable esta expresión debe ir siempre acompañada de los cambios morfológicos ya mencionados. Su ausencia en el nervio óptico no descarta el diagnóstico, ya que debe existir una buena perfusión de esta estructura y en casos de edema cerebral importante, ésta puede estar comprometida. Es por esto que el muestreo debe ser amplio e incluir la papila y regiones distales del nervio óptico, ya que son las zonas más sensibles al edema. En cualquier caso el edema papilar no asegura lesiones irreversibles (Gleckman y cols, 2000).

Por otro lado, el tiempo de supervivencia es muy corto, y como ya hemos reseñado anteriormente es necesario un tiempo mínimo de supervivencia de entre 35 a 60 min; pero como los abusos suelen ser prolongados y repetidos en el tiempo, pueden evidenciarse lesiones previas, ya que esta proteína perdura durante 6-8 semanas (Gleckman, 1999).

Otros autores (Geddes y cols, 2001; 2004), basándose en la presencia del precursor del β -APP en otras circunstancias de muerte en neonatos y lactantes hipotetizan sobre el mecanismo lesional de este síndrome. Los traumatismos, así como otros procesos nosológicos que tengan lugar en niños genéticamente susceptibles y que produzcan un edema por hipoxia tisular, producen un daño axonal difuso debido al aumento de presión intracraneal, la presión venosa central, y al aumento de la permeabilidad vascular, llegando a romper vasos, lo que como última consecuencia tendría la aparición de hematomas subdurales, subaracnoideos y retinianos.

De forma experimental aplicando esta técnica en ovejas, se demostró positividad para β -APP en el córtex cerebral, en las células de Purkinje cerebelosas y en el tallo cerebral, sin que se evidenciara pérdida neuronal en estas áreas por lo que se piensa que el daño neuronal es una respuesta difusa al estrés, sin que sea irreversible, porque el daño axonal resultó ser mínimo en algunos casos. Se observó también una mayor afectación de la cara anterior de la médula espinal cervical, probablemente por ser el punto de mayor agitación, sobre todo en menores de 3 meses (Geddes y cols, 2001; Finnie y cols, 2010).

10.B.- LESIONES POR ARMA DE FUEGO

Estas lesiones presentan unas características especiales, ya que no sólo se lesiona el tejido directamente afectado por el trayecto del proyectil, sino que éste crea una cavitación temporal por la velocidad a la que atraviesa el encéfalo provocando compresión, corte y estiramiento de axones no afectados directamente a su paso. La extensión de este daño secundario dependerá del tamaño y forma del proyectil, así como la energía con la que haya sido expelido y la estabilidad y elasticidad del tejido del sujeto.

Desde el punto de vista microscópico es visible una zona hemorrágica alrededor del trayecto de la bala con astrocitos activados (positivos para el marcador PGFA). En esta región inmediatamente adyacente al trayecto de la bala la destrucción axonal es total siendo evidentes las retracciones y las formaciones bulbares de los mismos. Conforme nos alejamos de la trayectoria el número de axones sanos, así como de neuronas y glía intactas aumenta progresivamente, hasta que a los 17-18 mm de distancia encontraríamos un tejido nervioso normal.

En casos con una supervivencia mayor a dos horas es posible observar leucocitos polimorfonucleares emigrados a la zona de lesión, aunque los

macrófagos no se presentan hasta las 24 horas. Del mismo modo el β -APP está totalmente ausente de la zona necrótica, localizándose, como muy próximo, a 1-2 mm de la trayectoria, hasta 2-4 mm más allá. También es importante señalar que pueden presentar reactividad axones aislados totalmente distantes a la lesión (especialmente en el tallo cerebral, quizá porque la energía liberada por el proyectil provoque presión y sea capaz de comprimir y/o provocar movimientos de torsión en el mismo). En resumen, estos cambios reactivos difusos evidencian el daño secundario paralelo a la cavidad creada directamente por el proyectil. Este daño secundario puede ser el que en última instancia provoque el fallo circulatorio y respiratorio que conduce al éxitus. En cualquier caso, siempre constituyen una evidencia de la vitalidad de la lesión y del tiempo mínimo de supervivencia. (Oehmichen y cols, 2004)

En las regiones alejadas del trayecto del proyectil, y cuando la supervivencia es suficiente, se observan dos patrones distintos de agregados axonales positivos a β -APP:

- Tipo I: axones en paralelo, ondulados y con edema (provocados por fuerzas mecánicas)
- Tipo II: axones agregados de forma irregular, en diagonal o longitudinalmente con mucho edema (provocados por hipoxia y edema)

Hay que tener en cuenta que aunque los axones son inmunorreactivos para β -APP la neurona no está muerta todavía, es decir que su situación es reversible, por lo que el tratamiento con ventilación mecánica puede aumentar las posibilidades de supervivencia (Oehmichen y cols, 2001).





JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

El gran número de muertes traumáticas que se producen al año y sus consecuencias criminalísticas y médico-legales, justifican el desarrollo del estudio de marcadores para conocer la evolución cronológica de los traumatismos cráneoencefálicos y consecuentemente su vitalidad. La finalidad del estudio es establecer un diagnóstico diferencial entre las muertes debidas estrictamente al traumatismo y aquellas otras atribuibles a causas ajenas, pero complicadas en su estudio por la presencia eventual de un traumatismo craneal (muertes súbitas que desencadenan un TCE ulterior).

La resolución del problema, pasa por la implementación de nuevas y mejores técnicas de laboratorio que puedan despejar los interrogantes que ofrece el estudio macroscópico. Así pues, técnicas como la Inmunohistoquímica y la Biología molecular entre otras, convierten estos análisis complementarios en imprescindibles para la resolución de los casos judiciales complejos. En particular, la aplicación de técnicas inmunohistoquímicas en la práctica forense habitual para el establecimiento de la cronología y de la vitalidad de la lesión, es un procedimiento de uso excepcional, fuera del alcance de la mayor parte de los laboratorios forenses de nuestro país. Sin embargo, su implantación casi universal en los laboratorios de Anatomía Patológica del sistema sanitario, ha demostrado un elevado grado de fiabilidad en aspectos relacionados, como es el caso de las lesiones de partes blandas. Consideramos que, la aplicación de estas técnicas a los casos forenses y la simplificación al máximo de los procedimientos de laboratorio, podría incrementar la seguridad diagnóstica.

Encontrar uno o varios parámetros que definan la evolución cronológica del TCE como mecanismo mortal y/o la vitalidad del mismo es uno de los retos de los investigadores en la actualidad.

El objetivo de este trabajo es exponer la situación actual de este tipo de técnicas en los casos de traumatismo craneoencefálicos, así como encontrar una batería de marcadores, cuyo estudio combinado nos permita de forma igualmente sencilla y fiable aproximarnos al diagnóstico y clasificación cronológica de estas las lesiones, mediante el descubrimiento de cambios mínimos y precoces en las distintas estirpes celulares de este tejido debidos a procesos tales como la necrosis, la inflamación y la apoptosis





MATERIAL Y MÉTODOS



MATERIAL Y MÉTODOS

1.- MATERIAL

En el presente estudio se han seleccionado exclusivamente cerebros humanos procedentes de autopsias médico legales. No se tuvo en cuenta el sexo o la edad del sujeto, sino que la muerte se debiera directa o indirectamente a un traumatismo craneoencefálico. La muestra total incluyó 25 cerebros.

El tiempo transcurrido entre la muerte y la recogida de la muestra se ha conocido siempre con bastante exactitud, bien a través de la historia clínica o bien a través de la información recabada en el momento del levantamiento. En ningún caso se superaron las 24 horas, durante las cuales, el cuerpo permaneció refrigerado a 4°C.

No se descartó ningún caso por haber sido sometido a tratamiento médico o quirúrgico, aunque sí que se tuvo este dato en cuenta, diferenciando las lesiones originales de las iatrogénicas.

Del estudio fueron excluidos aquellos casos en los que el sujeto sufriera accidentes cerebro-vasculares, convulsiones y/o crisis de hipo o hiperglucemia previos, dado que estas patologías producen lesiones neuronales similares al daño secundario por isquemia que tiene lugar en los TCE.

Los casos procedían de autopsias médico-legales practicadas en las subdirecciones de Santiago y Pontevedra del Instituto de Medicina Legal de Galicia, en virtud de los procedimientos judiciales instruidos en los Juzgados de Instrucción de Santiago, Padrón, Ribeira, Ordes, Arzúa, Noia, Muros, A Estrada, Lalín, Pontevedra, Caldas de Reis, Cambados, Villagarcía, Cangas de Morrazo y Marín. Para su estudio fueron divididos en dos categorías:

- **Casos problema:** constituido por un total de 21 cerebros pertenecientes a cadáveres de individuos que fallecieron de forma rápida o diferida por un traumatismo craneoencefálico. La autopsia se practicó lo más precozmente posible y siempre dentro de las primeras 24 h y, aunque en los casos de muerte diferida, era normal encontrar patologías asociadas (como neumonías) que pudieron constituir la causa inmediata de la muerte, la causa fundamental de la misma (y motivo del ingreso hospitalario) siempre fue un traumatismo craneoencefálico.
- **Controles negativos:** 4 cerebros de sujetos que fallecieron de forma súbita por causas naturales de origen cardíaco sin TCE asociado.

En todos los casos se realizó una autopsia médico-legal completa y se realizaron estudios toxicológicos que descartaran posibles orígenes tóxicos del daño neuronal. Se procedió además al estudio de la historia clínica completa de los casos que recibieron asistencia médica.

1.A.- Selección de los casos:

La información respecto a las lesiones encefálicas se obtuvo, mediante el examen directo en el caso de las muertes más rápidas y mediante el estudio detallado de la historia clínica, en los casos de muertes diferidas. En este último

grupo se valoró la existencia de fracturas y de hemorragias intracraneales, así como la eventual existencia de cirugía.

Los casos control fueron seleccionados entre los casos de muerte natural, siendo los idóneos aquellos en los que los fenómenos agónicos fueran mínimos, al objeto de evitar la aparición de lesiones encefálicas por posibles hipoxias o alteraciones metabólicas. Por ello, elegimos muertes súbitas cardiacas que quedaron documentadas por la autopsia completa y la historia clínica previa del paciente.

Los casos problemas fueron divididos en 4 grupos:

Grupo 1: supervivencia hasta 2 h

Grupo 2: supervivencia entre 2 y 24 h

Grupo 3: supervivencia entre 24 h y 30 días

Grupo 4: supervivencia de más de 30 días

2.- MÉTODOS

2.A.- Autopsia encefálica y procedimiento de obtención de secciones de tejido cerebral

Cada encéfalo fue extraído y pesado. Posteriormente se realizaron cortes transversales de entre 1 y 1,5 cm de espesor y se obtuvieron los bloques tisulares bilaterales de las siguientes estructuras:

- 1.- Corteza frontal pericallosa
- 2.- corteza temporal cisura de Silvio
- 3.- corteza parietal cisura de Rolando
- 4.- corteza occipital cisura calcarían
- 5.- mesencéfalo
- 6.- núcleos de la base
- 7.- oliva cerebelosa
- 8.- protuberancia
- 9.- oliva bulbar

Siempre que se observaba alguna zona lesionada o especialmente afectada en el córtex, se obtenían bloques tisulares adicionales de esa región específica.

2.B.- Preparación de los bloques tisulares

Las muestras fueron numeradas con el número de autopsia correspondiente, el número de bloque tisular y su lateralidad. Posteriormente se fijaron en formol tamponado al 10% durante un periodo máximo de 24 h y después conservadas en alcohol al 70% hasta que fueron procesadas.

Grupo 1: Tiempo de supervivencia hasta 2 h

Caso	Edad	Sexo	Tratamiento médico	Tratamiento quirúrgico	Tiempo de supervivencia	Bloques
58/11	51	H	no	no	minutos	2, 3 izdos
107/09	37	H	no	no	minutos	1 dcho, 1 izdo
92/11	83	M	no	no	minutos	2, 3 izdos
93/11	40	H	no	no	menos de 30 minutos	2, 3, 4 izdos
89/11*	56	H	no	no	30 minutos	2 y 3 dchos
97/13	99	M	no	no	30 minutos	4 dcho
77/09	79	M	no	no	inferior a dos horas	1 dcho

Grupo 2: Tiempo de supervivencia entre 2 y 24 h

Caso	Edad	Sexo	Tratamiento médico	Tratamiento quirúrgico	Tiempo de supervivencia	Bloques
290/10*	88	M	si	no	11 h y 20 min	10 dcho, 10 izdo
117/09	94	M	si	no	16 horas	1, 2 izdos
299/10*	78	H	si	no	16 horas	1, 2 y 3 dchos
308/14*	53	H	no	no	20 horas	2, 3 y 4 izdos
11/15*	27	H	si	no	20 horas	10 y 11 izdos
38/15	90	H	si	no	24 horas	10 izdo

Grupo 3: Tiempo de supervivencia entre 24 h y 30 días

Caso	Edad	Sexo	Tratamiento médico	Tratamiento quirúrgico	Tiempo de supervivencia	Bloques
318/13*	88	M	si	no	5-6 días	3 y 4 izdos
90/11*	87	M	si	no	11 días	1 y 2 dchos
36/11*	38	H	si	no	17 días	1 y 2 dcho
12/15*	83	M	si	no	20 días	2 y 3 dchos y 10 izdo
62/09	88	M	si	no	26 días	10 y 11 izdos
17/11*	51	H	si	no	30 días	11 izdo

Grupo 4: Tiempo de supervivencia superior a 30 días

Caso	Edad	Sexo	Tratamiento médico	Tratamiento quirúrgico	Tiempo de supervivencia	Bloques
34/13	83	H	si	no	3 meses	10, 11 dchos
95/11	66	M	si	no	7 meses (218 días)	1, 2, 3 izdos

(* Santiago)

2.C.- Procesamiento de los bloques tisulares

Inclusión en parafina

El procedimiento de inclusión en parafina se realizó con los siguientes pasos:

Deshidratación:

Etanol 70° 1h

Etanol 96° 1h

Etanol 100° 3x 1h

Aclarado

Xilol	1h
Xilol	2x 30 min

Impregnación

En parafina (60°C)	2x 2h
--------------------	-------

Sección

Las secciones (4 micras) se realizaron con un microtomo tipo Minot (Microm HM 350 S). Los cortes se recogieron en portas xilanizados (Dako®, Glostrup, Dinamarca) y se dejaron secar en estufa a 60°C (18-24h).

2.D.- *Técnicas Histológicas*

2.D.a.- Hematoxilina-Eosina

Como control de las muestras se realizó una Hematoxilina-Eosina con el siguiente procedimiento:

Desparafinado e Hidratación

Las secciones se pasan sucesivamente por:

xilol	3x 5 min
etanol 100°	2x 5 min
etanol 96°	2x 5 min
etanol 70°	5 min
agua corriente	

Hematoxilina 5 min

Lavar agua corriente

Eosina 3 min

2.D.b.- Técnica inmunohistoquímica

Desparafinado e Hidratación de los cortes.

Recuperación antigénica:

Para la realización de la recuperación antigénica, los cortes de 4 micras fueron tratados con calor mediante microondas a 750 W durante 20 minutos con tampón Tris-Edta (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 9). Se dejan enfriar los cortes durante 20 minutos a temperatura ambiente en el mismo tampón.

Reacción inmunohistoquímica:

Tras un lavado en PBS (Tampón fosfato salino, 100 mM fosfato pH 7,2; 150 mM NaCl) los cortes se incubaron consecutivamente en :

1.- Anticuerpo primario, durante 1h a temperatura ambiente con los siguientes anticuerpos: CD68 (KP1), PGFA, NF, Bcl2, p53 (FLEX *ready-to-use*, Dako®); β -APP (Invitrogen, CA, USA, a una dilución 1:50) y Vimentina (Dako®, prediluido).

2.- Para eliminar la peroxidasa endógena se incubó la preparación con H₂O₂ 3% en agua destilada (Merck, Darmstadt, Alemania) 10 min a temperatura ambiente (TA).

3.- Como sistema de detección se utilizó un polímero de dextrano (EnVision® dual de Dako, Glostrup, Dinamarca), conjugado con inmunoglobulinas (Ig) anti-conejo y anti-ratón, y con peroxidasa, 30 min TA

4.- El cromógeno utilizado para el revelado fue diaminobencidina (DAB, Dako), preparado siguiendo las instrucciones de la casa comercial (50 μ L DAB en 1mL de tampón de dilución). Se incubó 10 min TA.

5.- Contraintinción con Hematoxilina de Harris 30 s.

Entre las distintas etapas se realizaron 2 lavados de 5 minutos con PBS y tras la DAB el lavado se llevó a cabo con agua destilada. Las diluciones de anticuerpos primarios se prepararon con un diluyente comercial de anticuerpos (Dako). En todos los casos se incluyeron controles negativos, en los que se sustituyó el anticuerpo primario por PBS.

Las preparaciones fueron observadas y fotografiadas en campo claro con un microscopio Olympus Provis AX 70, equipado de una cámara digital Olympus DP70 de alta resolución (Olympus Corp, Tokyo, Japan). Se interpretó positividad y por tanto la localización de las proteínas, por la presencia de la coloración marrón-tabaco característica de la DAB.

2.E. Estudio de las muestras

En todos los casos se valoraron las características macro y microscópicas convencionales, tales como la presencia de hemorragia intracraneal y su observación microscópica mediante hematoxilina-eosina.

Se valoró la positividad del p53, el Bcl-2 por la presencia de somas positivos, y en el β -APP por la presencia de axones teñidos con la coloración marrón característica del DAB. En el caso del CD68 y el PGFA que son siempre positivos, se valoró la morfología celular así como el número de células por campo. En el caso de β -APP también se observó su patrón de distribución y en el de los neurofilamentos la alteración de la morfología axonal.

2.F.- Cuantificación de la inmunorreactividad

Para cuantificar los resultados del PGFA y del CD68, se realizó un conteo de las células teñidas por campo. Para ello se fotografiaron, a un

aumento de 20x, cuatro zonas de sustancia blanca y cuatro zonas de sustancia gris, que no estuvieran directamente afectadas por la hemorragia o la necrosis, pero que fueran próximas a la lesión. Se contabilizaron las células *de visu* sobre dichas fotografías y se hizo la media aritmética para obtener la densidad celular de cada caso. Dicho valor se comparó con la media de células marcadas por campo (al mismo aumento) en los controles, graduando así de forma semicuantitativa el grado de positividad. Se consideró por separado el número de células presentes en sustancia gris, del número presente en sustancia blanca.

Se consideró que existía hiperplasia cuando con el PGFA se observaba un 50% más de células que en los controles (tanto en sustancia blanca como gris). Se estableció este valor de referencia en base a los estudios de Weber y cols (2013) y de Li y cols (2012).

El CD 68 fue considerado positivo cuando su densidad era mayor del 100% que los controles. Cuando el aumento fue de 200 a 300% se le asignaron dos cruces y por encima del 300% se les asignaron tres cruces. Para establecer estos parámetros se tuvo en cuenta el análisis cuantitativo realizado por Smith y cols (2013).

Los resultados fueron incluidos en una tabla de Microsoft Excel para Windows 2010, que incluía los siguientes datos:

- N° de caso
- Edad
- Sexo
- Tratamiento médico y/o quirúrgico
- Tiempo de supervivencia
- Resultados de neurofilamentos (rosarios y bulbos)

- Resultados de PGFA (hipertrofia, hiperplasia y distribución geográfica)
- Resultados de CD68
- Resultados de β -APP (densidad y patrón)
- Resultados de Bcl-2
- Resultados de P53

Los resultados del aumento relativo de la densidad celular expresados por el PGFA y el CD68 se expresaron en tablas de contingencia.

2.G.- *Análisis estadístico:*

Para realizar la comparación estadística de las densidades celulares se utilizó el programa SPSS (IBM versión 20).

Para comparar la tendencia central de la densidad celular observada en todos los grupos con PGFA y con CD68 se realizó, en primer lugar, un test ANOVA que resultó significativamente diferente, por lo que se comprobó el comportamiento normal de nuestra muestra con el test de Kosgorov-Smirnov y, posteriormente se aplicó el test de Scheffe para la comparación “post hoc” de cada uno de los grupos con respecto a los controles.







RESULTADOS





RESULTADOS

1.- HALLAZGOS MACROSCÓPICOS

La mayoría de nuestros casos fueron muertes por traumatismos de alta intensidad (accidentes de tráfico, precipitaciones...), pero también existieron algunos casos de traumatismos por caída que incluso en un primer momento fueron considerados banales y que a medio plazo derivaron en hemorragia subdural y en el fallecimiento del sujeto. En este sentido los hallazgos macroscópicos nos dan una primera aproximación a la intensidad del traumatismo.

En la mayoría de los casos eran reconocibles lesiones de los tejidos blandos, que iban desde simples infiltrados hemorrágicos en la galea (hematomas), de mayor o menor extensión, a laceraciones y heridas abiertas (figura 1).

En los accidentes de tráfico es frecuente encontrar fracturas multifragmentarias que casi siempre afectan a la base del cráneo (figura 2). En los traumatismos producidos en el contexto de una caída o una precipitación, es más fácil que exista mayor tiempo de supervivencia, y además que las lesiones óseas consistan en fracturas lineales (figura 3). No siempre se ve afectada la base craneal, lo cual, en un principio es un dato de mejor pronóstico clínico cuando no se asocian a hundimiento del diploe con intrusión de fragmentos.

También era observable mayor o menor grado de remodelación ósea de la fractura dependiendo del tiempo de supervivencia. Los hallazgos macroscópicos en el encéfalo, como el edema y la contusión (figura 4), se producen tanto en los traumatismos de intensidad leve o media como en los de alta intensidad. Sin embargo, las hemorragias intracraneales son características de los de alta energía y fueron una constante en nuestro estudio. Lo más frecuente eran las hemorragias mixtas, habitualmente subaracnoideas asociadas a hemorragias subdurales, pero encontramos todo tipo de hemorragias, incluso intraventriculares (figuras 5, 6 y 7).

En nuestro estudio, cabría dividir a este respecto a nuestros sujetos de estudio en dos grandes grupos: aquellos con el hematoma aún presente (que incluirían los tres primeros grupos de supervivencia) y aquellos que tras tratamiento médico o quirúrgico ya han resuelto la hemorragia (que sería nuestro grupo 4). Estos últimos presentan una impregnación de hemosiderina y fibrina tanto en el córtex cerebral como en las meninges que les confieren un aspecto deslustrado y amarillento. En el caso de las hemorragias extradurales, es posible incluso observar el despegamiento de la meninge del hueso (figura 8). En las siguientes tablas se detallan los hallazgos macroscópicos de cada caso concreto

1.1.- GRUPO 1 (supervivencia menor de dos horas)

Caso nº	T. de supervivencia	Lesiones tejidos blandos	Fracturas bóveda craneal	Fractura base de cráneo	H. Extradural	HSD	HSA	H. intraparenquimatosa
58/11	minutos	si	si	si	no	no	no	no
107/09	minutos	si	si	si	no	si	no	si
92/11	minutos	si	si	si	no	no	si	no
93/11	minutos	si	si	si	no	no	si	no
89/11	30 min.	si	no	no	no	no	si	no
97/13	30 min	no	si	si	no	si	no	si
77/09	< 2 h.	no	no	si	no	no	no	no

1.2.- GRUPO 2 (supervivencia entre 2 y 24 horas)

Caso nº	T. de supervivencia	Lesiones tejidos blandos	Fracturas bóveda craneal	Fractura base cráneo	H. Extradural	HSD	HSA	H. intraparenquimatosa
290/10	11 h. y 20 min	si	no	no	no	si	si	si
117/09	16 h.	si	si	si	no	si	no	si
299/14	16 h.	si	si	si	no	no	si	no
308/14	20h.	si	si	no	no	si	si	no
11/15	20h.	no	no	no	no	si	si	si
38/15	24h.	no	no	no	no	no	si	si

1.3. GRUPO 3 (supervivencia entre 24 horas y 30 días)

Caso nº	T. de supervivencia	Lesiones tejidos blandos	Fracturas bóveda craneal	Fractura base cráneo	H. Extradural	HSD	HSA	H. intraparenquimatosa
318/13	5-6 d.	si	si	no	no	no	si	si
90/11	11 d.	si	no	no	no	si	si	si
36/11	17 d	si	si	no	no	si	si	no
12/15	20 d.	no	no	no	si	si	si	no
62/09	26 d.	si	no	no	no	no	si	si
17/11	30 d.	si	si	no	no	si	no	si

1.4. GRUPO 4 (supervivencia superior a 30 días)

Caso nº	T. de supervivencia	Lesiones tejidos blandos	Fracturas bóveda craneal	Fractura base craneo	H. Extradural	HSD	HSA	H. intraparenquimatoso
34/13	90 d.	no	no	no	si	no	si	si
95/11	218 d.	si	si	no	no	si	si	no



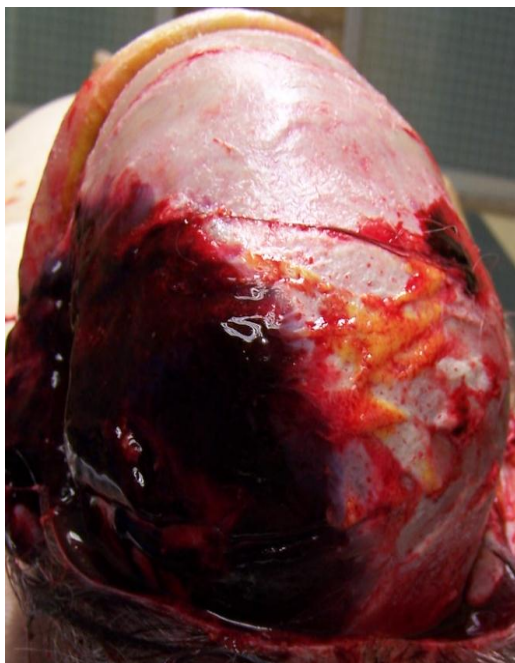


Figura 1. En la imagen se observa infiltrado hemorrágico subgaleal adherido a las serosas

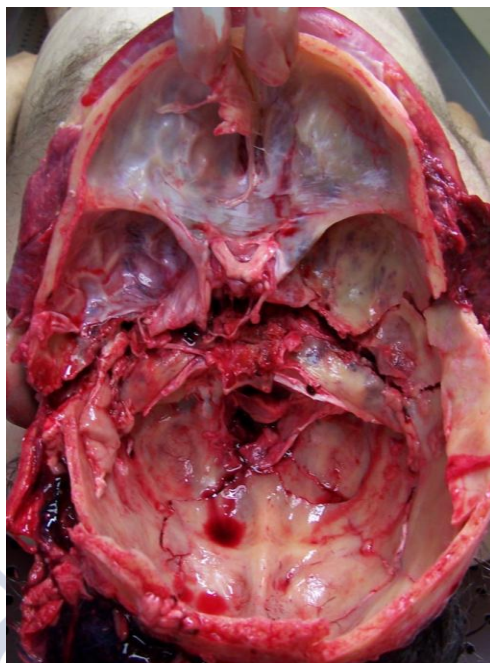


Figura 2. La imagen muestra una fractura de base de cráneo que afecta a ambos peñascos y a la silla turca



Figura 3. Debajo del infiltrado hemorrágico, se observó una fractura lineal de la bóveda craneal.

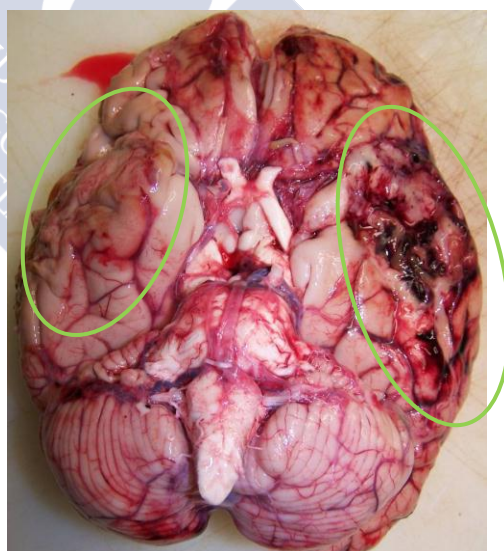


Figura 4. El encéfalo muestra focos de contusión cortical por el golpe directo y por contragolpe

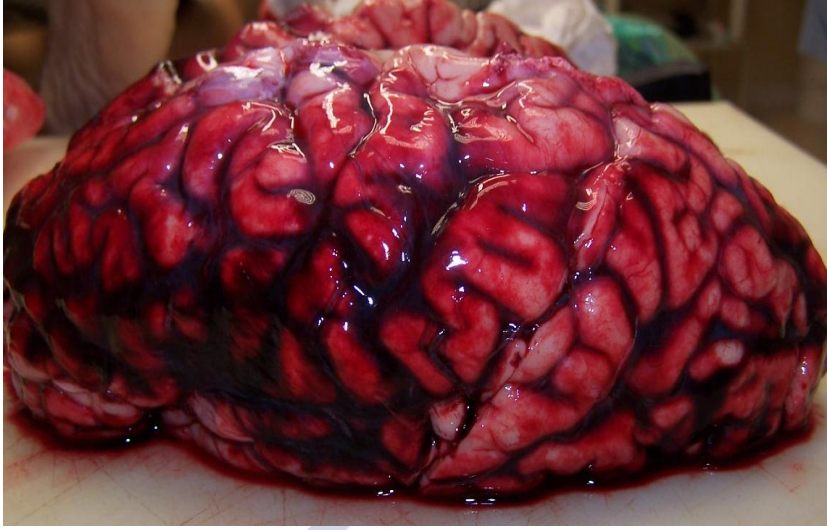


Figura 5. Imagen de una hemorragia subaracnoidea que abarca casi todo el hemisferio izquierdo

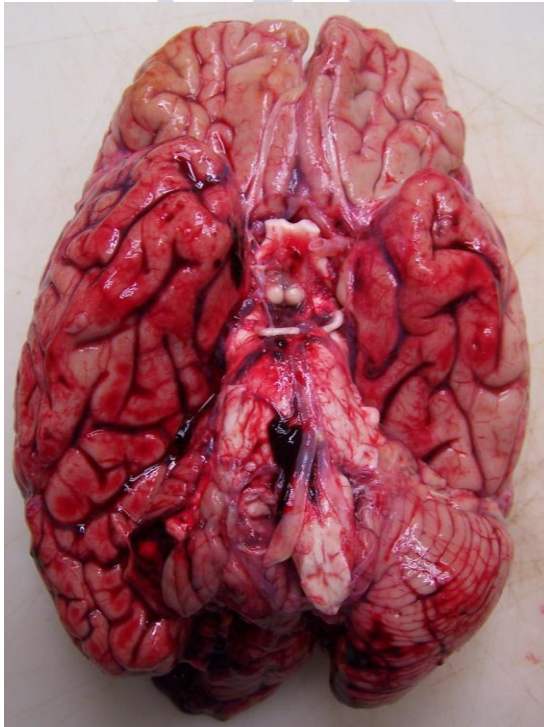


Figura 6. En la imagen se observa una hemorragia intraparenquimatosa occipital derecha.

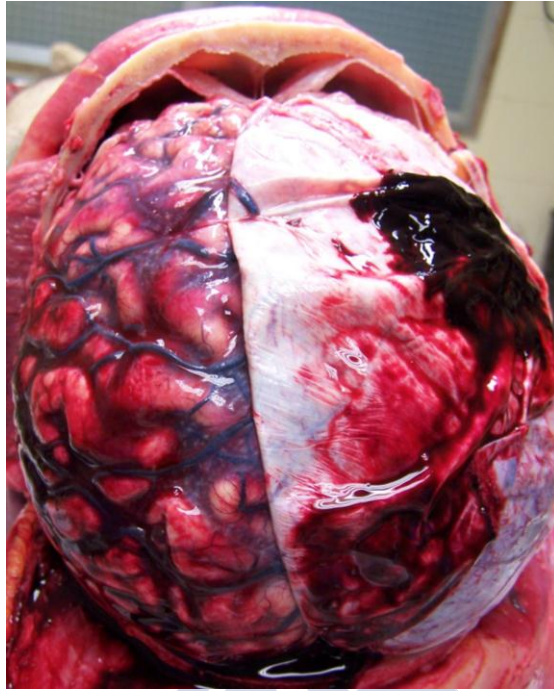


Figura 7. Hemorragia subdural

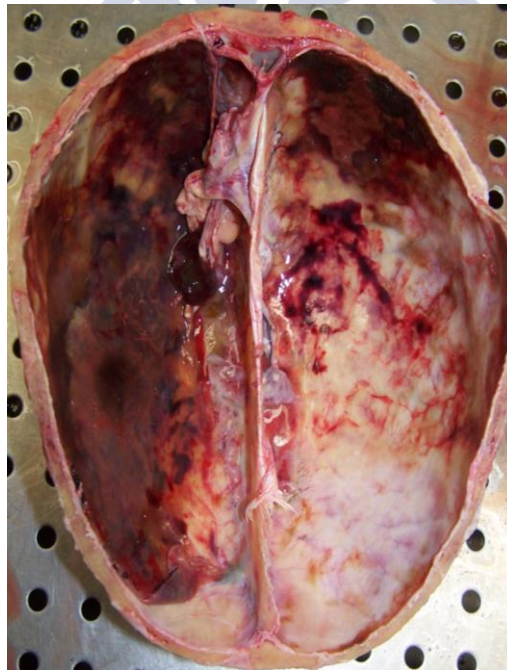


Figura 8. Hemorragia extradural antigua

2.- HEMATOXILINA-EOSINA

GRUPO 1 (supervivencia inferior a dos horas)

En los casos pertenecientes a este grupo se observa con frecuencia hemorragia meníngea, compuesta casi exclusivamente por eritrocitos, aunque ocasionalmente es posible encontrar algún macrófago cargado de hemosiderina (figura 9). En el parénquima cerebral, se observan también focos hemorrágicos consistentes únicamente en la presencia de eritrocitos y la desestructuración del tejido circundante (figura 10). En la sustancia blanca no se observaron cambios significativos, aunque fue posible identificar rosarios, en alguno de los casos con una evolución más larga (figura 11).

En la sustancia gris, las neuronas no mostraban aún cambios morfológicos importantes, pero sí eosinofilia indicativa del comienzo de la necrosis (figura 12). En uno de los casos se hicieron evidentes los defectos de mielinización de la sustancia blanca e incluso una ligera astrogliosis (figura 13). En la sustancia gris, la afectación neuronal era más llamativa que en el resto de los casos, con una mayor eosinofilia y evolución de la necrosis celular.

GRUPO 2 (supervivencia entre 2 y 24 horas)

En este grupo se siguen observando los focos hemorrágicos, tanto en meninges como en el tejido cerebral, pero los macrófagos ya son visibles

también en parénquima, especialmente en la región perivascular (figura 14).

La sustancia blanca ya acusa su afectación que se traduce en huecos en el tejido debido a la desmilitinización y la destrucción axonal (figura 15)

En la sustancia gris, la afectación neuronal es más evidente, no sólo por la eosinofilia de las células, sino por su deshidratación y pérdida de su morfología. En esta fase aún no se observan ni neuronas fantasmas ni halos de retracción (figura 16).

GRUPO 3 (supervivencia entre 24 horas y 30 días)

En estos casos fue posible observar la evolución de la hemorragia meníngea, con hialinización del coágulo, mayor presencia de fibras de colágeno, más infiltrado macrofágico y leucocitario y la menor presencia de eritrocitos, los cuales están deformados y retraídos (figura 17)

La sustancia blanca muestra infiltrado leucocitario de los focos hemorrágicos, en los que hay cada vez mayor número de macrófagos cargados de hemosiderina, y clara desmielinización, siendo posible identificar axones arrosariados e incluso bulbos distales de retracción (figuras 18 y 19). En la sustancia gris, los focos hemorrágicos presentan las mismas características que en la sustancia blanca. Lo más llamativo es la morfología de las neuronas, que son claramente picnóticas y necróticas. Se observan además neuronas fantasma e incluso neuronas apoptóticas con un núcleo aumentado de tamaño y granular, pudiendo encontrar halos de retracción a su alrededor. (figuras 20, 21 y 22)

También fue posible reconocer focos de astrogliosis, en los cuales se apreciaba una desestructuración del tejido y se distinguían astrocitos reactivos (figura 23)

GRUPO 4 (supervivencia superior a 30 días)

En este grupo lo más destacable fue la astrogliosis generalizada tanto en la sustancia blanca como en la gris.



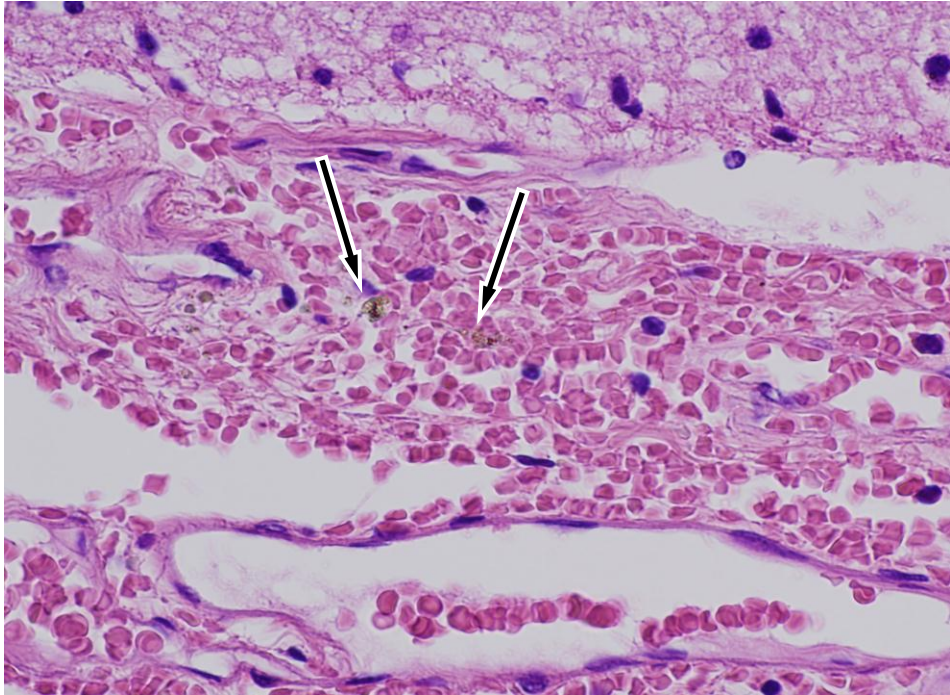


Figura 9. Hemorragia subaracnoidea con macrófagos cargados de hemosiderina. (H-E, 40X)

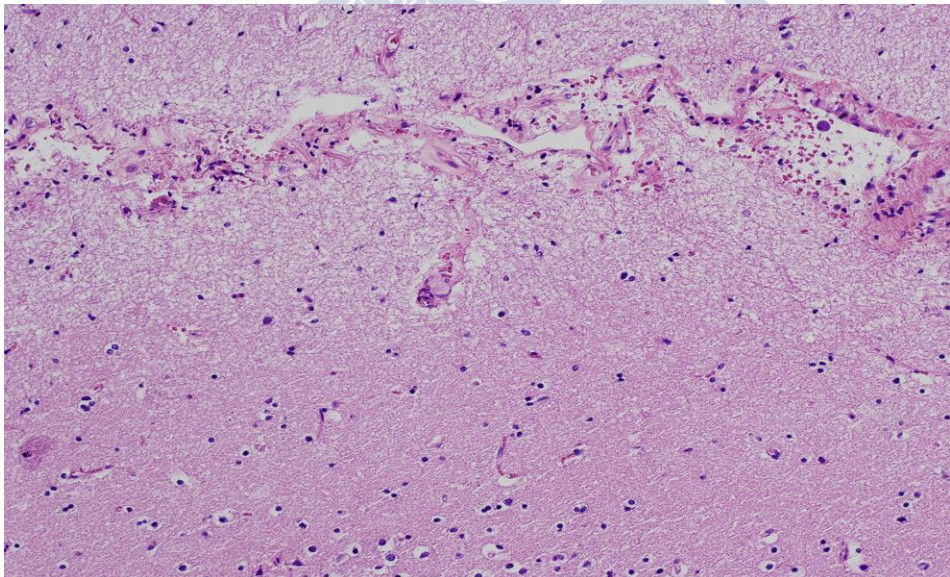


Figura 10. En la parte superior de la imagen se observa la desestructuración del tejido debido a una hemorragia intraparenquimatosa. (H-E, 10X)

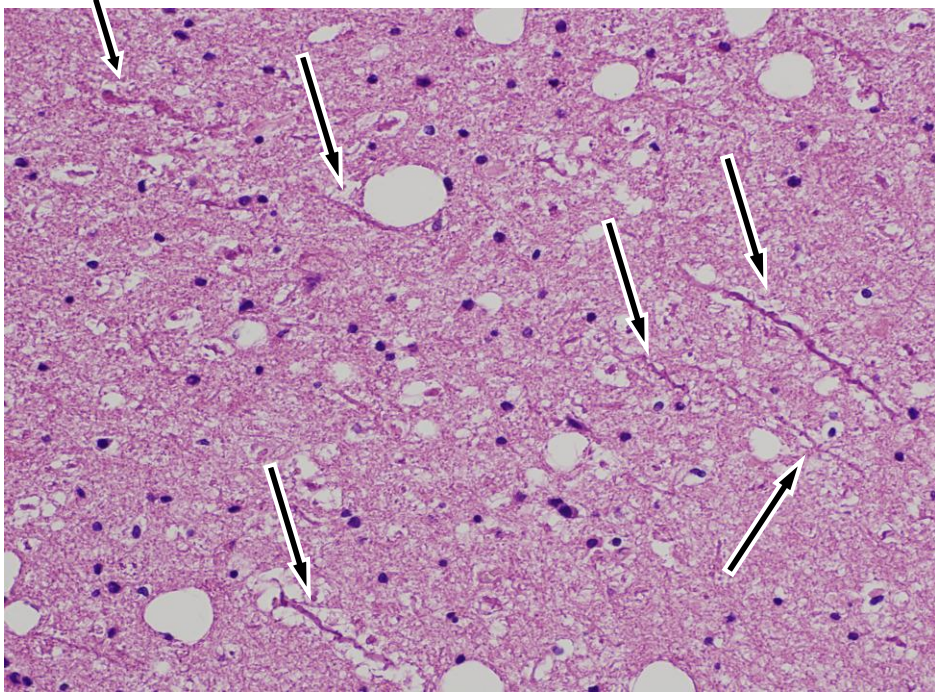


Figura 11. Las flechas señalan rosarios axonales en sustancia blanca. (H-E, 20X)

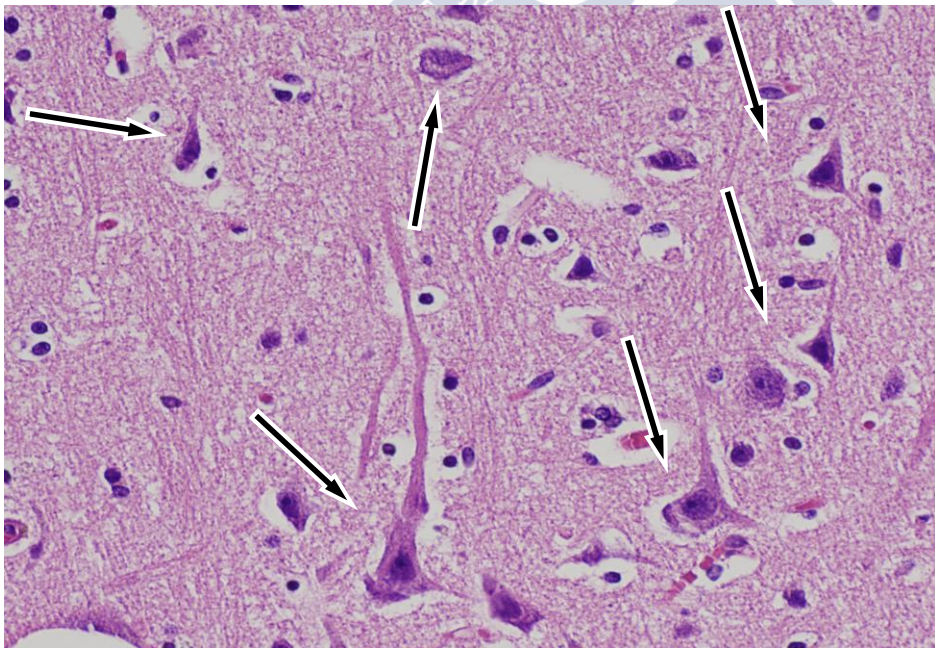


Figura 12. Las flechas señalan algunas de las neuronas eosinofílicas picnóticas que se observan en la imagen. (H-E, 20X)

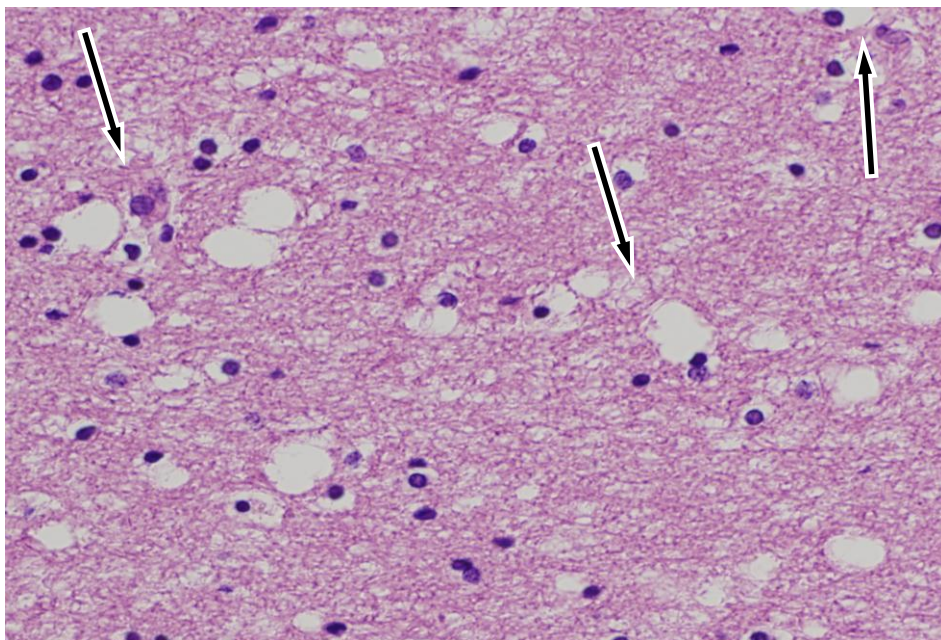


Figura 13. En esta imagen se observa la desmielinización de la sustancia blanca y astrocitos hipertróficos. (H-E, 20X)

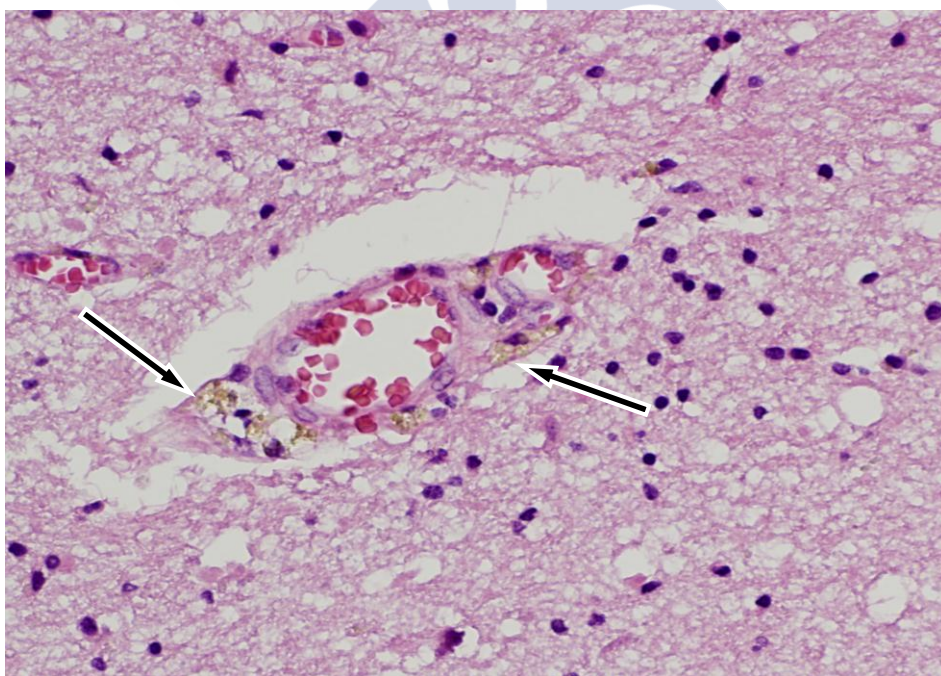


Figura 14. Las flechas señalan la presencia de macrófagos cargados de hemosiderina perivasculares. (H-E 20X)

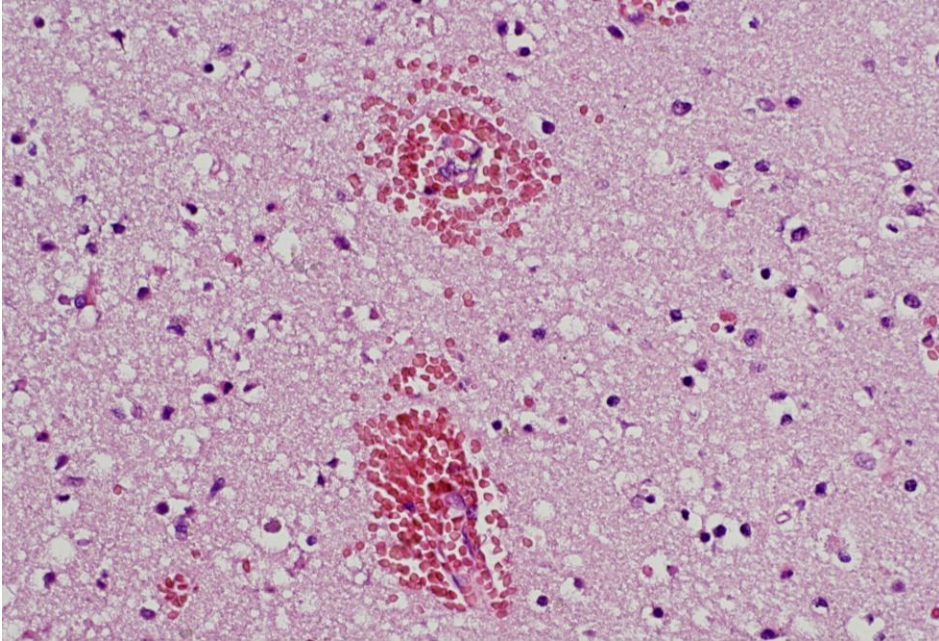


Figura 15. En esta imagen se observan focos hemorrágicos en sustancia blanca asociados a demielinización, sin infiltrado macrófagico asociado.(H-E, 20X)

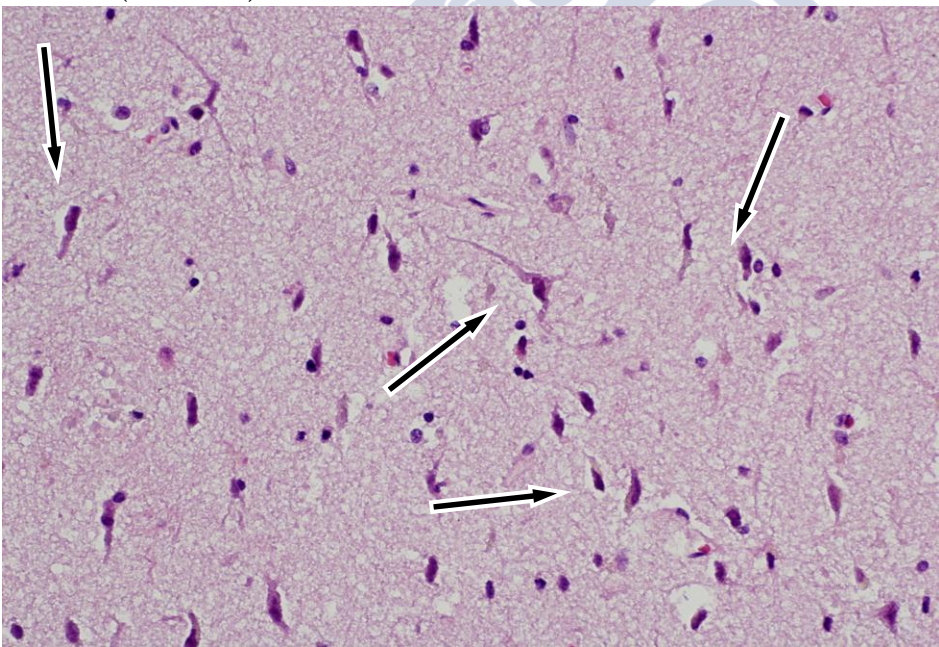


Figura 16. La necrosis neuronal está más avanzada, observándose retracción de los somas lo que da lugar a halos de retracción

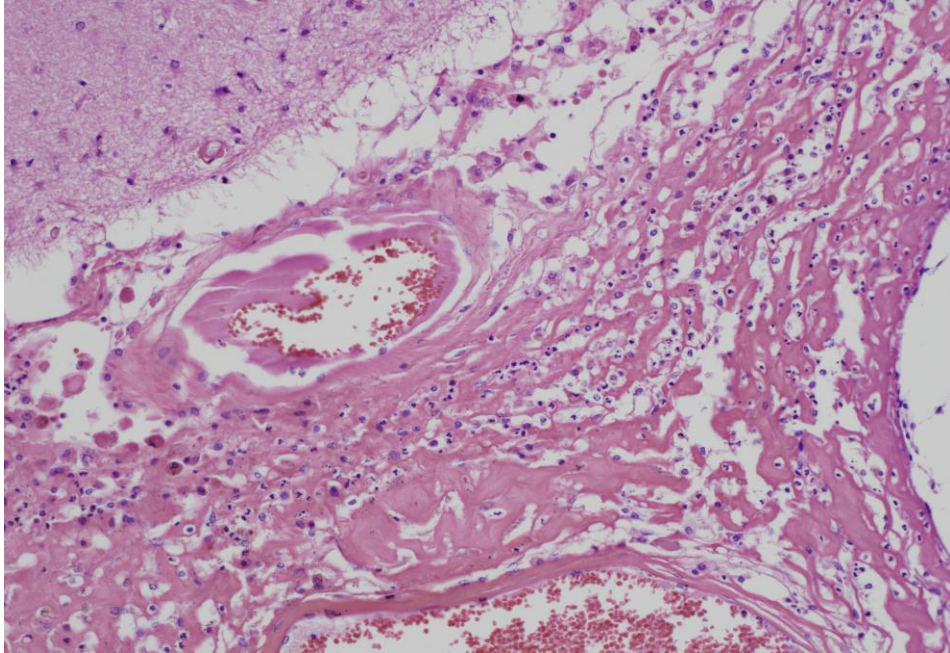


Figura 17. Coágulo subaracnoideo con infiltrado leucocitario, hialinización y aumento de las fibras colágenas. (H-E, 20X)

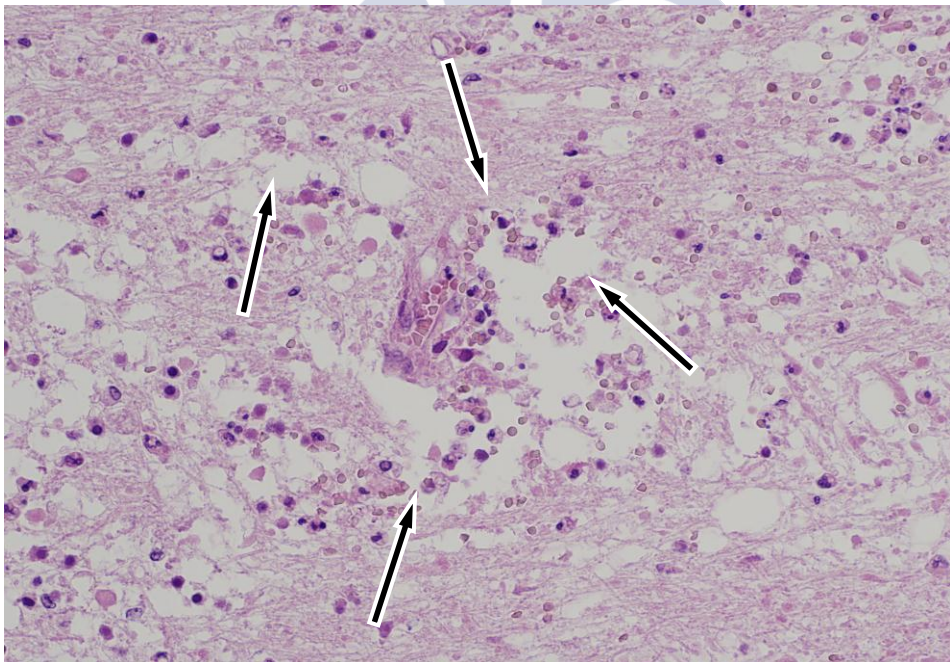


Figura 18. Hemorragia en sustancia blanca con macrófagos cargados de hemosiderina, desmielinización y destrucción de los axones. (H-E 20X)

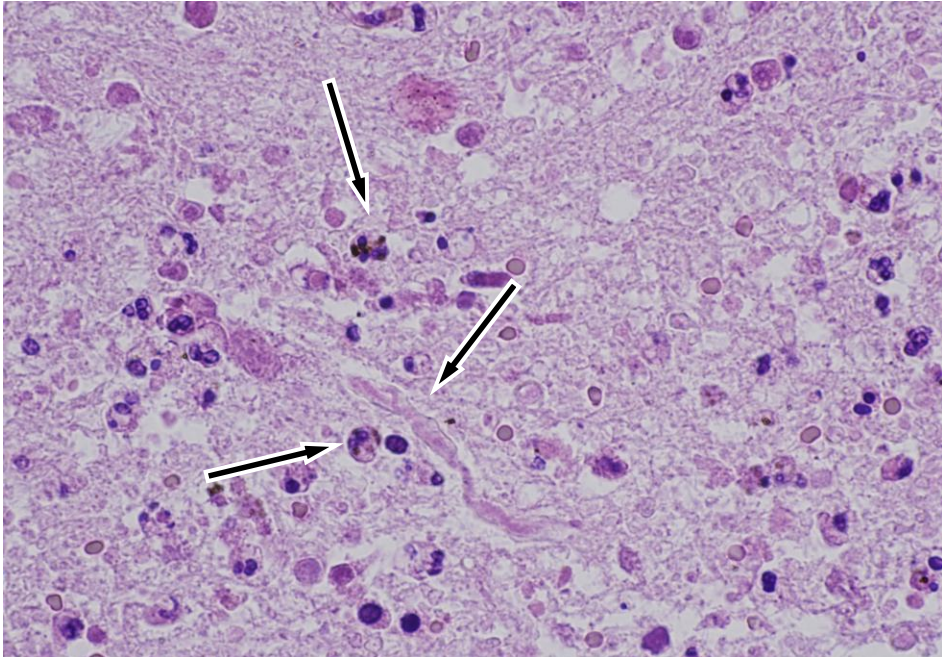


Figura 19. Las flechas señalan axones edematosos y arrosariados con infiltrado de macrófagos y polimorfonucleares asociado. (H-E 20X)

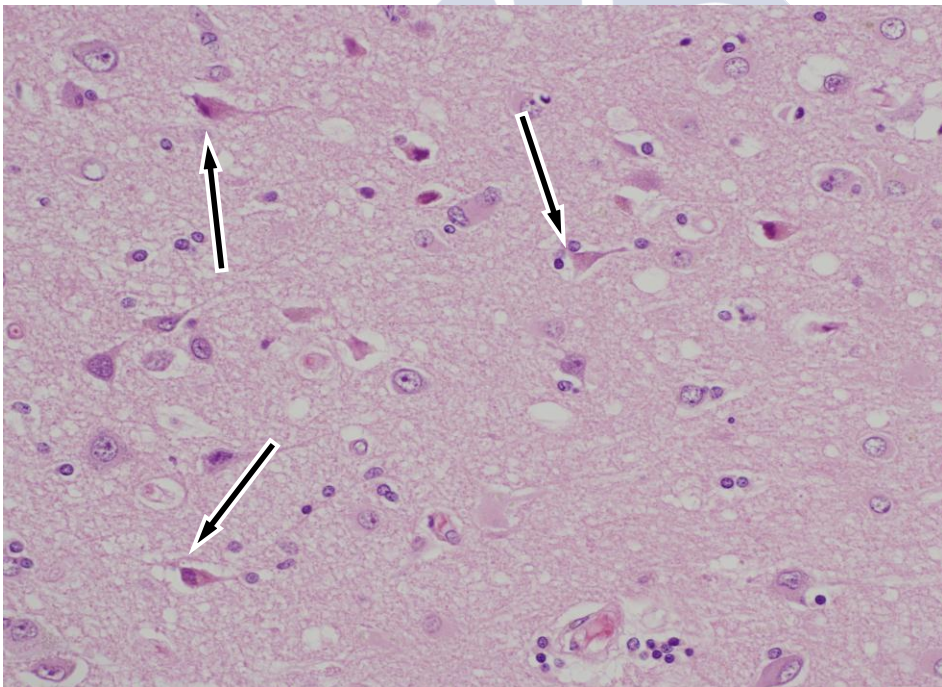


Figura 20. La necrosis neuronal continúa avanzando: mayor eosinofilia, halos de retracción más amplios y citoplasma granular. (H-E 20X)

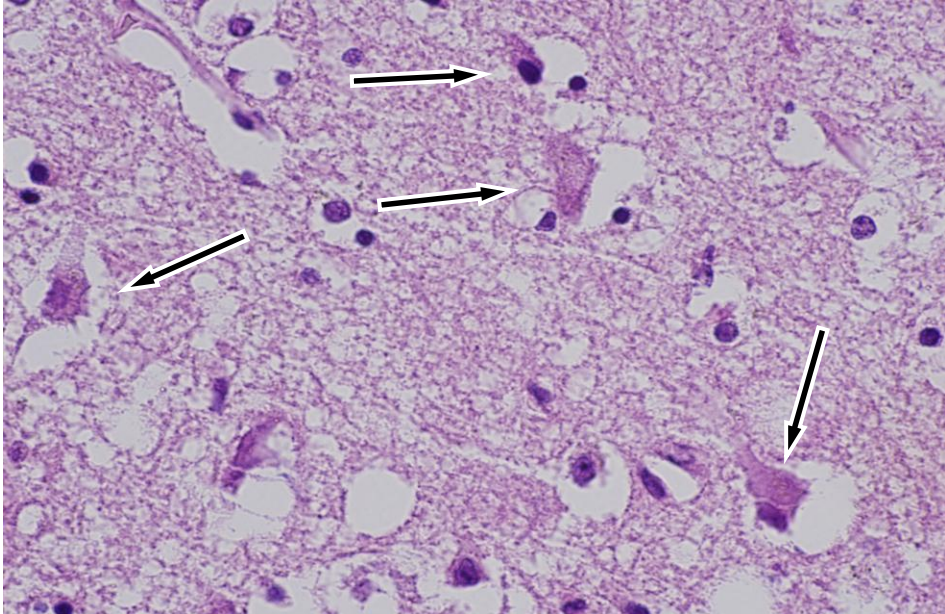


Figura 21. Al avanzar la necrosis, las neuronas pasan a ser neuronas fantasmas, amorfas, con citoplasma en cristal esmerilado y cariorrexis.(H-E, 40X)

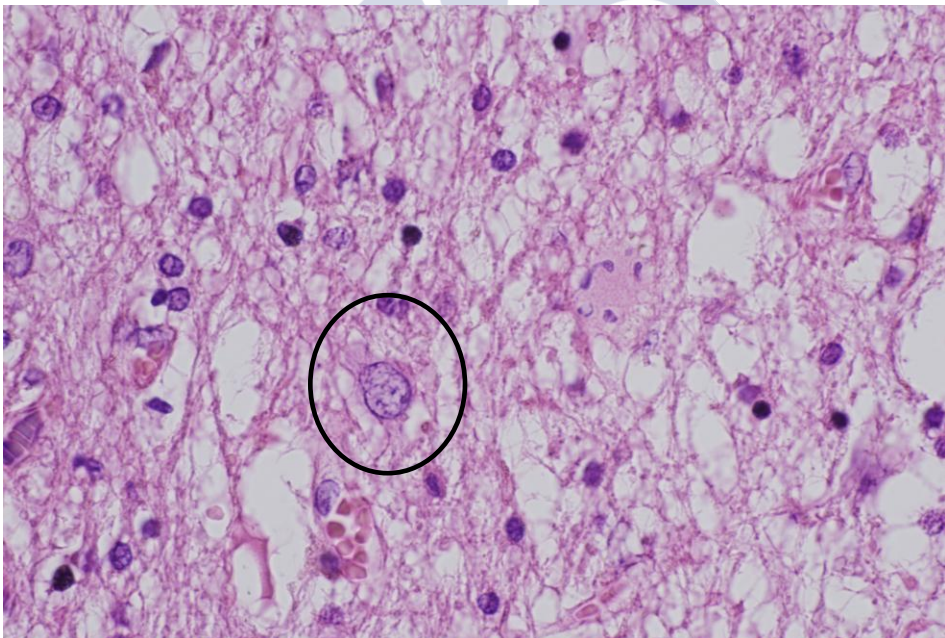


Figura 22. El círculo marca una neurona apoptótica en zona de lesión. El núcleo presenta una característica condensación marginal de la cromatina. (H-E 40X)

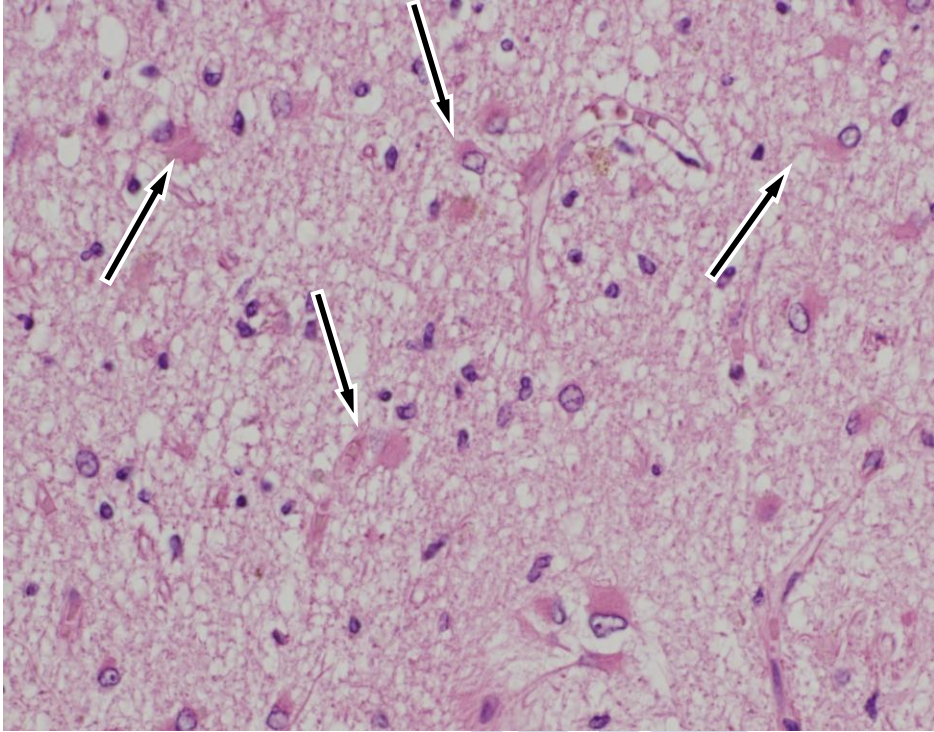


Figura 23. Las flechas señalan abundantes astrocitos hipertróficos en un tejido desmielinizado (H-E, 20X)

3.- TÉCNICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

3.A.- GRUPO CONTROL

Con el marcador para neurofilamentos se observa positividad en los somas neuronales y sus prolongaciones ya que esta proteína es un constituyente del citoesqueleto. Con frecuencia los cuerpos neuronales muestran una expresión más débil que axones y dendritas (figura 24) En la sustancia blanca son visibles los grandes tractos axonales que presentan una morfología lineal entrecruzándose unos con otros (figura 25). En las capas más superficiales de sustancia gris la tinción es menos densa por la menor presencia de prolongaciones neuronales y éstas son mas rugosas (figura 26).

La PGFA es positiva en los astrocitos tanto protoplasmáticos de la sustancia gris (figura 27) como en los astrocitos fibrosos, localizados sustancia blanca (figura 28) Los primeros tienen un soma redondeado, muy teñido por el marcador, en el que no se distingue el núcleo. Sus prolongaciones son más cortas, densas y homogéneas que las de los astrocitos fibrosos. El soma de estos últimos es más grande con una pequeña proporción de citoplasma en relación al núcleo y largas prolongaciones que apenas se dividen. En ambos casos los astrocitos muestran prolongaciones que envuelven los vasos sanguíneos y que forman parte de la barrera hematoencefálica. A nivel corticas en la superficie se observan también astrocitos fibrosos que con sus largas prolongaciones contribuyen a formar la barrera glial-pial.

El CD 68 marca la microglía tanto la residente como la activada, así como los macrófagos. Dado que en el grupo control no hay patología

inflamatoria, sólo se observa la residente, en especial en la sustancia blanca. Su aspecto es el de células alargadas con un núcleo central redondeado con escaso citoplasma teñido polarizado en dos extremos con escasas prolongaciones (figuras 29 y 30).

El precursor del β -amiloide tiñe neuronas (primero el soma y posteriormente el axón) en las que el transporte anterógrado está alterado debido a la entrada patológica de calcio de forma secundaria a un insulto en el SNC. Por ello en el grupo control este marcador resulta completamente negativo (figura 31)

Del mismo modo, los genes Bcl-2 y p-53 se expresan en somas de neuronas que han activado la cascada de la apoptosis, por lo que en el grupo control también son negativos. El Bcl-2 también es un marcador fisiológico de linfocitos T, motivo por el cual también es visible en algún caso problema considerado negativo para neuronas, sirviendo así este caso también como control positivo de la técnica inmunohistoquímica (figuras 32 y 33).

El marcador para la vimentina en los casos control, se expresó en el epitelio vascular, por ser esta proteína un componente habitual de estas células. Sin embargo, su expresión en astrocitos es prácticamente nula, si bien es visible en alguna célula aislada débilmente teñida. Esto es debido a que este marcador se expresa en células en proliferación, y dado que los astrocitos no son una estirpe celular aquiescente, siempre existe alguna célula proliferativa que se hace visible con este marcador (figura 34).

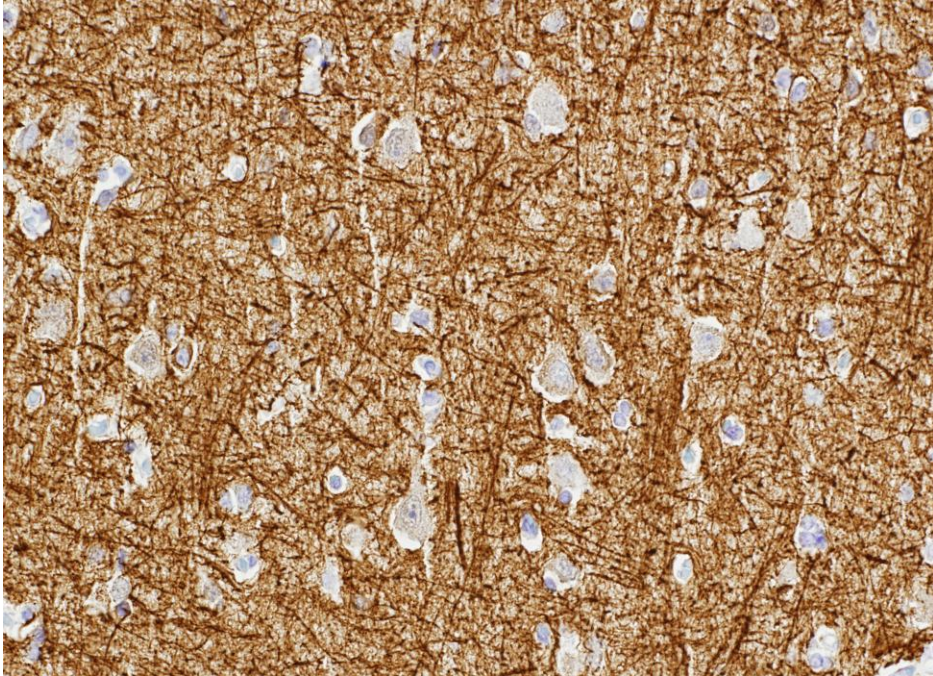


Figura 24. Con el marcador de NF los axones aparecen intensamente teñidos en sustancia gris, mientras los somas neuronales aparecen escasamente teñidos. (NF,20X)

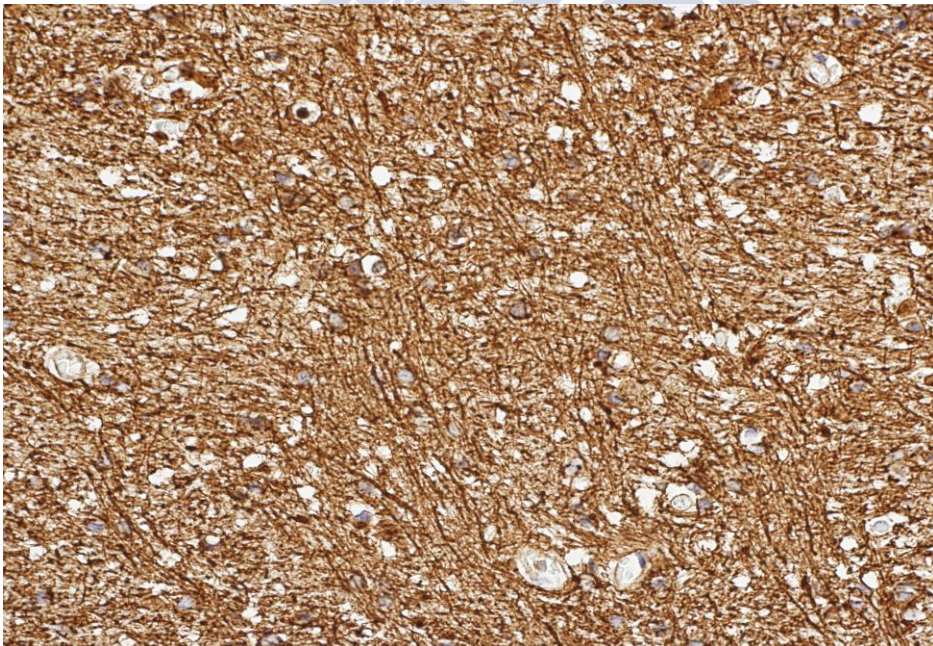


Figura 25. Axones teñidos en sustancia blanca formando haces paralelos que se entrecruzan entre sí. (NF,20X)

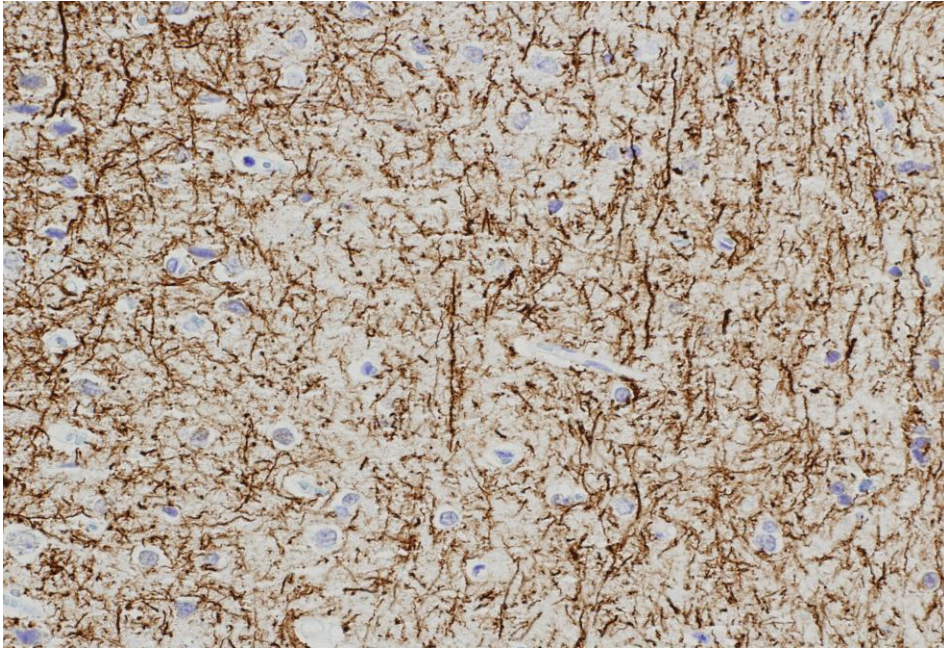


Figura 26. En las capas más superficiales de la sustancia gris las prolongaciones son mas delgadas y arrugadas y su densidad es menor, quizá porque se trate de dendritas. (NF, 20X)

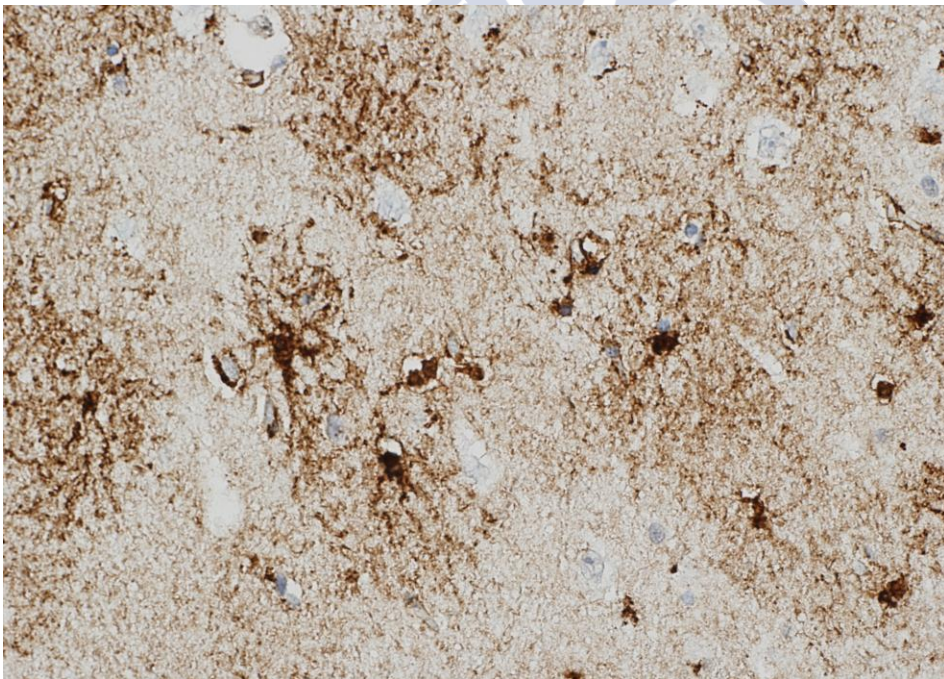


Figura 27. La imagen muestra astrocitos protoplasmáticos sanos en sustancia gris. (PGFA, 20X)

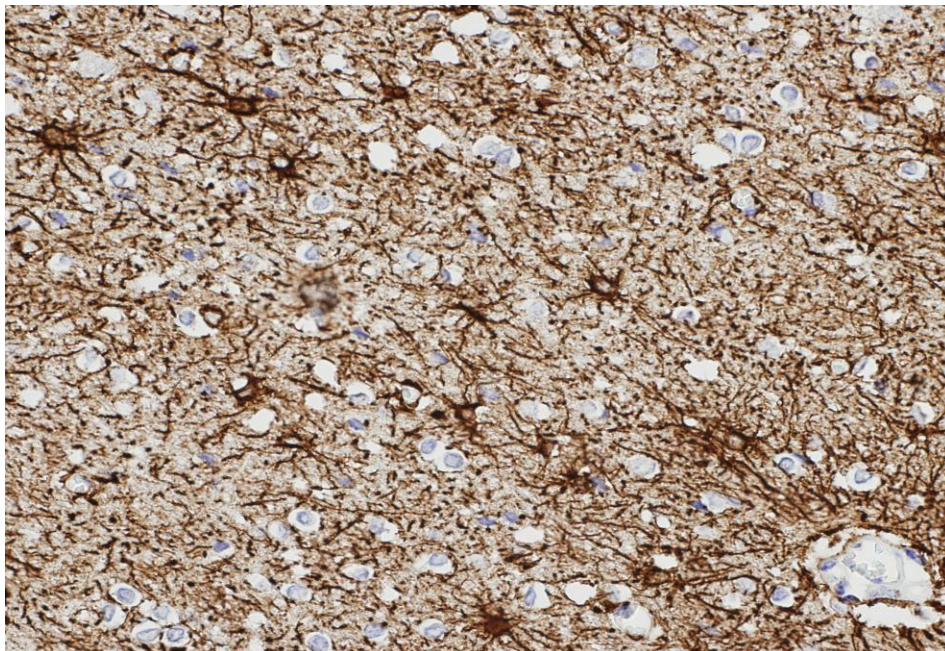


Figura 28. Esta imagen muestra astrocitos fibrosos sanos de la sustancia blanca. (PGFA, 20X)

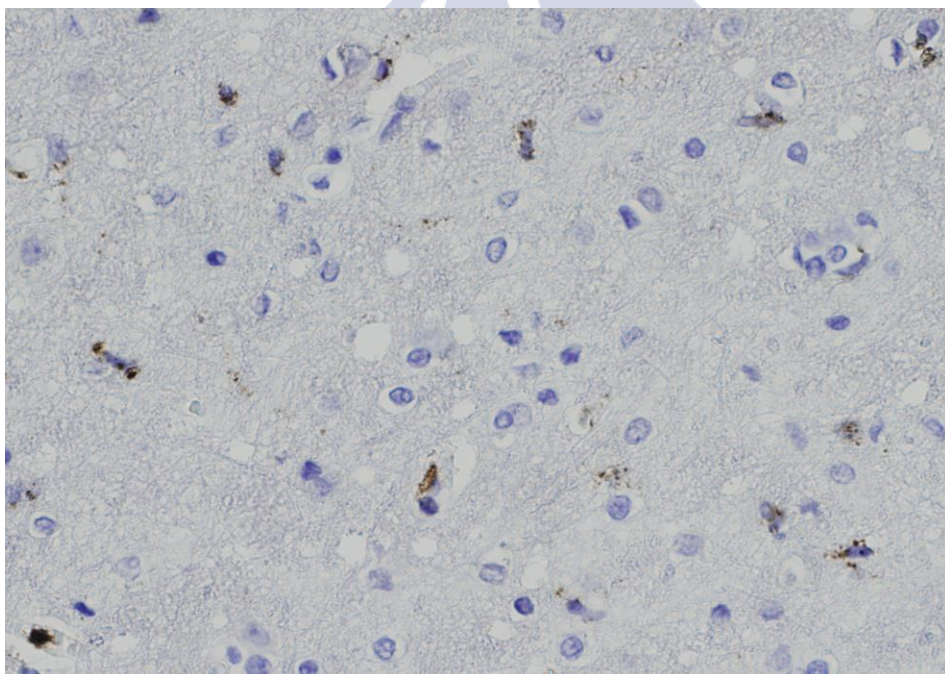


Figura 29. La imagen presenta microglía residente normal en sustancia blanca. (CD68, 20X)

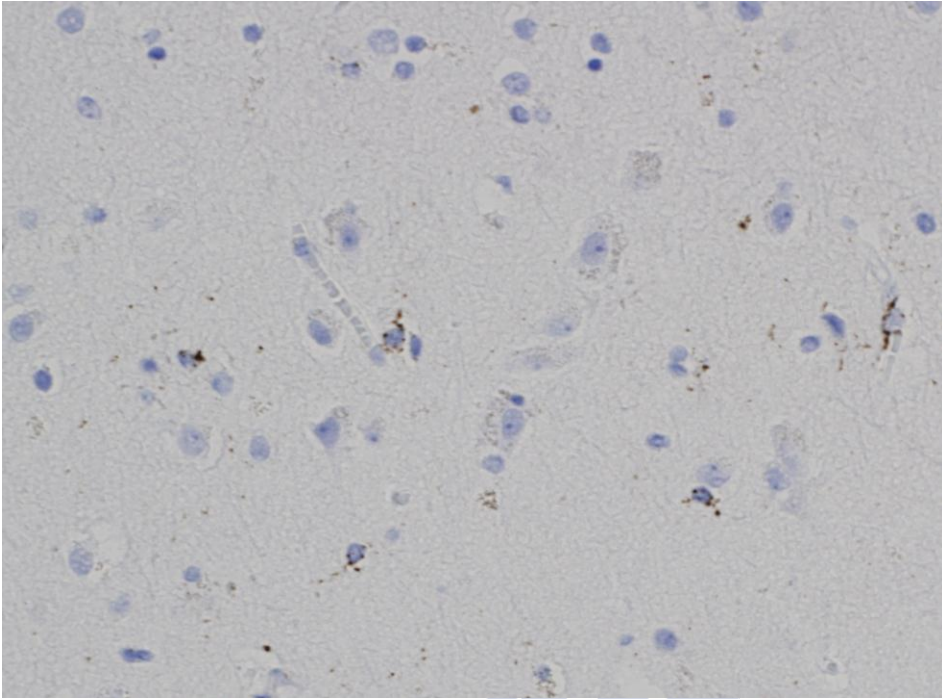


Figura 30. Esta imagen representa la microglía residente en sustancia gris. (CD68, 20X)

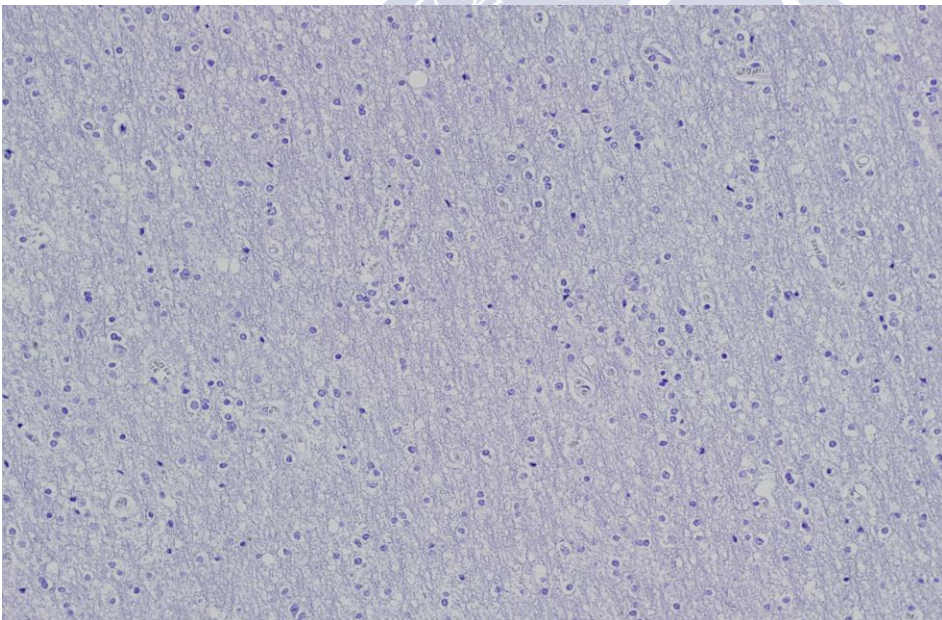


Figura 31. Negatividad para precursor del β - amiloide en sustancia blanca. (B-APP, 10X)

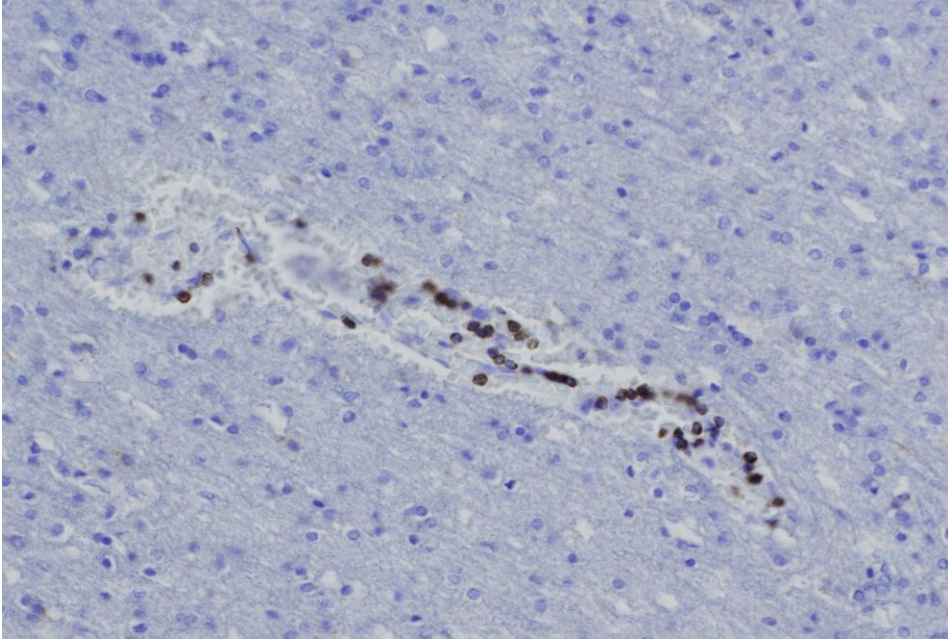


Figura 32. Negatividad para Bcl-2 en sustancia blanca. Los Linfocitos de los vasos sanguíneos se marcan de forma fisiológica con este marcador. (Bcl-2,20X)

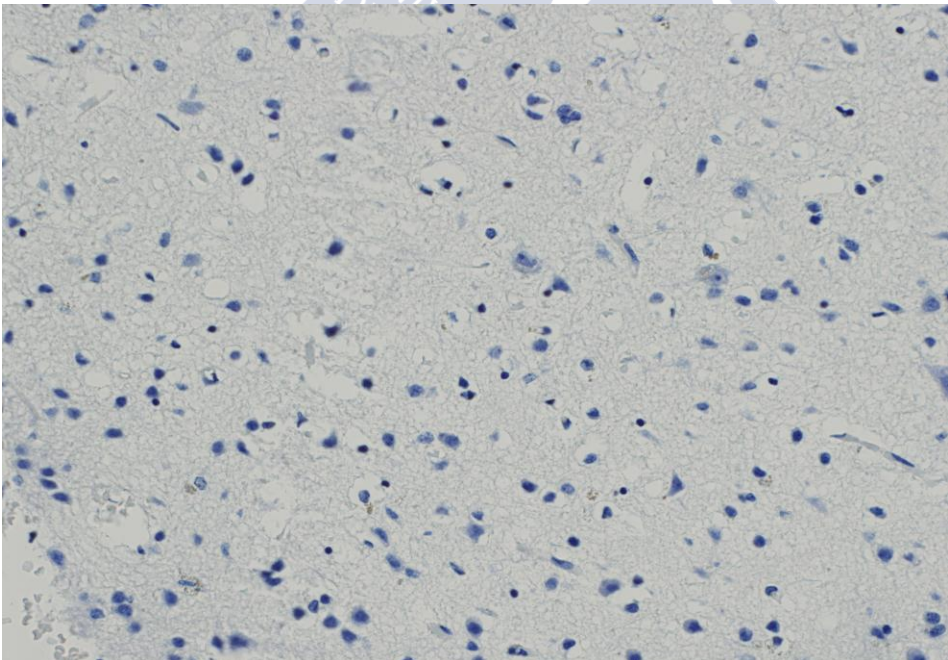


Figura 33. Negatividad para p53 en sustancia gris. (p53, 20X)

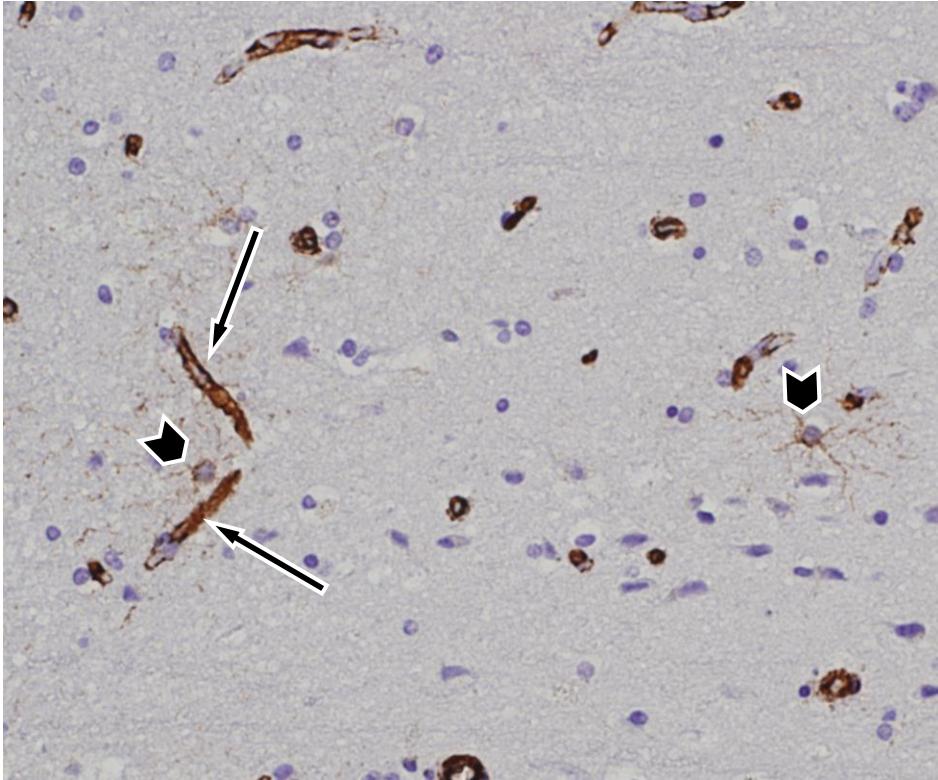


Figura 34. En la imagen se observan vasos intensamente teñidos con vimentina (flechas) y escasos astrocitos proliferativos débilmente teñidos (cabezas de flecha). (Vimentina, 20X)

3.B.- GRUPO 1 (supervivencia inferior a dos horas)

Neurofilamentos

A diferencia de lo observado en el córtex control, se observaron axones con una morfología arrosariada (en número variable) en el córtex en todos los casos estudiados, en especial en las regiones más superficiales (figura 35). Si bien, incluso en el grupo control, estos axones son menos regulares que en el resto del tejido, es lógico que esta sea la zona con más rosarios, ya que es la primera afectada por la contusión.

La presencia de bulbos axonales es ocasional en este grupo, en el que sólo fue posible encontrar un bulbo distal aislado en un caso (figura 36) y algún bulbo proximal en otro caso (figura 37). Resultó llamativo el comportamiento del soma neuronal en cinco de los casos de este grupo. Se teñía con mayor intensidad que en el córtex de los casos control (figura 38) reflejando una acumulación de neurofilamentos en el soma neuronal y era evidente la retracción del mismo, dejando un halo alrededor. Esos mismos halos de retracción fueron llamativos también en la sustancia blanca de tres de esos casos.

PGFA

En la mayoría de las muestras estudiadas, los astrocitos presentaban una morfología normal sin aumento del número de procesos ni aumento de la relación citoplasma/núcleo. Es decir, no se observaba hipertrofia y era claramente distinguible la morfología de los

astrocitos fibrosos de los protoplasmáticos. Incluso alrededor de zonas hemorrágicas, esta estirpe celular no mostraba cambios ni tampoco se observaba organización de los mismos alrededor de los focos hemorrágicos (figuras 39 y 40).

No obstante, en dos casos de mayor tiempo de supervivencia sí que se apreciaba un cambio en la morfología astrocitaria, mostrando una hipertrofia (más redondeados y con un citoplasma más abundante y teñido con más intensidad y más prolongaciones) (figuras 41 y 42); y en otros casos existía un engrosamiento asimétrico de la barrera hematoencefálica (BHE) a cargo de un aumento del grosor de las prolongaciones de los astrocitos (figuras 43 y 44).

Tras realizar el conteo de células sólo se objetivó hiperplasia en dos casos que tenían una lesión previa y un tiempo de supervivencia dudoso, respectivamente. Tampoco se observó en ningún caso la disposición geográfica de los astrocitos alrededor de la lesión, es decir, es pronto para que se haya organizado la cicatriz astrocitaria.

En resumen, en este periodo de tiempo, los astrocitos aún no habían tenido tiempo de presentar una reacción visible, y si bien es posible observar astrocitos dañados y necróticos en la zona lesionada y sus alrededores, no se observó ninguna reacción específica de esta estirpe celular en el parénquima. Por otra parte, la reacción astrocitaria en la BHE es más precoz, pudiendo ser detectada a partir de la media hora tras el impacto.

Caso n°	T. de supervivencia	N° medio de células en sustancia blanca PGFA	Desviación respecto a los controles	N° medio células sustancia gris PGFA	Desviación respecto a los controles
58/11	minutos	NO HAY TEJIDO		16,7	25,00%
107/09	minutos				
92/11	minutos	16,7	-2,91%	21	57,19%
93/11	minutos	21	22,09%	22,2	66,17%
89/11	30 min.	24	39,53%	16,5	23,50%
97/13	30 min	36	109,30%	44	229,34%
77/09	< 2 h.	20,05	16,57%	13,2	-1,20%

CD68

Al observar las tinciones no eran apreciables cambios en la microglía. Resultaba difícil observarla y casi siempre era prácticamente imposible encontrarla en la sustancia gris, aún a pesar de la presencia de lesión, es decir, sólo veíamos la microglía residente.

Sólo en un caso era obvio el aumento de la densidad de esta estirpe celular. Dato que se confirmó de forma empírica mediante el conteo celular. Sin embargo, fue posible observar la migración de macrófagos, aunque sólo perivascularmente (estas células no fueron tenidas en cuenta para el conteo), en dos casos (figura 45). Dado que el hecho de que se encuentren macrófagos alrededor de un vaso, no puede considerarse de forma inequívoca un signo inflamatorio, observamos que sí habían migrado al parénquima, y su presencia era obvia en un caso (figura 46). Otros dos casos presentaban algunas células cuya morfología podría ser considerada como la de un macrófago (más redondeada y su pigmentación más densa), si bien resulta difícil afirmarlo de forma categórica. Por supuesto, los macrófagos eran muy abundantes en el

espacio subaracnoideo debido a la presencia de hemorragia en esta región, pero nuestro estudio estaba centrado exclusivamente en el parénquima cerebral y sus signos inflamatorios.

Caso nº	T. de supervivencia	Nº medio de células en sustancia blanca CD 68	Desviación respecto a los controles	Nº medio de células en sustancia gris CD68	Desviación respecto a los controles	Presencia de macrófagos
58/11	minutos	NO HAY TEJIDO		9,5	-26,92%	no
107/09	minutos					
92/11	minutos	15,7	-17,89%	19,7	51,54%	no
93/11	minutos	21,7	13,49%	16,7	28,46%	dudoso
89/11	30 min.	24,7	29,18%	16,7	28,46%	dudoso
97/13	30 min	28	46,44%	46	253,85%	+
77/09	< 2 h.	25,2	31,80%	17,05	31,15%	no

Proteína precursora del β -amiloides (β -APP)

En este grupo este marcador sólo era visible, y de forma débil, en el soma neuronal. Sólo en dos casos pudimos observar marcaje en axones dañados. En el primero de ellos la tinción fue muy débil y consistía en un punteado difuso resultando muy difícil su interpretación. Sin embargo, en el de supervivencia cercana a las dos horas fue claro observar focos de axones lesionados (figura 47).

Genes de apoptosis Bcl-2 y p53

Estos marcadores resultaron negativos en todos los casos. El gen Bcl-2 era observable en los linfocitos T presentes en las hemorragias, lo

cual nos confirmaba que tan rotunda negatividad no era un defecto de tinción o un fallo del marcador.

Vimentina

Este grupo de casos de pocos minutos de evolución, su expresión resultó muy similar a la de los controles, sin que se apreciara aumento de tinción en las células del tejido cerebral ni en la sustancia blanca, ni en la sustancia gris (figura 48).



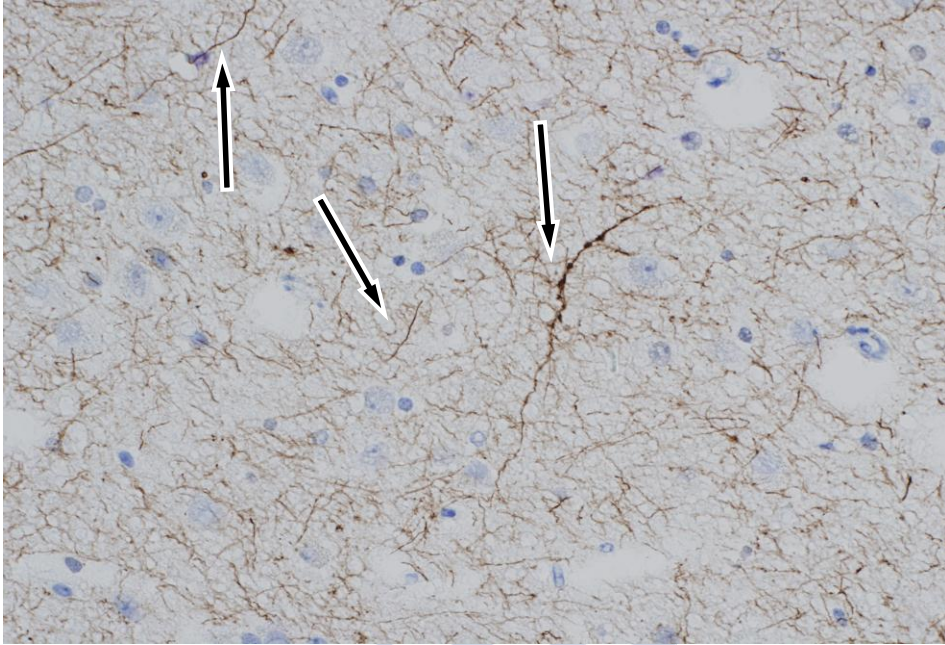


Figura 35. Las flechas señalan axones arrosariados en sustancia gris. (NF, 20X)

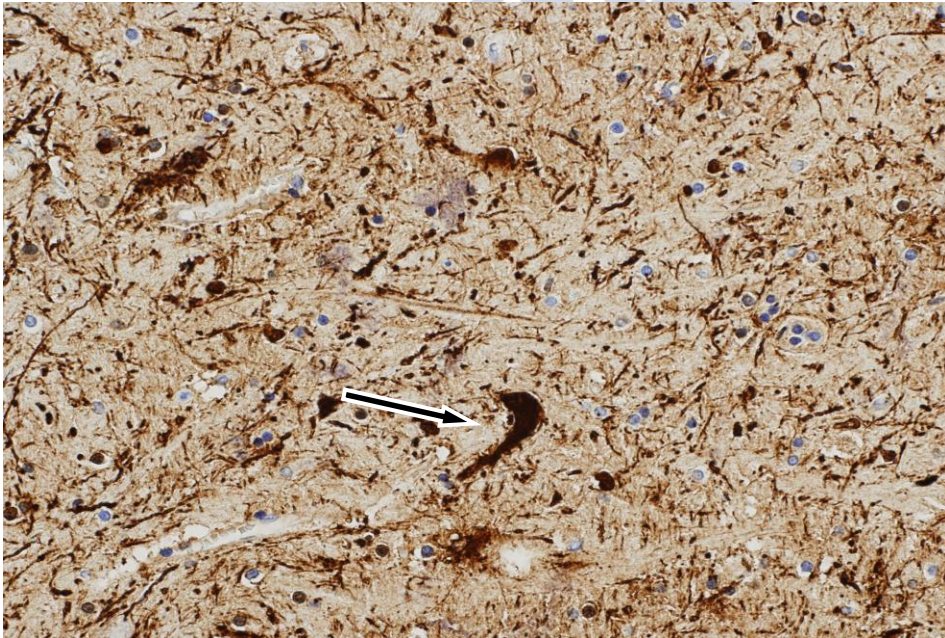


Figura 36. La flecha marca un bulbo distal en la sustancia blanca llena de rosarios axonales y axones rotos. (NF, 20X)

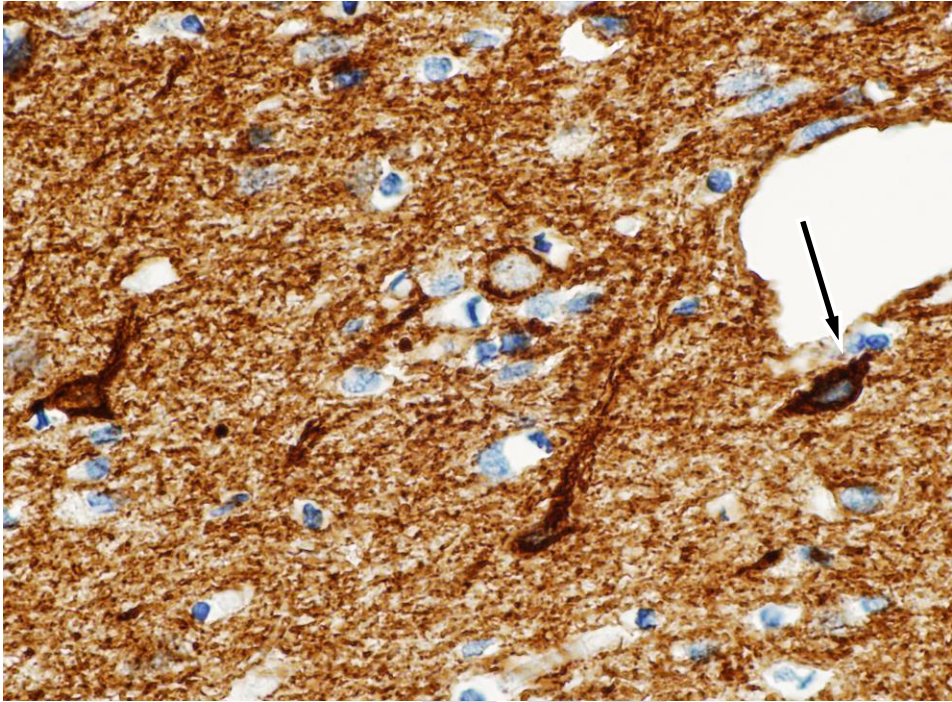


Figura 37. La flecha indica un bulbo proximal en sustancia gris.(NF, 20X.)

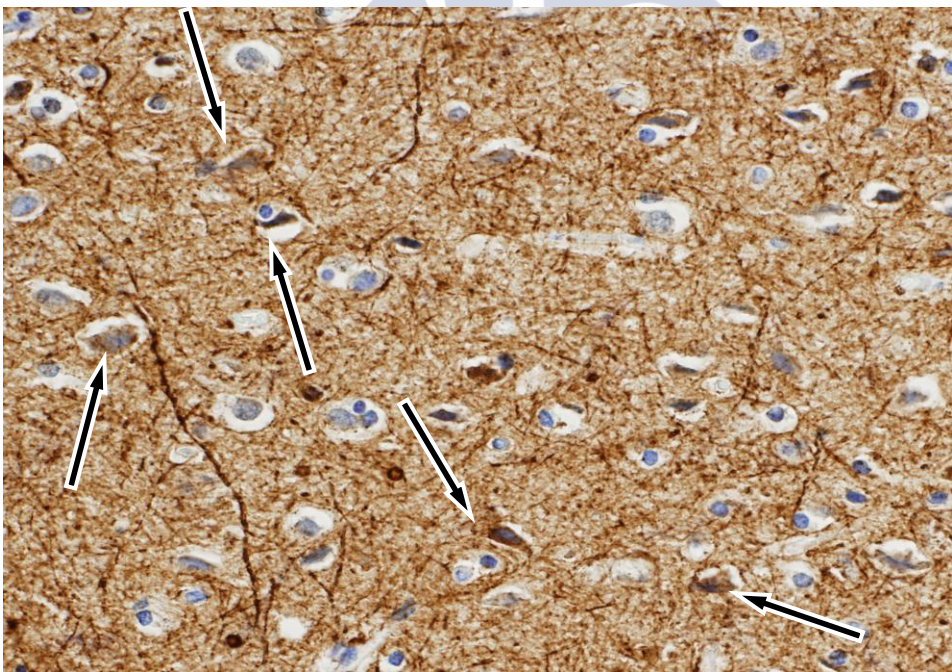


Figura 38. Las flechas marcan somas neuronales teñidos intensamente con halo de retracción alrededor y axones arrosariados. (NF. 20 X)

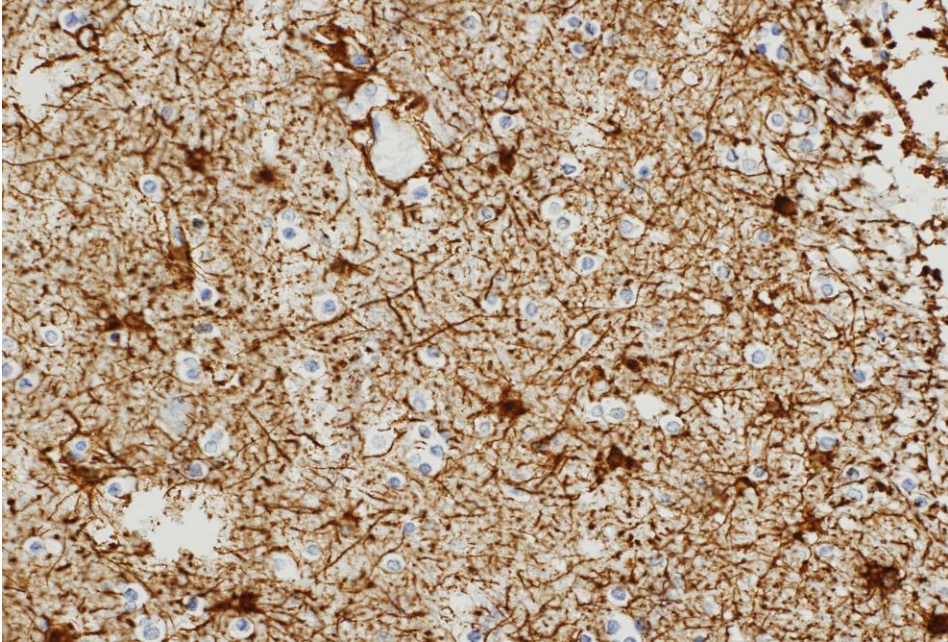


Figura 39. Zona hemorrágica en sustancia blanca sin que se observen cambios morfológicos en los astrocitos fibrosos. (PGFA, 20X)

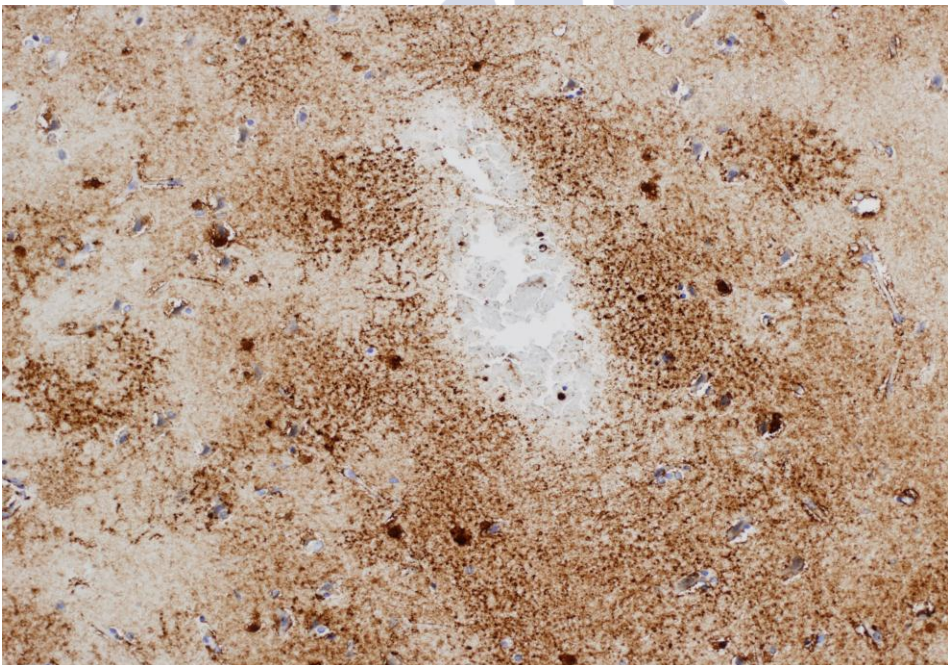


Figura 40. Zona hemorrágica en sustancia gris sin que se observen cambios morfológicos en los astrocitos protoplasmáticos. (PGFA, 20X)

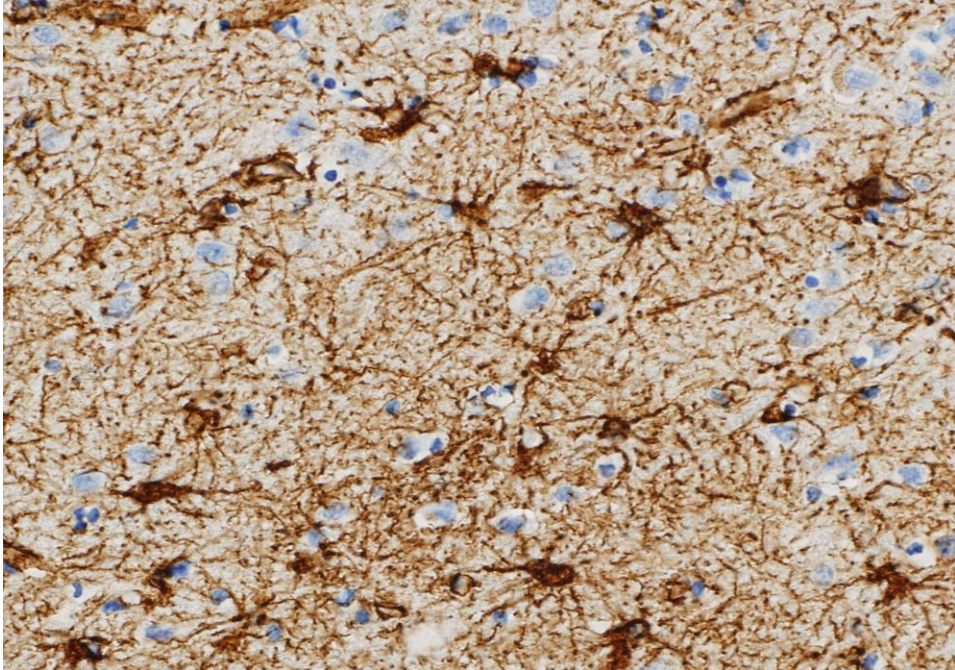


Figura 41. En la imagen se ven astrocitos protoplasmáticos hipertróficos con una mayor proporción citoplasma/núcleo y más prolongaciones. (PGFA 20X)

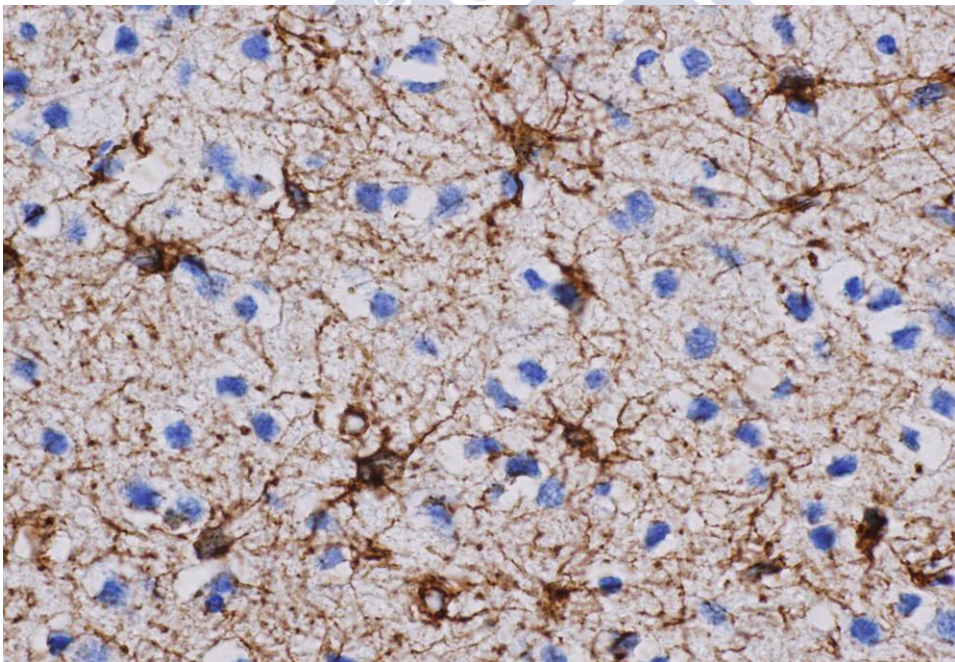


Figura 42. Astrocitos fibrosos hipertróficos con las mismas características que los anteriores. (PGFA, 20X)

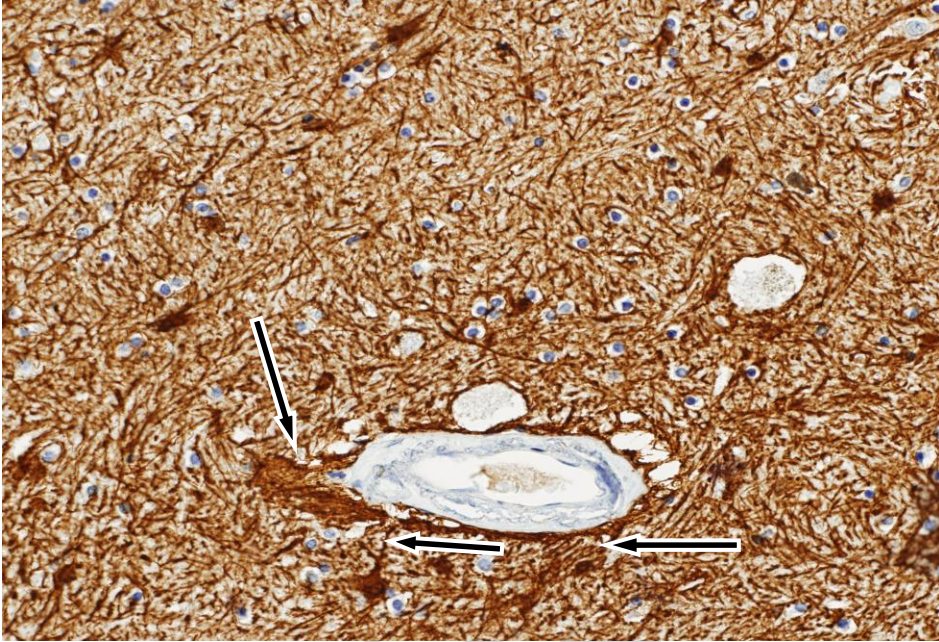


Figura 43. Engrosamiento asimétrico de la BHE. Se observa el aumento de las prolongaciones astrocitarias. (PGFA, 20X)



Figura 44. Engrosamiento de la BHE con aumento de los astrocitos en las proximidades. (PGFA, 10X)

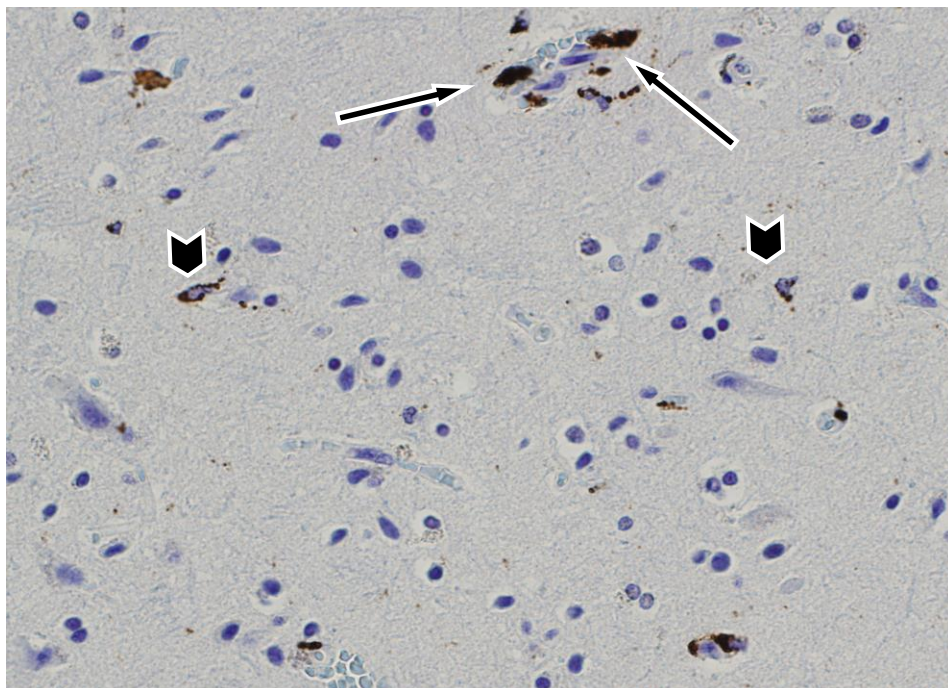


Figura 45. Macrófagos perivascular, mas grandes, amorfos y oscuros (flechas) y microglía residente, algadas y bipolares (cabezas de flecha). (CD68, 20X)

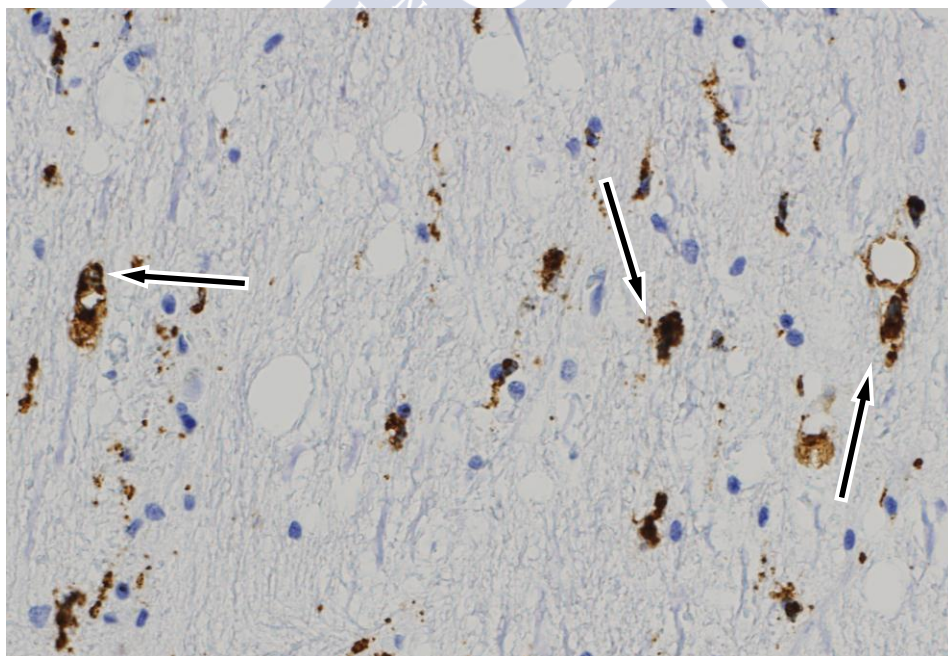


Figura 46. En esta imagen los macrófagos han invadido el parénquima de sustancia blanca. (CD68, 20X)

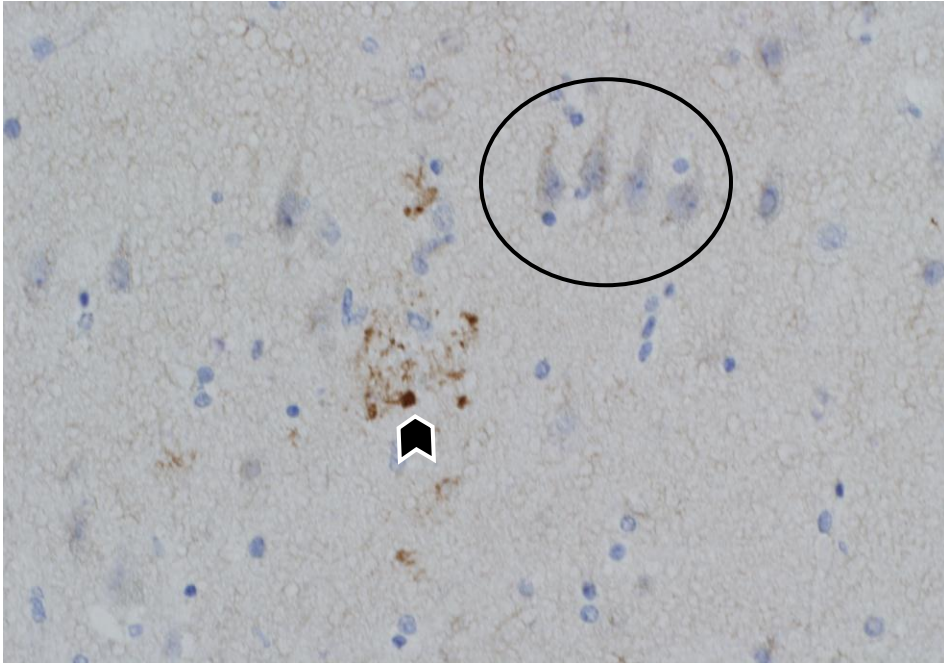


Figura 47. En este grupo se observó el primer positivo en somas neuronales (círculo) y axones dañados (flechas). (β -APP, 20X)

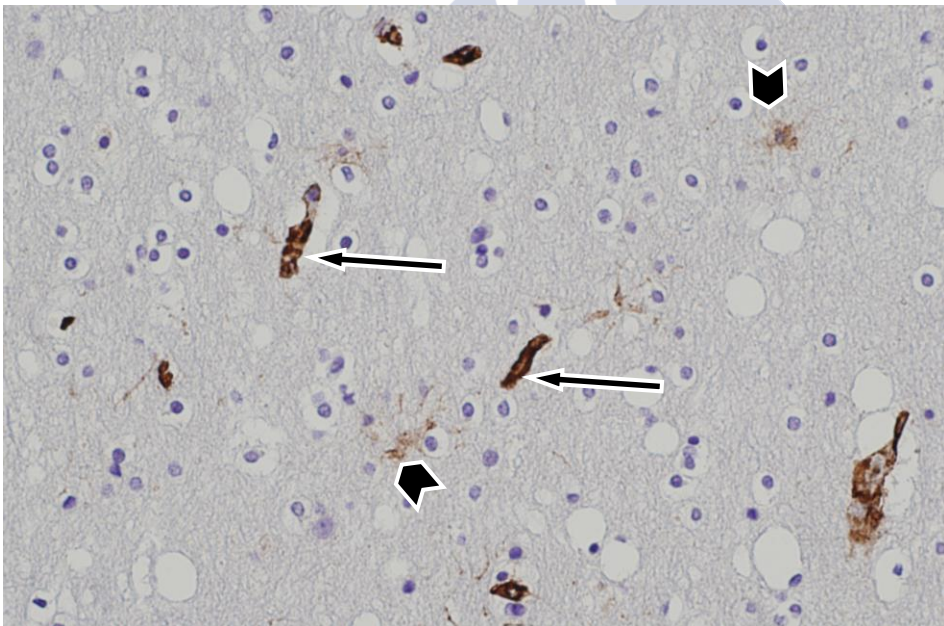


Figura 48. En la imagen se observa la misma tinción intensa del endotelio (flechas) y débil de escasos astrocitos (cabezas de felcha) que en los casos control

3.C. GRUPO 2 (supervivencia entre 2 y 24 horas)

Neurofilamentos

La formación de rosarios axonales fue una constante en este grupo, sobre todo en la sustancia gris, en especial en las zonas próximas a la hemorragia y alrededor de los vasos. En cambio, son más difíciles de observar en la sustancia blanca. Sólo dos casos presentaban rosarios en la sustancia blanca (figura 49) En cualquier caso, lo que sí es evidente, es que los rosarios eran de mayor diámetro que los observados en el grupo anterior.

Los bulbos proximales empezaron a ser observables en todos los casos en mayor o menor cantidad, excepto en un caso. Lo más llamativo en este grupo es la tinción de los somas neuronales. En otros cuatro casos se observan somas neuronales con una tinción intensa junto con otros menos teñidos, alrededor de los cuales se observó un halo de retracción. Normalmente los bulbos axonales se observaron en las que estaban más intensamente teñidas (figura 50)

PGFA

Los astrocitos son ya hipertróficos con somas redondeados y mayor número de prolongaciones, las cuales son más difíciles de distinguir. Estas características no se aprecian sólo en la zona afectada por la hemorragia, sino también en regiones más o menos indemnes del tejido.

La necrosis provocada por la lesión afecta también a los astrocitos. Por ejemplo, en un caso observamos claramente la presencia de astrocitos necróticos (sobre todo en los bordes de la lesión) deformes y retraídos junto con otros sanos e hipertróficos (figuras 51 y 52)

La BHE muestra distintos tipos de alteraciones. En algunos casos, no se encontraba engrosada, sino destruida, rota y directamente afectada por la hemorragia (figura 53). En algún caso, es francamente hipertrófica (figura 51) y en otros, se observa la lesión de estas estructuras, pero también se aprecia el envío de prolongaciones por parte de astrocitos próximos para reforzarla (figura 54)

La hiperplasia se demostró en todos los casos excepto en dos (ambos con supervivencias inferiores a 20 h). Dicha hiperplasia tuvo lugar sólo en córtex, y sólo en un caso presentó una distribución geográfica sugerente de formación de cicatriz (figura 55).

Caso n°	T. de supervivencia	Nº medio de células en sustancia blanca PGFA	Desviación respecto a los controles	Nº medio de células en sustancia gris PGFA	Desviación respecto a los controles
290/10	11 h. y 20 min	23,5	36,63%	19,5	45,96%
117/09	16 h.	16,2	-5,81%	14,7	10,03%
299/14	16 h.	19	10,47%	21,7	62,43%
308/14	20h.	24,7	43,60%	23,5	75,90%
11/15	20h.	17,5	1,74%	22,7	69,91%
38/15	24h.	23	33,72%	20,5	53,44%

CD68

En este grupo, la microgliosis se hizo evidente tanto en la sustancia blanca como en la sustancia gris en todos los casos, excepto en uno, en el que no se observó ni la microglía residente. La mezcla de la microglía activada con macrófagos fue también una constante (figuras 56 y 57).

En cualquier caso, se consideró un aumento discreto de la densidad celular, ya que en algunos casos, no se alcanzó el 100% del aumento celular y sólo en dos casos se superó ligeramente el 200%. Teniendo en cuenta que los macrófagos que infiltraban el parénquima (no así los perivasculares) también se contabilizaron, estas cifras revelaron una microgliosis difusa incipiente.

Caso nº	T. de supervivencia	Nº medio células en sustancia blanca CD 68	Desviación respecto a los controles	Nº medio de células en sustancia gris CD68	Desviación respecto a los controles	Presencia de macrófagos
290/10	11 h. y 20 min	45,7	139,02%	39,5	203,85%	+
117/09	16 h.		-100,00%		-100,00%	
299/14	16 h.	40	109,21%	25,2	93,85%	+
308/14	20h.	29,7	55,33%	28,2	116,92%	+
11/15	20h.	58,5	205,96%	30	130,77%	+
38/15	24h.	37,5	96,13%	31,7	143,85%	+

Proteína precursora del β -amiloide (β -APP)

En este grupo es cuando nuestros resultados para este marcador son positivos en axones de sustancia blanca y no sólo en los somas neuronales del córtex. . Lo llamativo de nuestra observación, es la

expresión errática de este marcador, con resultados positivos y negativos en casos con una supervivencia similar, y que no se consolida con un mayor tiempo de supervivencia.

Se observaron axones arrosariados e incluso se identificaron bulbos (figura 58) En los dos casos en los que este marcador fue positivo, el patrón difuso de la distribución sugiere que observamos sólo el daño causado por el traumatismo y el contragolpe (figuras 59 y 60)

Genes de apoptosis Bcl-2 y p53

Siguieron siendo negativos para todos los casos, sin que ni siquiera se observaran linfocitos marcados con Bcl-2

Vimentina

En este grupo comienza a observarse la primera positividad a este marcador, a partir de las 16 horas. En estos casos las células teñidas con esta proteína se circunscriben a la zona de la sustancia gris subyacente a la HSA. En dicha región se aprecian astrocitos marcados muy hipertróficos, si bien no se aprecia aún franca hiperplasia (figura 61). No sólo la sustancia blanca no mostraba positividad a este marcador, sino que en las capas profundas del córtex tampoco se encontraron células marcadas, es decir, se trata de una reacción local en el foco de contusión (figura 62)

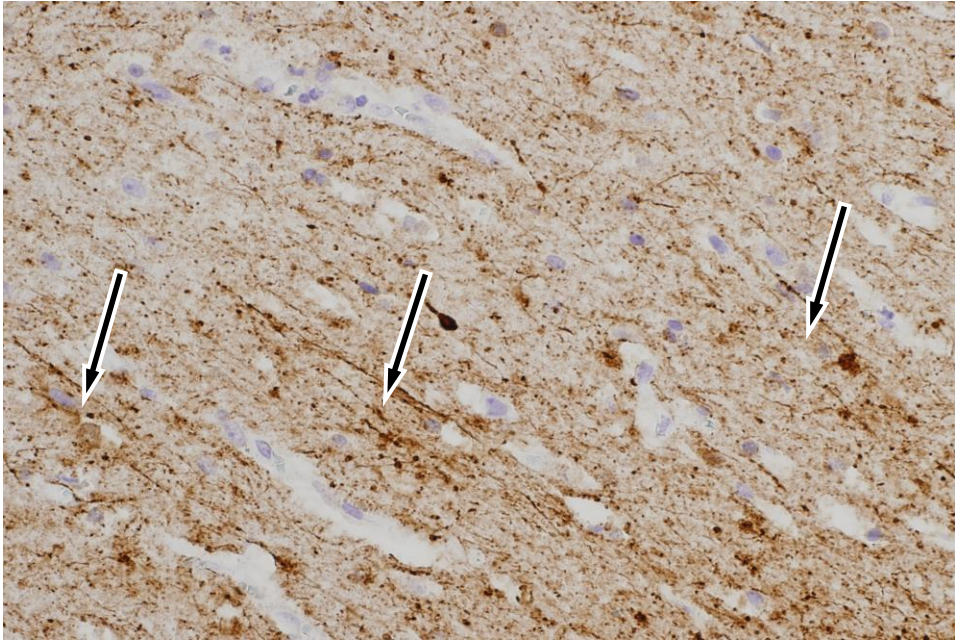


Figura 49. Las flechas señalan rosarios axonales en sustancia blanca teñidos con neurofilamentos. NF, 20X

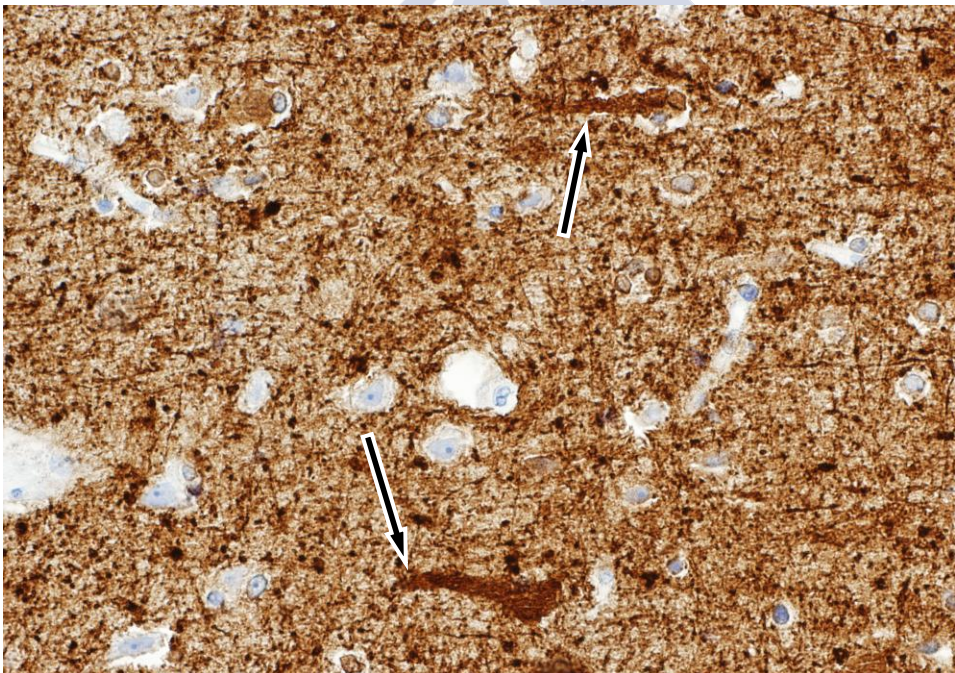


Figura 50. En sustancia gris se distinguen bulbos axonales proximales (NF, 20X)

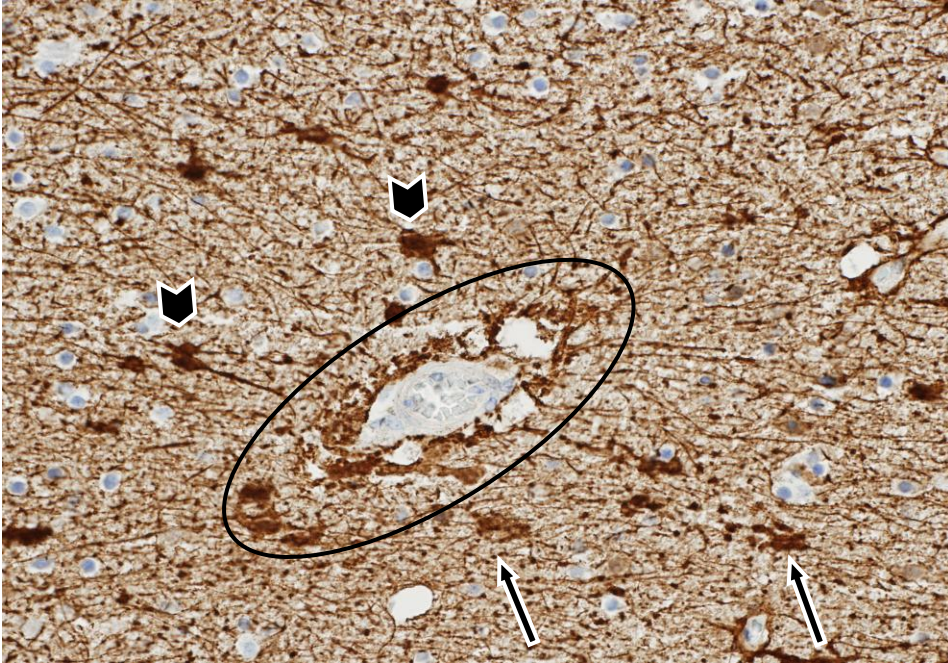


Figura 51. Astrocitos necróticos (flechas) junto con astrocitos hipertróficos (cabezas de flechas) en sustancia blanca. BHE hipertrófica (círculo). (PGFA, 20X).

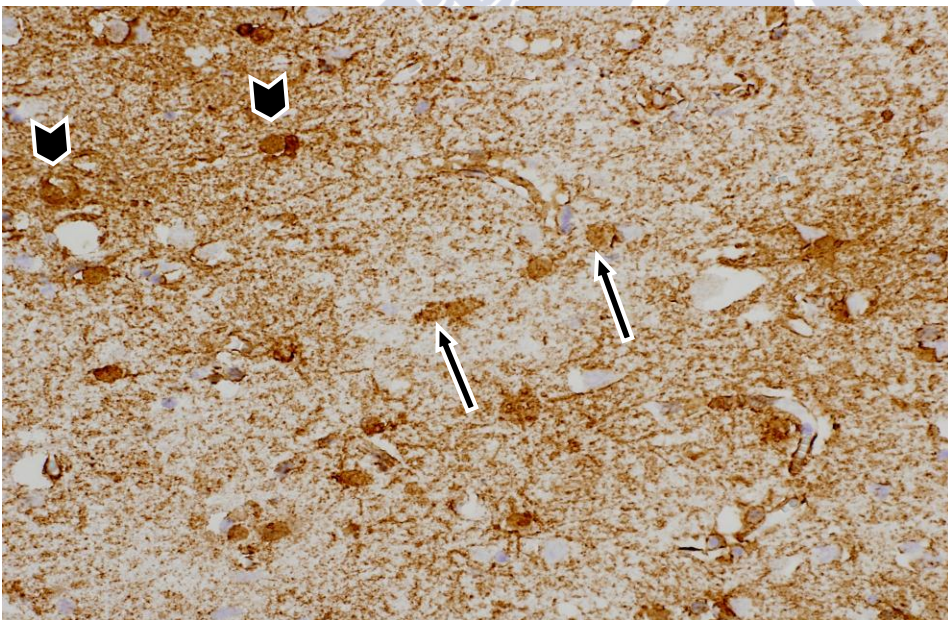


Figura 52. Astrocitos necróticos (flechas) junto con astrocitos hipertróficos (cabeza de flecha) en sustancia gris. (PGFA, 20X)

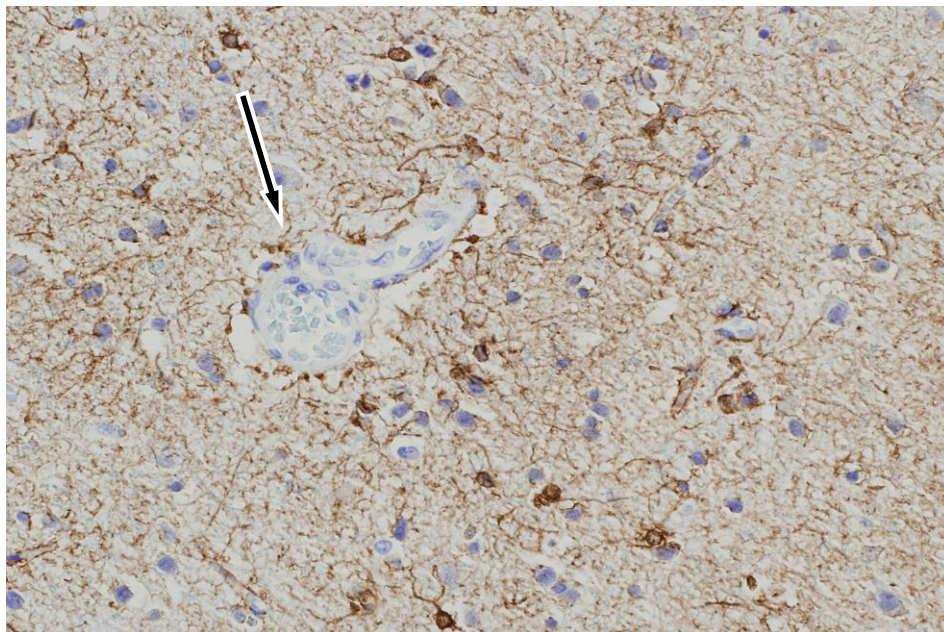


Figura 53. La flecha indica la BHE destruida en sustancia gris. (PGFA, 20X).

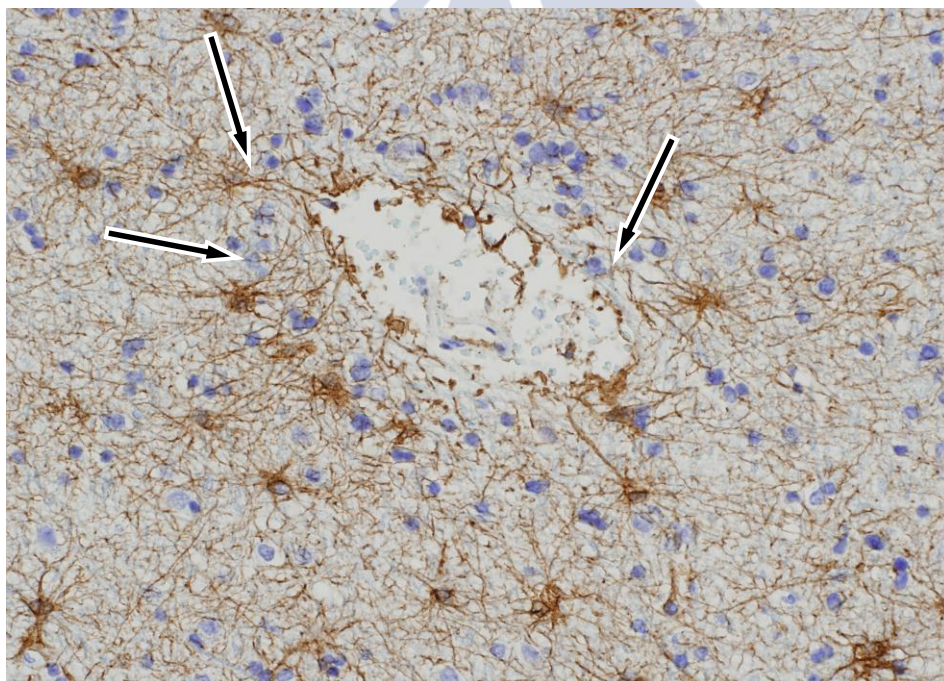


Figura 54. Se observa BHE lesionada pero las flechas marcan prolongaciones de astroцитos para reforzarla. (PGFA, 20X)

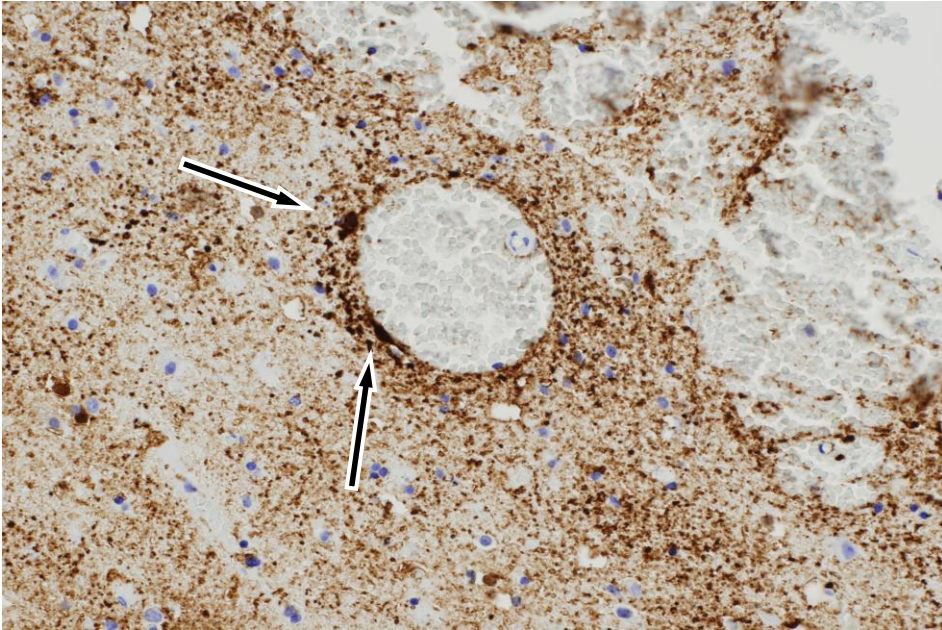


Figura 55. Disposición de los astrocitos protoplasmáticos en empalizada alrededor de un foco hemorrágico. (PGFA, 20X)

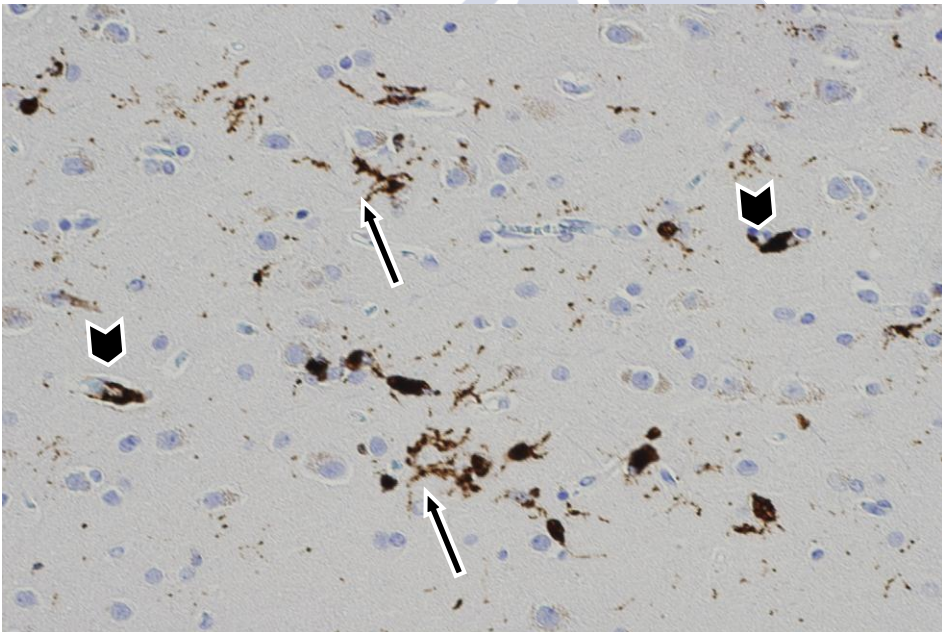


Figura 56. Microglía activada (flechas) junto con macrófagos (cabezas de flecha) en parénquima de sustancia gris. (CD68, 20X)

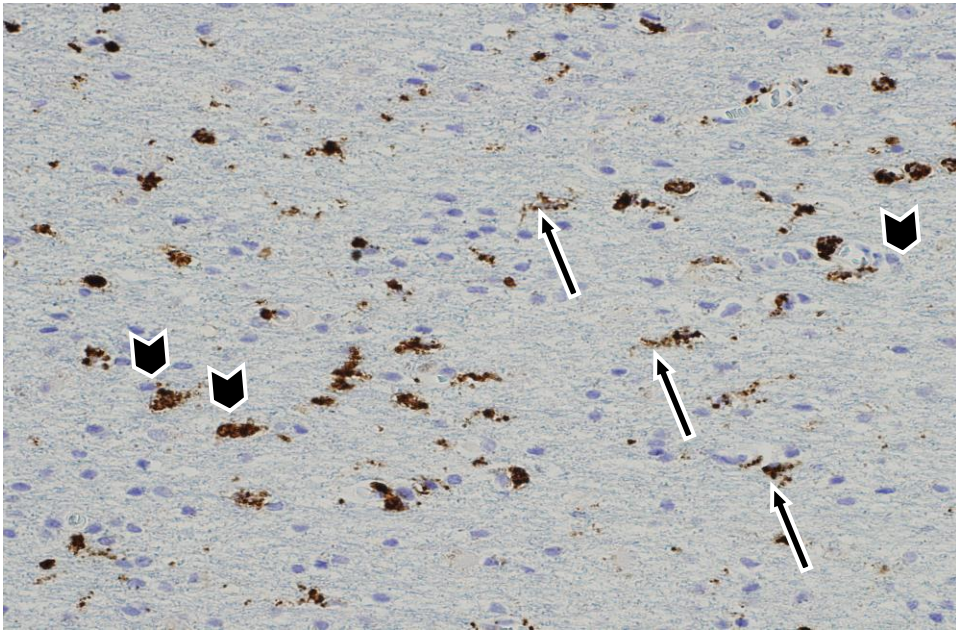


Figura 57. Microglía activada (flechas) junto con macrófagos (cabezas de flechas) en parénquima de sustancia blanca. (CD68, 20X)

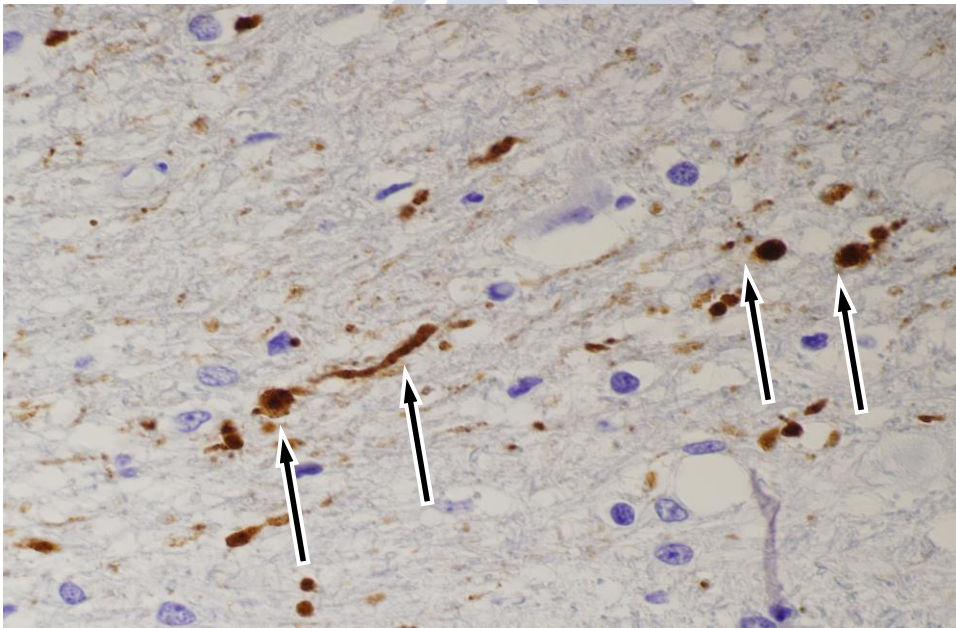


Figura 58. Axones arrosariados y bulbos en sustancia blanca. (β -APP, 20X).

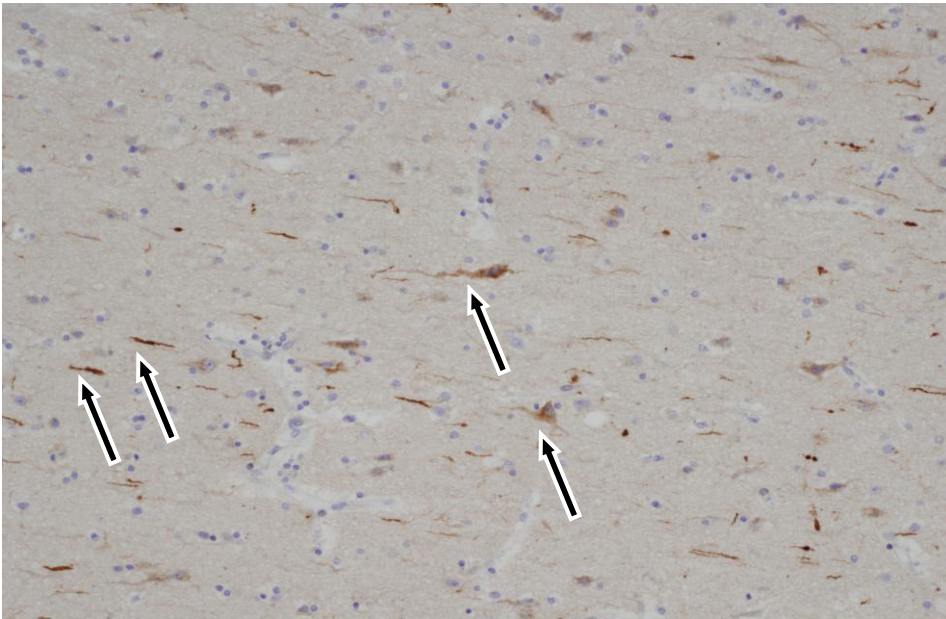


Figura 59. Axones arrosariados y somas neuronales necróticos en sustancia gris. (β -APP, 20X)

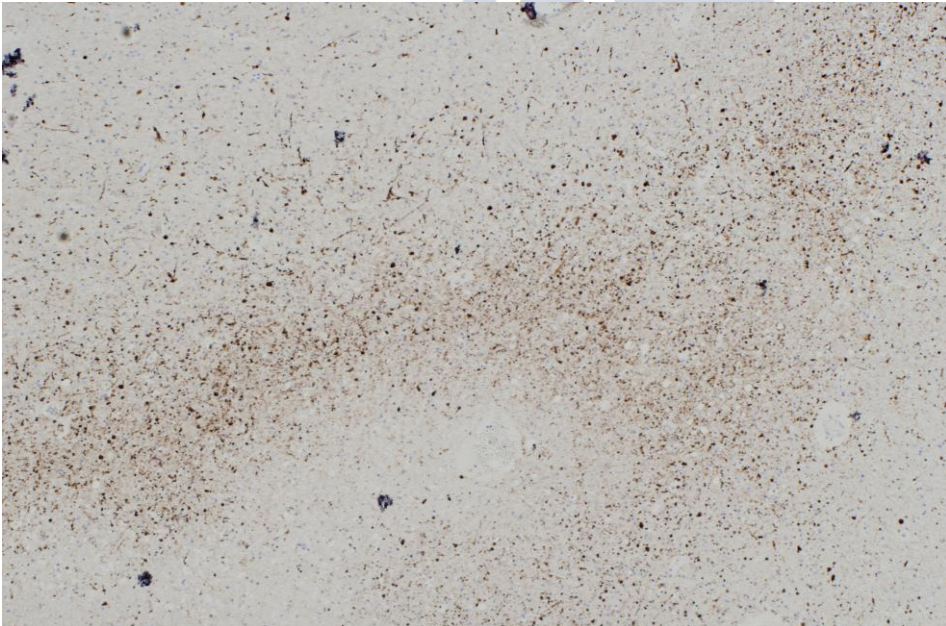


Figura 60. En la sustancia gris se observa un patrón difuso. (β -APP, 10X)

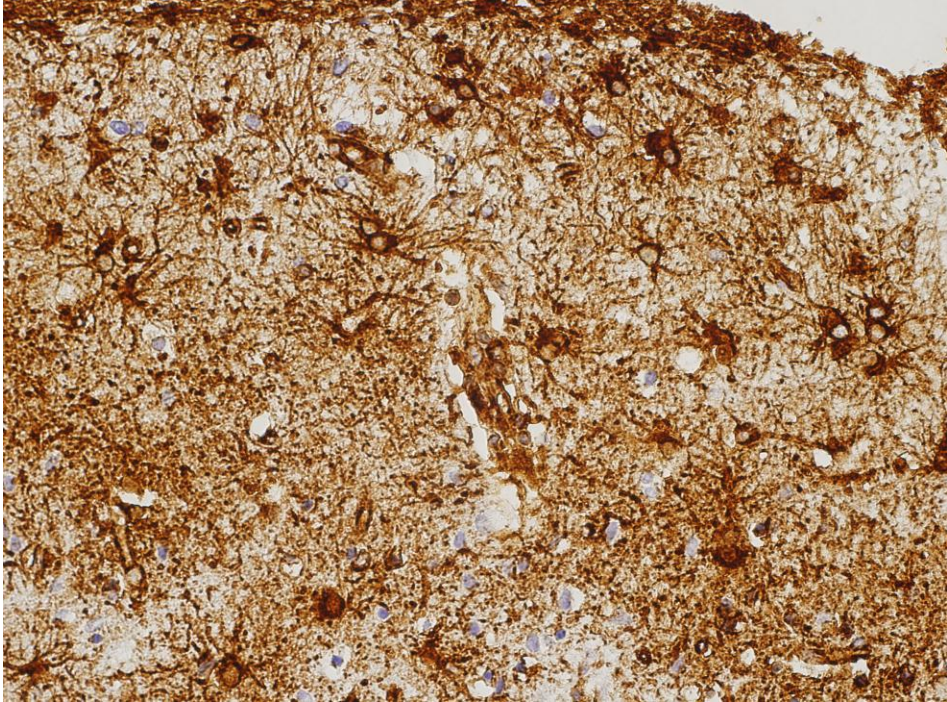


Figura 61. En esta imagen se aprecian astrocitos protoplasmáticos hipertróficos, pero no existe hiperplasia. (Vimentina, 20X).

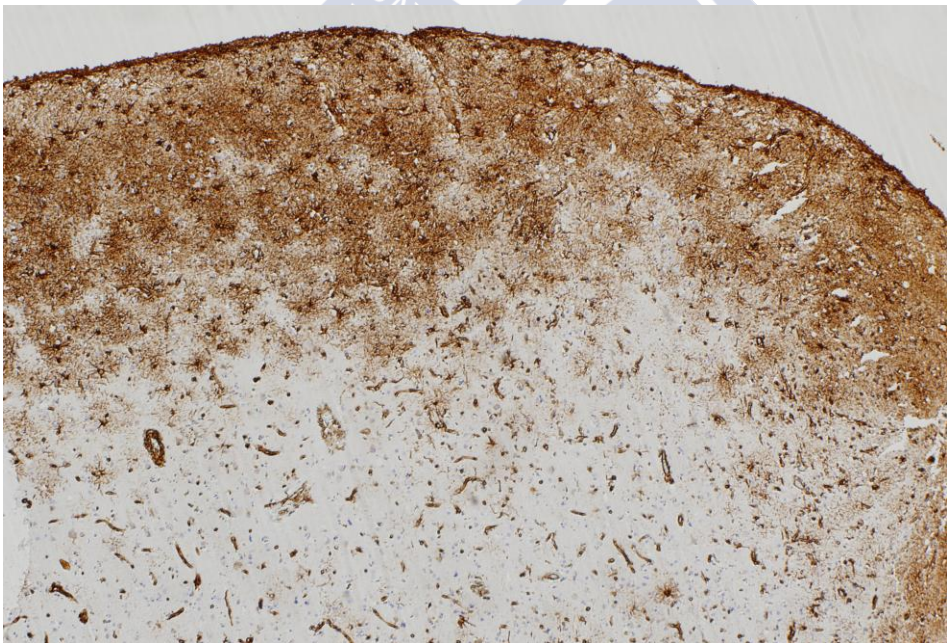


Figura 62. La hipertrofia astrocitaria sólo afecta a capas superficiales del córtex, demostrando que en este periodo la reacción aún es muy localizada (Vimentina, 4X)

3.D. GRUPO 3 (supervivencia entre 24 horas y 30 días)

Neurofilamentos

La expresión de rosarios y bulbos continuó aumentando. Los rosarios eran de mayor diámetro y volvieron a ser más abundantes en la sustancia gris. Los bulbos de retracción eran más bien somas neuronales con un citoplasma muy teñido (figura 63). Eran visibles neuronas picnóticas con halo de retracción a su alrededor, pero conforme aumenta el tiempo de supervivencia fue más frecuente observar los huecos que los somas dejan al desaparecer (figura 64).

La sustancia blanca de un caso estaba muy desestructurada, posiblemente por un artefacto (deshidratación) durante la fijación del bloque, pero lo que se observó en el resto de los casos fue un aumento de los rosarios y los bulbos con aumento de su diámetro. La estructura de la sustancia blanca estaba totalmente desestructurada (figura 65).

PGFA

Los astrocitos eran hipertróficos en todos los casos (figura 66). A partir de los 17 días se observó disposición de estas células alrededor de las regiones hemorrágicas, comenzando a conformarse la cicatriz (figura 67). A los 30 días fue visible una barrera perfectamente conformada entre la zona necrótica y el parénquima sano (figura 68)

La hiperplasia se demostró ampliamente en todos los casos, en especial en la sustancia gris, con un pico máximo a los 17 días. En la

sustancia blanca, la hiperplasia sólo existía en los casos con una supervivencia menor a 17 días y fue entre 2 y 3 veces menor.

También en todo momento fue evidente la hipertrofia asimétrica de la BHE, sin que fueran observables capilares destruidos (figura 69).

Caso nº	T. de supervivencia	Nº medio de células en sustancia blanca PGFA	Desviación respecto a los controles	Nº medio de células en sustancia gris PGFA	Desviación respecto a los controles
318/13	5-6 d.	26,7	55,23%	33,7	152,25%
90/11	11 d.	30,5	77,33%	42,5	218,11%
36/11	17 d.	22,7	31,98%	39	315,78%
12/15	20 d.	25,5	48,26%	26,2	96,11%
62/09	26 d.	17	-1,16%	36,2	170,96%
17/11	30 d.	22,5	30,81%	27,7	107,34%

CD68

La microgliosis mezclada con infiltrado macrofágico es la constante. Incluso en el caso de mayor supervivencia fue posible distinguir una célula gigante de Langans (figura 70).

Lo distintivo de este grupo fue la distribución de la microgliosis, que coincidió con las zonas de mayor astrocitosis, en especial en los dos últimos casos. En general, y también igual que la astrogliosis, la microgliosis fue más densa en sustancia gris, con un pico máximo entre los 17 y los 20 días, si bien no regresaron a niveles basales (figura 71).

Caso nº	T. de supervivencia	Nº medio de células en sustancia blanca CD 68	Desviación respecto a los controles	Nº medio de células en sustancia gris CD68	Desviación respecto a los controles	Presencia de macrófagos
318/13	5-6 d.	25,2	31,80%	25	92,31%	+
90/11	11 d.	28,5	49,06%	41	215,38%	+
36/11	17 d.	118,2	587,21%	73,5	450,15%	+
12/15	20 d.	56,2	193,93%	89,7	590,00%	+
62/09	26 d.	46,7	144,25%	45,7	251,54%	+
17/11	30 d.	46,7	144,25%	41,5	219,23%	+

Proteína precursora del β -amiloide (β -APP)

La expresión del β -APP fue observable tanto en la sustancia gris como en la blanca, pudiendo distinguirse las alteraciones morfológicas axonales (figuras 72 y 73)

El patrón de distribución más frecuente fue el difuso, pero a partir de los 26 días de supervivencia el patrón fue mixto, observándose una distribución en zig-zag en la sustancia blanca y un parcheado multifocal en la sustancia gris, lo que indica que la región está afectada también por la isquemia del daño axonal secundario (figuras 74 y 75). Sólo un caso (el de 20 días de supervivencia) resultó totalmente negativo.

Genes de apoptosis Bcl-2 y p53

En este grupo se encontraron los únicos casos positivos para el Bcl-2. Además de dos de ellos, en los que sólo se tiñeron linfocitos T, otros

tres mostraron positividad neuronal para este gen, a los 11, 26 y 30 días (figura 76).

Esto, junto con la expresión tardía del β -APP demuestra que en la zona de la lesión impera la necrosis debida directamente al traumatismo, por lo que hasta que no transcurre al menos una semana, no es posible observar cambios debidos al daño secundario. Sólo un caso mostró positividad para el gen p-53 (figura 77).

Vimentina

En los casos de varios días de evolución su expresión fue mucho más intensa y además se pudo observar una mayor expresión de este marcador en los astrocitos perilesionales, disminuyendo su expresividad conforme nos alejamos de la lesión, aunque llegaba a capas mucho más profundas que en los casos del grupo dos, cuya reacción ni siquiera llegaba a afectar a todas las capas del córtex. En este grupo el marcaje con esta proteína se extiende incluso por la sustancia blanca subcortical (figura 78, 79, 80 , 81 y 82 a y b)

Además desde el punto de vista morfológico los astrocitos que expresan este marcador son claramente reactivos con mayor densidad de citoplasma en relación al núcleo y con mayor número de prolongaciones, es decir, se trata de astrocitos claramente hipertróficos (figura 84).

Asimismo, en este grupo fue posible observar la evolución de la expresividad de este marcador, mostrando un punto máximo a los 11 días y disminuyendo a partir del 17 día (figura 83 a y b).

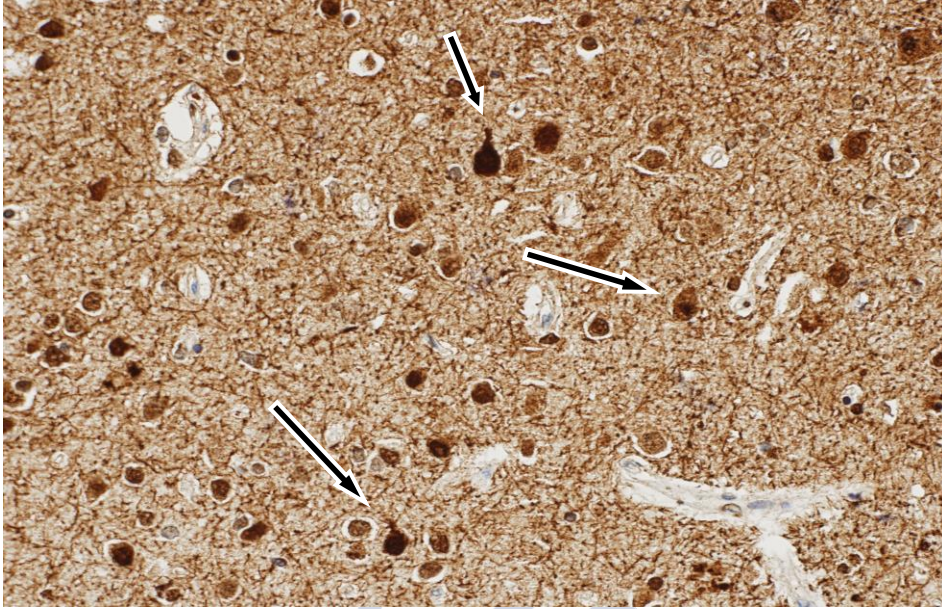


Figura 63. Bulbos proximales consistente en neuronales con un citoplasma muy teñido. NF, 20X

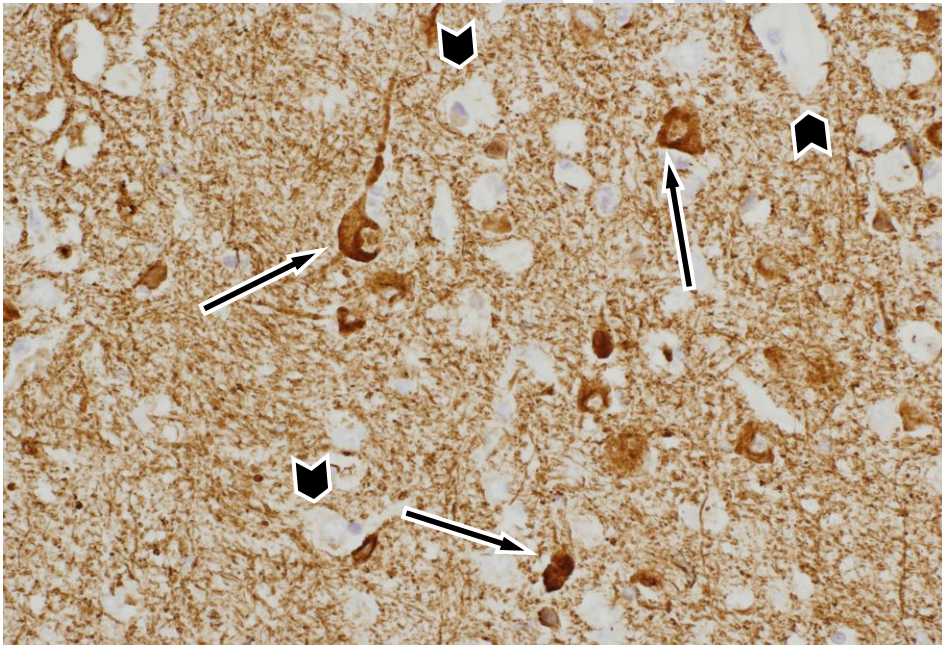


Figura 64 Neuronas picnóticas (flechas) con halo de retracción a su alrededor y neuronas fantasma, (huecos que los somas dejan al desaparecer) (cabezas de flecha). (NF, 20X.)

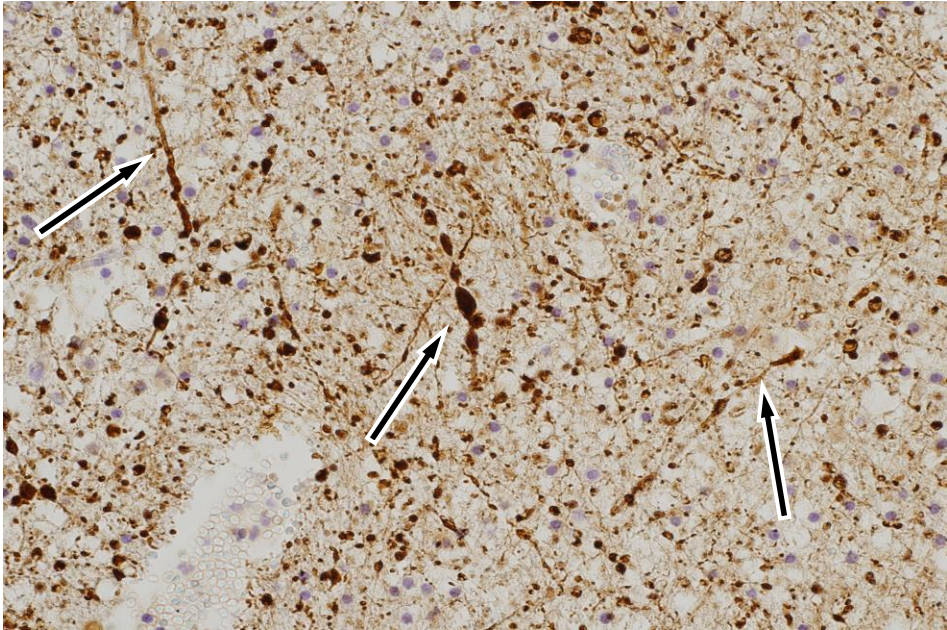


Figura 65 Aumento del número y diámetro de los rosarios y los bulbos axonales. La estructura de la sustancia blanca está totalmente perdida. (NF, 20X)

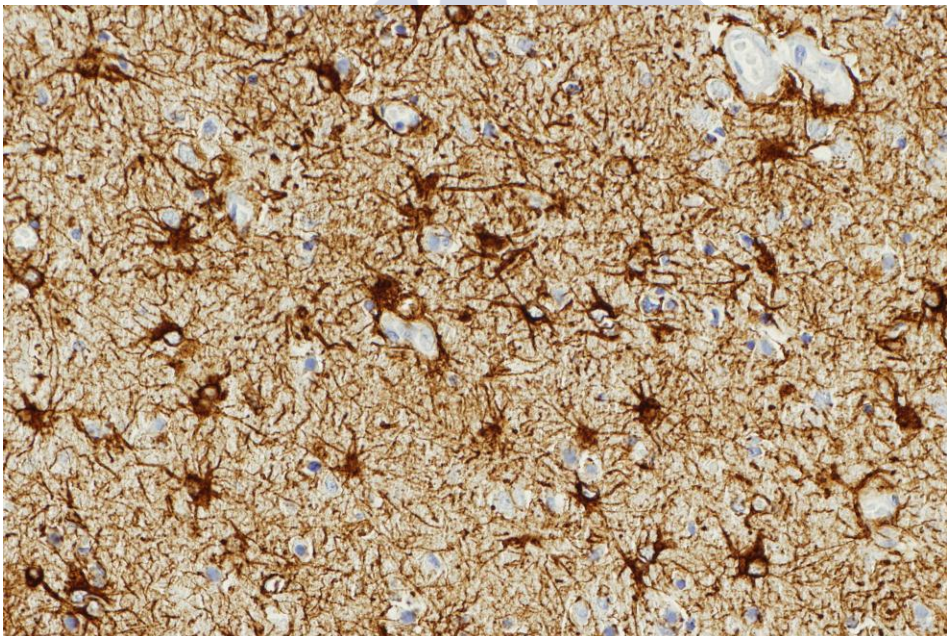


Figura 66. Astrocitos fibrosos hipertróficos con un citoplasma más abundante y más intensamente teñido y con mayor número de prolongaciones. (PGFA, 20X.)

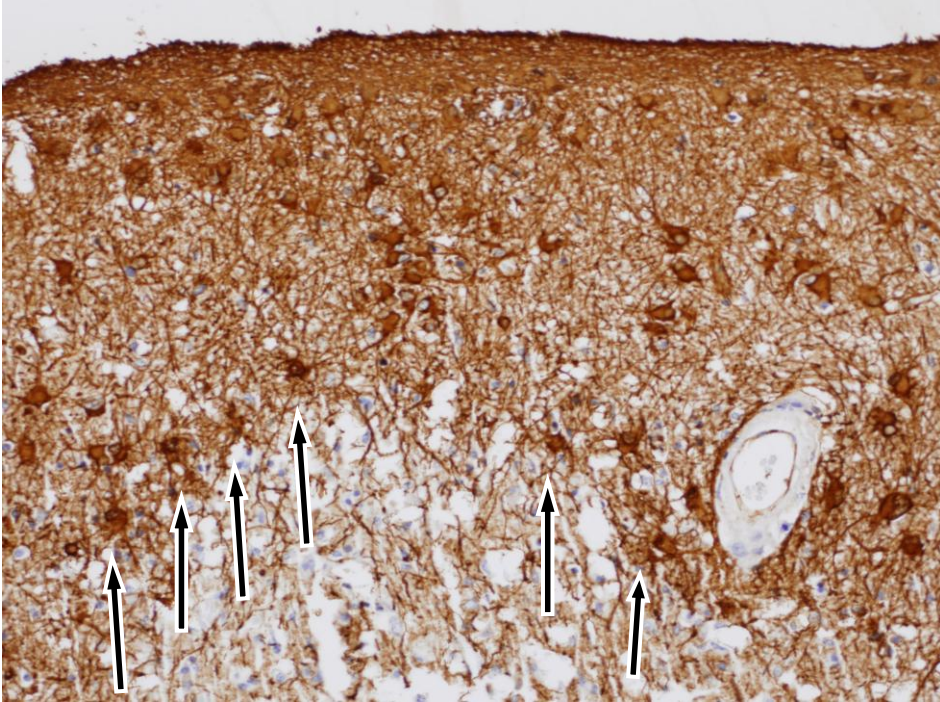


Figura 67. Disposición de los astrocitos alrededor de los focos de lesión comenzando la formación de la cicatriz. (PGFA, 20X)

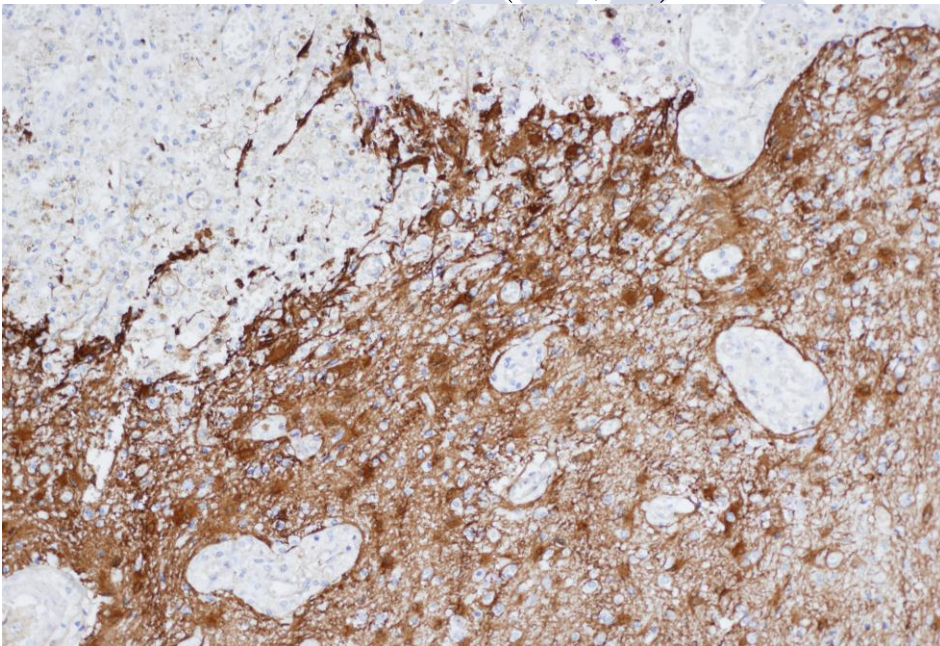


Figura 68. Barrera cicatricial glial bien conformada rodeando los restos necróticos del tejido. (PGFA, 20X)

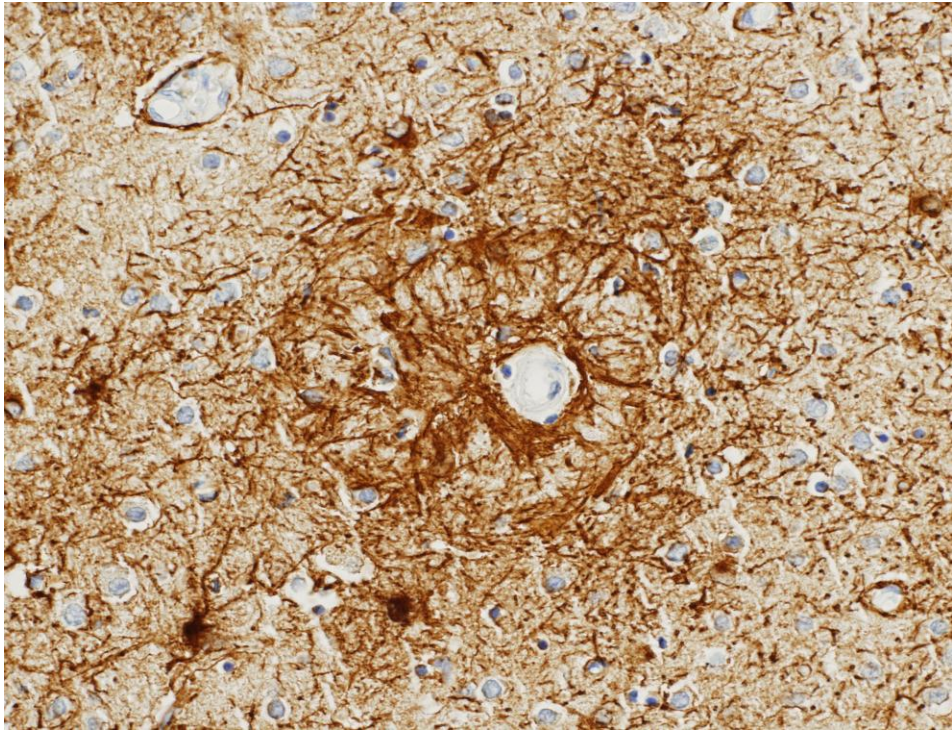


Figura 69. Hipertrofia asimétrica de la BHE. Es obvio el aumento de las prolongaciones de los astrocitos que la conforman (PGFA, 20X.)

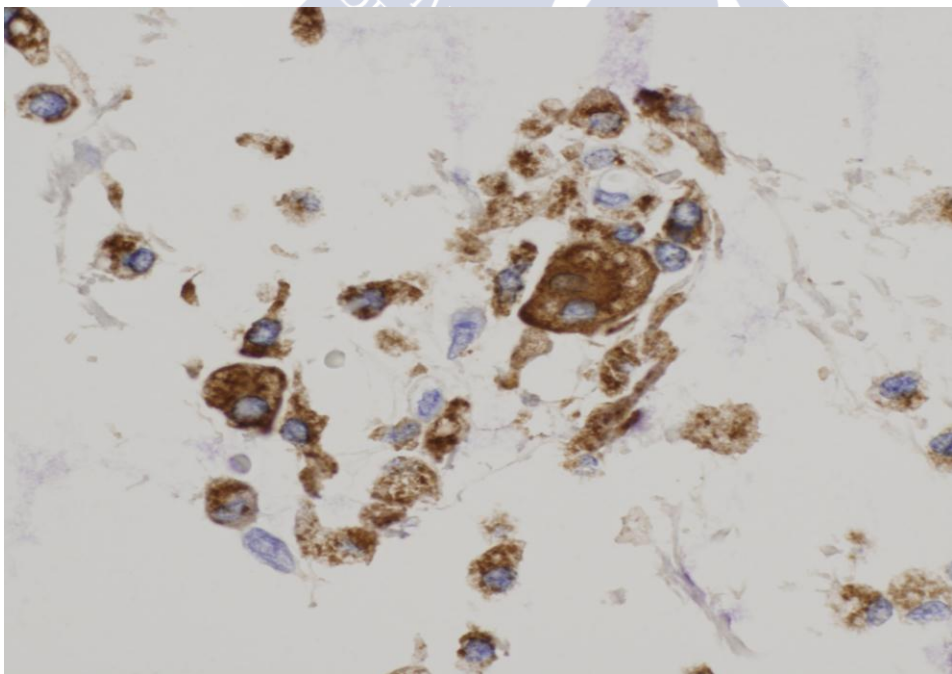


Figura 70. Célula gigante de Langans. (CD68, 40X.)

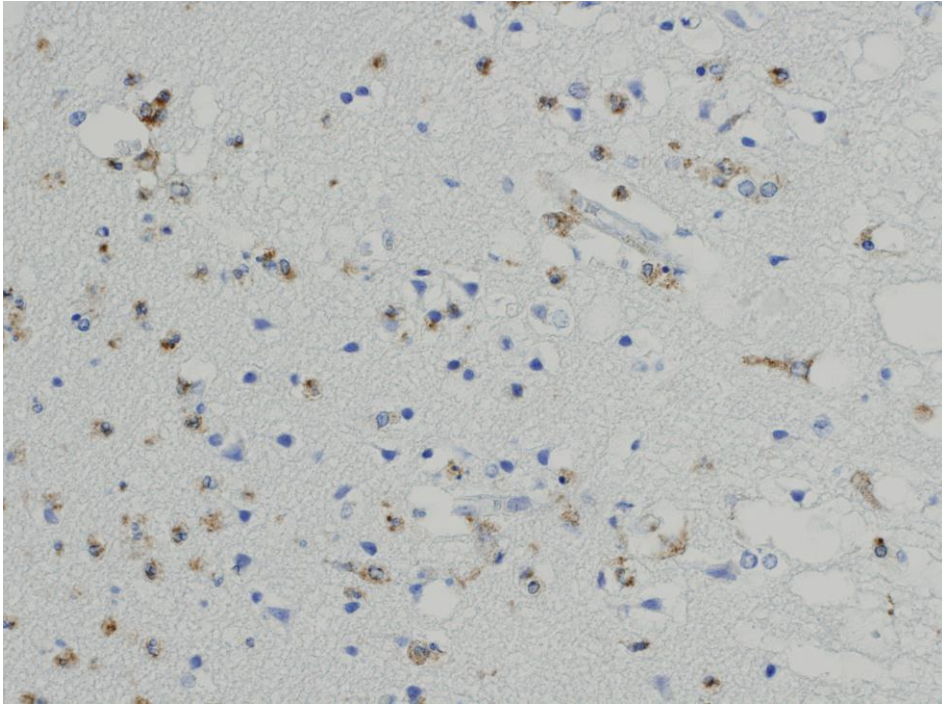


Figura 71. La microgliosis es más llamativa en sustancia gris, coincidiendo con las regiones de mayores astrogliosis. (CD68, 20X.)

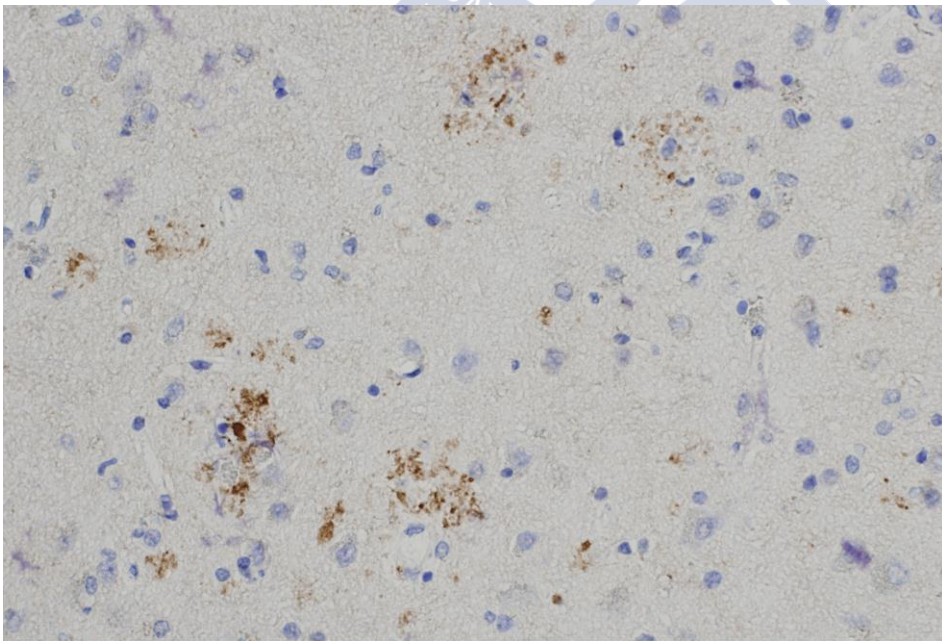


Figura 72. Axones en sustancia gris. Patrón difuso multifocal. (β -APP, 20X.)

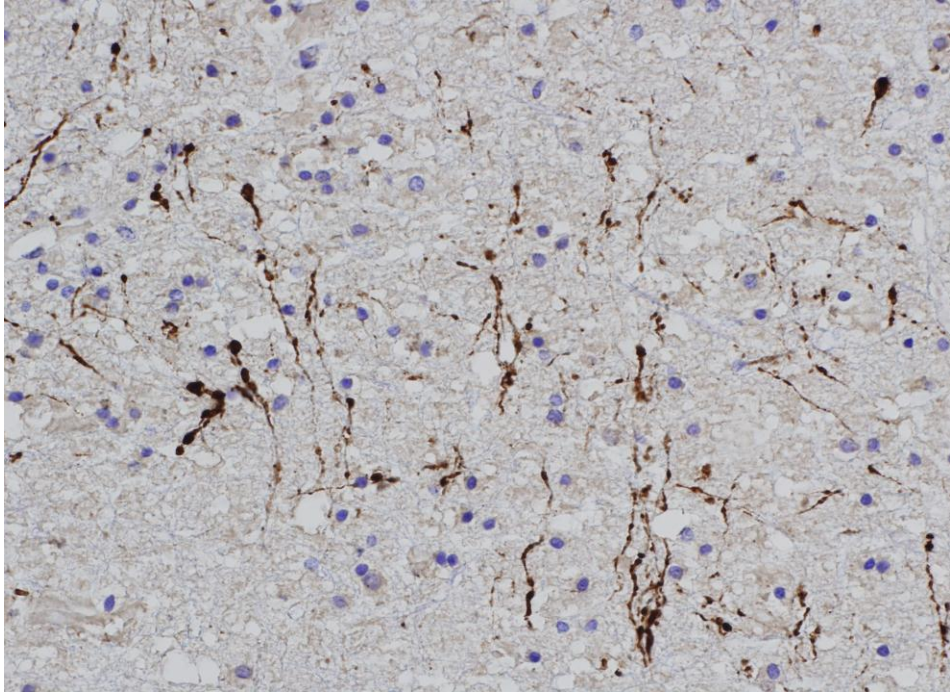


Figura 73. Axones arrosariados y engrosados en sustancia blanca con un patrón en “zig-zag”.(β -APP, 20X)

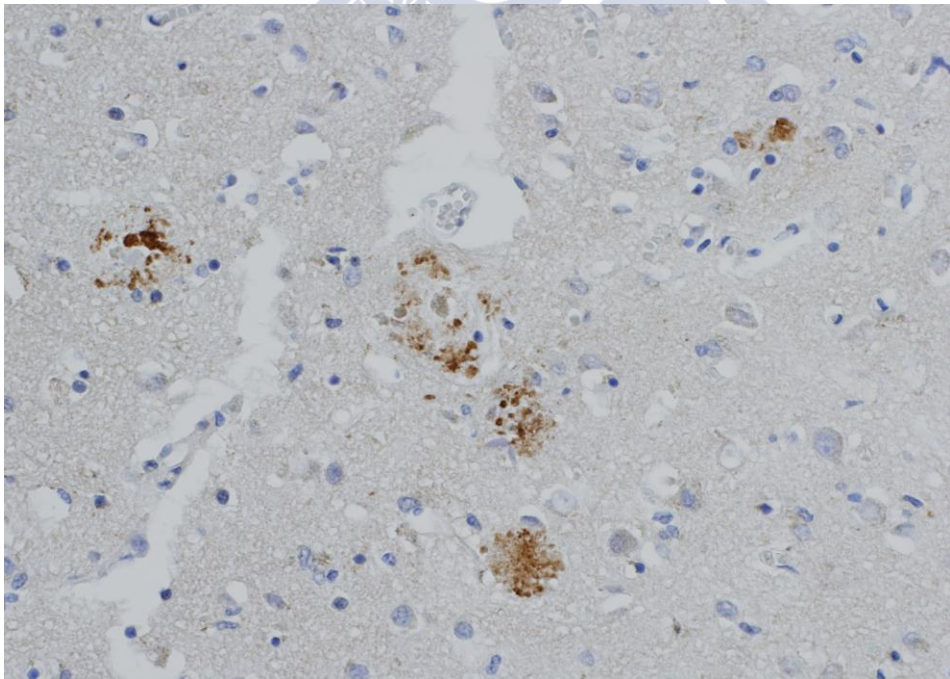


Figura 74. Patrón difuso multifocal en sustancia gris. (β -APP, 20X)

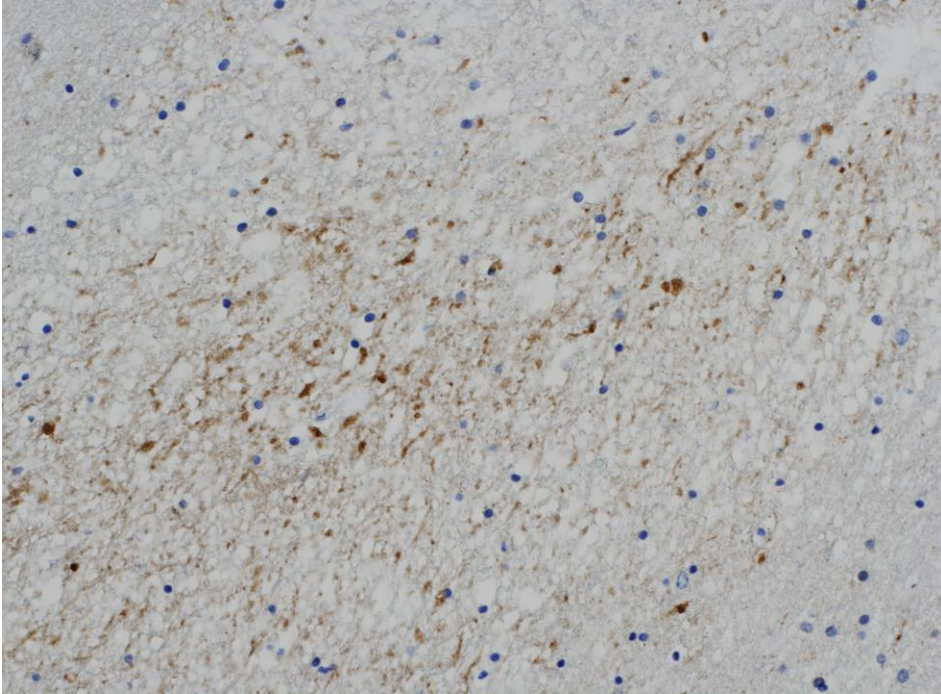


Figura 75. Patrón de los axones arrosariados en “zig-zag” en sustancia blanca aunque con los axones menos engrosados. (β -APP, 20X)

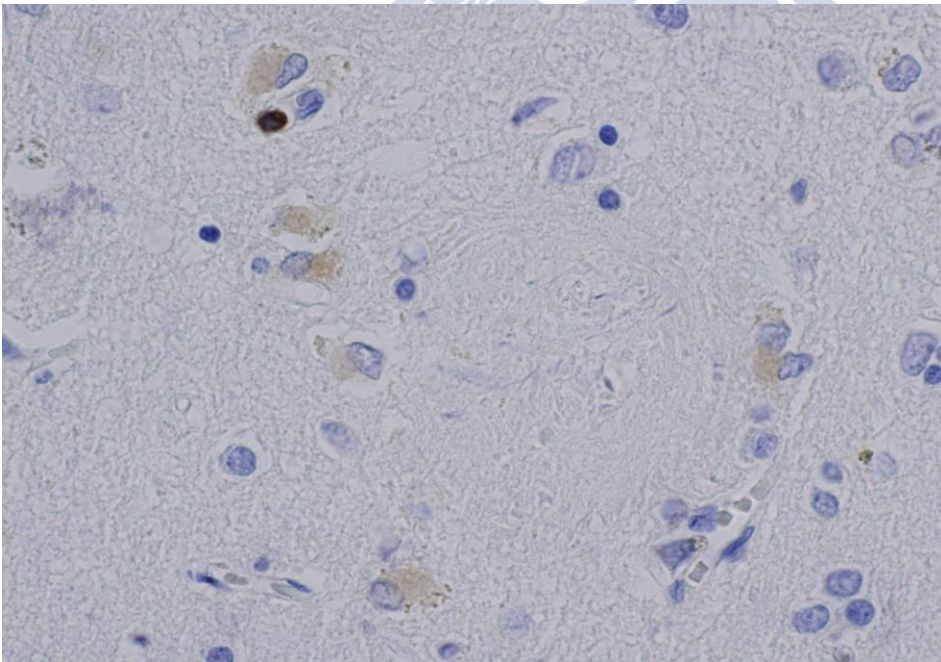


Figura 76. Somas neuronales que expresan Bcl-2 a partir de los 11 días. (Bcl-2, 20X)

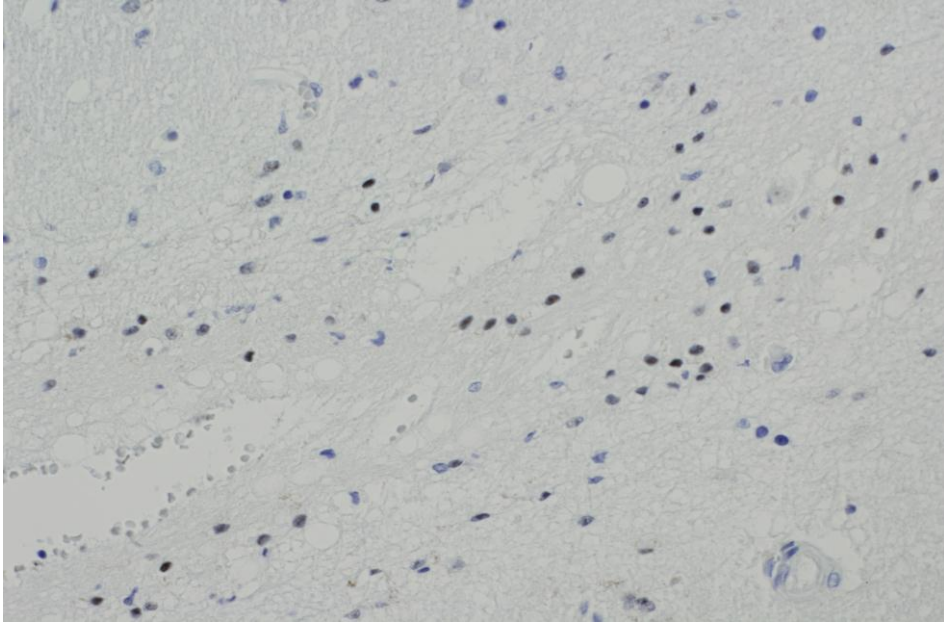


Figura 77. Única positividad para el gen p53 en un caso de más de una semana de supervivencia. (p53, 20X)

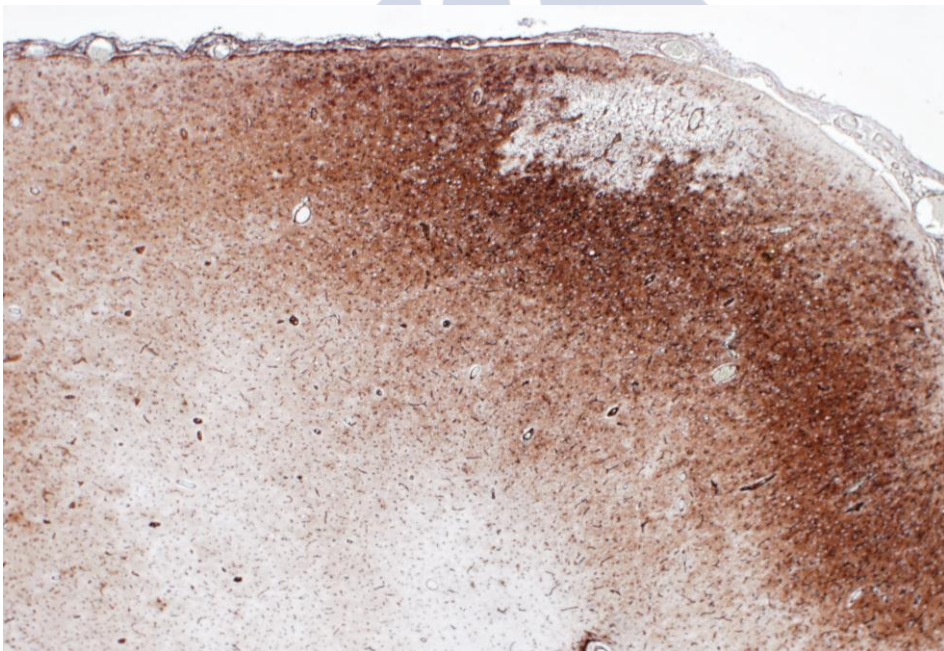


Figura 78. La fotografía muestra la imagen panorámica de la tinción con vimentina. Es evidente la disminución de la expresión de este marcador conforme nos alejamos del foco de contusión. (Vimentina, 4X)

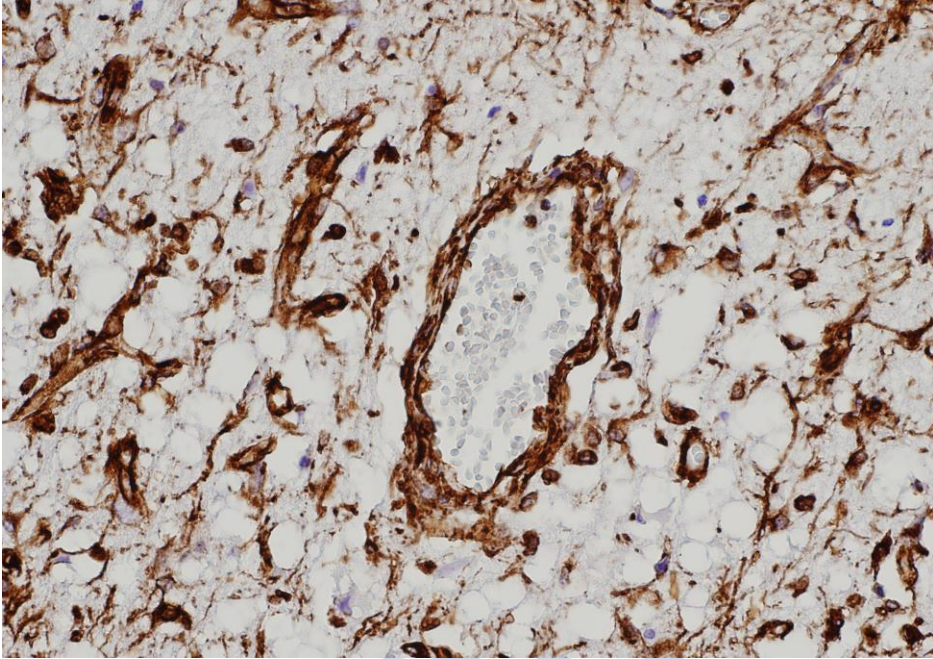


Figura 79. Detalle de la expresión de la vimentina en la zona directamente afectada por la lesión. (Vimentina 20X)

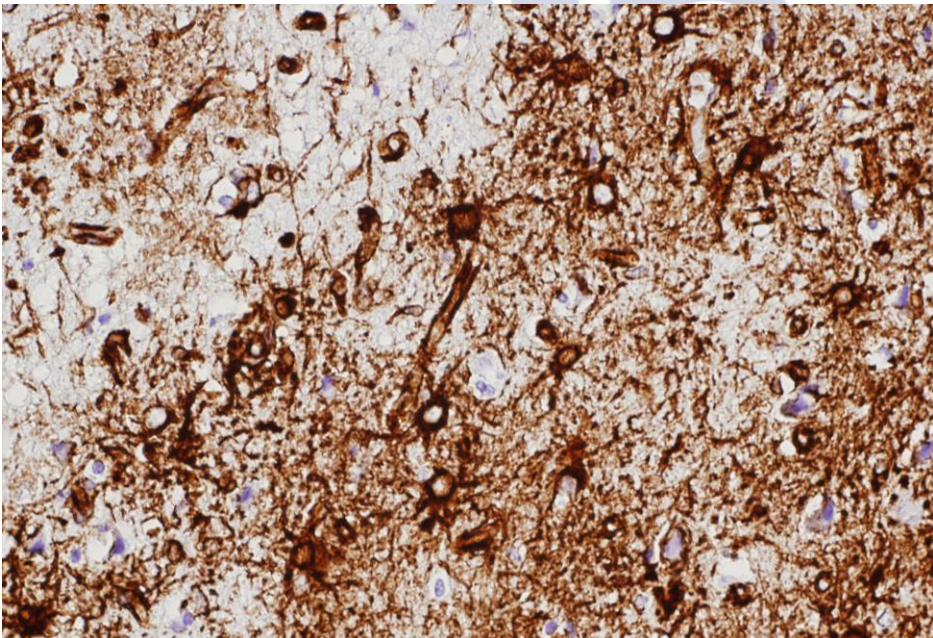


Figura 80. Detalle de la expresión de la vimentina en la zona limítrofe de la lesión. (Vimentina, 20X)

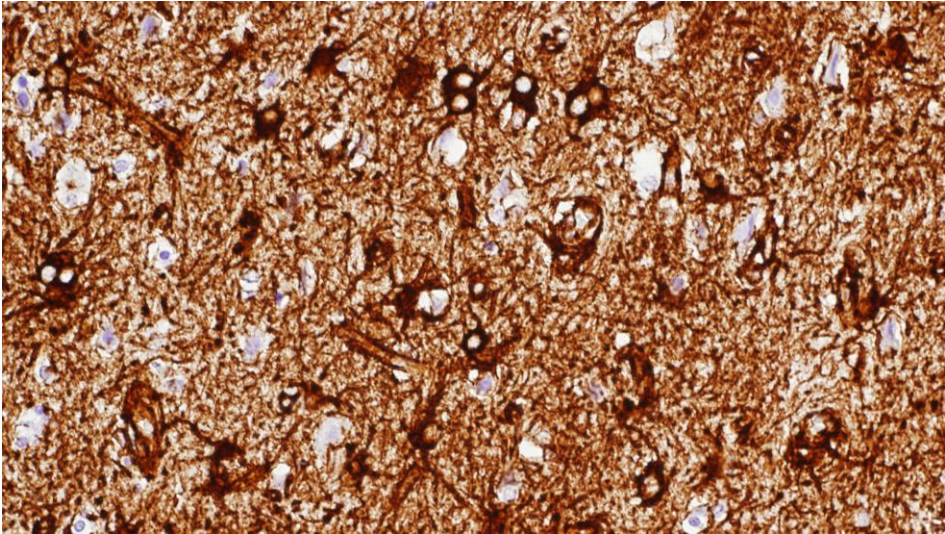
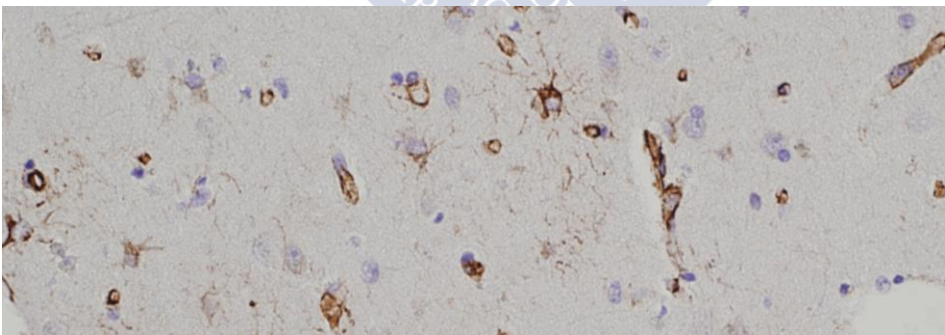
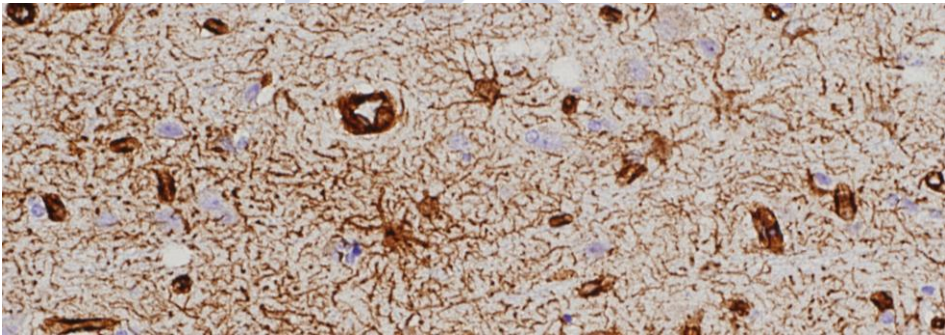


Figura 81. Detalle de la reacción astrocitaria alrededor de la lesión en la sustancia gris a los 11 días de supervivencia. (Vimentina, 20X)



Figuras 82 a y b. Detalle de la disminución de la expresión del marcaje con vimentina conforme más nos alejamos de la lesión. En las capas profundas de sustancia gris es negativa. (Vimentina, 20X)

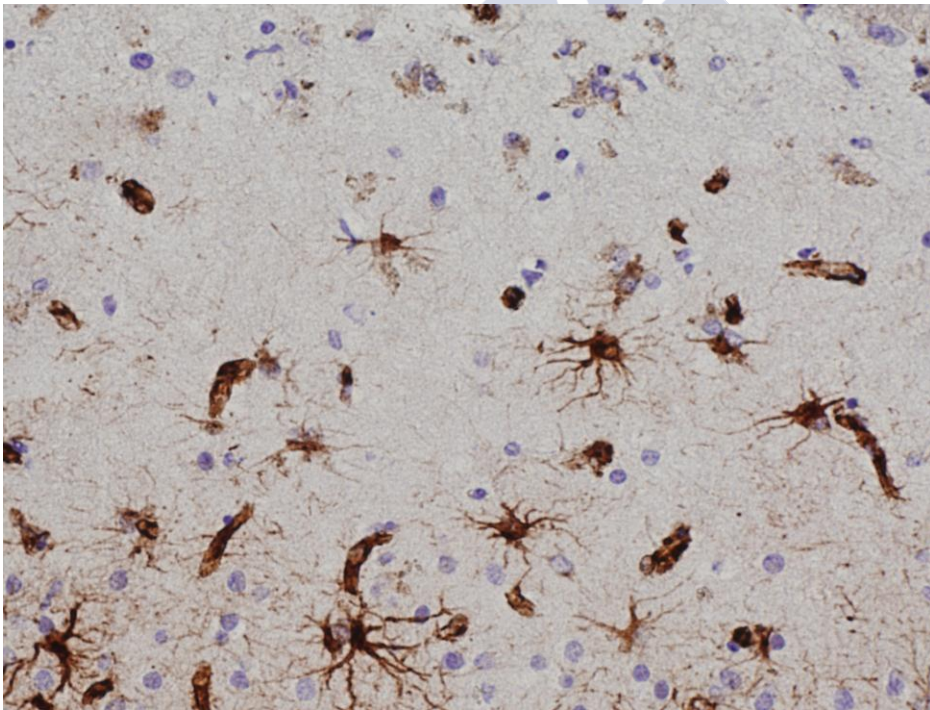
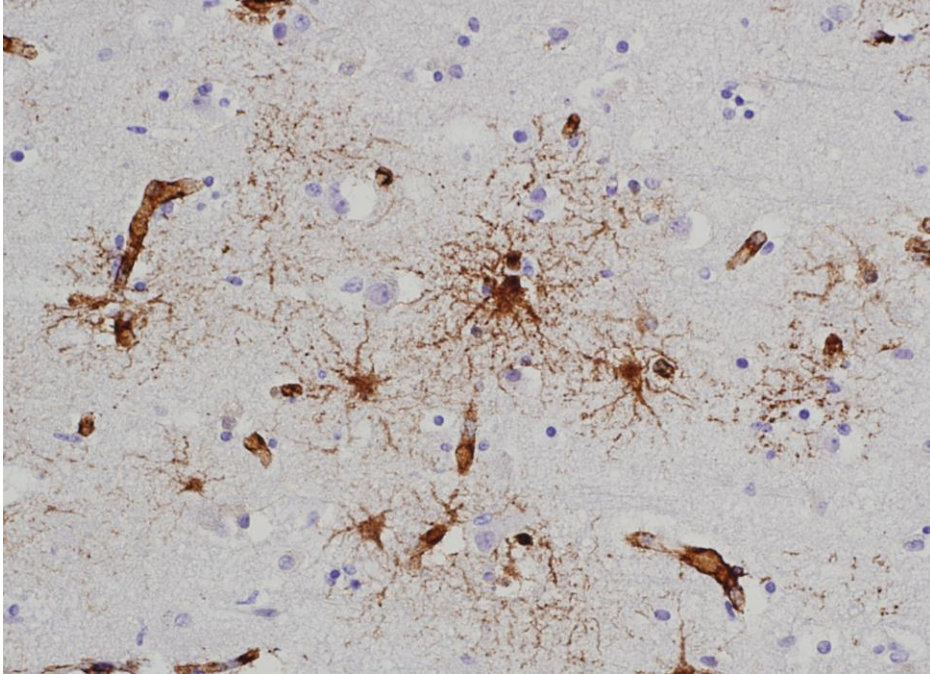


Figura 83 a y b. En estas imágenes se hace evidente la disminución de la expresión de este marcador a los 17 y 26 días, respectivamente, en relación con la mostrada a los 11 días. (Vimentina, 20X)

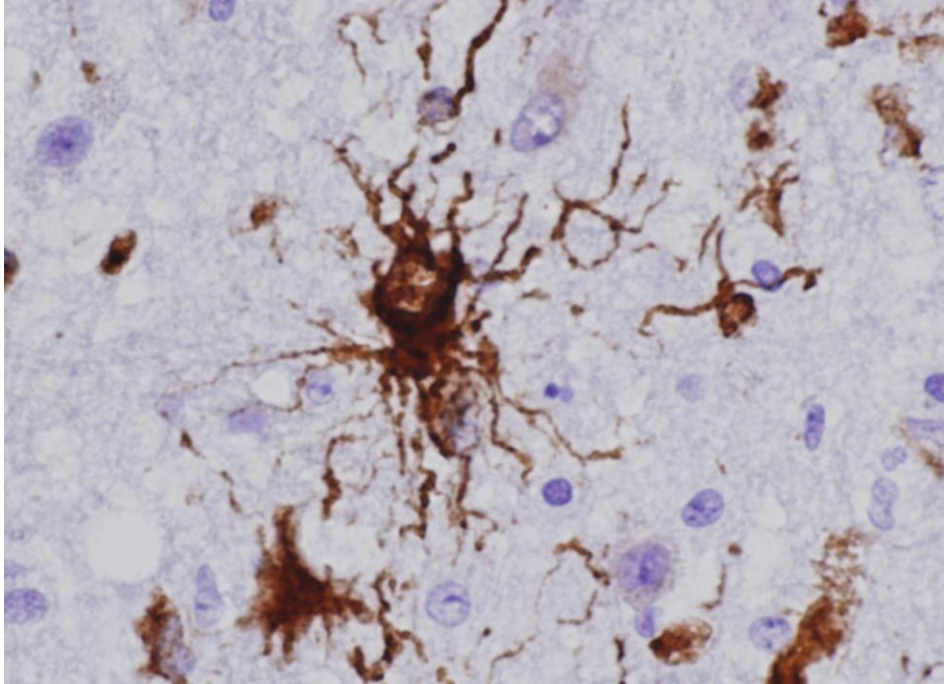


Figura 84. La morfología de los astrocitos marcados es este grupo es claramente hipertrófica (aumento del número de prolongaciones, de la proporción citoplasma/núcleo y de la intensidad de tinción del citoplasma). (Vimentina, 40X)

3.E. GRUPO 4 (supervivencia superior a 30 días)

Este grupo es el de menor interés médico legal, dado que las circunstancias de la muerte suelen quedar acreditadas por la historia clínica del sujeto. También el número de casos de estas características que llegan a instancias médico forenses es menor que el de los grupos anteriores. Por todo ello, el número de casos de este grupo fue menor.

Neurofilamentos

Continúan observándose rosarios y bulbos proximales, pero cada vez más escasos e inmersos en una sustancia blanca homogénea y sin los tractos axonales habituales. También se aprecia la pérdida de oligodendrocitos en la sustancia blanca, pero sobre todo es la sustancia gris la que presenta una mayor pérdida de densidad celular, dejando los huecos correspondientes, en los que ocasionalmente se observa algún resto celular (figuras 85 y 86)

PGFA

La morfología de los astrocitos casi ha vuelto a la normalidad. La cicatriz está bien estructurada. Los procesos de los astrocitos que la conforman son mayores (figura 87) y en el centro de la región delimitada por esa cicatriz los astrocitos son más redondeados y con menos procesos (figura 88)

La densidad celular ha vuelto a la normalidad excepto en la sustancia gris del tiempo de mayor evolución, tal vez debido a la presencia de la cicatriz glial que ya se encuentra consolidada, sustituyendo al parénquima cortical. La BHE también ha vuelto a la normalidad (figura 89)

Caso nº	T. de supervivencia	Nº medio de células en sustancia blanca PGFA	Desviación respecto a los controles	Nº medio de células en sustancia gris PGFA	Desviación respecto a los controles
34/13	90 d.	19,5	13,37%	19	42,22%
95/11	218 d.	21,7	26,16%	25,5	90,87%

CD68

La microgliosis continúa presente, sobre todo en la sustancia blanca, (figura 90) así como los macrófagos, si bien estos se encuentran próximos a los vasos sanguíneos (figura 91), en la sustancia gris (figura 92) y en las meninges (figura 93)

Caso nº	T. de supervivencia	Nº medio de células en sustancia blanca CD 68	Desviación respecto a los controles	Nº medio de células en sustancia gris CD68	Desviación respecto a los controles	Presencia de macrófagos
34/13	90 d.	30	56,90%	31,2	140,00%	+
95/11	218 d.	56,5	195,50%	53	307,69%	+

Proteína precursora del β -amiloide (β -APP)

La expresión del precursor del β amiloide vuelve a ser negativo. En la región necrótica, las neuronas muertas ya han sido retiradas y sustituidas por una cicatriz, así que no existen células que estén acumulando proteínas por alteración del transporte axonal.

Genes de apoptosis Bcl-2 y p53

Ambos son negativos, demostrando que la apoptosis en la región lesionada ha finalizado.



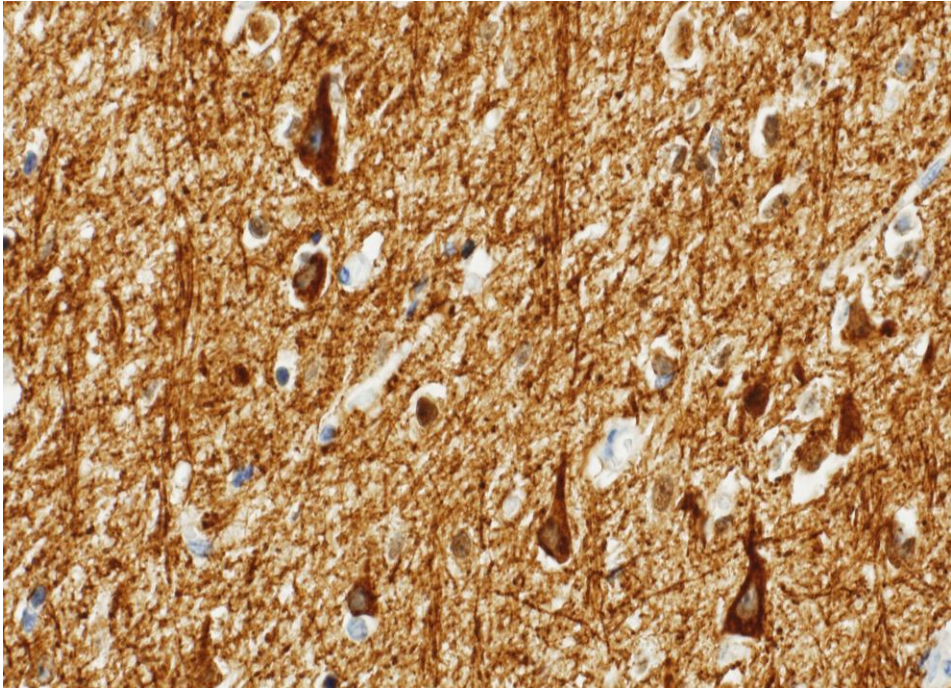


Figura 85. Pérdida de densidad celular en sustancia gris. Los somas neuronales que aún se observan están dañados. (NF, 20X)

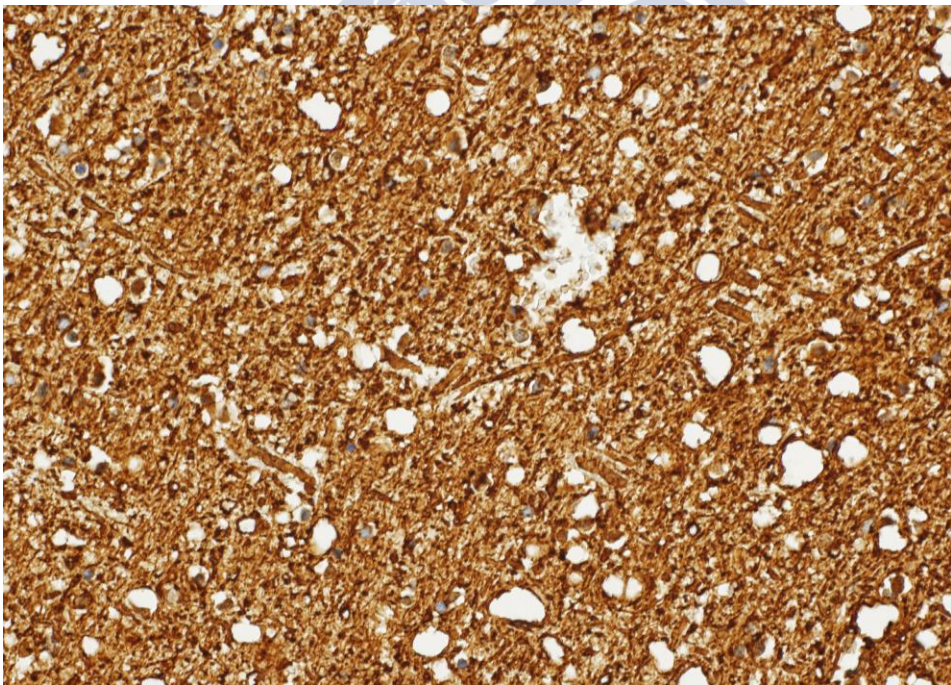


Figura 86 Pérdida de densidad celular en sustancia blanca, junto con rosarios axonales muy gruesos y deformes. (NF, 20X)

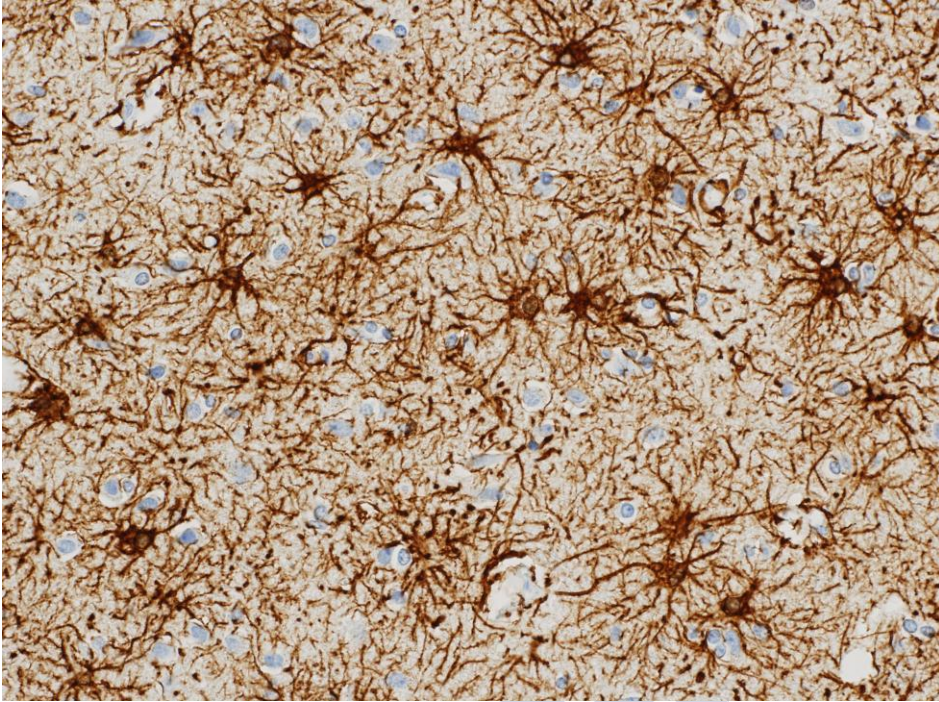


Figura 87. La cicatriz está bien estructurada. Los procesos de los astrocitos que la conforman son más grandes. PGFA, 20X.

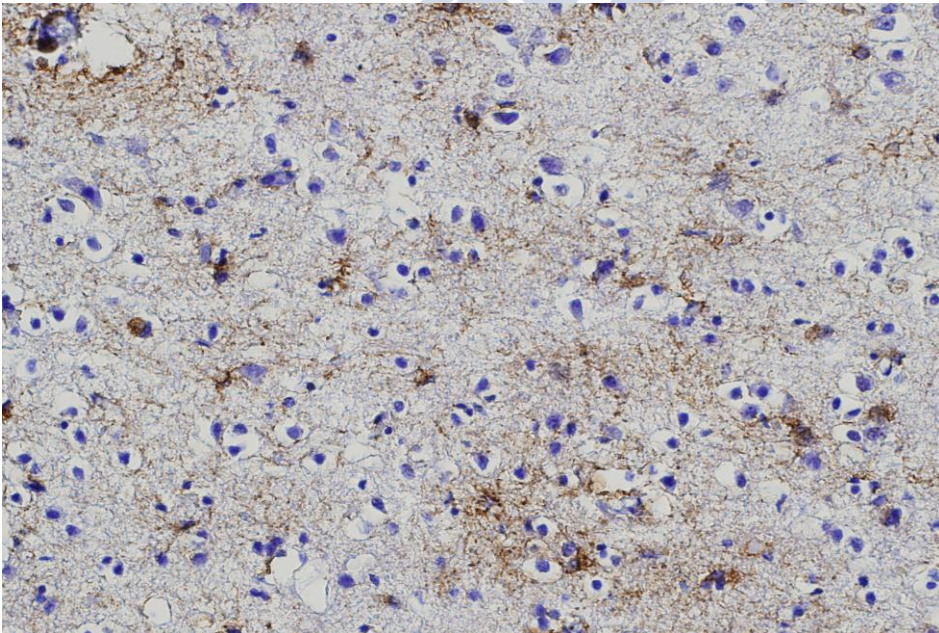


Figura 88. En el centro de la zona delimitada por la cicatriz, los astrocitos presentan menos procesos, un soma deformado y menos citoplasma. PGFA, 20X

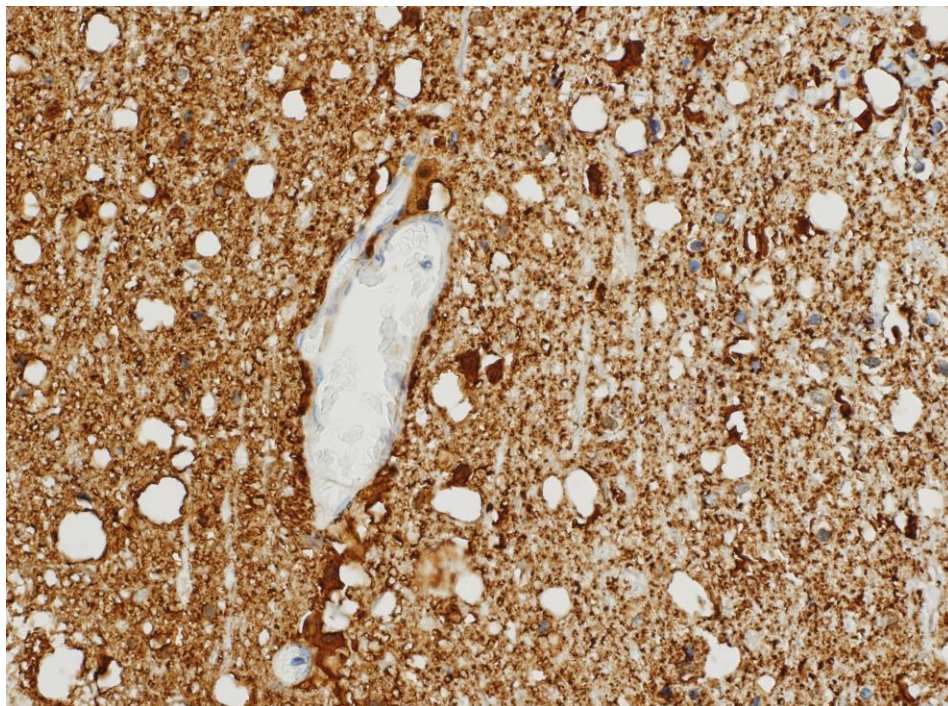


Figura 89. Tras meses de evolución la BHE ha vuelto a la normalidad. (PGFA, 20X)

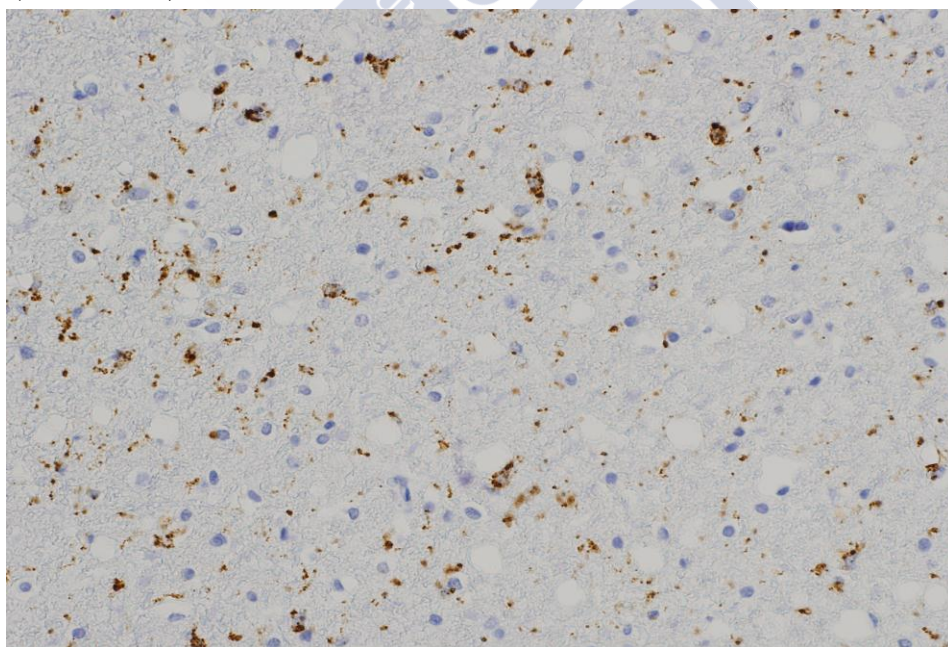


Figura 90. La microgliosis continúa presente, sobre todo en sustancia blanca. (CD68, 20X.)

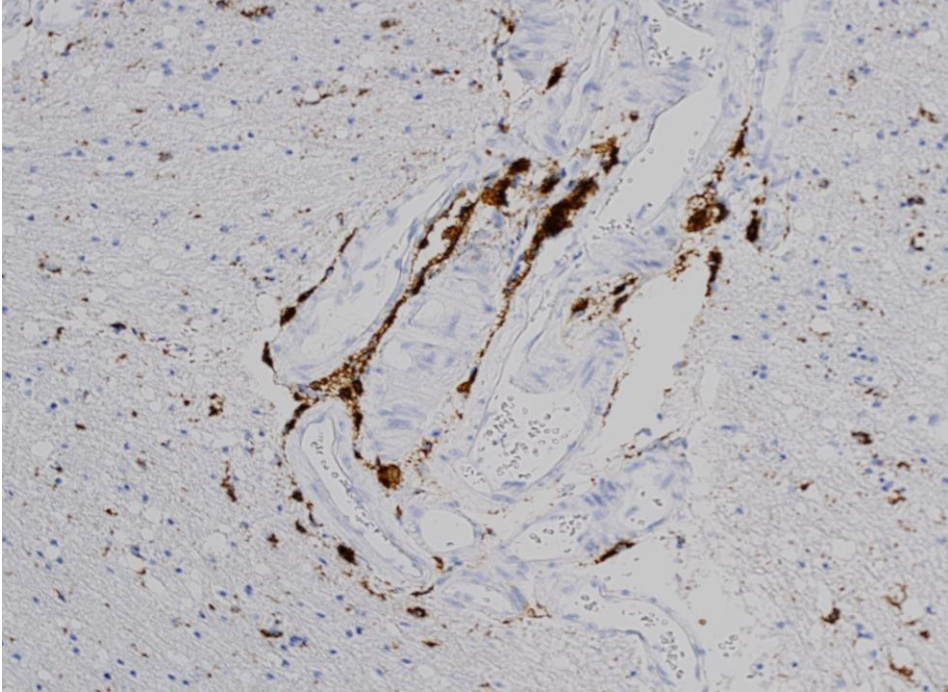


Figura 91. Macrófagos en sustancia gris, próximos a los vasos sanguíneos. (CD68, 10X.)

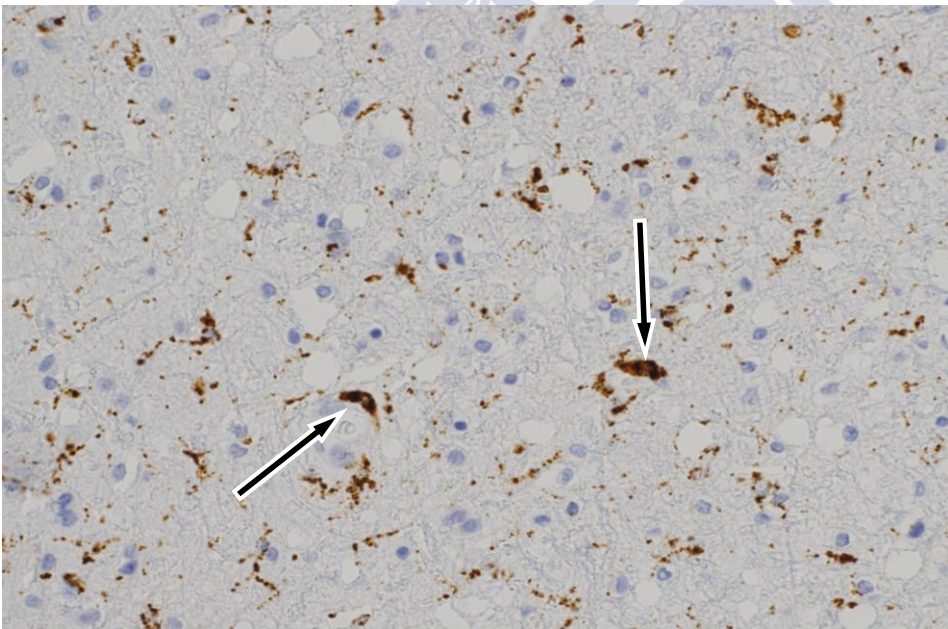


Figura 92. Macrófagos sustancia blanca junto con la microglia, fenómeno que perdura al menos un año. (CD68, 20X.)

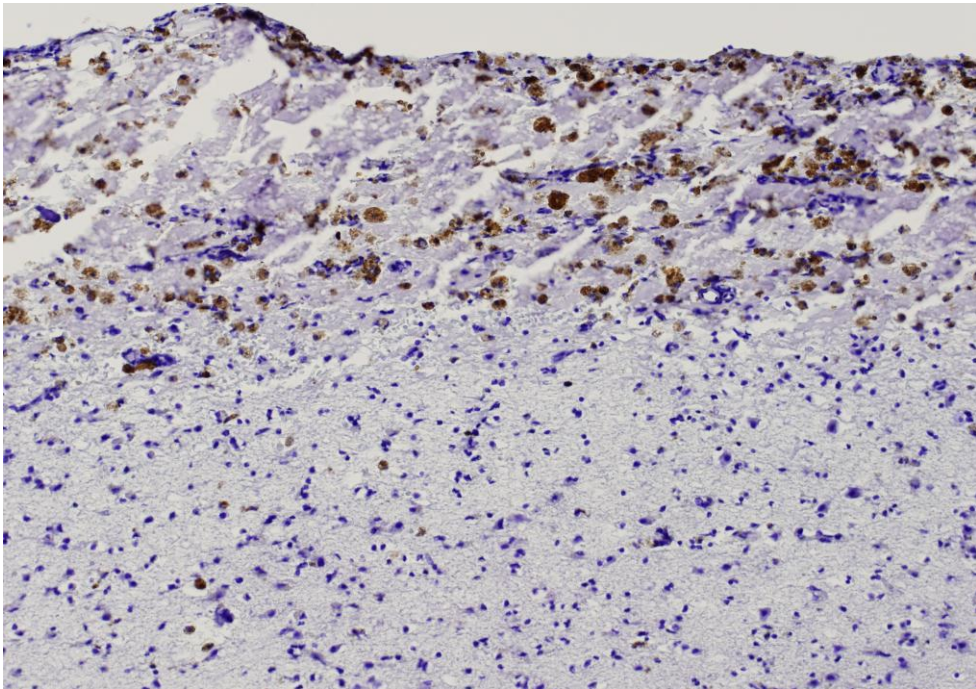


Figura 93. Macrófagos presentes en meninges aún meses después de la lesión. (CD68, 10X.)



4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Como ya se ha expuesto en los distintos grupos del epígrafe anterior, se realizó conteo celular de los astrocitos marcados con PGFA y de la microglía y los macrófagos marcados con CD68, lo cual nos permitió diagnosticar de forma más objetiva la hiperplasia. Pero esto también nos ofrece la posibilidad de realizar estudios estadísticos sobre el comportamiento de estas estirpes celulares conforme transcurre el tiempo con respecto a los controles.

4.A.- PGFA

4.A.a.- Sustancia gris

Observando la tendencia media de la densidad de astrocitos del grupo de los controles con la de los distintos grupos en sustancia gris, observamos que existen diferencias significativas, para lo cual el valor de p debe ser inferior a 0,005 para un rango de confianza del 95%. En nuestro estudio el valor de $p=0,002$.

ANOVA

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	659,997	4	164,999	4,669	,002
Dentro de grupos	3074,221	87	35,336		
Total	3734,217	91			

Para realizar comparaciones entre el grupo control y cada uno de los grupos problema, comprobamos, en primer lugar, la distribución normal de nuestra muestra mediante un test de Kosgorov-Smirnov (datos que no se muestran). Así, pudimos aplicar un test de Scheffe para observar detalladamente el comportamiento de cada grupo. Sólo se observó diferencia significativa con respecto al grupo control, en el grupo de supervivencia de entre 24 horas y 30 días:

Descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
C_PG_SG	20	17,0500	5,36534	1,19973
P_PG_SG1	16	18,5625	7,90754	1,97688
P_PG_SG2	24	20,0833	5,93381	1,21123
P_PG_SG3	24	24,3750	5,36342	1,09480
P_PG_SG4	8	20,6250	4,10357	1,45083
Total	92	20,3261	6,40588	,66786

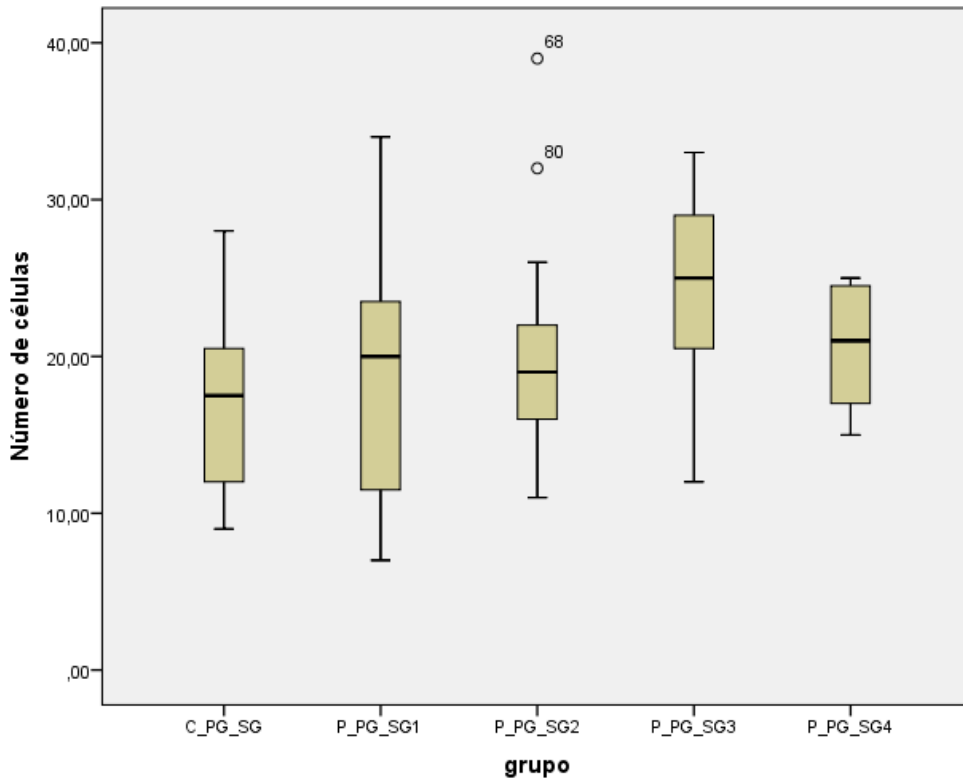
Comparaciones múltiples

Variable dependiente: número de células

Scheffe

(I) grupo	(J) grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
C_PG_SG	P_PG_SG1	-1,51250	1,99381	,965
	P_PG_SG2	-3,03333	1,79976	,587
	P_PG_SG3	-7,32500	1,79976	,004
	P_PG_SG4	-3,57500	2,48672	,724

Todo esto se observa de forma mucho más clara en un gráfico de cajas, en el que es obvia la agrupación de las medias en torno a un valor similar, excepto la del tercer grupo



En el eje Y figura el número de células agrupados en decenas y en el eje X la primera caja corresponde al grupo control en sustancia gris (C_PG_SG). Las siguientes cajas representan el comportamiento de la densidad celular en los cuatro grupos de distinta supervivencia, comenzando por el de menos de dos horas (P_PG_SG1) y finalizando por el de meses (P_PG_SG4).

4.A.b.- Sustancia blanca

En la sustancia blanca los resultados resultaron más llamativos, ya que las diferencias significativas afectaban a los grupos de horas y de días de

supervivencia, es decir, a los grupos dos y tres de nuestro estudio. Y el grupo cuatro se hallaba cerca de rangos significativos.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5642,367	4	1410,592	44,857	<0,001
Dentro de grupos	2861,633	91	31,447		
Total	8504,000	95			

Descriptivos

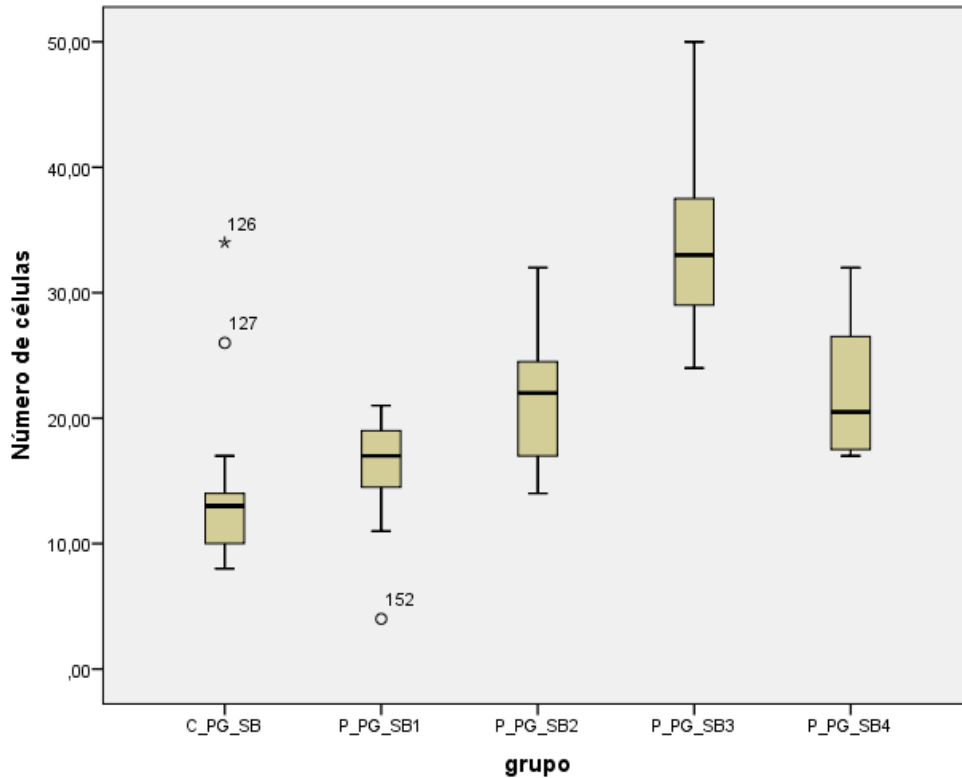
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
C_PG_SB	20	13,9000	6,16356	1,37821
P_PG_SB1	20	16,0000	3,94702	,88258
P_PG_SB2	24	21,4167	4,43226	,90473
P_PG_SB3	24	34,2500	7,07875	1,44494
P_PG_SB4	8	22,2500	5,84930	2,06804
Total	96	22,0000	9,46128	,96564

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: número de células

Scheffe

(I) grupo	(J) grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
C_PG_SB	P_PG_SB1	-2,10000	1,77332	,843
	P_PG_SB2	-7,51667	1,69782	,001
	P_PG_SB3	-20,35000	1,69782	<0,001
	P_PG_SB4	-8,35000	2,34588	,017



En el eje Y figura el número de células agrupados en decenas y en el eje X la primera caja corresponde al grupo control en sustancia gris (C_PG_SB). Las siguientes cajas representan el comportamiento de la densidad celular en los cuatro grupos de distinta supervivencia, comenzando por el de menos de dos horas (P_PG_SB1) y finalizando por el de meses (P_PG_SB4).

La distribución de las medias describe una curva que indica un aumento progresivo de la densidad celular, mucho mayor que en la sustancia gris, con un pico máximo de expresión en el grupo de semanas de evolución.

4.B.- CD68

4.B.a.- Sustancia gris

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	14494,590	4	3623,647	9,096	<,001
Dentro de grupos	34660,367	87	398,395		
Total	49154,957	91			

Descriptivos

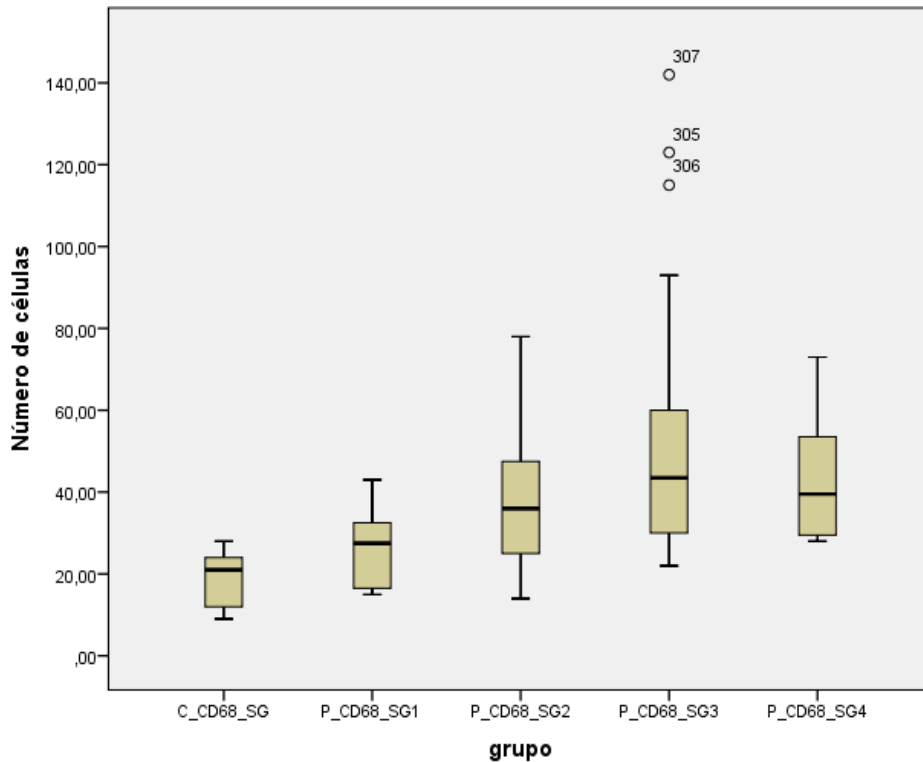
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
C_CD68_SG	16	19,1250	6,79093	1,69773
P_CD68_SG1	20	25,8000	8,79354	1,96629
P_CD68_SG2	24	37,7917	15,94278	3,25431
P_CD68_SG3	24	53,5417	32,85671	6,70685
P_CD68_SG4	8	43,2500	16,14001	5,70636
Total	92	36,5217	23,24144	2,42309

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: número de células

Scheffe

(I) grupo	(J) grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
C_CD68_SG	P_CD68_SG1	-6,67500	6,69473	,910
	P_CD68_SG2	-18,66667	6,44201	,088
	P_CD68_SG3	-34,41667	6,44201	,000
	P_CD68_SG4	-24,12500	8,64286	,110



En el eje Y figura el número de células agrupados en decenas y en el eje X la primera caja corresponde al grupo control en sustancia gris (C_CD68_SG). Las siguientes cajas representan el comportamiento de la densidad celular en los cuatro grupos de distinta supervivencia, comenzando por el de menos de dos horas (P_CD68_SG1) y finalizando por el de meses (P_CD68_SG4).

Como puede observarse la curva que describe este marcador es similar a la del PGFA en la sustancia blanca, con el pico de expresión máxima en el grupo de semanas de supervivencia, aunque ese pico sea menos pronunciado. Del mismo modo los grupos dos y cuatro (de horas y meses de supervivencia, respectivamente) se encuentran en rangos próximos a niveles significativos.

4.B.b.- Sustancia blanca

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	22874,884	4	5718,721	32,494	<,001
Dentro de grupos	15311,583	87	175,995		
Total	38186,467	91			

Comparaciones múltiples

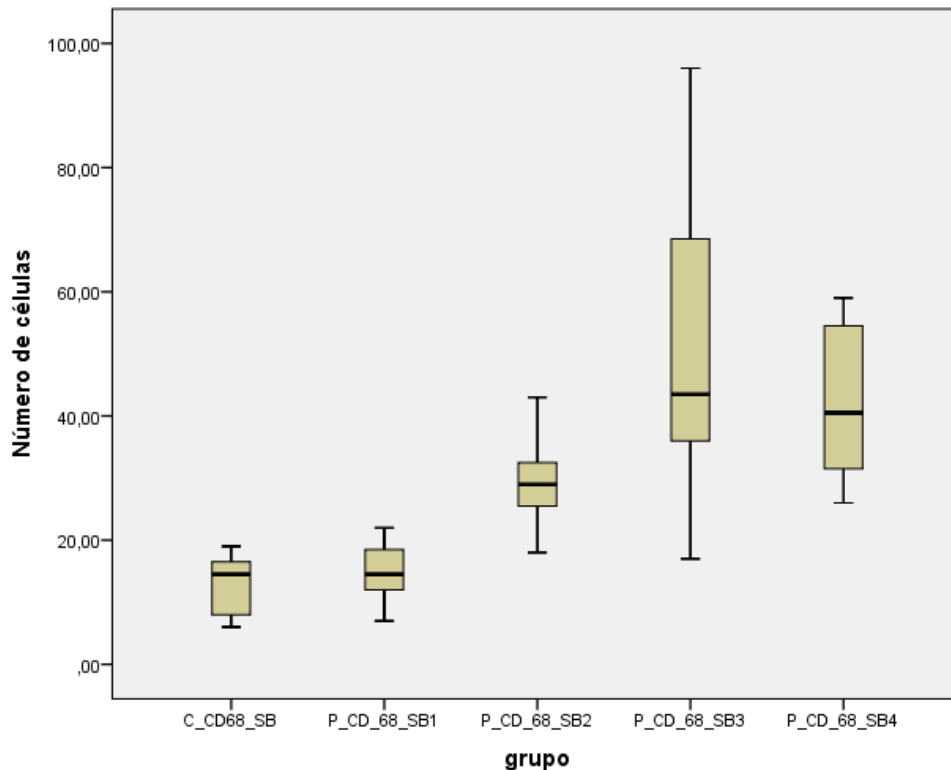
Variable dependiente: número de células

Scheffe

(I) grupo	(J) grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.
C_CD68_S B	P_CD_68_SB1	-1,75000	4,44966	,997
	P_CD_68_SB2	-16,41667	4,28169	,008
	P_CD_68_SB3	-39,75000	4,28169	<,001
	P_CD_68_SB4	-29,25000	5,74448	<,001

Descriptivos

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar
C_CD68_SB	16	13,0000	4,57530	1,14382
P_CD_68_SB1	20	14,7500	4,26584	,95387
P_CD_68_SB2	24	29,4167	6,00664	1,22610
P_CD_68_SB3	24	52,7500	23,43771	4,78420
P_CD_68_SB4	8	42,2500	13,02470	4,60493
Total	92	30,5761	20,48491	2,13570



En el eje Y figura el número de células agrupados en decenas y en el eje X la primera caja corresponde al grupo control en sustancia gris (C_CD68_SB). Las siguientes cajas representan el comportamiento de la densidad celular en los cuatro grupos de distinta supervivencia, comenzando por el de menos de dos horas (P_CD68_SB1) y finalizando por el de meses (P_CD68_SB4).

En este caso, la curva es paralela a los anteriores, si bien, la media del segundo grupo (de más de dos horas de supervivencia) ya resulta significativamente superior a la del grupo control. El pico máximo vuelve a encontrarse en las semanas de supervivencia y aunque se produce una disminución importante del número de células en el grupo de meses de supervivencia, la densidad celular continúa siendo significativamente superior a la del grupo control.

Resulta evidente una mayor expresividad de cualquiera de los dos marcadores en la sustancia blanca y un comportamiento paralelo de ambos. Sólo se objetivó un comportamiento diferente en la expresividad del PGFA en la sustancia gris









DISCUSIÓN





DISCUSIÓN

CONSIDERACIONES GENERALES

Es importante señalar que el presente trabajo tuvo un carácter prospectivo y que en nuestro país no se dispone de series amplias de casos ya que en las autopsias médico-legales no se realizan estudios anatomopatológicos del SNC exhaustivos. Por eso, el diagnóstico y la data de los traumatismos craneoencefálicos letales se ha basado habitualmente en los antecedentes clínicos y/o policiales y en las características macroscópicas de la lesión, que si bien son elementos de gran ayuda, resultan insuficientes para dar respuestas más concretas en determinados casos de relevancia médico legal

Nuestro trabajo se centró en la investigación del traumatismo cráneo encefálico en seres humanos, dada la escasez de estudios postmórtem en este tejido. La mayoría de los estudios a este respecto se basa en modelos animales o en series clínicas, por lo que el material necrópsico humano está prácticamente inexplorado. En el modelo animal, las circunstancias y el momento de la lesión son conocidos con absoluta precisión. Basándonos en dichos resultados pretendimos despejar esa incógnita en el ser humano, asumiendo que el comportamiento del tejido nervioso es similar en todos los mamíferos.

En cuanto a las muestras obtenidas de cada sujeto, algunos autores recomiendan un muestreo amplio de ambos hemisferios (que incluya tejido del córtex de cada uno de los lóbulos y los núcleos de la base), del cerebelo y

de cada una de las partes del tallo cerebral. En un principio se recogió todo el material, pero a la hora de diseñar el estudio nos circunscribimos a las muestras de córtex afectado directamente por el traumatismo porque uno de los objetivos de este trabajo era diseñar un procesamiento de utilidad en la práctica médico-forense diaria, y realizar un muestreo tan extenso en cada caso de interés médico legal, resultaría demasiado caro y prolongado en el tiempo, por lo que sería poco práctico para responder a las preguntas habituales de una autopsia.

Ciertos autores como Pierce y cols (1996), Raghupathi y cols (2003), Tweedie y cols (2007), Tashlykov y cols (2007) y Redel y cols (2013), que han realizado modelos experimentales en animales, han observado que traumatismos de intensidad media, pueden producir lesiones relevantes a corto y medio plazo con consecuencias clínicas importantes y con una expresión anatomopatológica similar a la encontrada en traumatismos de alta intensidad con periodos de supervivencia mayores.

Para corroborar ese punto, hubiera resultado de utilidad saber la energía del impacto recibido, dato casi imposible de conocer con precisión, salvo en los casos de accidente de tráfico. La contrapartida, es que en estas circunstancias de muerte y debido a lo grave de las lesiones asociadas, la muerte se produce de forma casi instantánea, por lo que las cuestiones médico-forenses quedan ampliamente respondidas, aunque el corto periodo de supervivencia dé lugar a resultados negativos en el estudio microscópico.

En cualquier caso, y dado que el objeto de nuestro estudio es la aplicación práctica de las técnicas inmunohistoquímicas al campo forense, tampoco tienen demasiada significación, ya que en la práctica habitual, los traumatismos no letales no entran en nuestro ámbito de estudio.

Tal y como se ha expuesto en la revisión bibliográfica es posible hacer una primera aproximación a la data del traumatismo observando las características del coágulo (Walter y cols (2009), pero también es cierto que el periodo de incertidumbre es mucho mayor que con técnicas microscópicas.

Para realizar el presente estudio, se han seleccionado los parámetros macroscópicos más trascendentes y que son manejados por todos los médicos forenses: fractura craneal, hemorragia intracraneal y contusión cerebral; toda vez que las técnicas convencionales no han ofrecido resultados útiles en lo que al problema de la data se refiere.

UTILIDAD DE LOS MARCADORES INMUNOHISTOQUIMICOS

La inmunohistoquímica se ha consolidado como un método mucho más resolutivo de estudio del tejido nervioso, no sólo por su sensibilidad y especificidad, que nos permite estudiar cada uno de los tipos celulares presentes en dicho tejido, sino por su mayor sencillez respecto a las tinciones clásicas morfológicas que, en el caso del tejido nervioso son las tinciones argentícas, por encima de la hematoxilina-eosina.

Al igual que Siman y cols (2009) consideramos que la utilización de un panel de anticuerpos de uso habitual puede ser de gran utilidad en la aproximación a la data de los traumatismos cráneo-encefálicos. Dado que estas técnicas están incluidas en la rutina de los laboratorios de histopatología, pueden ser dominados sin dificultad por el médico forense, lo cual facilita la tarea del estudio. Además, es importante señalar que la inmunohistoquímica nos permite comparar resultados de muestras procesadas con distintos anticuerpos.

Diversos estudios han puesto en valor la utilidad de múltiples proteínas con distinta significación o función:

- neovascularización: tenascina, colágenos...
- inflamación: IIs, TNF, vimentina, proteoglicanos, CD68, LCA
- de daño axonal difuso: BAPP
- de apoptosis: p53, Bcl-2, caspasa 3, citocromo C...

y muchos más, con distintos resultados. La conclusión generalizada de autores como Geddes y cols (1997), Oehmichem y cols (1998 y 2009) y Siman y cols (2009), es que un solo marcador aislado es insuficiente para realizar un diagnóstico correcto de la patología traumática del SNC y que es necesario estudiar diversas facetas del daño neurológico en casos de traumatismo para aproximarse al estudio de esta patología. Siman y cols (2009) propusieron un panel de marcadores combinando el estudio de productos de la degradación de los neurofilamentos con marcadores linfocíticos de inflamación y de apoptosis para realizar un diagnóstico más exacto de la magnitud del TCE, y del daño primario y secundario. En general, todos los marcadores que él estudió aparecían antes de las 24 horas y van aumentando alcanzando sus picos máximos antes de los 4 días, momento en el que comienzan a declinar. Según el patrón de expresión durante este tiempo se puede hacer un diagnóstico del TCE y sus características e incluso estudiando estos marcadores en LCR en sujetos vivos, es posible realizar un pronóstico de supervivencia.

En nuestro estudio descartamos determinados grupos de marcadores, como por ejemplo, los de neovascularización (tenascina, laminina, colágeno tipo IV, trombomodulina y factor VIII) por resultar poco específicos y de expresión demasiado tardía para poder reducir el periodo de incertidumbre a la hora de datar los traumatismos, según los resultados obtenidos por Hausman y cols (2000).

También se prescindió del estudio de marcadores linfocíticos, centrándose el estudio en el comportamiento de las células propias del tejido en cuestión. Es

cierto que los macrófagos tampoco son componentes habituales del tejido cerebral, pero su estudio va inevitablemente ligado al de la microglía, debido a que su activación y funciones son similares.

Del mismo modo, de entre los marcadores de astrogliosis desechamos la α -1-antitripsina por estar su expresión también relacionada con el envejecimiento (Hausman y cols (2001)). Dado el número de casos de nuestro estudio, no podíamos segregar la muestra por grupos de edad, por lo que el uso de este marcador hubiera podido ofrecer resultados sesgados.

También fueron rechazados los proteoglicanos, porque en momentos precoces de la evolución del traumatismo disminuyen y no presentan cambios durante días (Harris y cols (2009)), por lo que para discernir tiempos de evolución cortos resultan de poca utilidad.

En cuanto a los marcadores de macrófagos y microglía, se planteó el empleo de las interleukinas 1 y 6 y del TNF- α porque autores como Knobloch y cols (2000), Holmin y cols (2004) y Yan y cols (1992) observaron perfiles de expresión que hubieran podido ser de utilidad en el presente estudio, pero finalmente se prescindió de ellos, en primer lugar porque su expresión dependía del tipo de traumatismo (chorro a presión, contusión o punción) (Yan y cols 1992) y porque al fin y al cabo, son secretadas por los macrófagos y la microglía activada, por lo que estudiando el comportamiento de estas estirpes celulares obtenemos resultados directos de la evolución del proceso inflamatorio.

Por otro lado, el Pro-EMAP II se trata de un marcador apoptótico de las células inflamatorias (Yao y cols (2009)), y para estudiar esta faceta de la lesión se optó por marcadores que afectaran a todos los tipos celulares que componen el tejido cerebral.

De entre los marcadores del complejo mayor de histocompatibilidad se eligió el que presentaba una expresión más precoz, el CD 68.

Los marcadores neuronales no parecían ofrecer gran utilidad en este estudio ya que el NCAM no aparece en traumatismos graves por la imposibilidad de regeneración tisular en estos casos (Budinich (2012)) y la NSE presentaba un comportamiento similar al del β -APP, por lo que su estudio que resultaba redundante.

Para estudiar las alteraciones del citoesqueleto quedaba patente en la literatura que el marcador de mayor utilidad eran los neurofilamentos (Dunn-Meynell y cols (1997), Ronchao y cols (2012), Li y cols (2013) y DiLeonardi y cols (2009)), sobre todo teniendo en cuenta que las proteínas de los microtúbulos se degradan en casos de traumatismos severos, siendo muy difícil observar su expresión (Ogata 2007).

Los marcadores de proliferación celular fueron descartados por parecer de poca utilidad en nuestros casos, ya que en los traumatismos severos dicha proliferación está muy mermada, cuando no abolida y aunque se produzca siempre es en casos de largo tiempo de supervivencia: 8 h en el caso de la nestina Kaneko y cols (2010) y 14 días la BrdU (Tatsumi y cols (2005)) y 4 días la DNA-metiltransferasa (Lundberg y cols (2009)). Es decir, estos marcadores resultan útiles para estudiar la regeneración del tejido cerebral y establecer pronósticos e incluso posibles tratamientos en casos de TCE de intensidad media, pero no presentan utilidad para la datación de traumatismos severos.

Para el estudio de la apoptosis fueron rechazadas desde el inicio las técnicas especiales como la hibridación in situ y el TUNEL, sobre todo por no estar a disposición del médico forense en su práctica habitual.

Los marcadores inmunohistoquímicos de la apoptosis tampoco son de uso habitual en los laboratorios de histopatología, por lo que se optó por los que habían presentado mejores resultados en la literatura para el propósito de este estudio: la caspasa-3, el β -APP y los genes apoptóticos Bcl-2 y p53.

Los dos primeros no se encontraban a disposición en nuestro laboratorio, así que por un simple motivo de economía se optó por adquirir sólo uno de ellos, en este caso el β -APP por presentar una expresión inicial en 1,5-3 horas tras la lesión (Oehmichem y cols (1998)) frente a las 4 horas de la caspasa 3 (Cernak y cols (2002)).

Por otro lado se ha demostrado que la apoptosis es un proceso dinámico que supone la síntesis de proteínas, todas ellas observables mediante técnicas inmunohistoquímicas, pero estas proteínas no son específicas, no sólo de este proceso, sino del tejido cerebral.

De entre los genes pro y antiapoptóticos sencillamente se eligieron lo más representativos de ambas familias, es decir, el p 53 y el Bcl-2, respectivamente.

En resumen en nuestro estudio empleamos los siguiente marcadores:

- Marcadores que aportan información morfológica e inflamatoria: NF, PGFA y CD68
- Marcadores de daño axonal difuso β -APP
- Marcadores de apoptosis p53 y Bcl-2

Para evaluar la eficacia de esta batería de anticuerpos se recogieron 21 casos de TCE macoscópicamente reconocibles con distintos tiempos de supervivencia que oscilaban entre la muerte inmediata y los 7 meses. Los anticuerpos que se asocian a componentes estructurales de alguna estirpe celular, presentaron una

inmunoreactividad del 100%, no así los de apoptosis y daño axonal difuso, si bien su sensibilidad no sólo se ve garantizada por los controles realizados en nuestro estudio, sino por los realizados por diversos autores (Raghupati y cols (2004), Ohemichem y cols (1998) y Dolinak (2006), entre otros) que obtuvieron resultados prometedores con dichos marcadores.

Como controles negativos se eligieron 4 individuos con etiología de muerte que no implicara compromiso vascular encefálico tales como infartos cerebrales, ahorcamiento o ahogamiento, hipoglucemia y estatus epiléptico, para evitar falsos positivos. Por eso seleccionamos casos de muerte súbita cardiaca, considerando que los fenómenos agónicos no se prolongaron en el tiempo, por lo que no se habrían producido cambios por hipoxia en el encéfalo que pudieran alterar nuestro estudio.

En todos los casos control, los marcadores de apoptosis y daño axonal difuso fueron negativos. Los marcadores morfológicos fueron positivos, y de hecho, fueron tomados como referencia para valorar el aumento del número de células gliales.

CONSIDERACIONES TÉCNICAS

En nuestro estudio nos encontramos con dos dificultades técnicas. La primera fue la fijación de las muestras. En la práctica forense habitual, para obtener muestras cerebrales se fija el encéfalo en su totalidad durante al menos 15 días y posteriormente se obtiene la muestra de interés.

Cuando seguimos este protocolo, al realizar la técnica inmunohistoquímica observamos que, aún a pesar de la recuperación antigénica, la tinción era irregular y poco fiable a la hora de su interpretación.

Por eso se decidió obtener las muestras de interés en fresco, lo cual presenta una mayor dificultad técnica dada la densidad del tejido en concreto, sobre todo teniendo en cuenta que las muestras se obtuvieron de la zona de contusión, y fijarlas en formol 24 h para posteriormente conservarlas en alcohol de 70%. De esta forma la técnica inmunohistoquímica mejoró notablemente los resultados, aunque como contrapartida en algún caso se obtuvo poco tejido viable para su examen microscópico, en especial de sustancia blanca. Maeda y cols (2010), ya observaron la importancia de una correcta toma y conservación de las muestras en casos de TCE, no sólo con el fin de depurar la técnica inmunohistoquímica, sino para que otros factores externos, como la autólisis, a la que el encéfalo es muy sensible, no alteren los resultados.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

La interpretación de los resultados es uno de los aspectos más difíciles de la inmunohistoquímica y debe ser llevada a cabo con precaución. Para una buena valoración de los resultados, es importante estar familiarizado con los patrones de tinción y con el grado de sensibilidad y especificidad de los anticuerpos empleados.

En general, es más fácil confiar en un resultado positivo que en uno negativo. Si bien en nuestro estudio, a veces no es tan importante la positividad *per se*, sino la morfología y el patrón de distribución. Por ejemplo, el PGFA siempre es positivo en el SNC, ya que es un marcador característico de los astrocitos, pero lo importante para nosotros es la forma y distribución de estas células, diferenciando la hipertrofia y la hiperplasia en una reacción de astrogliosis, si es que está presente.

En este caso y en el del CD68 recurrimos al conteo de células teñidas por campo, comparándolo con la media de células marcadas por campo (al mismo

aumento) en los controles, graduando así de forma semicuantitativa el grado de positividad.

Es cierto que alguno de los marcadores no ofreció los resultados esperados, algunos por franca negatividad (como el p53) y otros por escasa significación de sus positivos (como el Bcl-2 y el β -APP).

EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES SELECCIONADOS.

5.A.-NEUROFILAMENTOS

Los marcadores que habitualmente se utilizan para el estudio del citoesqueleto son múltiples (proteína Tau, proteína asociada a microtúbulos MAP-2, la proteína alfa-syn y neurofilamentos), pero lo más frecuente es emplear anticuerpos contra de alguna de las subunidades, generalmente al M o la L (que es la empleada en nuestro caso) dado que nos aportan información funcional y morfológica.

Uryu y cols (2007) apuntan la utilidad de estudiar los distintos marcadores de neurofilamentos dado su distinto comportamiento cronológico tras un insulto encefálico. No obstante, en nuestro estudio y dado que se realizó una batería más amplia de marcadores que atendían a otras estructuras y funciones de la neurona, al igual que sostiene Siman y cols (2009) entre otros autores, fue suficiente el empleo del marcador para la fracción de 68kD, lo cual nos permitió hacer un diagnóstico morfológico de la lesión evidenciando la patología axonal en distintos momentos evolutivos: primero axones arrosariados y, cuando se produce la axonotmesis, bulbos axonales proximales; tal y como los describe Dolinak (2006) en sus trabajos, si bien él relaciona estos estadios con la longitud del axón, por lo que considera que

no es un buen criterio para la data del traumatismo. Para nosotros sí que posee utilidad, ya que, aunque es cierto que es más fácil observarlo en axones largos, se hace evidente en todos los axones, presentando además un patrón morfológico similar al del BAPP (en ziga-zag, difuso o mixto), y conforme avanza la lesión, es fácil identificar distintos estadios de degradación de axones de longitudes similares. en la zona de lesión se observa edema y formación de rosarios en los axones incluso en casos de supervivencia de menos de media hora. Este fenómeno se observa sobre todo en zonas próximas a los vasos y a los focos hemorrágicos; pero su distribución es más difusa y su diámetro mayor conforme transcurren las horas. Sin embargo, no es posible encontrar bulbos axonales hasta que no han transcurrido al menos 11 h.

A partir de las dos horas de supervivencia es posible encontrar franca ruptura axonal y necrosis neuronal identificable por la retracción del soma con su halo asociado.

Conforme transcurren las horas los axones dañados predominan sobre los sanos y aumenta el número de bulbos axonales, sobre todo proximales, y de neuronas necróticas, hasta que por encima de las 24 h. empiezan a morir las células y conforme avanzan las semanas sólo es posible identificar el halo de retracción neuronal.

Estos resultados difieren de los Dunn-Meynell y cols (1997) que no detecta la subunidad de 68 KDa en los axones dañados (ondulados o arrosariados) en todo el hemisferio homolateral a la contusión hasta las 24 horas. La explicación a estas diferencias podría estar en que este autor estudia localizaciones distantes del traumatismo y nosotros nos centramos en el foco de lesión. El periodo de latencia hallado en este estudio es más corto que el de Ronchao y cols (2012), quienes no ven agregación de los neurofilamentos hasta transcurridas 1 o 2 h tras el traumatismo y la deformidad del axón a las 6 h, pero una vez más, ellos estudian la

reacción del traumatismo cráneoencefálico en una estructura distante de la lesión (concretamente el tallo encefálico).

No obstante, en lo que respecta a los bulbos axonales, nuestros resultados sí se aproximan más a los de DiLeonardi y cols (2009) que observan los bulbos axonales a partir de las 6 h empleando el Ac anti-neurofilamentos en cíngulo y córtex.

En algunos casos observamos además, una intensa inmunorreactividad en el soma neuronal que podría ser debida a la agregación de los neurofilamentos en neuronas dañadas conforme transcurre el tiempo. Esta hipótesis se confirma por la presencia de somas neuronales fuertemente teñidos en el grupo 2 (horas de evolución), que aumenta en el grupo 3 (días de evolución), desapareciendo en el grupo 4 debido a la muerte de esas neuronas.

5.B.- PGFA

Esta proteína característica de los astrocitos ha sido empleada en ocasiones como marcador principal para demostrar daño del tejido y en otras ocasiones como marcador secundario para demostrar que un determinado resultado se debía al comportamiento de esta estirpe celular. Así lo empleó Bye (2011) cuando demostró la proliferación de astrocitos tras un TCE en la sustancia blanca subyacente a los ventrículos laterales. Este autor observó mediante BrdU la proliferación celular demostrando mediante inmunohistoquímica que una de las estirpes celulares que proliferaban eran astrocitos.

En nuestro estudio empleamos esta proteína como marcador primario, es decir, para realizar el estudio morfológico sobre la evolución de la actividad

astrocítica (que al fin y al cabo es la encargada de la formación de la cicatriz en el tejido nervioso). Para ello, hemos tenido en cuenta tanto el aumento del número de estas células por campo, como la morfología celular, que es más redondeada y grande con una mayor proporción de citoplasma con respecto al núcleo en los astrocitos activados, (hiperplasia e hipertrofia). Otro aspecto morfológico importante es el engrosamiento de sus prolongaciones a nivel de la barrera hematoencefálica, y la asimetría de la misma, signo de reacción inflamatoria y que condiciona las alteraciones funcionales de esta estructura dando lugar al edema cerebral y al paso de células inflamatorias del torrente sanguíneo al parénquima cerebral, en especial de macrófagos. Todo ello ampliamente descrito por Ronchao y cols (2012).

En el grupo de casos en los que la muerte fue prácticamente inmediata no se observó reacción astrocitaria de ningún tipo, distinguiéndose perfectamente los astrocitos protoplasmáticos de la sustancia blanca de los fibrosos de la sustancia gris; incluso es posible observar zonas de hemorragia con astrocitos completamente normales a su alrededor y la BHE tampoco se ve alterada.

A partir de las dos horas de supervivencia comienza a observarse la hipertrofia de esta estirpe celular y la hiperplasia no aparece hasta las 16 o 20 h. Sólo uno de los casos con una supervivencia escasa (30 min) presentaba tanto hipertrofia como hiperplasia

Otro caso de este grupo presenta hiperplasia difusa de los astrocitos, engrosamiento de la BHE, y disminución de la densidad celular, expresión de necrosis neuronal, a pesar de que la causa de la muerte fue una precipitación, con fallecimiento inmediato.

Dadas las anomalías en los resultados de estos dos casos, se decidió no incluirlos a la hora de realizar el análisis estadístico, para no sesgar los resultados, ya que habrían aumentado falsamente la tendencia central del grupo.

La causa de los resultados discordantes de estos dos casos con respecto a su grupo será vista más adelante en esta discusión (página 215).

Conforme transcurren el tiempo la reacción astrocitaria se va haciendo más difusa, llegando incluso a regiones más distantes. A partir de las 16 h. se hace evidente la migración de los astrocitos alrededor de los focos hemorrágicos y la lesión de la BHE, la cual en algunos casos está engrosada y en otros está completamente destruida.

La hipertrofia y sobre todo la hiperplasia se van haciendo cada vez más evidentes y más difusas conforme transcurren los días, siendo su mayor expresión entre el 5° y el 17° día. A partir de este punto es posible observar cómo se organiza el tejido cicatricial, distinguiéndose el tejido sano del necrótico, y como se produce una retracción de dicho tejido alrededor de los vasos.

En los casos de supervivencia mayor o igual a 30 días, el tejido no lesionado muestra una vuelta a la normalidad en lo que se refiere a la morfología astrocitaria y de la BHE, siendo perfectamente distinguible la cicatriz alrededor de material hialino que progresivamente se sustituye por más tejido astrocitario.

En cuanto al análisis estadístico de la densidad celular observada con este marcador en sustancia gris, se observó que en los grupos 1, 2 y 4 no había diferencia significativa en la tendencia central con respecto a la de los controles. Realmente, las medias de todos los grupos presentaban una gran diferencia con la de los controles, pero al ser tan pequeña la muestra el error estándar era tan grande como dicha diferencia, por lo que ésta no resultaba significativa. Es decir, sería conveniente realizar estudios más amplios, pero resulta difícil conseguir suficientes

casos de cada grupo para obtener una muestra significativa (mayor a 30 individuos por grupo).

En la sustancia blanca se obtuvieron diferencias significativas en los grupos 2 y 3, y el grupo 4 no resultó significativo por un escaso márgen. Una vez más, la escasez de muestra originaba una desviación estándar demasiado amplia. Probablemente aumentando la muestra, se obtendrían diferencias significativas. En cualquier caso, el grupo de meses de supervivencia no resulta especialmente trascendente en nuestro estudio, ya que no es un reto especialmente difícil de resolver en la práctica forense habitual.

Bye (2011) observó que a partir de 4 h. postraumatismo, los pecutores celulares de la región subventricular se diferenciaban en distintas estirpes celulares, si bien la primera en ser identificada eran los oligodendrocitos. Este proceso se prolongaba, al menos dos semanas. Sin embargo, su estudio no incluía resultados a largo plazo. Geddes (1997), en cambio no observó positividad en el hemisferios homolateral del traumatismo para PGFA hasta el 5º día, con un pico máximo a los ocho días y una distribución adyacente a los bulbos axonales. Es decir, nuestros resultados se aproximan más a los de Bye, pero el pico máximo coincide con los hallazgos de Geddes (1997) y de Tashykov y cols (2007).

En lo que se refiere al proceso de cicatrización, nuestras observaciones difieren de las que refiere Geddes (1997), el cual establece que este proceso comienza a los tres meses, pero nosotros lo encontramos a partir de los 17 días. Es posible que la diferencia entre nuestros resultados y los suyos radiquen, una vez más, en la diferencia de la intensidad del traumatismo y la existencia de HSA en nuestros casos, mientras que su estudio se centró en traumatismos de intensidad media y sin hemorragia.

Por otro lado, las diferencias con autores como Wang y cols (2012), quienes detectan la disminución de la expresión de la PGFA y de la densidad neuronal a partir de las 12 h tras un traumatismo, se deben a que ellos estudiaron el comportamiento de las estructuras distantes del traumatismo, es decir, intentan discernir las alteraciones que se deben al daño secundario por aumento de la PIC y a la isquemia relativa, dejando de lado la zona directamente contundida, que es precisamente la región que a nosotros nos interesa.

Obviamente, estos cambios diferidos también pueden ser de utilidad en el campo forense para el fin que nos ocupa, pero un estudio tan prolijo de cada uno de los casos dificultaría su manejo en la práctica habitual.

5.C.- CD68

La tinción con CD 68 resultó muy débil con el clon KP1, por lo que empleamos el clon PGM1 con el que se observó una tinción más intensa y nítida. En nuestras muestras el empleo del primer anticuerpo dió lugar a una minusvaloración de los datos ya que el número de células de la microglía y macrófagos observados con este marcador era mucho menor.

El CD68 nos permite reconocer una característica inflamatoria, que es la activación de la microglía y la migración de macrófagos al foco de lesión, siendo en ocasiones imposible diferenciar unas de otros. Oehmichem (2009) y Geddes (1997) también observaron este problema al intentar distinguir los patrones de expresión de distintos marcadores, entre ellos el CD68, en casos de daño axonal difuso.

Es cierto que un observador entrenado puede llegar a distinguir la coloración y la disposición granular de la hemosiderina, del CD68 que suele ser más homogéneo y oscuro. Por otro lado, resulta más fiable constatar la morfología de

las células positivas, que en el caso de la microglía activada es alargada y con procesos en polos opuestos de la célula. O utilizar un cromógeno diferente como el NBT. Sin embargo, en algunas muestras la microglía activada presentaba una morfología que se asemejaba a la de los macrófagos por lo que en este caso un cambio de coloración no sería suficiente.

Dada la existencia de microglía residente en condiciones normales, sobre todo en sustancia blanca, aplicamos un método cuantitativo para determinar la existencia de microgliosis.

Autores como Oppenheimer y cols (1968) estudiaron con técnicas clásicas la agrupación de la microglía alrededor de los bulbos axonales. Sin embargo, con las técnicas inmunohistoquímicas la observación de este fenómeno es más difícil y resulta más práctico observar el aumento difuso de células inflamatorias (microglía activada y macrófagos) en el tejido.

También hay que tener en cuenta que la simple presencia de macrófagos en el tejido cerebral ya es signo de inflamación, ya que esta estirpe celular no se encuentra en condiciones normales en este tejido. En nuestro estudio es posible observarlos entre los 30 min y las 2 h en la región perivascular, pero conforme avanzan las horas difunden por toda la lesión siendo difícil distinguirlos de la microglía activada.

Observamos un aumento significativo del número de células microgliales a partir de los 30 min, sobre todo en sustancia gris. En los casos de mayor supervivencia siempre era evidente esa microgliosis difusa con un mayor o menor grado de infiltrado macrofágico asociado. Además evidenciamos que a partir de las 12 h su expresión en sustancia blanca era mucho mayor.

El pico máximo de microgliosis lo hemos observado a los 17 días en sustancia blanca y a los 20 en sustancia gris, y aunque después la densidad de esta

estirpe celular decrece, perdura durante al menos meses, puesto que no encontramos ningún sujeto que hubiera vuelto a cifras normales. Dada la escasez de casos con una supervivencia mayor de un año que pueden llegar a nuestro Servicio, resulta imposible averiguar en qué momento vuelve a la normalidad esta estirpe celular. Lo que sí podemos afirmar es que a los siete meses continúa existiendo microgliosis difusa.

El análisis estadístico de la tendencia central de la celularidad de los distintos grupos con respecto a los controles, muestra, en la sustancia gris, diferencias significativas sólo en el tercer grupo, aunque en el caso del segundo grupo ocurrió lo mismo que en el análisis del PGFA. En cualquier caso, es evidente que el pico máximo de expresividad de este marcador se alcanza a las semanas del traumatismo.

En la sustancia blanca, las diferencias resultaron muy significativas en los tres últimos grupos, aunque, una vez más, el pico máximo se alcanza en semanas y, si bien disminuye ligeramente al transcurrir los meses, esa disminución dista mucho del estado basal, coincidiendo con los resultados de Ohemichem y Gentelman (2009). En estos estudios observaron que en casos de TCE severo, en la zona hemorrágica aumenta la expresión de CD 68 a partir de las 3 horas, con un pico máximo a los 10 días y permanece positivo hasta 1 año. Sin embargo, en la sustancia blanca no aumenta hasta las 12 horas. Gentelman (2004) constata como primer momento de positividad en microglía al 2º o 3º día en las regiones distantes al traumatismo. Ambos coinciden en que dura incluso más de un año en cualquier localización.

Smith y cols (2013) refieren que desde el punto de vista regional, la activación de la microglía no presentaba relación con el daño neuronal.

Nuestros resultados se aproximan más a los de Oehmichem, aunque reducimos el periodo de “penumbra” a 30 minutos. También observamos que a las

12 h su expresión en sustancia blanca es mayor, coincidiendo con dicho autor y con Walter y cols. (2009). Nuestro pico máximo de expresión se produce entre 7 y 10 días más tarde que en el estudio de Oehmichem.

En cuanto a su persistencia durante meses e incluso años nuestros resultados coinciden con los de todos los autores.

Nuestro trabajo no estudió en profundidad la disposición topográfica de la microglía, pero en los casos en los que los astrocitos mostraban una agregación en los focos de lesión, es visible a pequeño aumento una agregación de la microglía en la misma zona, por lo que la afirmación de Smith y cols (2013) parece ser muy plausible.

Las diferencias entre este trabajo y el de Oehmichem son difíciles de explicar, ya que ambos estudian TCE severo con hemorragia intracraneal asociada. Y mientras que en el presente estudio se detecta la primera positividad mucho antes, el pico máximo de expresividad era mucho más diferido. Sería plausible que estas diferencias se deban a diferencias en la técnica, tanto al anticuerpo empleado (PGM1 en este trabajo) como al empleo de EnVisión o ABC como sistema de detección.

5.D.- β APP

La interpretación de la presencia de este marcador es compleja y para realizarla correctamente, es necesario conocer cómo y por qué es inmunorreactivo el precursor de β amiloide en estos casos. En resumen, se acumula por una alteración del transporte axonal. En la zona de la lesión esta interrupción tiene un origen puramente mecánico, es decir, los axones directamente afectados por el traumatismo y por la torsión del contragolpe se rompen y se acumulan deshechos

tanto en el extremo proximal como en el distal. Pero los fenómenos de hipoxia secundarios al aumento de PIC dan también lugar a una alteración bioquímica de la membrana axonal, permitiendo la entrada de Ca^{+2} en la célula, interrumpiendo dicho transporte axonal, hasta que finalmente la célula muere y el axón se rompe físicamente. Este fenómeno se da en todo el encéfalo, pudiendo llegar a provocar enfermedades neurodegenerativas a largo plazo. Todo ello fue ampliamente descrito por Chen y cols (2004).

Es decir, existe una expresión primaria directamente a consecuencia del traumatismo y otra diferida, debida al daño axonal difuso. El grado de expresión en ambos casos va a depender de la severidad del traumatismo, aunque no se relaciona con la presencia de hemorragia, tal y como afirma McKenzie (1996). Por otro lado, el patrón de expresión (difuso multifocal, en zig-zag o mixto) descrito por Graham (2004) se relaciona directamente con el origen primario o secundario de la expresión del marcador.

Morrison y cols, (2008) estableció que la tinción positiva a β -APP debe ser interpretada con cautela, ya que en estudios realizados sobre casos con escasa supervivencia, sólo se apreció presencia de esta proteína en 1% de los casos y en todos ellos había historia de isquemia y/o edema cerebral.

La mayoría de los autores estudian la expresión de este marcador a distancia, en distintas estructuras encefálicas, para determinar el daño axonal difuso e incluso para buscar alternativas terapéuticas que disminuyan las repercusiones a medio y largo plazo del TCE.

Así, Pierce y cols (1996) observan en la sustancia blanca homolateral al traumatismo, axones dañados tras una hora tras el traumatismo, alcanza un pico máximo a las 48 h y su presencia se prolonga al menos 1 semana.

Willemsee-van son y cols (2007), observan axones marcados en el hemisferio contralateral a la media hora, con una meseta de expresión máxima entre las 6 y las 26 h y disminuye hasta niveles iniciales a partir de las 40 h.

Oehmichem y cols (1999) estudia estructuras en axones largos como el puente (no porque la expresión de este marcador dependa de la longitud del axón) observando un primer momento de expresión en casos de TCE severo con hemorragia asociada a las 3 h tras el insulto, mientras que en los casos en los que el daño axonal se debe a la isquemia, no es observable hasta las 8-24 h.

En nuestro estudio, los casos de menos de media hora la inmunotinción de los axones fue negativa aunque sí fue posible detectarlo en soma neuronal. A las dos horas ya se observó la inmunorreactividad para β APP de axones en la sustancia blanca con un patrón focal. A partir de las 20-24 h aparece una distribución difusa que coincide con las zonas en las que se observó un mayor grado de axones lesionados con neurofilamentos y de astrogliosis con PGFA, es decir, se observó la lesión propiamente causada por el traumatismo. Esta expresión difusa aumenta con los días con un pico máximo en los casos sobre los 5-6 días y a partir de los 26 días el patrón se va transformando en mixto, evidenciando el solapamiento entre el daño primario y secundario.

Finalmente en casos con meses de supervivencia nuestros resultados con este marcador son negativos, al menos, en la zona de la lesión.

Nuestros resultados concuerdan en las horas próximas al traumatismo, con los obtenidos por Onyszchuk y cols (2009) y por Oehmichem (1999). Sin embargo, el pico máximo se detectó a los 5-6 días frente a las 48 h de Pierce y cols (1996) y las 6-26 h de Willemsee-van son y cols (2007).

Las diferencias con estos últimos autores se deben a que ellos estudiaron únicamente el daño secundario a distancia y nosotros, en el foco de lesión, no

detectamos ese daño secundario hasta los 26 días, (siempre solapado con el daño primario), es decir, realmente nuestros resultados no son del todo comparables. El estudio más similar al nuestro es el de Pierce y cols (1996) quienes estudian la sustancia blanca homolateral. La diferencia con nuestros resultados puede deberse a distintas causas. En primer lugar, en el foco de lesión, la principal vía de muerte celular es la excitotóxica por encima de la apoptosis y hasta que ese proceso no termina no es posible observar las neuronas que mueren por alteración del transporte axonal. Es decir, primero desaparecerían las neuronas afectadas en sus somas y posteriormente las que presentan lesiones axonales. Por otro lado, tanto la idiosincrasia del marcador (dependiendo de las casas comerciales, como la del individuo, pueden condicionar diferencias en los resultados

En cuanto a los resultados meses después del traumatismo, la literatura no recoge resultados a tan largo plazo. El que más se aproxima es Willemsee-van son y cols (2007) que observan su disminución en zonas a distancia, a partir de las 40 h. De todas formas, parece lógico pensar que meses después del traumatismo este marcador no sea observable, ya que el proceso de muerte celular no dura tanto tiempo, sea cual sea su origen. Por otra parte, y los fenómenos que dan lugar al daño secundario o han conducido a la muerte antes o han sido atajados por el tratamiento médico.

Las diferencias no sólo de nuestros resultados con las del resto de los autores, así como las diferencias que existen entre ellos, tienen su origen en que este marcador se expresa en distintas circunstancias y presenta cierta variabilidad de expresión en las distintas estructuras encefálicas (según sus sensibilidad a la hipoxia y la longitud de sus axones), por lo que todos los autores que lo han estudiado concluyen que es necesario realizar un muestreo amplio. Por motivos prácticos, el trabajo se limitó al estudio de la zona directamente lesionada. Para salvar estas distancias, queda claro que los estudios no deben ser aislados y que los resultados

del β APP han de ser interpretados con cautela y teniendo en cuenta factores como la escena del levantamiento del cadáver y la historia clínica previa. Ello es importante en casos de especial trascendencia médico legal como los de sospecha de abuso infantil (síndrome del niño sacudido).

5.E.- GENES DE APOPTOSIS: Bcl-2 Y p53

Los resultados obtenidos con estos marcadores resultaron bastante decepcionantes, en especial el p53 que sólo aportó una positividad en la zona de la lesión. Dado que la expresividad de estos genes dependen del grado de lesión celular, es decir, de la intensidad del traumatismo, es posible que en la zona de la lesión de nuestros casos exista un mayor grado de necrosis que de apoptosis, ya que siempre se trata de traumatismos cráneo-encefálicos graves. De hecho, Kaya y cols (1999) demostraron que la intensidad del traumatismo cambia por completo la expresividad de este marcador.

En el caso del Bcl-2 observamos datos positivos a partir de los 11 días de supervivencia y sigue observándose hasta los 30 días, pero vuelve a ser negativo en casos de meses de supervivencia. Esto concuerda con lo sostenido por Raghupaty (2003) que observó la disminución de la expresión de los genes protectores de la apoptosis entre las 2 y las 24 primeras horas tras el traumatismo coincidiendo con el pico máximo de necrosis. Es importante tener en cuenta que el proceso de muerte celular mediante apoptosis en el cerebro adulto tras un insulto isquémico o traumático dura unos 14 días, con un pico máximo de células muertas a los 7 días (Martin y cols, 2003). Para confirmar estos datos referentes al daño axonal difuso observamos, fuera del protocolo del estudio el comportamiento de este marcador en un caso de 24 h. de supervivencia pero en el hemisferio contralateral a la lesión, obteniendo positividad (estos datos no se mostraron en los resultados). Es decir, el

Bcl-2 comenzó a aumentar una vez ha pasado el pico máximo de necrosis, tras las primeras 24 horas.

Nuestros resultados coinciden también con los de Wennersten (2003), que observa la elevación del Bcl-2 a partir del décimo día postraumatismo, y su grupo también observó que su expresión no era cuantitativamente tan rotunda como la de otros marcadores.

En cualquier caso este marcador puede resultar útil en nuestro estudio para diferenciar un insulto de supervivencia media (de días) frente a traumatismos que asientan sobre otras lesiones antiguas cuando lo observamos en el foco de lesión, ya que su expresión en el foco de lesión se circunscribe entre los 10 y los 30 días, descartando las datas más precoces y las de meses o años de evolución.

5.F.- VIMENTINA

La utilidad de este marcador reside en que sólo es observable en células inmaduras y en astrocitos en estado de proliferación, lo cual no permite observar la regeneración del tejido cerebral ante una lesión; y no sólo en la región directamente afectada, sino también en regiones que se alteran por el daño secundario, como el cuerpo caloso, el tálamo y el hipocampo. (Ekmark-Lewén y cols. 2013).

Al observar la cronología de la expresión de este marcador tras una lesión producida en condiciones experimentales, Janeczko K. (1993), observó que no era detectable antes de las 24 horas, con un pico máximo de expresión a los dos días; y además que las células que expresaban este marcador eran las que se situaban más próximas a lesión. El hecho de que las que expresaban tanto PGFA, como vimentina se encontraran en un segundo plano, puede tener su explicación tanto en

la llegada de nuevas células inmaduras en fase de diferenciación al foco de lesión, como en la división de los astrocitos adultos. En cualquier caso, estas nuevas células van desplazando progresivamente hacia capas más profundas, a las que se encuentran en un mayor grado de diferenciación, hasta que termina el proceso de cicatrización conformando con el tiempo un tejido organizado y formado finalmente por astrocitos maduros.

Los resultados del presente estudio, son ligeramente más sensibles que los de este último autor, ya que la primera reacción local en la que observamos expresión de este marcador fue a las 16 horas, coincidiendo con el momento en que se detecta hiperplasia con la PGFA, es decir, los resultados de la vimentina confirman los de la PGFA demostrando que la hiperplasia se debe no sólo a la migración de células desde los nichos de la zona subventricular y de debajo del giro dentado, sino también a la división de los astrocitos maduros del córtex, los cuales ante una lesión recuperan la capacidad reproductiva.

En cuanto a la disposición geográfica de los astrocitos en estado de proliferación coincide plenamente con el estudio de Janeczko (1993). En resumen, este marcador resulta útil para discernir estados evolutivos a partir de las 16-24 horas, pero sobre todo es un gran indicador de la extensión de la lesión.

CASOS DE ESPECIAL MENCIÓN

Como se ha señalado en la discusión sobre los resultados del primer grupo, se observó que dos casos presentaban unos resultados inesperados: uno de 30 min de supervivencia que presentaba hipertorfia e hiperplasia astrocitaria y otro de supervivencia de minutos que presentaba hiperplasia difusa de los astrocitos.

Estudiando con detalle la historia clínica del primero, se comprobó que este sujeto presentaba dudas sobre el momento del traumatismo, ya que la paciente sufrió una caída con pérdida de conciencia por la que no acudió a los servicios médicos y que, cinco días más tarde, acudió a Urgencias del hospital de referencia tras una caída sin pérdida de conciencia en la vía pública. Al ingreso presentó un Glasgow de 15/15, pero en el Servicio de Radiología comenzó a deteriorarse (Glasgow de 3), convulsionó y falleció. En la autopsia se observó una fractura del occipital derecho que se irradiaba hasta el foramen magno. Una HSD en el lóbulo occipital derecho y una hemorragia intraparenquimatosa en el lóbulo cerebeloso derecho.

Es posible que el primer traumatismo fuera el originario de la lesión con una hemorragia subdural subaguda, que en última instancia (por el efecto masa), diera lugar al aumento de la PIC, la pérdida de conciencia y por último a la muerte. Esto explicaría el comportamiento de los astrocitos, pero el comportamiento del CD68 y el β APP es más similar al del grupo de menos de 2 h. Esto tal vez se explique porque la lesión no era aguda, es decir no se produjo una destrucción masiva y brusca de neuronas con una hemorragia asociada, sino que la lesión se produjo poco a poco por aumento de la PIC, la cual no alcanzó niveles que supusieran hipoxia celular hasta pasadas muchas horas. Este hecho, sumado a la distinta sensibilidad que a dicha hipoxia presentan las distintas estructuras encefálicas (Li y cols, 2009 y Ekmark-Lewén y cols, 2013), explicaría los peculiares resultados de ese caso concreto.

En el segundo caso, la historia clínica también fue clave, porque demostraba que el sujeto había tenido un intento autolítico previo hacía años, en el que sufrió un TCE severo, lo que explicaba la astrogliosis difusa que presentaba, (más propia de lesiones antiguas). Así mismo, en este caso, el CD 68 también presentaba niveles normales lo cual es propio de los casos de escasa supervivencia, pero también es posible en aquellos de muy larga data (por encima de un año).

CONSIDERACIONES FINALES

Como acabamos de ver en todo lo anterior, el simple estudio macroscópico no responde a muchas de las preguntas de interés médico legal en casos de muerte traumática, lo cual indica la necesidad del estudio complementario anatomopatológico para dar respuestas lo más concretas posible y mayor validez científica a sus conclusiones.

Esto está lejos de alcanzarse y sólo se podrá conseguir mediante una mayor disponibilidad de las técnicas histopatológicas convencionales e inmunohistoquímicas en el momento de la autopsia, y a través de la utilización de forma rutinaria de una metodología sistemática de estudio de las muestras en aquellos casos de interés judicial.

No cabe duda que la data de un TCE supone un auténtico problema médico-legal ya que tiene repercusiones en una investigación criminal y judicial, siendo fundamental para la reconstrucción de los hechos, establecer una responsabilidad penal y conocer determinados factores modificadores de la misma, como el ensañamiento. Para dar una respuesta lo más exacta posible a este extremo, se han propuesto distintos modelos tanto desde el punto de vista experimental como desde el punto de vista forense. No obstante, y aunque hay autores como

Orthobagy (2007) que han conseguido resultados con un tiempo de “penumbra” más reducido (35 min) aún estamos lejos de poder ofrecer datos concluyentes. A modo de conclusión, en primer lugar deberemos ser cautos tanto a la hora de interpretar los resultados histológicos, como a la hora de informar a los órganos judiciales, y en segundo lugar, es necesario seguir investigando en este campo para disminuir al máximo ese periodo “penumbra” y para delimitar cuál es la combinación idónea de marcadores a estudiar para alcanzar nuestro objetivo.







CONCLUSIONES





CONCLUSIONES

1.- A pesar de la recomendación general de estudiar un muestreo amplio de todas las estructuras del encéfalo cuando se produce una lesión a este nivel, el estudio de la región directamente afectada por el traumatismo, es suficiente para dar respuesta a los problemas médico-legales, siendo recomendable la utilización combinada de varios anticuerpos.

2.- Para obtener un correcto rendimiento de los marcadores resulta aconsejable obtener el bloque objeto de estudio en fresco, 24 h de fijación en formol y conservación en alcohol al 70% hasta su procesado. La extracción y fijación del órgano entero durante días, antes de obtener el bloque, enmascara epitopos y produce numerosos falsos negativos.

3.- Para el estudio del citoesqueleto el anticuerpo para la subunidad del 68 kD y el marcador CD68 PGM1 ofrece mejores resultados que el CD68 KP1

4.- La PGFA demuestra hipertrofia a partir de las dos horas e hiperplasia a partir de las 16 h. Posteriormente también se observa reacción de la BHE. El pico máximo de la hiperplasia se produce entre el 5º y 17º día.

6.- El precursor del β -amiloide se expresa a las 2 h, con un patrón focal. A partir de las 20 h, se observa un patrón difuso coincidiendo con el pico máximo de necrosis y daño axonal observados con neurofilamentos y con el comienzo de la hiperplasia astrocitaria.

6.- La expresión del gen Bcl-2 comienza a observarse a los 11 días, permaneciendo hasta los 30 días, momento a partir del cual desaparece. Dado

que su expresión comienza cuando declina la necrosis, este marcador resulta útil para diferenciar traumatismos de días de evolución de otros recientes que asientan sobre lesiones antiguas

7.- El gen p53 no resulta útil en el estudio del foco de lesión.

8.- La vimentina se expresa en el foco de lesión a partir de las 16 horas, incrementándose en las capas más profundas del córtex y de la sustancia blanca conforme avanzan los días. Su utilidad principal es delimitar la extensión de la lesión.

9.- Se han establecido una serie de cambios cronológicos, siendo de especial relevancia los cambios observados en los primeros 30 minutos de evolución (rosarios axonales con neurofilamentos y macrófagos prevasculares) y a las dos horas (necrosis neuronal, hipertrofia astrocitaria, macrófagos en parénquima y patrón focal de marcaje con β -APP). Estos hallazgos reducen significativamente el periodo de incertidumbre a la hora de datar un traumatismo craneo encefálico.

10.- Nuestros resultados resultan novedosos y diferentes a los establecidos en la literatura actual. Las diferencias radican en las características de nuestra muestra (exclusivamente TCE por impacto de alta energía) y en el estudio circunscrito al área lesionada (aspecto secundario para la mayoría de los autores).



BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- **ACOSTA SA, TAJIRI N, SHINOZUKA K, ISHIKAWA H, GRIMMIG B, DIAMOND D, SANBERG PR, BICKFORD PC, KANEKO Y, BORLONGAN CV (2013).** Long term upregulation of inflammation and suppression of cell proliferation in the brain of adult rats exposed to traumatic brain injury using the controlled cortical impact model. *Plos one* 8(1):e53376. DOI: 10.1371/journal.pone.0053376
- **ALIM MA, HUSSAIN MS, ARIMA K, TAKEDA K, IZUMIYAMA Y, NAKAMURA M, KAJI H, SHINODA T, HISANAGA S, UEDA K. (2002).** Tubulin seeds alpha-synuclein fibril formation. *J. Biol. Chem.* 277(3):2112-2117
- **ASCHNER M. (1998)** Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes. *Toxicol Lett* 102-103:283-287
- **ATKINS CM, OLIVA AA, ALONSO O, PEARSE DD, BRAMLETT HM, DIETRICH WD (2007)** Modulation of the cAMP signaling pathway after traumatic brain injury. *Exp Neurol* 208(1):145-158
- **BI FF, XIAO B, HU YQ, TIAN FF, WU ZG, DING L, ZHOU XF (2008).** Expression and localization of Fas-associated proteins following focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 1191:30-38
- **BISHT A, GARG K, AGARWAL D, SINGH PK, SATYARTHEE GD, GUPTA D, SINHA S, KAKKAR A, SURI V, LALWANI S, KALE SS, SHARMA BS (2013).** Histological changes in thalamus in

short term survivors following traumatic injury: an autopsy study. *Neurol. India* 61(6):599-605.

- **BUDINICH CS, CHEN HZ, LOWE D, ROSENBERGER JG, BERNSTOCK JD, MCCABE JT (2012).** Mouse brain PSA-NCAM levels are altered by graded controlled cortical impact injury. *Neural Plast.*2012:378307
- **BÜKI A, OKONKWO DO, WANG KK, POVLISHOCK JT (2000).** Cytocrome C release and caspase activation in traumatic axonal injury. *J Neurosci* 20(8):2825-2834
- **BYE N, CARRON S, HAN X, AGYAPOMAA D, NG SY, YAN E, ROSENFELD JV, MORGANTI-KOSSMANN MC (2011).** Neurogenesis and glial proliferation are stimulated following diffuse traumatic brain injury in adult rats. *J Neurosci Res.* 89:986-1000
- **CAHILL WJ, CALVERT JH, ZHANG JH (2006).** Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:1341-1353
- **CAI Z, PAN ZL, PANG Y, EVANS OB, RHODES PG (2000)** Cytokine induction in fetal rat brains and brain injury in neonatal rats after maternal lipopolysaccharide administration. *Pediatr Res.*47:64-72.
- **CAO T, THOMAS TC, ZIEBELL JM, PAULY JR, LIFSHITZ J (2012).** Morphological and genetic activation of microglia after diffuse traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience* 225:65-75
- **CASTELLANO ARROYO M (2000).** En *Medicina legal y toxicológica*. Capítulo 33. Masson. Barcelona 405-407
- **CERNAK I, CHAPMAN SM, HAMLYN GP, VINK R (2002).** Temporal characterisation of pro- and anti-apoptotic mechanism

following diffuse traumatic brain injury in rats. *J Clin Neurosci* 9(5):565-572

- **CHEN J, LI X, QIU J, YOU H, ZHANG Q, DONG G, ZUO Y (2013).** Kinetics of apoptosis and expression of apoptosis related proteins in rat CA3 hippocampus cells after experimental diffuse brain injury. *Cell. Biochem. Biophys.* 67:1015-1019.
- **CHEN J, WU X, SHAO B, ZHAO W, SHI W, ZHANG S, NI L, SHEN A (2011).** Increased expression of TNF receptor-associated factor-6 after rat traumatic brain injury. *Cell Mol Neurobiol* 31:269-275
- **CHEN XH, SIMAN R, IWATA A, MEANEY DF, TROJANOWSKI JQ, SMITH DH (2004).** Long-term accumulation of amyloid beta, beta secretase, presenilin-1, and caspase-3 in damaged axons following brain trauma. *AJP* 165(2):357-371
- **CHIARETTI A, GENOVESE O, ALOE L, ANTONELLI A, PIASTRA M, POLIDORI G, Di ROCO C (2005).** Interleukin 1 β and interleukin 6 relationship with paediatric head trauma severity and outcome. *Childs Nerv. Syst.* 21:185-193
- **CURTIS MA, PENNEY EB, PEARSON AG, VAN ROON-MOM WM, BUTTERWOTH NJ, DRAGUNOW M, CONNOR B, FAUL RL(2003).** Increased cell proliferation and neurogenesis in the adult human Huntington's disease brain. *PNAS* 100:9023-9027
- **DiLEONARD AM, HUH JW, RAGHUPATHI R (2009).** Impaired axonal transport and neurofilament compaction occur in separate populations of injured axons following diffuse brain injury in the immature rat. *Brain Res* 1263:174-182

- **Di MAIO VJM y DANA SE (2003)** En manual de Patología Forense. Capítulo 6.XI. Lesiones en la cabeza causadas por un trauma contuso, Ed Díaz Santos. Madrid 92-93
- **DOLINAK D, REICHARD R. (2006)** An overview of inflicted head injury in infants and young children, with a review of beta amyloid precursor protein immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med* 130:712-717
- **DONG GX, SINGH DK, DENDLE P, PRASAD RM (2001).** Regional expression of Bcl-2 mRNA and mitochondrial cytochrome C release after experimental brain injury in the rat. *Brain Res* 903:45-52
- **DRESSLER J, HANISCH U, KULISCH E GEIGER KD (2007).** Neuronal and glial apoptosis in human traumatic brain injury. *Int J Legal Med* 121:365-375
- **DRESSLER J, VEMUGANTI R (2009).** Apoptosis and gene expression after TBI. *Legal Med.* 11:554-555
- **DUNN-MEYNELL AA, LEVIN BE (1997).** Histological markers of neuronal, axonal and astrocytic changes after lateral rigid impact traumatic brain injury. *Brain Res.* 761:25-41
- **EKMARK-LEWÉN S, FLYGT J, KIWANUKA O, MEYERSON BJ, LEWÉN A, HILLERED L, MARKLUND N (2013).** Traumatic axonal injury in the mouse is accompanied by a dynamic inflammatory response, astroglial reactivity and complex behavioural changes. *J. Neuronfl.* 10:44-63
- **ERIKSEN JL, MCKENZIE IR (2008).** Progranulin: normal function and role in neurodegeneration. *J. Neurochem.* 104(2):287-297

- **FASSBENDER K, SCHNEIDER S, BERTSCH T, SCHLUETER D, FATAR M, RAGOSCHKE A, KÜHL S, KISCHKA U, HENNERICI M (2000).** Temporal profile of release of interleukin-1 β in neurotrauma. *Neurosci. Let.* 284:135-138
- **FELDERHOFF-MUESER U, SIFRINGER M, PESDITSCHKE S, KUCKUCK H, MOYSICH A, BITTIGAU P, IKONOMIDOU C (2002).** Pathways leading to apoptotic neurodegeneration following trauma to the developing rat brain. *Neurobiol Dis* 11:231-245
- **FINNIE JW, MANAVIS J, BLUMBERGS PC (2010).** Diffuse neuronal perikaryal amyloid precursor protein immunoreactivity in an ovine model of non-accidental head injury (the shaken baby syndrome). *J Clin Neurosci.* 17:237-240
- **FOLKERSMA H, BREVÉ JJP, TILDERS FJH, CHERIAN L, ROBERTSON CS, VANDERTOP WP (2008).** Cerebral microdialysis of interleukin (IL)-1 β and IL-6: extraction efficiency and production in the acute phase after severe traumatic brain injury in rats. *Acta Neurochir.* 150:1277-1284
- **GEDDES JF, VOLWES GH, BEER TW, ELLISON DW (1997).** The diagnosis of diffuse axonal injury: implications for forensic practice. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23:339-347
- **GEDDES JF, VOLWES GH, HACKSHAW AK, NICKOLS CD, SCOTT IS, WHITWELL HL (2001).** Neuropathology of inflicted head injury in children II. Microscopic brain injury in infants. *Brain* 124:1299-1306
- **GEDDES JF, WHITWELL HL (2004).** Inflicted head injury in infants. *Forensic Sci Int* 146:83-88

- **GENTELMAN SM, LECLERQ PD, MOYES L, GRAHAM DI, SMITH C, GRIFFIN WS, NICOLL JA (2004).** Long-term intracerebral inflammatory response after traumatic brain injury. *For Sci Int* 146:97-104
- **GLECKMAN AM, BELL MD, EVANS RJ, SMITH TW (1999).** Diffuse axonal injury in infants with nonaccidental craniocerebral trauma. Enhanced detection by beta-amyloid precursor protein immunohistochemical staining. *Arch Pathol Lab Med* 123:146-151
- **GLECKMAN AM, EVANS RJ, BELL MD, SMITH TW (2000).** Optic nerve damage in shaken baby syndrome. *Arch Pathol Lab Med* 124:251-256
- **GRAHAM DI, SMITH C, REICHARD R, LECLERCQ PD, GENTELMAN SM (2004).** Trials and tribulations of using Beta-amyloid precursor protein immunohistochemistry to evaluate traumatic brain injury in adults. *Forensic Sci Int* 146:89-96
- **GROSJEAN MB, LENZLINGER PM, STAHEL PF, YATSIV I, SHOHAMI E, TRENTZ O, KOSSMANN T, MORGANTI-KOSSMANN MC (2007).** Immunohistochemical characterization of Fas (CD95) and Fas Ligand (FasL/CD95L) expression in the injured brain: relationship with neuronal cell death and inflammatory mediators. *Histol Histopathol* 22:235-250
- **GUERRA RR, KRIAZHEV L, HERNÁNDEZ-BLÁZQUEZ FJ, BATEMAN A (2007).** Progranulin is a stress response factor in fibroblast subjected to hypoxia and acidosis. *Growth Factors* 25:280-285
- **HARRIS NG, CARMICHAEL ST, HOVDA DA, SUTTON RL (2009).** Traumatic brain injury results in disparate regions of chondroitin

sulphate proteoglycan expression that are temporally limited. *J Neurosci Res.* 87(13):2937-2950

- **HARTING MT, JIMENEZ F, MERCER DW, COX CS Jr (2008).** Acute, regional inflammatory response after traumatic brain injury: implications for cellular therapy. *Surgery* 144(5):803-813.
 - **HAUSMAN R, BETZ P (2000).** The time course of the vascular response to human brain injury. An immunohistochemical study. *Int J Legal Med* 113:288-292
 - **HAUSMAN R, BETZ P (2001).** Course of glial immunoreactivity for vimentin, tenascin and alfa1-antichymiotrypsin after traumatic brain injury to human brain. *Int J Legal Med* 114:338-342
 - **HAUSMAN R, BIERMAN T, WIEST I, TÜBEL J, BETZ P (2004).** Neuronal apoptosis following human brain injury. *Int J Legal Med* 118:32-36
 - **HAUSMAN R, KAISER A, LANG C, BOHNERT M, BETZ P (1999).** A quantitative immunohistochemical study on the time-dependent course of acute inflammatory cellular response to human brain injury. *Int J Legal Med* 112:227-232
 - **HAYASHI T, KANEKO Y, YU S, BAE E, STHAL CE, KAWASE T, VAN LOVEREN H, SANBERG PR, BORLONGAN CV (2009).** Quantitative analyses of matrix metalloproteinase activity after traumatic brain injury in adult rats. *Brain. Res.* 1280:172-177
- HE Z, BATEMAN A (2003).** Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumogenesis. *J. Mol. Med.* 81:600-612

- **HE Z, ONG CH, HALPER J, BATEMAN A (2003).** Progranulin is a mediator of wound response. *Nat. Med* 9:225-229
- **HELLMICH HL, CAPRA B, EIDSON K, GARCIA J, KENNEDY D, UCHIDA T, PARSLEY M, COWART J, DeWITT DS, PROUGH DS (2005).** Dose-dependent neuronal injury after traumatic brain injury. *Brain Res* 1044:144-15
- **HOLMIN S, HÖJEBERG B (2004).** In situ detection of intracerebral cytokine expression after human brain contusion. *Neurosci Lett.* 369:108-114
- **HUANG RQ, CHENG HL, ZHAO XD, DAI W, ZHUANG Z, WU Y, LIU Y, SHI JX (2010).** Preliminary study on the effect of trauma-induced secondary cellular hypoxia in brain injury. *Neurosci Lett.* 473:22-27
- **ITOH T, SATOU T, NISHIDA S, TSUBAKI M, HASHIMOTO S, ITO H (2009).** Expression of amyloid precursor protein after rat traumatic brain injury. *Neurol Res* 31:103-109
- **JANECZKO K.** Co-expression of GFP and vimentin in astrocytes proliferating in response to injury in the mouse cerebral hemisphere. A combined autoradiographic and double immunocytochemical study. *Int J Dev Neurosci.* 1993 Apr;11(2):139-47.
- **KANEKO Y, TAJIRI N, YU S, HAYASHI T, STAHL CE, BAE E, MESTRE H, FRANZESE N, RODRIGUES A Jr, RODRIGUES MC, ISHIKAWA H, SHINOZUKA K, HETHORN W, WEINBREN N, GLOVER LE, TAN J, ACHYUTA AH, VAN LOVEREN H, SANBERG PR, SHIVSANKAR S, BORLONGAN CV (2012).** Nestin overexpression precedes caspase-3 upregulation in

rats exposed to controlled cortical impact traumatic brain injury. *Cell. Med.* 4(2):55-63

- **KAYA SS, MAHMOOD A, LI Y, YAVIZ E, GÖSKEL M, CHOPP M (1999).** Apoptosis and expression of p53 response proteins and cyclin D1 after cortical impact in rat brain. *Brain Res* 818:23-33
- **KELLEY BJ, FARKAS O, LIFTSHITZ J, POVLISHOCK JT (2006).** Traumatic axonal injury in the perisomatic domain triggers ultrarapid secondary axotomy and wallerian degeneration. *Exp Neurol* 198:350-360
- **KERNIE SG, ERWIN TM, PARADA LF (2001)** Brain remodeling due to neuronal and astrocytic proliferation after controlled cortical injury in mice. *J Neurosci Res* 66:317-326
- **KITA T, TANAKA T, TANAKA N, KINOSHITA Y (2000).** The role of tumor necrosis factor- α in diffuse axonal injury following fluid-percussive brain injury in rats. *Int J Legal Med* 113:221-228
- **KLEMP T ND, SIRIMANNE E, GUNN AJ, KLEMP T M, SINGH K, WILLIAMS C, GLUCKMAN PD (1992).** Hyposia-eschemia induces transforming growth factor β 1 mRNA in the infant rat brain. *Mol. Brain. Res.* 13 93-101
- **KNOBLACH SM, FADEN AI (2000).** Cortical interleukin-1 β elevation after traumatic brain injury in the rat: no effect of two selective antagonists on motor recovery. *Neurosci Lett.* 289:5-8
- **KORZHEVSKII DE, NIKOLEISHVILI MG, OTELLIN VA (2006).** Suppression of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes of superficial glial delimiting membrane in traumatic subarachnoid hemorrhage. *Neurosci Behav Physiol* 36(3):285-287

- **KOSTULAS N, LI HL, XIAO BG, HUANG YM, KOSTULAS V, LINK H (2002).** Dendritic cells are present in ischemic brain after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Stroke* 33:1129-1134
- **KRADY JK, LIN HW, LIBERTO CM, BASU A, KREMLEY SG, LEVISON SW (2008).** Ciliary neurotrophic factor and interleukin-6 differentially activated microglia. *J Neurosci Res.* 86:1538-1547
- **KUBO SI, KITAMURA O, ORIHARA Y, OGATA M, TOKUNAGA I, NAKASONO I (1998).** Immunohistochemical diagnosis and significance of forensic neuropathological changes. *J. Med. Invest.* 44:109-119
- **LAI AI, TODD KG (2008).** Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury. *Glia* 56:259-270
- **LI HP, KOMUTA Y, KIMURA-KURODA J, VAN KUPPEVELT TH, KAWANO H (2013).** Roles of chondroitin sulfate and dermatan sulfate in the formation after traumatic injury of the mouse brain. *J. Neurotrauma* 30:413-425
- **LI DR, ISHIKAWA T, ZHAO D, MICHIUE T, QUAN L, ZHU BL, MAEDA H (2009).** Histopathological changes of the hippocampus neurons in brain injury. *Histol. Histopathol.* 24:1113-1120
- **LI DR, ZHANG F, WANG Y, TAN XH, QIAO DF, WANG HJ, MICHIUE T, MAEDA H. (2012).** Quantitative analysis of GFAP and S100 protein-immunopositive astrocytes to investigate the severity of traumatic brain injury. *Legal Medicine* 14 : 84-92

- **LI S, SUN Y, SHAN D, FENG B, XING J, DUAN Y, DAI J, LEI H, ZHOU Y (2013)**. Temporal profiles of axonal injury following impact acceleration traumatic brain injury in rats. A comparative study with diffusion tensor imaging and morphological analysis. *Int. J. Legal Med.* 127:159-167.
- **LI Y, SONG J, LIU X, ZHANG M, AN J, SUN P, LI D, JIN T, WANG J (2013)**. High expression of STIM1 in the early stages of diffuse axonal injury. *Brain Res.* 1495:95-102
- **LIU CL, CHEN S, DIETRICH D, HU BR (2008)**. Changes in autophagy after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 28:674-683
- **LIU H, YANG M, QIU GP, ZHUO F, YU WH, SUN SQ, XIU Y (2012)**. Aquaporin 9 in rat brain after severe traumatic brain injury. *Arq Neuropsiquiatr* 70:214-220
- **LONCAREVIC-VASILJKOVIC N, PESIC V, TANIC N, MILANOVIC D, POPIC J, KANAZIR S, RUZDIJIC S (2009)**. Changes in markers of neuronal and glial plasticity after cortical injury induced by food restriction *Exp Neurol.* 220(1):198-206.
- **LU J, MOOCHHALA S, KAUR C, LING E (2000)**. Changes in apoptosis-related protein (p53, Bax, Bcl-2 and Fos) expression with DNA fragmentation in the central nervous system in rats after closed head injury. *Neurosci Lett* 290:89-92
- **LUNDBERG J, KARIMI M, VON GERTTEN, HOLMIN S, EKSTÖRM TJ, SANDBERG-NORDQVIST AC (2009)**. Traumatic brain injury induces relocalization of DNA-methyltransferase 1. *Neurosci Lett.* 457:8-11

- **MADATHIL SK, EVANS HN, SAATMAN KE (2010).** Temporal and regional changes in IGF-1/IGF-1R signaling in the mouse brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 27:95-107
- **MAEDA H, ZHU BL, ISHIKAWA T, MICHIEUE T (2010).** Forensic molecular pathology of violent deaths. *For Sci Int* 203: 83-92
- **MARTIN LJ, KAISER A, YU JW, NATALE JE, AL-ABDULLA NA (2001).** Injury induced apoptosis of neurons in adult brain is mediated by p53-dependent and p53-independent pathways and requires Bax. *J Comp Neurol* 433:299-311
- **MARTIN LJ, PRICE AC, McCLENDON KB, AL-ABDULLA NA, SUBRAMANIAM JR, WONG PC, LIU Z (2003).** Early events of target deprivation/axotomy-induced neuronal apoptosis in vivo:oxidative stress, DNA damage, p53 phosphorylation and subcellular redistribution of death proteins. *J Neurochem* 85:234-247
- **MASLINNSKA D, LAURE-KAMIONOWSKA M, MASLINSKI S (2004).** Toll-like receptors in rat brains injured by hypoxic-ischaemia or exposed to staphylococcal alpha-toxin. *Folia Neuropathol.* 42:125-132
- **MCGINN MJ, KELLEY BJ, AKINYI L, OLIS MW, LIU MC, HAYES RL, WANG KK, POVLISHOCK JT (2009).** Biochemical, structural and biomarker evidence of calpain-mediated cytoskeletal change following diffuse brain injury uncomplicated by contusion. *J Neuropathol Exp Neurol* 68 (3):241-249
- **MCKENZIE KJ, MCLELLAN DR, GENTLEMAN SM, MAXWELL WL, GENNARELLI TA, GAHAM DI (1996).** Is beta-APP a marker of axonal damage in short-surviving head injury?. *Acta Neuropathol* 92:608-613

- **MELLEGLARD P, ANEMAN O, SJÖGREN F, SÄBERG C, HILLMAN J (2011).** Differences in cerebral extracellular response of interleukin 1 β , interleukin 6 and interleukin 10 after subarachnoid hemorrhage or severe head trauma in humans. *Neurosurg* 68:12-19
- **MICHIUE T, ISHIKAWA T, QUAN L, LI DR, ZHAO D, KOMATSU A, ZHU BL, MAEDA H (2008).** Single-stranded DNA as an immunohistochemical marker of neuronal damage in human brain: An analysis of autopsy material with regard to the cause of death. *For Sci Int* 178:185-191
- **MILLARD SM, WOOD SA (2006).** Riding the Dbway: regulation of protein trafficking by deubiquitinating enzymes. *J Cell Biochem* 173(4):463-468
- **MOISSE K, VOLKENING K, LEYSTRA-LANTZ C, WELCH I, HILL T, STRONG MJ (2009).** Divergent patterns of cytosolic TDP-43 and neuronal progranulin expression following axotomy: implications for TDP-43 in the physiological response to neuronal injury. *Brain Res* 1249:202-211
- **MORGANTI-KOSSMANN MC, SATGUNASEELAN L, BYE N, KOSSMANN T (2007).** Modulation of immune response by head injury. *Injury Int J Care Injured* 38:1392-1400
- **MORIO I, NAKATOME M, OGURA Y, FUJIMURA H, KUROKI H, INOUE H, INO Y, FUJII T, TERAO T, MATOBA R (2003).** Real-time PCR quantification of FE65 a beta-amyloid precursor binding protein after traumatic brain injury in rats. *Int J Legal Med* 117:153-159

- **MORRISON C, MacKENZIE JM (2008).** Axonal injury in head injuries with very short survival times. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 34:124-125
- **MORRISON C y MacKENZIE JM (2008).** Axonal injury is not an everyday occurrence. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 34:126-127
- **NAG S, MANIAS JL, STEWART DJ (2009).** Expression of endothelial phosphorylated caveolin-1 is increased in brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35:417-426
- **NAKANO T, ISEKI K, HOZUMI Y, KAWAMAE K, WAKABAYASHI I, GOTO K (2009).** Brain trauma induces expression of diacylglycerol kinasa ζ in microglía. *Neurosci Lett.* 461:110-115
- **NAPIERALSKI JA, RAGHUPATHI R, MCINTOSH TK (1999).** The tumor-suppressor gene, p53, is induced in injured brain regions following experimental traumatic brain injury. *Mol Brain Res* 71:78-86
- **OEHMICHEN M, JAKOB S, MANN S, SATERNUS KS, PEDAL I, MEISSNER C (2009).** Macrophage subsets in mechanical brain injury (MBI)- a contribution in timing of MBI based on immunohistochemical methods: a pilot study. *Legal Med.* 11:118-124
- **OEHMICHEN M, MEISSNER C, KÖNIG HG (2001).** Brain injury after survived gunshot to the head: reactive alterations at sites remote from the missile track. *For Sci Int* 115:189-197
- **OEHMICHEN M, MEISSNER C, KÖNIG HG, GEHL HB (2004).** Gunshot injuries to the head and brain caused by low velocity handguns and rifles. A review. *Forensic Sci Int* 146:111-120

- **OEHMICHEN M, MEISSNER C, SCHMIDT V, PEDAL I, KÖNIG HG, SATERNUS KS (1998).** Axonal injury: a diagnostic tool in forensic neuropathology?. *Forensic Sci Int* 95:67-83
- **OEHMICHEN M, MEISSNER C, SCHMIDT V, PEDAL I, KÖNIG HG (1999).** Pontine axonal injury after brain trauma and nontraumatic hypoxic-ischemic brain damage. *Int J Legal Med* 112:261-267
- **OEHMICHEM 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. *Acta Neuropathol.* 97:491-494
- **OGATA M (2007).** Early diagnosis of diffuse brain damage resulting from a blunt head injury. *Leg Med* 9(2):105-8
- **OGATA M, TSUGANEZAWA O (1999).** Neuron specific enolase as an effective immunohistochemical marker for injured axons after fatal brain injury. *Int J Legal Med.* 113:19-25
- **OMALU BI (2004).** Diagnosis of traumatic diffuse axonal injury *Am J Forensic Med Pathol.* 25(3):270-271
- **ONAYA M (2002).** Neuropathological investigation of cerebral white matter lesions caused by closed head injury. *Neuropathology.* 22(4):243-51
- **ONYSZCHUK G, LeVINE SM, BROOKS WM, BERMAN NEJ (2009).** Post-acute pathological changes in the thalamus and internal capsule in aged mice following controlled cortical impact injury: a magnetic resonance imaging, iron histochemical, and glial immunohistochemical study. *Neurosci Lett.* 452:204-208

- **OPPENHAIMER DR (1968).** Macroscopic lesions in the brain following head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 31:1299-1306
- **ORTHOBAGYI T, WISE S, HUNT N, CARY N, DJUROVIC V, FEGAN-EARL A, SHORROCK K, ROUSE D, AL-SARRAJ S (2007).** Traumatic axonal damage in the brain can be detected using beta-APP immunohistochemistry within 35 minutes after head injury to human adults. *Neuropathol Appl Neurobiol* 33:226-237
- **OSHIMA T, LEE S, SATO A, ODA S, HIRASAWA H, YAMASHITA T (2009).** TNF- α contributes to axonal sprouting and functional recovery following traumatic brain injury. *Brain Res* 1290:102-110
- **OTSUKA N, TOMONAGA M, IKEDA K (1991).** Rapid appearance of beta-amyloid precursor protein immunohistochemistry in damaged axons and reactive glial cells in rat brain following needle stab injury. *Brain Res* 568:335-338
- **PERRY VH, NICOLL JA, HOLMES C. (2010).** Microglía in neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol* 6:193-201
- **PIERCE JEAN ES, TROJANOWSKI JOHN Q, GRHAM DI, SMITH DH, McINTOSH TK (1996).** Immunohistochemical characterization of alterations in the distribution of amyloid precursor proteins and beta amyloid peptide after experimental brain injury in the rat. *J Neurosci.* 16(3):1083-1090
- **PRUNELL GF, SVENDGAARD NA, ALKASS KB, MATHIESEN T (2005).** Inflammation in the brain after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurg.* 56:1082-1092

- **RAGHUPATHI R (2004)**. Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathol* 14:215-222
- **RAGHUPATHI R, CONTI AC, GRAHAM DI, KRAJEWSKI S, REED JC, GRADY MS, TROJANOWSKI JQ, McINTOSH TK (2002)**. Mild traumatic brain injury induces apoptotic cell death in the cortex that is preceded by decreases in cellular Bcl-2 immunoreactivity. *Neuroscience* 110(4):605-616
- **RAGHUPATHI R, STRAUSS KI, ZHANG C, KRAJEWSKI S, REED JC, McINTOSH TK, Krajewski S, Reed JC, McIntosh TK (2003)**. Temporal alterations in cellular bax/Bcl-2 ratio following traumatic brain injury in the rat. *J. Neurotrauma*. 20(5):421-435
- **RAMIREZ B (2004)**. CNTF: una citoquina con potenciales efectos terapéuticos en patologías neurodegenerativas. *Clínica y ciencia* 2(2):55-61.
- **REDEL JB, MOORE AN, GRILL RJ, JOHNSON D, ZHAO J, LIU Y, DASH PK (2013)**. Analysis of functional pathways altered after mild traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*. 30:752-764
- **REICHARD R, SMITH C, GRAHAM DI (2005)**. The significance of beta amyloid precursor protein immunoreactivity in forensic practice. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31:304-313
- **RHODES JKJ, ANDREWS PJD, HOLMES MC, SECKL JR (2002)**. Expression of interleukin-6 messenger RNA in a rat model of diffuse axonal injury. *Neurosc Lett* 335:1-4
- **ROBERT S, CLARK B, KOCHANEK PM, CHEN M, WATKINS SE, MARION DW, CHEN J, HAMILTON RL, LOEFFERT JE,**

- GRAHAM SH (1999).** Increases in BCL-2 and cleavage of caspase-1 and capase-3 in human brain after head injury. *FASEB J* 13:813-821
- **ROLA R, MIZUMATSU S, OTSUKA S, MORHARDT DR, NOBLE-HAEUSSLEIN LJ, FISHMAN K, POTTS MB, FIKE JR (2006).** Alterations in hippocampal neurogenesis following traumatic brain injury in mice. *Exp Neurol.* 202:189-199
 - **RONCHAO S, SHUDONG Y, ZHIYI Z (2012).** Pathological and immunohistochemical study of lethal primary brain stem injury. *Diagnostic Pathol.* 7:54-61
 - **ROOKER S, JANDER S, VAN REEMPTS J, STOLL G, JORENS PG, BORGERS M, VERLOOY J (2006).** Spatiotemporal pattern of neuroinflammation after impact-acceleration closed head injury in the rat. *Mediators Inflamm.* 2006(1):90-123
 - **SAKAI K, FUKUDA T, IWADATE K (2014).** Immunohistochemical analysis of the ubiquitin proteasome system and autophagy lysosome system induced after traumatic intracranial injury: association with tiem between the injury and death. *Am J Forensic Med Pathol* 35(1):38-44
 - **SCHWAB JM, SEID K, SCHLUESENER HJ (2001).** Traumatic brain injury induces prolonged accumulation of cyclooxygenase-1 expressing microglia/brain macrophages in rats. *J Neurotrauma* 18:881-890
 - **SCHWEITER JB, PARK MR, EIHANUS SL, ROBERTSON JT (1993).** Ubiquitin marks the reactive swellings of diffuse axonal injury. *Acta Neuropathol.* 85:503-507
 - **SIMAN R, TORASKAR N, DANG A, McNEIL E, McGARVEY M, PLAUM J, MALONEY E, GRADY MS (2009).** A panel of

neuron-enriched proteins as markers for traumatic brain injury in humans. *J. Neurotrauma* 26:1867-1877

- **SMITH C, GENTLEMEAN SM, LECLERCQ PD, MURAY LS, GRIFFIN WS, GRAHAM DI, NICOLL JA (2013).** The neuroinflammatory response in humans after traumatic brain injury. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 39:654-666.
- **SMITH C, GRAHAM DI, GEDDES JF, WHITWELL HL (2003).** The interpretation of β -APP β -APP immunoreactivity: a response to C. Ness et al., *Acta Neuropathol* (2002) 104:79. *Acta Neuropathol* (2003) 106:97-98
- **STAAL JA, DICKINSON 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. *J. Neurochem.* 112: 1147-1155
- **STONE JR, SINGLETON RH, POVLISHOCK JT (2000).** Antibodies to the C-terminus of the beta-amyloid precursor protein (APP): a site of specific marker for the detection of traumatic axonal injury. *Brain Res* 871:288-302
- **TASHLYKOV V, KATZ Y, VOLKOV A, GAZIT V, SCHREIBER S, ZOHAR O, PICK CG (2007).** Minimal traumatic brain injury induce apoptotic cell death in mice. *J Mol Neurosci* 37(1):16-24
- **TASHLYKOV V, KATZ Y, GAZIT V, ZOHAR O, SCHREIBER S, PICK CG (2007).** Apoptotic changes in the cortex and hippocampus following minimal brain trauma in mice. *Brain Res.* 1130(1):197-205

- **TATLISUMAK E, INAN S, ASIRDIZER M, APAYDIN N, HAYRETDAG C, KOSE C, TEKDEMIR I (2009).** Defining de macroscopic and microscopio findings of experimental focal brain ischemia in rats from a forensic scientist's point of view. *Am J Forensic Med Pathol* 30:26-31
- **TATSUMI K, HAGA S, MATSUYOSHI, INOUE M, MANABE T, MAKINODAN M, WANAKA A (2005).** Characterization of cells with proliferative activity after a brain injury. *Neurochem Int* 46:381-389
- **TURTZO LC, LESCHER J, JANES L, DEAN DD, BUDDE MD, FRANK JA (2014).** Macrophagic and microglial responses after focal traumatic brain injury. *J. Neuroinfl.* 11:82-96
- **TWEEDIE D, MILMAN A, HOLLOWAY HW, LI Y, HARVEY BK, SHEN H, PISTELL PJ, LAHIRI DK, HOFFER BJ, WANG Y, PICK CG, GREIG NH (2007)** Apoptotic and behavioral sequelae of mild brain trauma in mice. *J Neurosci Res* 85:805-815
- **URYU K, CHEN XH, MARTINEZ D, BROWNE KD, JOHNSON VE, GRAHAM DI, LEE VM, TROJANOWSKI JQ, SMITH DH (2007)** Multiple proteins implicated in neurodegenerative diseases accumulate in axons after brain trauma in humans. *Exp Neurol.* 208(2):185-92.
- **VANEZIS P, CHAN KK, SCHOLTZ CL (1997)** White matter damage following accute head injury. *Forensic Sci Int* 35:1-10
- **VLODAVSKY E, PALZUR E, FEINSOD M, SOUSTIEL JF (2005)** Evaluation of the apoptotis-related proteins of the Bcl-2 family in the traumatic penumbra area of the rat model of cerebral contusion, treated by hiperbaric oxygen therapy: a quantitative immunohistochemical study. *Acta Neurophthol* 110: 120-126

- **WALTER T, MEISSNER C, OEHMICHEN M (2009).** Pathomorphological staging of subdural hemorrhages: statistical analysis of posttraumatic histomorphological alterations. *Legal Med.* 11:556-562
- **WANG Q, ISHIKAWA T, MICHIUE T, ZHU BL, GUAN DW, MAEDA H (2012).** Quantitative immunohistochemical analysis of human brain basic fibroblast growth factor, glial fibrillary acidic protein and single stranded DNA expressions following traumatic brain injury. *Forensic Sci Int* 221: 142-151
- **WASSERMAN JK, ZHU X, SCHLICHTER LC (2007).** Evolution of the inflammatory response in the cerebral hemorrhage and effects of delayed minocycline treatment. *Brain Res.* 1180:140-154
- **WEBWE M, SCHERF N, KAHL T, BRAUMANN UD, SCHEIBE P, KUSKA JP, BAYER R, BÜTTNER A, FRANKE H (2013).** Quantitative analysis of astrogliosis in drug-dependent humans. *Brain Res.* 1500:72-87
- **WEI M, LI H, SHANG Y, ZHOU Z, ZHANG J (2014).** Increased CD147 (EMMPRIN) expression in the rat brain following traumatic brain injury. *Brain Res.* 1585:150-158
- **WENNERSTEN A, HOLMIN S, MATHIESEN T (2003).** Characterization of Bax and Bcl-2 in apoptosis after experimental traumatic brain injury in the rat. *Acta Neuropathol.* 105:281-288
- **WILKINSON AE, BRIDGES LR, SIVALOGANATHAN S (1999).** Correlation of survival time with size of axonal swellings in diffuse axonal injury. *Acta Neuropathol.* 98:197-202
- **WILLEMSE-VAN SON AHP, RIBBERS GM, HOP WCJ, VAN DUIJIN CM, STAM HJ (2007).** Association between apolipoprotein-

ε4 and long-term outcome after traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 79:426-430

- **XU T, FAN X, TAN Y, YUE Y, CHEN W, GU X (2014)** expression of PHB2 in rat brain cortex following traumatic brain injury. *Int. J. Mol. Sci*. 15:3299-3318
- **YAMADA P, AMORIM F, MOSELEY P, SCHNEIDER S (2008)** Heat shock protein 72 response to exercise in humans. *Sports and Medicine*. 9:715-733
- **YAN HQ, ALCAROS M, HERREGODTS P, HOOGHE-PETERS EL (1992)** Expresión of interleukin (IL)-1 β , IL-6 and their respective receptors in the normal rat brain and alter injury. *Eur. J. Immunol*. 22:2963-2971
- **YAO C, WILLIAMS AJ, OTTENS AK, LU XC, LIU MC, HAYES RL, WANG KK, TORTELLA FC, DAVE JR (2009)** P43/pro-EMAPII: a potential biomarker for discriminating traumatic versus ischemic brain injury. *J Neurotrauma* 26:1295-1305
- **YIN J, SAKAMOTO K, ZHANG H, ITO Z, IMAGAMA S, KISHIDA S, NATORI T, SAWADA M, MATSUYAMA Y, KADOMATSU K (2009)** Transforming growth factor- β 1 upregulates keratin sulphate and chondroitin sulphate biosynthesis in microglia after brain injury. *Brain Res*. 1263:10-22
- **ZAKARIA N., KALLAKURI S, BANDARU S, CAVANOUGH JM (2012)** Temporal assessment of traumatic axonal injury in the rat corpus callosum and optic chiasm. *Brain Res*. 1467:81-90

- **ZHANG Z, ZHANG ZY, WU Y, SCHLUESENER HJ (2012)** Lesional accumulation of CD163+ macrophages/microglia in rat traumatic brain injury. *Brain Res.* 1461:102-110
- **ZHENG W, ZHUGE Q, ZHONG M, CHEN G, SHAO B, WANG H, MAO X, XIE L, JIN Ks (2013)** Neurogenesis in adult human brain after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 30:1872-1880

