

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 428 313**

51 Int. Cl.:

A61K 31/57 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2006 E 11177154 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.06.2013 EP 2431042**

54 Título: **Métodos para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central mediante un protocolo de administración decreciente**

30 Prioridad:

24.03.2005 US 664728 P

24.10.2005 US 729663 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

07.11.2013

73 Titular/es:

**EMORY UNIVERSITY (100.0%)
1784 North Decatur Road, Suite 130
Atlanta, GA 30322, US**

72 Inventor/es:

**STEIN, DONALD G. y
CUTLER, SARAH MELISSA**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 428 313 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos para el tratamiento de lesiones del sistema nervioso central mediante un protocolo de administración decreciente

5

Campo de la invención

[0001] La invención se refiere a métodos para tratar lesiones traumáticas o isquémicas del sistema nervioso central.

10

Antecedentes de la invención

15

[0002] Hay evidencias experimentales crecientes de que la progesterona, sus metabolitos y otros esteroides gonadales tales como el estrógeno y posiblemente la testosterona, son agentes neuroprotectores eficaces; aunque los mecanismos fisiológicos, específicos, por los que estas hormonas actúan en el sistema nervioso central para mejorar la reparación no se comprenden completamente. Además de ser un esteroide gonadal, la progesterona también pertenece a una familia de hormonas de autocrina/paracrina llamadas neuroesteroides. Los neuroesteroides son esteroides que se acumulan en el cerebro independientemente de fuentes endocrinas y que se pueden sintetizar a partir de precursores de esteroide en células gliales. Estos neuroesteroides pueden potenciar la transmisión de GABA, modular los efectos del glutamato, mejorar la producción de mielina, reducir la expresión de citocinas inflamatorias y prevenir la liberación de radicales libres de las microglías activadas.

20

25

[0003] Datos in vivo han demostrado los efectos neuroprotectores de la progesterona en sistemas nerviosos dañados. Por ejemplo, después de una lesión por contusión, la progesterona reduce la gravedad del edema cerebral post-lesión. La atenuación del edema por la progesterona está acompañado por la prevención de la muerte neuronal secundaria y mejoras en los resultados cognitivos (Roof et al. (1994) *Experimental Neurology* 129:64-69). Además, después de lesiones isquémicas en ratas, se ha demostrado que la progesterona reduce el daño celular y el déficit neurológico (Jiang et al. (1996) *Brain Research* 735: 101-107). Los efectos protectores de la progesterona pueden ser mediados por su interacción con GABA y/o receptores de glutamato al igual que sus efectos en las citocinas inflamatorias y la expresión de la acuaporina que se median por el receptor de progesterona intranuclear.

30

35

[0004] También se ha sugerido que varios metabolitos de progesterona podrían tener propiedades neuroprotectoras. Por ejemplo, los metabolitos de la progesterona alopregnanolona o epipregnanolona son moduladores positivos del receptor GABA, aumentando los efectos de GABA de forma independiente de las benzodiazepinas (Baulieu, E. E. (1992) *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 47:1-16; Robel et al. (1995) *Crit. Rev. Neurobiol.* 9:383-94; Lambert et al. (1995) *Trends Pharmacol. Sci.* 16:295-303; Baulieu, E. E. (1997) *Recent Prog. Horm. Res.* 52:1-32; Reddy et al. (1996) *Psychopharmacology* 128:280-92). Además, estos neuroesteroides actúan como antagonistas del receptor sigma: un receptor que puede activar el complejo canal NMDA (Maurice et al. (1998) *Neuroscience* 83:413-28; Maurice et al. (1996) *J. Neurosci. Res.* 46:734-43; Reddi et al. (1998) *Neuroreport* 9:3069-73). Estos neuroesteroides han mostrado también que reducen la estimulación de neuronas colinérgicas y la liberación posterior de acetilcolina por excitabilidad. Numerosos estudios han mostrado que las neuronas colinérgicas del cerebro anterior basal son sensibles a los traumatismos craneoencefálicos y que la liberación excesiva de acetilcolina puede ser más excitotóxica que el glutamato (Lyeth et al. (1992) *J. Neurotrauma* 9(2): S463 -74; Hayes et al. (1992) *J. Neurotrauma* 9(1): S 173-87).

40

45

[0005] Después de una lesión traumática del sistema nervioso central, una cascada de eventos fisiológicos conduce a la pérdida neuronal incluyendo, por ejemplo, una respuesta inmune inflamatoria y excitotoxicidad que resultan del impacto inicial que interrumpen los sistemas receptores del glutamato, acetilcolina, colinérgico GABA_A, y NMDA. Además, la lesión traumática del SNC frecuentemente está seguida por un edema cerebral y/o de médula espinal que realza la cascada de lesión y conduce a más muerte celular secundaria y aumenta la mortalidad del paciente.

50

55

[0006] Otros tipos de lesiones del sistema nervioso central (SNC) pueden establecer diferentes eventos fisiológicos que llevan a pérdida neuronal. Por ejemplo, una lesión isquémica ocurre cuando se interrumpe el flujo sanguíneo al sistema nervioso central (SNC). Durante la isquemia, el ATP celular consumido normalmente no puede ser adecuadamente restablecido en ausencia de un suministro de oxígeno. Otros eventos fisiológicos asociados a las lesiones isquémicas del Sistema Nervioso Central (SNC) incluyen la liberación o sobreexpresión de proteínas tales como la enolasa específica neuronal (NSE), la proteína básica de la mielina, la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), la proteína S-100, y la isoforma gamma de la proteína quinasa C (PKCγ), la estimulación de la degradación de los fosfolípidos de membrana y la posterior acumulación de ácidos grasos libres, la acidosis celular, la liberación de glutamato y la excitotoxicidad, el influjo de iones calcio, y la generación de radicales libres.

60

[0007] Una isquemia significativa en el sistema nervioso central (SNC) ocurre con derrame cerebral, conduciendo a muerte celular rápida en las regiones nucleares del derrame cerebral donde el flujo sanguíneo se reduce aproximadamente al 20% de los niveles normales. No obstante, hay un área más grande de lesión potencial, llamada la penumbra isquémica, donde el flujo sanguíneo se reduce en menor medida. Las células en esta región están en peligro, pero puede que no resulten dañadas irreversiblemente.

65

[0008] Debido a limitaciones en las terapias actuales para las lesiones del sistema nervioso central (SNC) como se ha

descrito anteriormente, se necesitan métodos mejorados para tratar lesiones traumáticas e isquémicas del Sistema Nervioso Central (SNC).

Resumen de la invención

5

[0009] Se provee la administración decreciente de progesterona o metabolitos de progesterona para el tratamiento o la prevención del daño neuronal en el sistema nervioso central (SNC). En particular, la presente invención mantiene la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una progesterona o metabolito de progesterona después de una lesión traumática o isquémica del sistema nervioso central (SNC) de manera que, antes de la terminación de la progesterona o del metabolito de progesterona la administración se reduce gradualmente para evitar la retirada. La reducción gradual del medicamento empleada puede implicar una disminución lineal, una disminución exponencial, una división progresiva al 50 % de las dosis administradas, o se pueden determinar basándose en una evaluación del médico responsable del tratamiento respecto a la respuesta del paciente a la terapia. Los métodos de administración decreciente de la presente invención se pueden utilizar en combinación con cualquier protocolo terapéutico o régimen para la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una progesterona o metabolito de progesterona para tratar una lesión traumática o isquémica del SNC.

Breve descripción de los dibujos

20

[0010]

La figura 1 muestra una curva de respuesta de dosificación para la recuperación conductual después de una lesión cerebral traumática. Las figuras 1A y 1B muestran que después del tratamiento con dosis bajas (8 mg/kg), moderadas (16 mg/kg), y altas (32 mg/kg) de progesterona en un portador conteniendo ciclodextrina, tanto las dosis bajas como las moderadas de progesterona producen mejoras considerables en el rendimiento del laberinto de agua de Morris.

25

La figura 2 muestra los resultados de la "prueba de eliminación de adhesivos" posterior al tratamiento con dosis bajas (8mg/kg), moderadas (16 mg/kg), y altas (32 mg/kg) de progesterona en un portador conteniendo ciclodextrina.

La figura 3 muestra los datos de déficit somatosensorial a un día (Figura 3A) y una semana (Figura 3B) post-retirada.

30

La figura 3A muestra que a un día post-retirada, los animales TWL mostraron un una latencia disminuida en comparación con animales VL y animales AWL (#, $p < 0.05$). Las ratas AWS demostraron elevadas deficiencias sensoriales en comparación con los grupos TWS y VS grupos (*, $p < 0,05$). La figura 3B muestra que a una semana post-retirada, los animales tratados con placebo mostraron un estado de latencia equivalente, mientras que los de tratamiento de administración decreciente mantenían una latencia disminuida en comparación con el tratamiento drástico y el tratamiento de vehículo (#, $p < 0.05$).

35

La figura 4 muestra el tiempo central, determinado a través de cajas de actividad locomotora Digiscan, entre uno (Figura 4A) y siete (Figura 4B) días post-retirada. La figura 4A muestra que un día después de la retirada, el tiempo central se aumentó para animales TWS en comparación con todos los otros animales de placebo (#; $p < 0,05$), mientras que el tiempo central para TWL se aumentó en comparación con otros grupos de lesión (**, $p < 0,05$). El tiempo central de los animales AWL aumentó en comparación con animales de vehículo (###; $p < 0,05$), y tiempo central de los animales AWS disminuyó significativamente en comparación con los animales VS (*, $p < 0,05$). La figura 4B mostró que el tiempo central para TWL una semana después de la retirada se aumenta por encima de AWL (**; $p < 0,05$), que se aumenta por encima de VL (###; $p < 0,05$). Ninguna diferencia se observó entre grupos de placebo.

40

La figura 5 muestra una densitometría Western blotting para p53 entre grupos experimentales que demuestra un aumento en la actividad apoptótica para Animales VL por encima de todos los otros grupos de tratamiento (*, $p < 0,05$).

45

La figura 6 muestra la densitometría Western blotting para HSP70 entre grupos experimentales que demuestra un aumento para los animales TWL sobre todos los otros grupos (*, $p < 0,05$).

La figura 7 muestra la densitometría Western blot para BDNF entre grupos experimentales que demuestra un aumento para animales TWL sobre todos los otros grupos (*; $p < 0,05$), seguido de AWL (#, $p < 0,05$). Los niveles de BDNF de VL fueron comparables a los placebos.

50

La figura 8 muestra imágenes representativas de secciones seleccionadas anteriores al bregma (Figura 8A), y datos cuantificados para cada grupo de lesión (Figura 8B). La figura 8A muestra secciones representativas marcadas con tiorina mm anteriores al bregma para animales de lesión. La figura 8B muestra que el porcentaje del volumen de la lesión a 3 semanas post-lesión es mayor en animales tratados con vehículo, seguido de aquellos con retirada drástica (*; $p < 0,05$) y retirada gradual (#, $p < 0.05$).

55

La figura 9 muestra relativos astrocitos reactivos determinados por tinción inmunofluorescente de GFAP a tres semanas post-lesión. La figura 9A muestra la tinción inmunofluorescente de GFAP en cortes finos cerebrales de los siguientes grupos: (A) VL; (B) AWL; (C) TWL; (D) VS; (E) AWS; y (F) TWS. Las imágenes se muestran a 40x, con 10 μ m representados. La figura 9B muestra la cuantificación de luminosidad para la tinción inmunofluorescente de GFAP de astrocitos reactivos indica la mayor respuesta en animales VL (*; $p < 0,05$), seguido de AWL (**; $p < 0,05$) y animales TWL. Los animales AWS mostraban niveles significativamente elevados de astrocitos reactivos en comparación con otros grupos placebo m (#, $p < 0.05$).

60

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

65

[0011] La presente invención se refiere a métodos y composiciones para el tratamiento o prevención de una neurodegeneración después de una lesión traumática o isquémica del sistema nervioso central. En particular, los

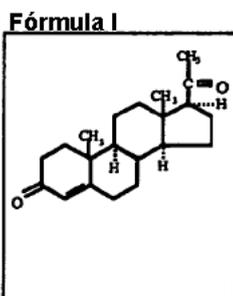
métodos de la invención mantienen la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una progestina o metabolito de progestina después de una lesión traumática o isquémica del sistema nervioso central (SNC) de manera que, antes de suprimir la administración de la progestina o metabolito de progestina la administración se reduce gradualmente para evitar la retirada. Como se describe aquí con más detalle en otra parte, la presente invención demuestra que la administración decreciente permite una reparación del SNC más provechosa que cuando se da una terminación brusca de la progestina o metabolito de progestina.

[0012] Con "tratamiento" se pretende cualquier mejora en el sujeto con la lesión traumática o isquémica incluyendo ambas recuperaciones mejoradas morfológicaS (es decir, viabilidad de tejido mejorada) y/o conductual. La mejora se puede caracterizar como un aumento en el índice y/o en la extensión de la recuperación anatómica y conductual después de la lesión traumática o isquémica del Sistema Nervioso Central (SNC). Por consiguiente, una "respuesta terapéutica positiva" induce tanto una respuesta completa como una respuesta parcial. Se describen aquí en otra parte varios métodos para determinar si una respuesta terapéutica completa o parcial ha tenido lugar.

[0013] La neurodegeneración es la pérdida progresiva de neuronas en el sistema nervioso central. Como se utiliza en este caso "neuroprotección" es el paro y/o progresión inversa de la neurodegeneración después de una lesión isquémica o traumática del sistema nervioso central. Por lo tanto, los métodos de la invención también encuentran uso en la reducción y/o prevención de los eventos fisiológicos que conducen a la neurodegeneración. Específicamente, la presente invención proporciona métodos para reducir o eliminar la muerte celular neuronal, edema, isquemia, y aumentar la viabilidad del tejido después de una lesión traumática o isquémica del sistema nervioso central.

[0014] Las hormonas sexuales son esteroides que se pueden clasificar en grupos funcionales según estructura química y actividad fisiológica e incluyen hormonas estrogénicas, hormonas progestacionales, y hormonas androgénicas. De interés particular en los métodos de la presente invención son las hormonas progestacionales, denominadas en este caso como "progestinas" o "progestágenos", y sus derivados y metabolitos bioactivos. Entre los elementos de esta amplia familia se incluyen hormonas esteroideas descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro et al., Mack Publishing Co. (18th ed. 1990), 990- 993. Como en todas las otras clases de esteroides, el estereoisomerismo tiene una importancia fundamental en las hormonas sexuales. Por lo tanto, una variedad de progestinas (es decir; progesterona) y sus derivados se incluyen en la presente invención, incluyendo tanto productos naturales como sintéticos. En un aspecto de la invención, la progestina o metabolito de progestina es progesterona.

[0015] El término "progesterona" como se utiliza en este caso se refiere a un elemento de la familia progestínica y comprende una hormona esteroide de 21 carbonos. La progesterona se conoce también como D4-pregnen-3,20-diona; δ 4-pregnen-3,20-diona; o pregn-4-en-3,20-diona y su estructura se muestra debajo como fórmula (I). La progesterona usada en los métodos de la invención puede ser de origen natural o sintético.



[0016] Además los métodos de la invención incluyen progestinas sintéticas. Como se utiliza en este caso una "progestina sintética" es una molécula cuya estructura está relacionada con la de la progesterona, es derivado sintéticamente, y retiene la actividad biológica de la progesterona (es decir, trata una lesión traumática del SNC). Entre las progestinas sintéticas representativas se incluyen, pero de forma no restrictiva, modificaciones que producen ésteres 17 α -OH (es decir, caproato de 17 α -hidroxiprogesterona), al igual que modificaciones que introducen sustituyentes 6 α -metilo, 6-Me, 6-en, y 6-cloro sobre la progesterona (es decir, acetato de medroxiprogesterona, acetato de megestrol, y acetato de clormadinona). La tabla 1 proporciona otros ejemplos no restrictivos de progestinas sintéticas.

Tabla 1 Clasificación de progestinas sintéticas

Clasificación usual por generación*			
Clasificación por estructura	Primero	Segundo	Tercero
Estranos	Diacetato de etinodiol (con etinilestradiol: Demulen) Noretindrona (Micronor)	--	--

Gonanos	Acetato de noretindrona (Aygestin) Norgestrel (Ovrette)	Levonorgestrel (Norplant; con etinilestradiol: Alesse, Nordette)	Desogestrel (con etinilestradiol: Desogen) Gestodeno† Norgestimato (con etinilestradiol: Ortho-Cyclen, Ortho Tri-Cyclen)
Pregnanos	Acetato de Medroxiprogesterona (Provera)	--	--

*--La clasificación tradicional se basa en el tiempo desde la introducción en el mercado y no en diferencias fisiológicas y estructurales o de eficacia.

5 [0017] Como se utiliza en este caso, por "derivado" o "metabolito bioactivo" de progestina se comprende cualquier progestina producida natural o sintéticamente que prevenga o retarde la neurodegeneración. Entre tales derivados de progestina se incluyen, por ejemplo, derivados de progesterona, tales como 5-dehidroprogesterona, 6-dehidroretroprogesterona (didrogesterona), alopregnanolona (alopregnan-3 α , o 3 β -ol-20-ona), diacetato de etinodiol, caproato de hidroxiprogesterona (pregn-4-en-3,20-diona, 17-(1-oxohexi)oxi); levonorgestrel, noretindrona, acetato de noretindrona (19-norpregn-4-en-20-in-3-ona, 17- (acetiloxi)-(17a)-); noretinodrel, norgestrel, pregnenolona, y acetato de meggestrol. Entre las progestinas útiles también se pueden incluir allopregnona-3 α o 3 β , 20 α o 20 β -diol (Véase Merck Index 258-261); alopregnan-3 β ,21-diol-11,20-diona; alopregnan-3 β , 17 α -diol-20-ona; 3,20-alopregnandiona, alopregnano, 3 β , 11 β , 17 α ,20 β ,21-pentol; alopregnan-3 β , 17 α ,20 β ,21-tetrol; alopregnan-3 α o 3 β , 11 β , 17, .21-tetrol-20-ona, alopregnan-3 β ,17 α o 20 β -triol; alopregnan-3 β , 17 α ,21-triol-11,20-diona; alopregnan-3 β ,11 β ,21-triol-20-ona; alopregnan-3 β ,17 α ,21-triol-ona; alopregnan-3 α o 3 β -ol-20-ona; pregnanodiol; 3,20-pregnanediona; pregnan-3 α -ol-20-one; 4-pregnen-20,21-diol-3,11-diona; 4-pregnen-11 β , 17 α ,20 β ,21-tetrol-3-ona; 4-pregnen-17 α ,20 β ,21-triol-3,11-diona; 4-pregnen-17 α ,20 β ,21-triol-3-ona, y éter metílico de pregnenolona. Otros derivados de progestina incluyen ésteres con ácidos orgánicos no tóxicos tales como el ácido acético, ácido benzoico, ácido maleico, ácido málico, ácido caproico, ácido cítrico y similares. Entre las sales inorgánicas se incluyen, por ejemplo, las sales de hidrocloreuro, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato. Adicionalmente, entre los compuestos que pueden encontrar uso en la presente invención se incluyen los derivados de progestina que se describen en U. S Patent No. 5,232,917.

25 [0018] La progestina o metabolito de progestina se puede administrar per se o en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Cuando se usan en medicina, las sales de la progestina o metabolitos de progestina deberían ser tanto farmacológicamente como farmacéuticamente aceptables, pero las sales no aceptables farmacéuticamente pueden ser usadas convenientemente para preparar el compuesto activo libre o sales farmacéuticamente aceptables del mismo y no son excluidas del alcance de esta invención. Tales sales farmacológicamente y farmacéuticamente aceptables se pueden preparar por reacción de una progestina o metabolito de progestina con un ácido inorgánico u orgánico, utilizando métodos estándar detallados en la bibliografía. Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables son sales de ácidos orgánicos formadas de un anión fisiológicamente aceptable, tal como, tosglato, metenosulfurato, acetato, citrato, malonato, tartrato, succinato, benzoato, etc. Las sales de ácidos inorgánicos se pueden formar a partir de sales de, por ejemplo, hidrocloreuro, sulfato, nitrato, bicarbonato y carbonato. Además, las sales farmacéuticamente aceptables se pueden preparar como sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, o sales de calcio del grupo ácido carboxílico.

35 [0019] Una lesión traumática del sistema nervioso central (SNC) se caracteriza por un impacto físico en el sistema nervioso central. Por ejemplo, un traumatismo craneoencefálico resulta cuando el cerebro está sujeto a una fuerza física que produce daño progresivo de la célula neuronal y/o muerte celular. Un traumatismo craneoencefálico se puede causar por un golpe en la cabeza y se manifiesta como una herida bien sea abierta o cerrada. Por ejemplo, las heridas por explosión se provocan por la compleja onda de presión generada por una explosión, y puede incluir heridas cerradas tales como conmoción sin señales externas de traumatismo craneal. Otras fuerzas físicas que pueden actuar en el cerebro incluyen la presión intracraneal aumentada debido a, por ejemplo, una hemorragia subaracnoidea o intracraneal, crecimiento tumoral, ventriculomegalia, o edema cerebral. Las lesiones cerebrales severas pueden ocurrir por laceraciones, fracturas de cráneo, y en cambio, incluso en ausencia de señales externos de traumatismo craneal. Las fuerzas físicas que resultan en un traumatismo craneoencefálico causan sus efectos induciendo tres tipos de lesión: fractura de cráneo, lesión parenquimal, y lesión vascular.

50 [0020] Las heridas parenquimales incluyen la conmoción, la lesión parenquimal directa y lesiones axonales difusas. Las conmociones se caracterizan como un síndrome clínico de alteración de conciencia derivado de un traumatismo craneal resultando típicamente de un cambio en el momento de la cabeza (movimiento de la cabeza detenida contra una superficie rígida). La patogénesis de la alteración repentina de la actividad nerviosa es desconocida, pero las anomalías fisiológicas y bioquímicas que ocurren incluyen, por ejemplo, la despolarización debida a flujos iónicos mediados por

aminoácidos excitatorios a través de membranas celulares, disminución de la adenosina trifosfato mitocondrial, y la alteración en la permeabilidad vascular. El síndrome postconmoción puede poner en evidencia una lesión parenquimal directa, pero en algunos casos no hay evidencias de daño.

5 [0021] Contusiones y heridas son condiciones en las que un daño parenquimal directo del cerebro ha sucedido, bien a través de la transmisión de energía cinética al cerebro y magulladuras análogas a las observadas en tejido blando (contusión) o por penetración de un objeto y desgarrado de tejido (laceración). Un golpe en la superficie del cerebro conduce al desplazamiento rápido de tejido, interrupción de los canales vasculares, y posterior hemorragia, lesión del tejido y edema. Entre las evidencias morfológicas de lesiones en el cuerpo celular neuronal se incluyen la picnosis del núcleo, eosinofilia del citoplasma, y desintegración de la célula. Además, un hinchamiento axonal puede aparecer en la proximidad de neuronas dañadas y también a grandes distancias desde el sitio de impacto. Este fenómeno se puede caracterizar como "lesión neuronal difusa" y se provoca por extensión y rasgadura del axón. La respuesta inflamatoria del tejido deteriorado sigue su curso usual con neutrófilos previos a la aparición de macrófagos.

15 [0022] Una lesión isquémica en el sistema nervioso central (SNC) se caracteriza por una insuficiencia o interrupción del suministro sanguíneo en cualquier localización del cerebro tales como, pero no restringido a, una localización del cerebro, cerebelo o tronco del cerebro. La médula espinal, que es también una parte del sistema nervioso central (SNC), es igualmente susceptible de isquemia como resultado de un flujo sanguíneo disminuido. Un episodio isquémico se puede provocar por una constricción u obstrucción de un vaso sanguíneo, como ocurre en el caso de un trombo o émbolo. Alternativamente, el episodio isquémico puede resultar de cualquier forma de función cardíaca comprometida, incluyendo el paro cardíaco. Donde la deficiencia es suficientemente severa y prolongada, puede llevar a interrupción de la función fisiológica, muerte posterior de neuronas, y necrosis (infarto) de las áreas afectadas. La extensión y el tipo de anomalía neurológica como resultado de la lesión dependen de la ubicación y el tamaño del infarto o el foco de isquemia. Donde la isquemia se une con un derrame cerebral, puede presentar una extensión bien global o focal.

25 [0023] Isquemia global, como se utiliza en este caso en referencia al sistema nervioso central (SNC), se refiere a una condición que resulta de una disminución general del flujo sanguíneo al cerebro entero, cerebro anterior, o médula espinal, que causa la muerte retardada de las neuronas, particularmente aquellas en loci metabólicamente activos, a lo largo de estos tejidos.

30 [0024] Isquemia focal, como se utiliza en este caso en referencia al sistema nervioso central (SNC), se refiere a una condición que resulta del bloqueo de una única arteria que proporciona sangre al cerebro o a la médula espinal, dando como resultado la muerte de todos los elementos celulares (pannecrosis) en el territorio suministrado por esa arteria.

35 [0025] Como se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona un método para el tratamiento o la prevención del daño neuronal provocado por una lesión traumática o isquémica en el sistema nervioso central (SNC) a través de la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de una progestina o metabolito de progestina de manera que, antes de la interrupción de la administración de la progestina o metabolito de progestina, la administración se disminuye gradualmente para evitar la retirada. Como se describe con más detalle en la sección experimental más adelante, la presente invención se refiere al hallazgo de que, cuando se para la terapia de progesterona, la administración decreciente de progesterona para evitar la retirada resulta en una eficacia superior de la terapia de progesterona en comparación con la interrupción brusca de la administración.

45 [0026] Por "régimen de dosificación de administración decreciente" o "administración decreciente" se entiende dosis reducidas sucesivas y la eliminación eventual de la progestina o metabolito de progestina, bien durante un periodo temporal fijo o un tiempo determinado empíricamente por una evaluación del médico basada en el control regular de una respuesta terapéutica de un paciente de una lesión traumática o isquémica en el Sistema Nervioso Central (SNC). El periodo de la reducción gradual de la administración de progestina o metabolito de progestina puede ser aproximadamente 12, 24, 36, 48 horas o más largo. Alternativamente, el periodo de reducción gradual de la administración de progestina o metabolito de progestina puede variar aproximadamente de 1 a 12 horas, aproximadamente de 12 a aproximadamente 48 horas, o de aproximadamente 24 a aproximadamente 36 horas. En un aspecto de la invención, la administración decreciente de una progestina o metabolito de progestina implica la administración decreciente de progesterona.

55 [0027] La reducción gradual del medicamento empleada podría implicar dividir progresivamente las dosis administradas al 50%. Por ejemplo, una disminución gradual tal de la administración de 500 mg iría 500, 250, 125, 62.5, etc. La reducción gradual del medicamento empleada podría ser una reducción "lineal". Por ejemplo, una reducción lineal del "10%" de 500 mg iría 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, etc. Alternativamente, una reducción exponencial podría ser empleada en la que, si el programa arriba descrito se usa como ejemplo, la reducción exponencial sería, por ejemplo, 500, 450, 405, 365, 329, 296, 266, 239, etc. Por consiguiente, una reducción exponencial o lineal alrededor del 5%, 10%, 20%, 30%, o 40% se podría emplear en los métodos de la invención. Además, una reducción gradual exponencial o lineal de aproximadamente de 1% a 5%, aproximadamente de 6% a 10%, aproximadamente de 11% a 15%, aproximadamente de 16% a 20%, aproximadamente de 21% a 25%, aproximadamente de 26% a 30%, aproximadamente de 31% a 35%, aproximadamente de 36% a 40% podría ser empleada. Alternativamente, el plan de reducción gradual se puede determinar en base a la evaluación del médico encargado del tratamiento de la respuesta del paciente a la terapia.

[0028] Los métodos de administración decrecientes de la presente invención se usan en combinación con terapias de administración de progestina o metabolitos de progestina para sujetos con lesiones traumáticas o isquémicas del Sistema Nervioso Central (SNC). Tal y como se define aquí, el sujeto puede ser cualquier mamífero, preferiblemente un humano o un animal, incluyendo animales domésticos, agrícolas o exóticos. En formas de realización específicas, el humano es un adulto (mayor de 18 años), mientras que en otras formas de realización, el humano es un niño (menor de 18 años de edad). El niño puede ser un neonato, bebé, niño, post-pubescente o pre-pubescente y variar en la edad desde cercano al nacimiento, desde 1 mes hasta aproximadamente 2 años, aproximadamente 1 año hasta aproximadamente 5 años, aproximadamente 4 años hasta aproximadamente 9 años, aproximadamente 8 años hasta aproximadamente 14, o aproximadamente 13 a aproximadamente 18 años de edad. Además, el humano puede tener aproximadamente 55 hasta 60, 60 hasta 70, 70 a 80, 80 a 90, 90 a 95 años o más viejo.

[0029] Antes de la administración decreciente de la presente invención, la progestina o metabolito de progestina se administra a un nivel terapéuticamente eficaz a un sujeto con la necesidad de la misma para el tratamiento de una lesión del sistema nervioso central (SNC). Por "cantidad terapéuticamente efectiva" se entiende la concentración de una progestina o metabolito de progestina que es suficiente para obtener un efecto terapéutico. Así, la concentración de una progestina o metabolito de progestina en una unidad de dosis administrada conforme a la presente invención es eficaz en el tratamiento o prevención del daño neuronal posterior a una lesión traumática o isquémica del sistema nervioso central (SNC) y por lo tanto, suscita un efecto neuroprotector. La cantidad terapéuticamente eficaz dependerá de muchos factores incluyendo, por ejemplo, la actividad específica de la progestina o metabolito de progestina, la gravedad, modelo, y tipo de lesión (p. ej., isquémica o traumática), el daño neuronal resultante, la receptividad del paciente, el peso del paciente respecto a la variabilidad intrapersonal, el método de administración, y la formulación de progestina o de metabolito de progestina usada. Varios métodos para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de progestina o metabolito de progestina para tratar lesiones del sistema nervioso central (SNC), incluyendo la determinación de la eficacia, dosificación, y forma de administración, se conocen en la técnica (ver, por ejemplo, U.S. Patent Application No 60/664,728 filed March 24, 2005, y U. S. Patent Application No. 09/973,375, filed October 9, 2001). Cualquier protocolo terapéutico o régimen para la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de progestina o metabolito de progestina para tratar una lesión traumática o isquémica del SNC se puede utilizar en combinación con el método de administración decreciente de la presente invención.

[0030] En una forma de realización de la invención, los métodos de administración decrecientes de la presente invención se usan en combinación con la administración de progestina o metabolito de progestina al menos una vez al día, incluyendo la administración de una vez o varias veces en un día. La duración del tratamiento puede ser una vez al día durante un periodo de dos a tres semanas y puede continuar durante un periodo de meses o incluso años. La dosis diaria se puede administrar bien como una única dosis en forma de una unidad de dosificación individual o diferentes unidades de dosificación más pequeñas o por administración múltiple de dosificaciones subdivididas en ciertos intervalos.

[0031] Por ejemplo, una unidad de dosificación se puede administrar de aproximadamente 0 horas hasta aproximadamente 1 hr, aproximadamente 1 hr a aproximadamente 24 horas, aproximadamente 1 a aproximadamente 72 horas, aproximadamente 1 a aproximadamente 120 horas, o aproximadamente 24 horas a por lo menos aproximadamente las 120 horas posteriores a la lesión. Alternativamente, la unidad de dosificación se puede administrar de aproximadamente 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 30, 40, 48, 72, 96, 120 horas o más posteriores a la lesión. Las unidades de dosificación posteriores se pueden administrar cualquier tiempo después de la administración inicial de manera que se consigue un efecto terapéutico. Por ejemplo, unidades de dosificación adicional se pueden administrar para proteger el paciente de la onda secundaria de edema que puede ocurrir a partir de los primeros días post-lesión.

[0032] En otra forma de realización de la invención, los métodos de administración decrecientes de la presente invención se usan en combinación con una progesterona constante o un régimen de dosificación de progestina sintética. Por "progesterona constante o régimen de dosificación de progestina sintética" se pretende que al paciente experimentando una terapia con progesterona o progestina sintética se le administre una dosis constante total por hora de progesterona o progestina sintética durante el curso del tratamiento. Esta dosis por hora de la progesterona o progestina sintética se divide en una serie de dosis equivalentes que se administran según un horario de dosificación apropiado dependiendo del método de administración. La duración de la progesterona constante o régimen de dosificación de progestina sintética es aproximadamente 12, 24, 36, 60, 72, 84, o 120 horas o aproximadamente 1 a 24 horas, aproximadamente 12 a 36 horas, aproximadamente 24 a 48 horas, aproximadamente 36 a 60 horas, aproximadamente 48 a 72 horas, aproximadamente 60 a 96 horas, aproximadamente 72 a 108 horas, aproximadamente 96 a 120 horas, o aproximadamente 108 a 136 horas.

[0033] En otras formas de realización de la invención, los métodos de administración decrecientes de la presente invención se usan en combinación con un "régimen de dosificación de progesterona o progestina sintética en dos niveles." por "régimen de dosificación de progesterona o progestina sintética en dos niveles" se pretende que al paciente que experimente la terapia con progesterona o progestina sintética se le administre la progesterona o progestina sintética durante dos periodos temporales de progesterona o dosificación de progestina sintética. Los periodos de dos tiempos pueden tener una duración combinada de aproximadamente 12 horas hasta aproximadamente 7 días,

incluyendo, 1, 2, 3, 4, o 5 días o aproximadamente 15, 15, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, o 144 horas o aproximadamente 1 a 24 horas, aproximadamente 12 a 36 horas, aproximadamente 24 a 48 horas, aproximadamente 36 a 60 horas, aproximadamente 48 a 72 horas, aproximadamente 60 a 96 horas, aproximadamente 72 a 108 horas, aproximadamente 96 a 120 horas, o aproximadamente 108 a 136 horas. En una forma de realización, el régimen de dosificación de progesterona o progestina sintética en dos niveles tiene una duración combinada de aproximadamente 1 día hasta aproximadamente 5 días; en otras formas de realización, el régimen de dosificación de progesterona o progestina sintética en dos niveles tiene una duración combinada de aproximadamente 1 día hasta aproximadamente 3 días.

[0034] En una forma de realización, la dosis total por hora de progesterona o progestina sintética que debe ser administrada durante los primeros y segundos periodos temporales del régimen de dosificación de progesterona o progestina sintética en dos niveles se elige de manera que se da una dosis total por hora de progesterona o progestina sintética más alta durante el primer periodo de tiempo y una dosis total inferior por hora de progesterona o progestina sintética se da durante el segundo periodo de tiempo. La duración de los primeros y segundos periodos temporales individuales del régimen de dosificación de progesterona o progestina sintética en dos niveles puede variar, dependiendo de la salud del individuo y de la historia de la lesión traumática o isquémica. Generalmente, se administra al paciente una dosis total por hora más alta de progesterona o progestina sintética durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 o 24 horas fuera del 1 día al 5 progesterona del régimen de dosificación de progesterona o progestina sintética en dos niveles. La longitud del segundo periodo de tiempo se puede ajustar por consiguiente, y varía por ejemplo, de aproximadamente 12 hrs, 24 hrs, 36 hrs, 48 hrs, 60 hrs, 72 hrs, 84 hrs, 96 hrs, 108 hrs, 120 hrs o aproximadamente 12 a aproximadamente 36 hrs, aproximadamente 24 a aproximadamente 36 hrs, aproximadamente 24 a aproximadamente 48 hrs, aproximadamente 36 hrs a aproximadamente 60 horas, aproximadamente 48 hrs a aproximadamente 72 hrs, aproximadamente 60 hrs a aproximadamente 84 horas, aproximadamente 72 hrs a aproximadamente 96 hrs, o aproximadamente 108 hrs a aproximadamente 120 hrs. Así, por ejemplo, donde el régimen de dosificación de progesterona o progestina sintética en dos niveles tiene una duración combinada de 3 días, las dosis total más alta de progesterona o progestina sintética podría ser administrada durante la primera hora, y la dosis por hora total menor de la progesterona o progestina sintética podría ser administrada durante las horas 2 a 72.

[0035] En otras formas de realización, la dosis total por hora de progesterona que debe ser administrada durante el primer y segundo periodo temporal del régimen de dosificación de progesterona o progestina sintética en dos niveles es elegido de manera que la menor dosis por hora total de progesterona o progestina sintética se da durante el primer periodo de tiempo y la mayor dosis por hora de progesterona o progestina sintética se da durante el segundo periodo de tiempo.

[0036] El área bajo la curva (AUC) se refiere a la área bajo la curva que traza la concentración de suero (nmol/L) de progesterona o progestina sintética durante un tiempo dado después de la administración IV del estándar de referencia de progesterona o progestina sintética. Por "estándar de referencia de progesterona o progestina sintética" se entiende la formulación de la progesterona o progestina sintética que sirve como base para la determinación del total por hora de la dosis de progesterona o progestina sintética a ser administrada a un paciente humano con una lesión isquémica o traumática del sistema nervioso central conforme a la constante deseada o régimen de dosificación de progesterona o progestina sintética en dos niveles para conseguir el efecto deseado, p. ej. una respuesta positiva mejorada respecto a la que se observa sin administración de la progesterona o progestina sintética. Por consiguiente, la dosis total por hora de progesterona o progestina sintética a ser administrada durante el régimen de dosificación constante o en dos niveles de progesterona o progestina sintética puede por lo tanto permitir una concentración sérica final de progesterona o progestina sintética de aproximadamente 100 ng/ml a aproximadamente 1000 ng/ml, de aproximadamente 1100 ng/ml a aproximadamente 1450 ng/ml, de 100 ng/ml a aproximadamente 250 ng/ml, de aproximadamente 200 ng/ml a aproximadamente 350 ng/ml, de aproximadamente 300 ng/ml a aproximadamente 450 ng/ml, de aproximadamente 400 ng/ml a aproximadamente 550 ng/ml, de aproximadamente 500 ng/ml a aproximadamente 650 ng/ml, de aproximadamente 600 ng/ml a aproximadamente 750 ng/ml, de aproximadamente 700 ng/ml a aproximadamente 850 ng/ml, de aproximadamente 800 ng/ml a aproximadamente 950 ng/ml, de aproximadamente 900 ng/ml a aproximadamente 1050 ng/ml, de aproximadamente 1000 ng/ml a aproximadamente 1150 ng/ml, de aproximadamente 1100 ng/ml a aproximadamente 1250 ng/ml, de aproximadamente 1200 ng/ml a aproximadamente 1350 ng/ml, de aproximadamente 1300 ng/ml a aproximadamente 1500 ng/ml. En formas de realización específicas, la concentración sérica de la progesterona o progestina sintética comprende aproximadamente 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 750 ng/ml, 900 ng/ml, 1200 ng/ml, 1400 ng/ml, 1600 ng/ml.

[0037] Los métodos de administración decrecientes de la presente invención también contemplan formas de realización donde a un paciente experimentando una terapia de progesterona constante o régimen de dosificación de progesterona o progestina sintética en dos niveles se le da un periodo de tiempo sin dosificación de progesterona o progestina sintética. Por ejemplo, cuando se lleva a cabo un régimen de dosificación de progesterona o progestina sintética, el periodo de tiempo sin progesterona o progestina sintética puede ocurrir entre la conclusión del primer periodo de tiempo del régimen de dosificación de progesterona o progestina sintética en dos niveles y la iniciación del segundo periodo de tiempo del régimen de dosificación de progesterona o progestina sintética en dos niveles. Por ejemplo, uno podría contemplar que el primer periodo de tiempo se administre en el ámbito pre-hospitalario, por ejemplo en el lugar del traumatismo. El segundo periodo de tiempo se podría luego iniciar a la llegada a un hospital. En estas formas de realización, el régimen de dosificación de progesterona o progestina sintética en dos niveles es interrumpido de manera

que la dosificación de progesterona o de progestina sintética se detiene durante un periodo de aproximadamente 15 minutos, 30 minutos, 1 hr, 2 hrs, 3 hrs, 4 hrs, 5 hrs, 6 hrs o más.

5 [0038] Donde un paciente que experimenta una terapia conforme a los regímenes de dosificación previamente mencionados muestra una respuesta parcial, o una recaída después de la finalización de la terapia, pueden ser necesarias nuevas aplicaciones de la terapia de progesterona o progestina sintética para conseguir una respuesta terapéutica parcial o completa. Así, después de un periodo temporal sin tratamiento, que puede haber comprendido una administración de progesterona constante o un régimen de dosificación de progesterona o progestina sintética en dos niveles o régimen de dosificación de progestina sintética, un paciente puede recibir uno o más periodos adicionales de tratamiento que comprenden progesterona constante o regímenes de dosificación de progesterona o progestina sintética en dos niveles. Tal periodo temporal sin tratamiento entre periodos de tratamiento se denomina en este caso como un periodo de tiempo de discontinuación. Es reconocido que la longitud del periodo de tiempo de discontinuación depende del grado de respuesta de paciente (es decir, completo frente a parcial) conseguido con cualquier periodo de tratamiento previo de la terapia de progesterona o progestina sintética. Es también reconocido que antes de un periodo temporal sin tratamiento o de discontinuación, la administración de la terapia de progesterona o progestina sintética puede ser reducida gradualmente.

20 [0039] Para el uso con los métodos de administración decrecientes de la presente invención, múltiples sesiones de tratamiento se denominan en este caso ciclos de mantenimiento, donde cada ciclo de mantenimiento comprende un régimen de dosificación completado. Por "régimen de dosificación en dos niveles completado" se entiende que al paciente se le ha administrado el primer periodo y el segundo periodo de dosificación de progesterona o progestina sintética. La necesidad de ciclos de mantenimiento múltiple se puede evaluar por monitorización de la mejora conductual y fisiológica del paciente. La duración entre ciclos de mantenimiento puede ser aproximadamente 1 hr, 15 hrs, 1 día, 2 día, 3 día, 4 día, 5 día, 6 día u otros periodos de tiempo de este tipo incluidos en el rango de aproximadamente 1 día hasta aproximadamente 14 días.

30 [0040] Para el uso en los métodos de administración decrecientes de la presente invención, la progestina o el metabolito de progestina puede comprender además un portador orgánico o inorgánico, sólido o líquido, farmacéuticamente aceptable. El portador también puede contener conservantes, agentes de humidificación, emulsionantes, agentes de solubilización, agentes estabilizantes, tampones, solventes y sales. Las composiciones se pueden esterilizar y existen como sólidos, particulados o polvos, soluciones, suspensiones o emulsiones. Además de los ingredientes ya mencionados, las composiciones de la invención pueden incluir además uno o más elemento(s) accesorios seleccionados del grupo que consiste en diluyentes, tampones, agentes aromatizantes, ligantes, desintegrantes, agentes activos de superficie, espesantes, lubricantes, conservantes (incluyendo antioxidantes) y similares.

35 [0041] La progestina o metabolito de progestina se puede formular según métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, tales como por mezcla con un vehículo portador farmacéuticamente aceptable. Vehículos adecuados y su formulación están descritos, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences (16th ed., Osol, A. (ed.), Mack, Easton PA (1980)). Para formar una composición farmacéuticamente aceptable adecuada para la administración eficaz, tales composiciones contendrán una cantidad eficaz de progestina o metabolito de progestina, bien solo, o con una cantidad adecuada de vehículo portador.

40 [0042] El portador farmacéuticamente aceptable variará dependiendo del método de administración farmacológica y puede ser, por ejemplo, bien un sólido, un líquido, o de liberación prolongada. Portadores sólidos representativos son lactosa, terra alba, sacarosa, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, estearato de magnesio, ácido esteárico, celulosa microcristalina, hidrogeles poliméricos, y similares. Portadores líquidos típicos incluyen jarabe, aceite de cacahuete, aceite de oliva, ciclodextrina, y similares emulsiones. Expertos en la técnica están familiarizados con los soportes apropiados para cada uno de los métodos de administración comúnmente utilizados. Además, es reconocido que la cantidad total de progestina o metabolito de progestina administrada como una dosis efectiva terapéutica dependerá de la composición farmacéutica administrada (es decir, el portador usado) y el modo de administración.

45 [0043] Las composiciones para utilizar en los métodos de la presente invención incluyen aquellas adecuadas para la administración oral, rectal, tópica, nasal, oftálmica, o parenteral (incluyendo, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, o inyección intramuscular). Las composiciones pueden ser presentadas convenientemente en la forma de dosificación unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica de farmacia. Todos los métodos incluyen el paso de asociar el agente activo con un portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan por una asociación uniforme e íntima del compuesto activo con un portador líquido, un soporte sólido finamente dividido o ambos, y luego, si es necesario, el modelado del producto en formulaciones deseadas.

60 [0044] Las composiciones para la administración oral se pueden presentar como unidades específicas tales como cápsulas, sellos, comprimidos, pastillas, y similares, conteniendo una cantidad predeterminada del agente activo como un polvo o gránulos; o una suspensión en una solución acuosa o líquido no acuoso tal como un jarabe, un elixir, una emulsión, un calado, y similares.

65 [0045] Una pastilla puede ser hecha por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios.

Las pastillas comprimidas se pueden preparar por compresión en una máquina adecuada, con el compuesto activo en una forma libre tal como un polvo o gránulos que es opcionalmente mezclado con un ligante, desintegrante, lubricante, diluyente inerte, agente tensioactivo o agente de dispersión. Los comprimidos moldeados que constan de un portador adecuado pueden ser hechos por moldeo en una máquina adecuada.

[0046] Un jarabe puede ser hecho añadiendo el compuesto activo a una solución acuosa concentrada de un azúcar, por ejemplo sacarosa, a la que también se puede adicionar cualquier elemento(s) de accesorio. Tales ingredientes accesorios pueden incluir aromatizantes, conservantes adecuados, un agente para retardar la cristalización del azúcar, y un agente para aumentar la solubilidad de cualquier otro ingrediente, tal como un alcohol polihídrico, por ejemplo, glicerol o sorbitol.

[0047] Las formulaciones adecuadas para la administración parental comprenden convenientemente una preparación acuosa estéril del compuesto activo, que puede ser isotónica con la sangre del receptor.

[0048] Las formulaciones de spray nasal comprenden soluciones acuosas purificadas del agente activo con agentes conservantes y agentes isotónicos. Tales formulaciones se ajustan preferiblemente a un pH y un estado isotónico compatible con las membranas mucosas nasales.

[0049] Las formulaciones para la administración rectal se pueden presentar como un supositorio con un portador adecuado tal como manteca de cacao, o grasas hidrogenadas o ácidos carboxílicos grasos hidrogenados.

[0050] Las formulaciones oftálmicas se preparan por un método similar al spray nasal, excepto que el pH y factores isotónicos se ajustan preferiblemente para corresponderse a aquel del ojo.

[0051] Las formulaciones tópicas comprenden el compuesto activo disuelto o suspendido en un medio tal como un aceite mineral, petróleo, alcoholes polihidroxilados u otras bases se han usado para formulaciones tópicas. La adición de otros ingredientes accesorios como se ha indicado anteriormente puede ser deseable.

[0052] Además, las composiciones para el uso en los métodos de la presente invención incluyen formulaciones liposómicas. La tecnología para formar suspensiones liposómicas es bien conocida en la técnica. Cuando la progestina o la sal del metabolito de progestina es una sal soluble en agua, utilizando la tecnología de liposoma convencional, el mismo se puede incorporar en vesículas lipídicas. En tal ejemplo, debido a la solubilidad en agua del compuesto o sal, el compuesto o sal será sustancialmente arrastrado al centro hidrofílico o núcleo de los liposomas. La capa lipídica empleada puede ser de cualquier composición convencional y pueden contener colesterol o puede ser sin colesterol. Cuando el compuesto o sal de interés es insoluble en agua, nuevamente utilizando tecnología de formación de liposoma convencional, la sal puede ser sustancialmente arrastrada a través de la doble capa de lípido hidrofóbico que forma la estructura del liposoma. En cualquier ejemplo, los liposomas que son producidos pueden tener un tamaño reducido, como a través del uso de la sonicación estándar y las técnicas de homogeneización. Las formulaciones liposómicas que contienen progestina o metabolito de progestina o sales derivadas, se pueden liofilizar para producir un liofilizado que se puede reconstituir con un portador farmacéuticamente aceptable, tal como agua, para regenerar una suspensión liposómica.

[0053] Las formulaciones farmacéuticas para el uso en los métodos de la presente invención también incluyen los que se adecuan para la administración como aerosol, por inhalación. Estas formulaciones comprenden una solución o suspensión de la progestina deseada o metabolito de progestina o de una sal de la misma o una pluralidad de partículas sólidas del compuesto o sal. La formulación deseada se puede colocar en una cámara pequeña y pulverizarse. La pulverización se puede realizar por aire comprimido o por energía ultrasónica para formar una pluralidad de gotitas líquidas o partículas sólidas comprendiendo los compuestos o sales.

[0054] Además las formulaciones farmacéuticas para el uso en los métodos de la presente invención incluyen las preparaciones de liberación controlada. Tales preparaciones de liberación controlada se pueden conseguir con el uso de polímeros para complejar o absorber la progestina o metabolito de progestina. La administración controlada se puede llevar a cabo seleccionando macromoléculas apropiadas (por ejemplo, poliésteres, ácidos poliamínicos, polivinilpirrolidona, etilenvinilacetato, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, o sulfato de protamina). El índice de liberación farmacológica también se puede controlar alterando la concentración de tales macromoléculas.

[0055] Otro método posible para controlar la duración de la acción comprende la incorporación de los agentes terapéuticos en partículas de una sustancia polimérica tal como poliésteres, ácidos poliamínicos, hidrogeles, poli(ácido láctico) o copolímeros de etilenvinilacetato. Alternativamente, es posible atrapar los agentes terapéuticos en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, por el uso de celulosa hidroximetilica o microcápsulas de gelatina o microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, o en un sistema coloidal de administración de medicamentos, por ejemplo, liposomas, albúmina, microesferas, microemulsiones, nanopartículas, nanocápsulas, o en macroemulsiones. Tales instrucciones están descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences (1980).

[0056] Para el uso en los métodos de la presente invención, las composiciones que comprenden una concentración

terapéuticamente eficaz de progestina o metabolito de progestina se pueden administrar usando cualquier método aceptable conocido en la técnica. Así, por ejemplo, la composición farmacéutica que comprende progestina o metabolito de progestina se puede administrar por métodos que incluyen administración intravenosa (IV), intramuscular (IM), subcutánea (SC), intraperitoneal, transdérmico, bucal, vaginal o intracerebroventricular. Cuando se administra por vía intravenosa, la composición farmacéutica que comprende progesterona o progestina sintética se puede administrar por infusión durante un periodo de aproximadamente 1 a aproximadamente 120 horas. En algunas formas de realización, la infusión de progesterona o progestina sintética ocurre durante un periodo de aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas, durante un periodo de aproximadamente 48 a aproximadamente 96 horas, o durante un periodo de aproximadamente 24 a aproximadamente 120 horas.

[0057] Una forma de realización de la presente invención mantiene la administración de una progesterona o progestina sintética o derivado análogo a través de la administración IV en dosis de aproximadamente 0,1 ng a aproximadamente 100 g por kg de peso corporal, aproximadamente 10 ng a aproximadamente 50 g por kg de peso corporal, de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 1 g por kg de peso corporal, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal; y de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal. Alternativamente, la cantidad de progesterona o progestina sintética administrada para conseguir una dosis efectiva terapéutica es aproximadamente 0.1 ng, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 1 µg, 10 µg, 100 µg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg, 16 mg, 17 mg, 18 mg, 19 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 500 mg por kg de peso corporal o superior.

[0058] En otra forma de realización de la presente invención mantiene la administración de una progestina o metabolito de progestina o derivado análogo a través de la administración parenteral en una dosis de aproximadamente 0,1 ng a aproximadamente 100 g por kg de peso corporal, aproximadamente 10 ng a aproximadamente 50 g por kg de peso corporal, de aproximadamente 100 ng a aproximadamente 1 g por kg de peso corporal, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal, de aproximadamente 1 µg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal; y de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal. Alternativamente, la cantidad de progestina o metabolito de progestina administrada para conseguir una dosis efectiva terapéutica es aproximadamente 0.1 ng, 1 ng, 10 ng, 100 ng, 1 µg, 10 µg, 100 µg, 1 mg, 2 mg, 3 mg, 4 mg, 5 mg, 6 mg, 7 mg, 8 mg, 9 mg, 10 mg, 11 mg, 12 mg, 13 mg, 14 mg, 15 mg, 16 mg, 17 mg, 18 mg, 19 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg, 50 mg, 60 mg, 70 mg, 80 mg, 90 mg, 100 mg, 500 mg por kg de peso corporal o superior. En un aspecto de la invención, la progestina o metabolito de progestina para la administración parenteral es progesterona o alopregnanolona.

[0059] En otras formas de realización de la presente invención, los métodos de administración decrecientes de la invención se usan en combinación con el uso de una progestina o metabolito de progestina y al menos un agente neuroprotector adicional para mejorar la neuroprotección después de una lesión traumática o isquémica del Sistema Nervioso Central (SNC). Tales agentes incluyen, por ejemplo, cualquier combinación de progestina o metabolito de progestina. Entre los agentes neuroprotectores de interés se incluyen, por ejemplo, compuestos que reducen la excitotoxicidad del glutamato y mejoran la regeneración neuronal. Tales agentes se pueden seleccionar de, pero no restringido a, el grupo que comprende factores de crecimiento. Por "factor de crecimiento" se entiende una molécula extracelular polipeptídica de señalización que estimula una célula a crecer o proliferar. Los factores de crecimiento preferidos son aquellos a los que responden una amplia variedad de tipos celulares. Entre los ejemplos de factores de crecimiento neurotrófico se incluyen, pero no se limita a, elementos de la familia del factor de crecimiento de fibroblasto tales como el factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF) (Abraham et al. (1986) Science 233:545-48), el factor de crecimiento de fibroblasto ácido (aFGF) (Jaye et al. (1986) Science 233:541-45), el producto de gen hst/Kfgf, FGF-3 (Dickson et al. (1987) Nature 326-833), 4 fGF (Zhan et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:3487-3495), FGF-6 (deLapeyriere et al. (1990) Oncogene 5: 823-831), el factor de crecimiento de queratinocito (KGF) (Finch et al. (1989) Science 245:752-755), y el factor de crecimiento inducido por andrógenos (AIGF) (Tanaka et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8928-8923).

[0060] Entre los agentes neuroprotectores adicionales se incluyen, el factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor de crecimiento de nervioso (NGF) (Seiler, M. (1984) Brain Research 300:33-39; Hagg T. et al. (1988) Exp Neurol 101:303-312; Kromer L. F. (1987) Science 235:214-216; y Hagg T. et al. (1990) J. Neurosci 10(9):3087-3092), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Kiprianova, I. et al. (1999) J. Neurosci. Res. 56:21-27), neurotrofina 3 (NT3), neurotrofina 4 (NT4), factores de crecimiento de transformación-β1 (TGF-β1) (Henrick-Noack, P. et al. (1996) Stroke 27:1609-14), proteína morfogénica del hueso (BMP-2) (Hattori, A. et al. (1999) J. NeuroChem. 72:2264-71), factor neurotrófico derivado de una línea celular glial (GDNF) (Miyazaki, H. et al. (1999) Neuroscience 89:643-7), factor neurotrófico dependiente de actividad (ADNF) (Zamostiano, R. et al. (1999) Neurosci Letter 264:9-12), la citocina factor de inhibición de leucemia (LIF) (Blesch, A. et al. (1999) J. Neurosci. 19:3356-66), oncostatina M, interleucina, y los factores de crecimiento de tipo insulina 1 e 2.

[0061] Entre otras formas de agentes neuroprotectores terapéuticos se incluyen, por ejemplo, clometiazol (Zendra) (Marshal, J.W. et al. (1999) Exp. Neurol. 156:121-9); ácido quinurénico (KYNA) (Salvati, P. et al. (1999) Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 23:741-52), Semax (Miasoedova, N. F. et al. (1999) Zh Nevrol Psikhiatr Imss

Korsakova 99:15-19), FK506 (tacrolimus) (Gold, B.G. et al. (1999) J. Pharmacol. Exp. Ther. 289:1202-10), L-treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol (Inokuchi, J. et al. (1998) Act Biochim Pol 45:479-92), análogo de andrenocorticotropin-(4-9) (ORG 2766) y dizolcipina (MK-801) (Herz, R. C. et al. (1998) Eur J. Pharmacol 346:159-65), interleucina 6 del cerebro (Loddick, S.A. et al. (1998) J. Cereb Blood Flow Metab 18:176-9), selegilina (Semkova, I. et al. (1996) Eur J Pharmacol 315:19-30), MK-801 (Barth, A. et al. (1996) Neuro Report 7:1461-4) antagonistas de glutamato tales como, NPS1506; GV1505260; MK801 (Baumgartner, W.A. et al.(1999) Ann Thorac Surg 67:1871-3), GV150526 (Dyker, A.G. et al. (1999) Stroke 30:986-92); antagonistas de AMPA tales como NBQX (Baumgartner, W.A. (1999) et al. Ann Thorac Surg 67:1871-3), PD152247 (PNQX) (Schielke, G.P. et al. (1999) Stroke 30:1472-7), SPD 502 (Nielsen, E.O. et al. (1999) J. Pharmacol Exp Ther 289:1492-501), LY303070 y LY300164 (May, P.C. et al. (1999) Neuroscience Lett 262:219-221).

[0062] Donde los métodos de administración decreciente de la invención se usan en combinación con el uso de una progestina o metabolito de progestina y al menos un agente neuroprotector adicional para mejorar la neuroprotección después de una lesión traumática o isquémica del Sistema Nervioso Central (SNC), es reconocido que incluso menos progestina o metabolito de progestina es necesaria para ser terapéuticamente eficaz.

[0063] Los métodos de la presente invención encuentran uso en el tratamiento de una lesión traumática o isquémica del sistema nervioso central. Los métodos para cuantificar la extensión del daño del sistema nervioso central (es decir; neurodegeneración) y para determinar si el daño neuronal fue tratado o prevenido después de la administración de una progestina o metabolito de progestina son bien conocidos en la técnica. Tales efectos neuroprotectores se pueden evaluar a varios niveles, incluyendo, por ejemplo, por promoción morfológica y conductual (es decir, aumentando la viabilidad de tejido) de la recuperación después de una lesión traumática o isquémica del cerebro. Una variedad de ensayos inmunológicos, anatómicos y inmunocitoquímicos para determinar el efecto de la progestina o metabolito de progestina en la necrosis, apoptosis, y reparación neuronal glial se conocen en la técnica. Como tal, la neuroprotección que resulta de los métodos de la presente invención supondrá un aumento en al menos aproximadamente un 10% a 20%, 20% a 30%, 30% a 40%, 40% a 60%, 60% a 80% o superior en la supervivencia neuronal y/o recuperación conductual en comparación con los grupos de control.

[0064] Ensayos de marcadores moleculares e histológicos para un aumento en la supervivencia neuronal son conocidos. Por ejemplo, la proteína asociada al crecimiento 43 (GAP-43) se puede usar como etiqueta para nuevos crecimientos axonales después de una agresión al sistema nervioso central (SNC). Véase, por ejemplo, Stroemer et al. (1995) Stroke 26:2135-2144, Vaudano et al. (1995) J. of Neurosci. 15:3594-3611. Entre otros marcadores histológicos se pueden incluir una reducción en la astrogliosis y la microgliosis. Alternativamente, un retraso en la muerte celular se puede evaluar usando etiquetado por TUNEL en el tejido deteriorado. Más medidas anatómicas que pueden utilizarse para determinar un aumento en la neuroprotección incluyen un recuento de tipos de células neuronales específicas para determinar si la progestina o metabolito de progestina está preservando preferentemente un tipo de célula particular (p. ej., células colinérgicas) o neuronas en general.

[0065] Además, pueden utilizarse ensayos conductuales para determinar el índice y la extensión de la recuperación del comportamiento en respuesta al tratamiento. Las mejoras en las habilidades motoras del paciente, el rendimiento en el aprendizaje espacial, la función cognitiva, la percepción sensorial, el habla y/o una reducción en la propensión a las crisis también se pueden usar para medir el efecto neuroprotector. Tales pruebas funcional/comportamentales usadas para valorar las funciones sensitivas y motoras y la función refleja están descritas en, por ejemplo, Bederson et al. (1986) Stroke 17:472-476, DeRyck et al. (1992) Brain Res. 573:44-60, Markgraf et al. (1992) Brain Res. 575:238-246, Alexis et al. (1995) Stroke 26:2336-2346. La mejora de la supervivencia neuronal también se puede medir usando la Escala Escandinava Carrera (SSS) o el índice de Barthl. La recuperación conductual puede ser evaluada además usando las recomendaciones del Subcommittee of the NIH/NINDS Head Injury Centers in Humans (Hannay et al. (1996) J. Head Trauma Rehabil. 11:41-50). La recuperación conductual puede ser evaluada además usando los métodos descritos en, por ejemplo, Beaumont et al. (1999) Neurol. Res. 21:742-754; Becker et al. (1980) Brain Res. 200:07-320; Buresov et al. (1983) Techniques and Basic Experiments for the Study of Brain and Behavior ; Kline et al. (1994) Pharmacol. Biochem. Behav. 48:773-779; Lindner et al. (1998) J. Neurotrauma 15:199-216; Morris (1984) J. Neurosci. Methods 11:47-60; Schallert et al. (1983) Pharmacol. Biochem. Behav. 18:753-759.

[0066] Es reconocido que una lesión traumática del sistema nervioso central (SNC) produce múltiples eventos fisiológicos que impactan en la extensión e índice de neurodegeneración, y así en el resultado clínico final de la lesión. El tratamiento de una lesión traumática del sistema nervioso central (SNC), tal y como se define por la presente invención, abarca cualquier reducción y/o prevención en uno o más de los varios eventos fisiológicos que siguen al impacto inicial. Por lo tanto, los métodos de la invención encuentran uso en la reducción y/o prevención de eventos fisiológicos que conducen a neurodegeneración después de una lesión traumática del sistema nervioso central.

[0067] Por ejemplo, un edema cerebral se desarrolla frecuentemente después de una lesión traumática del sistema nervioso central (SNC) y es una de las primeras causas de muerte e incapacidad. Las contusiones corticales, por ejemplo, producen aumentos masivos en el contenido de agua en el tejido del cerebro que, sucesivamente, pueden causar un aumento de la presión intracraneal conduciendo a la reducción del flujo sanguíneo al cerebro y una adicional pérdida neuronal. Por lo tanto, los métodos de la invención encuentran uso en la reducción y/o eliminación del edema cerebral y/o en la reducción de la duración del evento edémico después de una lesión traumática del sistema nervioso

central (SNC). Ensayos para determinar una reducción en el edema se conocen en la técnica e incluyen, pero de forma no restrictiva, una reducción en el contenido de agua del tejido después de la administración de la progestina o metabolito de progestina (Betz et al. (1990) *Stroke* 21:1199-204). Además, una mejora total en la recuperación conductual también puede usarse como una medida de la reducción en el edema. Una reducción en el edema en el tejido afectado de al menos aproximadamente 15% a 30%, aproximadamente 30% a 45%, aproximadamente 45% a 60%, aproximadamente 60% a 80%, o aproximadamente 80% a 95% o superior será terapéuticamente beneficioso, como será cualquier reducción en la duración del evento edémico.

[0068] El edema vasogénico después de un daño traumático cerebral ha sido asociado a un daño en la vasculatura y la interrupción de la barrera hematoencefálica (BBB) (Duvdevani et al. (1995) *J. Neurotrauma* 12:65-75). Se ha demostrado que la progesterona es capaz de reducir la permeabilidad de la BBB a las macromoléculas, pero no iones, tal como sodio in vitro (Betz et al. (1990) *Stroke* 21:1199-204; Beta et al. (1990) *Acta. Neurochir. Suppl.* 51:256-8). Por lo tanto, los métodos de la invención encuentran uso en la reducción o eliminación del edema vasogénico después de un daño cerebral traumático. Los ensayos para determinar una reducción en el edema vasogénico se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, una reducción en la extravasación de Evans' Blue después de una contusión cortical (Roof et al. (1994) *Society for Neuroscience* 20:91).

[0069] Otros efectos fisiológicos de las lesiones cerebrales traumáticas incluyen una respuesta inmune. Véase, por ejemplo, Soares et al. (1995) *J. Neurosci.* 15:8223-33; Holmin et al. (1995) *Acta Neurochir.* 132:110-9; Arvin et al. (1996) *Neurosci. Biobehav. Rev.* 20:445-52. Después de un impacto cortical, aparecen reacciones inflamatorias severas y gliosis en el área del impacto y en áreas cerebrales distales del área primaria de la lesión. La respuesta inflamatoria se caracteriza por la expresión de moléculas de adhesión en las superficies vasculares, dando como resultado la adherencia de células inmunológicas y la extravasación posterior en el parénquima cerebral. Liberando citocinas, los macrófagos de invasión y neutrófilos estimulan la astrocitosis reactiva. La liberación de diferentes quimiocinas por otros tipos celulares induce a estas células inmunológicas a hacerse fagocíticas, con la liberación simultánea de radicales libres y compuestos proinflamatorios, por ejemplo, citocinas, prostaglandinas, y excitotoxinas (Arvin et al. (1996) *Neurosci. Biobehav. Ref.* 20:445-52; Raivich et al. (1996) *Kelo J. Med.* 45:239-47; Mattson et al. (1997) *Brain Res. Rev.* 23:47-61).

[0070] Los métodos de la invención proporcionan medios para reducir o eliminar las reacciones inmunológicas inflamatorias que siguen una lesión traumática del SNC. Además, reduciendo la respuesta inflamatoria después de una lesión, la progestina o metabolito de progestina de la presente invención puede reducir sustancialmente la inflamación del cerebro y la presión intracraneal y reducir la cantidad de sustancias neurotóxicas (p. ej., radicales libres y excitotoxinas) que son liberadas. Por lo tanto, reduciendo la respuesta inmuno/inflamatoria después de una lesión traumática del sistema nervioso central (SNC), se mejorará la supervivencia neuronal y/o recuperación conductual.

[0071] Entre los ensayos que pueden utilizarse para determinar si la progestina o metabolito de progestina de la invención están impartiendo un efecto anti-inflamatorio y supresor no específico en el sistema inmunológico después de una lesión traumática del SNC se incluyen, por ejemplo, una reducción en la proliferación microglial inducida por citocina in vitro (Hoffman et al. (1994) *J. Neurotrauma* 11:417- 31; Garcia-Estrada et al. (1993) *Brain Res* 628:271-8); una reducción en la generación de radicales libres citotóxicos por los macrófagos activados (Chao et al. (1994) *Am. J. Reprod. Immunol.* 32:43-52 ; Robert et al. (1997) *Nitric Oxide* 1:453-62 ; Kelly et al. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239:557-61; Ganter et al. (1992) *J. Neurosci. Res.* 33:218-30); una reducción en la expresión de la sintetasa de óxido nítrico inducible y la cantidad de liberación de óxido nítrico por macrófagos (Robert et al. (1997) *Nitric Oxide* 1:453-62; Miller et al. (1996) *J. Leukoc. Biol.* 59:442-50); la liberación de un "factor bloqueador inducido por progesterona" que inhibe la actividad de la célula NK asesinas naturales (Cheek et al. (1997) *Am. J. Reprod Immunol.* 37:17-20; Szekeres-bartho et al. (1997) *Cell Immunol.* 177:194-9; Szekeres-bartho et al. (1996) *Am. J. Reprod Immunol.* 35:348- 51); una disminución en el número de astrocitos GFAP-positivos después de una lesión cerebral que sugiere un daño cerebral secundario menor (Garcia-Estrada et al. (1993) *Brain Res.* 628:271-8 ; Garcia-Estrada et al. (1999) *Int. J. Dev. Neurosci.* 17:145-51; Cheek et al. (1997) *Am. J. Reprod Immunol.* 37:17-20; Szekeres-bartho et al. (1997) *Cellular Immunol.* 177:194-9; Szekeres-bartho et al. (1996) *Am. J. Reprod Immunol.* 35:348-51); una reducción en el número de células inmunológicas inflamatorias (células OX42-positivas); una reducción en la pérdida de neuronas COX-positivas y ChAT-positivas; una reducción en el número de neuronas MnSOD-positivas y TUNEL-positivas; y un aumento en la intensidad de la actividad de la succinato deshidrogenasa y de la citocromo c oxidasa.

[0072] Además, una reducción en las reacciones inmunológicas inflamatorias después de una lesión cerebral traumática se puede evaluar por medición del nivel de citocina después de la lesión en controles placebo frente a sujetos tratados con progestina o metabolito de progestina. Las citocinas son mediadores de inflamación y se liberan en concentraciones altas después de una lesión cerebral. El nivel de citocinas proinflamatorias (p. ej., interleucina 1-beta, factor de necrosis tumoral, e interleucina 6) y el nivel de citocinas anti-inflamatorias (p. ej., interleucina 10 y factor de crecimiento transformante beta) puede ser medido. Por ejemplo, las reacciones en cadena de la polimerasa "en tiempo real" (PCR) pueden utilizarse para medir la resistencia de la señal de ARNm y se puede utilizar ELISA para determinar niveles de proteína. Además, se puede utilizar un análisis histológico para diferentes tipos de células inflamatorias (p. ej., astrocitos reactivos, macrófagos y microglia) para medir una reducción en la respuesta inflamatoria.

[0073] Otra consecuencia fisiológica de una lesión traumática del SNC es un aumento en la peroxidación lipídica. Los

métodos de la invención encuentran uso en la reducción del daño de los radicales libres y así se disminuye o elimina la peroxidación lipídica. Este efecto puede ocurrir a través de un realce de los sistemas endógenos de depuración de radicales libres. Ensayos para medir una reducción en la peroxidación lipídica tanto en el homogeneizado de cerebro como en la mitocondria se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, el método del ácido tiobarbitúrico (Roof et al. (1997) Mol. Chem. Neuropathol. 31:1-11; Subramanian et al. (1993) Neurosci. Lett. 155:151-4; Goodman et al. (1996) J. Neurochem. 66:18 6-44; Vedder et al. (1999) J. Neurochem. 72: 2531-8) y varios sistemas generadores de radicales libres in vitro. Además, las alteraciones en los niveles de enzimas críticas depuradoras de radicales libres, tales como la glutatona mitocondrial pueden ser evaluadas. Véase, por ejemplo, Subramanian et al. (1993) Neurosci. Lett. 155:151-4; y Vedder et al. (1999) J. Neurochem. 72:2531-8.

[0074] Además, los macrófagos cultivados estimulados con citocina generan nitrito, superóxido, y peróxido de hidrógeno. Ya que los macrófagos se conocen por ser muy activos entre 48 horas y siete días después de que una lesión cerebral traumática, una reducción en estas células reactivas reducirían el daño secundario a las neuronas. Véase, por ejemplo, Fulop et al. (1992) 22 nd Annual Meeting of the Society for Neuroscience 18:178; Soares et al. (1995) J. Neurosci. 15:8223-33; Holmin et al. (1995) Acta Neurochir. 132:110-9.

[0075] Es reconocido que una lesión isquémica del sistema nervioso central (SNC) tiene como resultado su propio conjunto de eventos fisiológicos que impactan en la extensión y el índice de neurodegeneración, y así en el resultado clínico final de la lesión. El tratamiento de una lesión isquémica del sistema nervioso central (SNC), tal y como se define por la presente invención, abarca cualquier reducción y/o prevención en uno o más de los varios eventos fisiológicos que siguen a la interrupción inicial en el riego sanguíneo. Por lo tanto, los métodos de la invención encuentran uso en la reducción y/o prevención de eventos fisiológicos que conducen o están asociados a neurodegeneración después de una lesión isquémica al sistema nervioso central.

[0076] Como se describe en otra parte aquí, las lesiones isquémicas del Sistema Nervioso Central (SNC) están asociadas a determinados eventos fisiológicos que conducen a neurodegeneración, incluyendo, por ejemplo, la liberación o la sobreexpresión de proteínas tales como NSE, proteína básica de la mielina, GFAP, la proteína S-100, y PKCg, la estimulación de la degradación de fosfolípidos de la membrana y posterior acumulación de ácidos grasos libres, el fallo de energía debido a la disminución de ATP, acidosis celular, la liberación de glutamato y excitotoxicidad, el influjo de iones calcio, y la generación de radicales libres. Los ensayos para determinar una reducción y/o prevención de eventos fisiológicos que conducen o están asociados a neurodegeneración después de una lesión isquémica del Sistema Nervioso Central (SNC) se pueden dirigir hacia la medición de cualquiera de estos eventos fisiológicos. Por ejemplo, los ensayos para medir niveles de NSE, proteína básica de la mielina, GFAP, proteína S-100, y PKCg se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Missler et al. (1997) Stroke, 28:1956-1960; Shashoua et al. (1984) J. Neurochem., 42:1536-1541; y U.S. Patent No. 6,268,223). Ensayos para medir una reducción en los niveles de suero de ácidos grasos se pueden determinar por métodos bien conocidos en la técnica tal como los enseñados en U.S. Patent Nos. 4,071,413, 5,512,429, 5,449,607; y 4,369, 250.

[0077] Otros ensayos para determinar una reducción y/o prevención de los eventos fisiológicos que conducen o están asociados a neurodegeneración después de una lesión isquémica del Sistema Nervioso Central (SNC) se pueden dirigir hacia valoraciones clínicas de, por ejemplo, una reducción en la área de infarto, una mejora en el peso corporal, y mejoras en los resultados neurológicos. Tales ensayos clínicos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

[0078] Habiendo descrito ahora generalmente esta invención, la misma será mejor entendida por referencia a determinados ejemplos específicos que se incluyen aquí con fines de ilustración sólo, y no se destinan a limitar la invención, a menos que se especifique.

EXPERIMENTAL

Ejemplo 1: Efectos de la Progesterona en el Daño Necrótico y las Anomalías Conductuales provocadas por TCE

Métodos:

[0079] Ratas Sprague-Dawley macho (300 g) fueron alojadas individualmente en jaulas de alambre y sometidas a un ciclo inverso de luz-oscuridad (0800 - 2000 h). Los animales se asignaron a uno de cuatro grupos: (1) lesión (n=7); (2) lesión + 3 días de progesterona (LP3 n=7); (3) lesión + 5 días de progesterona (LP5 n=7); y (4) placebo (n=8). Todos los procedimientos que implicaban animales estaban conformes a las pautas que se describen en la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (U.S. Department of Health and Human Services, Pub no. 85-23, 1985) y fueron aprobadas por el Emory University Institutional Animal Care and Use Committee.

[0080] Las contusiones bilaterales del córtex prefrontal medial fueron creadas por un dispositivo neumático impactador tal y como se describe anteriormente [40]. Brevemente, las ratas fueron anestesiadas con ketamina/xilazina (90 mg/kg;10 mg/kg) y colocadas en un equipo estereotáxico. Una craniectomía (diámetro 6 mm) fue realizada sobre la línea media del córtex prefrontal con su centro a 1.5 mm AP del bregma. Después de la eliminación del hueso, la punta del impactador (diámetro 5 mm) fue movido a +3.0 mm AP; 1.0 mm ML (del bregma), y controlado para un espaciado adecuado. El traumatismo fue producido por activación neumática del pistón para impactar a -2.0 mm DV (de dura) a

una velocidad de 3 m/s con un tiempo de contacto con el cerebro de 0.5 segundos.

[0081] La progesterona fue disuelta en aceite de cacahuete (Sigma; 4mg/kg) y se dieron inyecciones a 1 y 6 horas post-lesión y luego una vez al día durante bien 3 o 5 días consecutivos. Los animales de control recibieron inyecciones de vehículo a puntos de tiempo similares. Los animales fueron codificados con respecto a la cirugía y el tratamiento para prevenir el sesgo durante análisis conductual y examen histológico.

[0082] Veintiún días después de la cirugía, los animales fueron perfundidos con 100 ml de una solución salina tamponada con fosfato 0,1 M (PBS; pH 7,4) seguidos de 400 ml al 4% de paraformaldehído en tampón fosfato 0,1 M (PB; pH 7,4). Después de una crioprotección en sacarosa al 30%, secciones coronales de 40 μm de espesor se cortaron en un microtomo de congelación, inmediatamente se montaron en láminas recubiertas de gel y se aplicó una tinción de Nissl con tionina para determinar la localización y extensión de la lesión.

[0083] Las mediciones de área media del tamaño de la lesión fueron cuantificadas a partir de secciones a 15 niveles en la dirección caudal-rostral distanciados por 300 μm de separación. El perímetro de la cavidad necrótica (incluyendo la penumbra deteriorada) fue trazado en imágenes digitalizadas utilizando el software de Jandel Scientific SigmaScan calibrado para calcular el área en mm^2 para cada nivel trazado. Los perímetros del cuerpo estriado y los ventrículos laterales fueron también trazados y las áreas medias fueron cuantificadas a partir de 7 niveles en la dirección caudal-rostral (separados por 300 μm).

[0084] El recuento celular se hizo en un microscopio Olympus BH-2 equipado con una rejilla micrométrica para el ocular (área de muestra = 40 μm^2 a X400 aumentos). El recuento celular bilateral de neuronas teñidas con la técnica de Nissl se hizo en 3 secciones separadas en cada una de las siguientes áreas: (1) STR (+1.8 a +1.2 mm AP), (2) GP (-0.3 a -1.2 mm AP), (3) DMN (-2.3 a -2.9 mm AP), y (4) VMN (-2.3 a -2.9 mm AP). Sólo las células con núcleos neuronales y membranas intactas se contaron como neuronas.

[0085] Individuos del experimento que no respondieron a las condiciones del tratamiento del estudio condujeron todos los análisis conductuales e histológicos. Todos los datos se evaluaron en cuanto a normalidad y varianza homogénea antes de ser analizados por análisis paramétrico de la varianza (ANOVA). Los resultados de MWM se analizaron usando análisis de varianza (ANOVA) factoriales mixtos (4 grupos x 5 días) separados en cada uno de los dos periodos de análisis de 5 días (adquisición y retención respectivamente). Los resultados de la tarea BSN fueron analizados usando el ANOVA factorial mixto (4 grupos X 2 ensayos de post-lesión). Las comparaciones histológicas en los registros de densitometría media, mediciones de área, y recuentos celulares se hicieron utilizando un ANOVA unidireccional. Todas las comparaciones entre grupos se hicieron utilizando múltiples pruebas Tukey post-hoc ($p < .05$) cuando el ANOVA total fue significativo ($p < .05$) entre grupos. Los coeficientes de Pearson r fueron calculados para determinar si podrían ser detectadas correlaciones significativas entre parámetros histológicos (p. ej., tamaño de lesión y densidad celular) y parámetros conductuales (p. ej., adquisición y retención de la tarea MWM y medidas de negligencia sensorial).

[0086] Empezando una semana después de la cirugía, la capacidad de aprendizaje espacial fue evaluada con la tarea del laberinto de agua de Morris (MWM) descrita previamente. Cada animal fue evaluado durante un total de 10 días en dos bloques de pruebas de 5 días (adquisición y retención respectivamente). Los animales fueron colocados en la piscina (dirigiendo la nariz a la pared de la piscina) en una de las cuatro posiciones de inicio determinadas de forma aleatoria (por ejemplo: N, S, E, O). Se permitió que cada rata nadara libremente en la piscina hasta que encontrara la plataforma oculta o hasta que transcurrieran 90 segundos. Si un animal no encontraba la plataforma en 90 segundos, se le guiaba manualmente hasta ésta. Una vez en la plataforma, se permitió que los animales descansaran durante 10 segundos y luego se sacaron de la piscina y se colocaron cerca de una lámpara calorífica para adquirir tibieza. Cada rata se sometió a dos ensayos al día con un intervalo entre pruebas (ITI) de 20 segundos. Las medidas dependientes para esta tarea fueron la latencia para encontrar la plataforma oculta y la estrategia de nado (p. ej., porcentaje de tiempo consumido en el interior vs. anillos externos). Las medidas de velocidad de nado fueron registradas diariamente para delinear disfunciones motoras a partir de deficiencias de aprendizaje.

[0087] Las medidas de capacidades atencionales, utilizando una tarea de una deficiencia sensorial bilateral (BSN), fueron registradas un día antes de la cirugía (línea base) y en los días postoperatorios 6 y 20. Pares de papeles de adhesivo circular (2 cm día) fueron unidos a las áreas distal-radiales de cada pata y las latencias de las ratas para eliminar los estímulos fueron registrados. Cada rata fue sometida a cuatro ensayos (2-min ITI) por periodo de análisis con una longitud máxima de prueba de 2 minutos. Si las ratas no eliminaban los discos adhesivos en el tiempo estándar, un estado latente total de 2 minutos fue registrado para esta prueba.

Resultados:

[0088] Histología. En la mayoría de animales, el tejido necrótico estaba principalmente restringido al córtex prefrontal medial y cingulado. No obstante, en algunos casos, el daño de tejido más severo se extendió al corpus callosum y los aspectos más dorsales del tabique medial y el cuerpo estriado (datos no mostrados). Un efecto principal significativo en la formación de la cavidad necrótica fue observado entre los tres grupos deteriorados, ($F_2 .19 = 3.57, P < .05$). El análisis Tukey post-hoc revela una reducción dependiente de la dosis en la formación de la cavidad necrótica. Datos no mostrados. Sobre todo, todos los animales a los que se dio progesterona tendieron a tener lesiones más pequeñas en

comparación con los animales dañados a los que se dio inyecciones de vehículo. No obstante, sólo 5 días de progesterona tienen como resultado reducciones significativas en la formación de la cavidad necrótica total ($P < .05$). Se observa también una ampliación de los ventrículos laterales en todos los grupos dañados en comparación con los animales de control ($F3 .25 = 5.28$, $P < .01$) pero la progesterona no ha tenido ningún efecto en esta medida. Datos no mostrados. Ningunas diferencias entre grupos se muestran en las medidas de área estriada media.

[0089] El ANOVA unidireccional reveló un efecto principal de la densidad celular media entre grupos en el recuento tomado en STR ($F3 .25 = 15.58$, $P < .01$), GP ($F3 .25 = 4.47$, $P < .01$), DMN ($F3 .25 = 5.37$, $P < .01$), y VMN ($F3 .25 = 8.68$, $P < .01$). Los resultados de las pruebas Tukey post hoc mostraron que ambos tratamientos LP3 y LP5 tenían como resultado una reducción significativa de pérdida neuronal inducida por la lesión en todas las regiones cerebrales examinadas. No obstante, 5 días de progesterona fueron más eficaces que 3 días de atenuación de la pérdida neuronal en el VMN, el área más distal de la penumbra dañada. Datos no mostrados.

[0090] Análisis conductual. En la tarea MWM, todos los grupos dañados mostraron déficits en el rendimiento de aprendizaje espacial en comparación con los animales de control durante la fase inicial de adquisición de 5 días ($F3 .25 = 19.45$, $P < .01$). No obstante, las pruebas Tukey post hoc han detectado una mejora en el rendimiento de aprendizaje espacial en los animales LP5, pero no LP3, durante el segundo bloque de pruebas de 5 días ($F3 .25 = 6.76$, $P < .01$). Datos no mostrados.

[0091] El ANOVA reveló un efecto principal significativo en los modelos de nado durante la adquisición ($F3 .25 = 28.23$, $P < .01$) y la retención ($F3 .25 = 12.25$, $P < .01$) de la tarea MWM. Datos no mostrados. Todos los animales dañados mostraron patrones de nado tigmotáxico prolongado (avanzar en contacto con la pared) durante el primer bloque de 5 días prueba MWM. Pero se observó una reducción del comportamiento tigmotáxico en los animales tratados con LP5 en los últimos 2 días de la segunda fase de análisis de MWM ($P > .05$ en comparación con los controles) que se corresponde con la reducción en el estado latente para encontrar la plataforma observada en este grupo. No había ninguna diferencia entre grupos en las medidas de velocidad de nado en cualquier día del análisis.

[0092] No había ninguna diferencia entre grupos en las medidas de línea base de déficit sensorial registradas un día antes de la cirugía. Un efecto principal significativo entre grupos ($F3 .25 = 6.17$, $P < .01$) fue observado en los resultados de la tarea BSN después de una contusión cortical controlada al córtex prefrontal medial. El análisis Tukey post hoc mostró que sólo los animales tratados LP3 fueron perjudicados en esta tarea en comparación con los animales de control tanto a 6 como a 20 días post-lesión (datos no mostrados).

[0093] También detectamos correlaciones significativas entre las medidas histológicas y el rendimiento en la tarea MWM. Específicamente, hubo una correlación positiva entre la formación de la cavidad necrótica y la mejora del rendimiento MWM durante el segundo bloque de prueba de 5 días, sugiriendo que lesiones pequeñas tienen como resultado una mejora en la retención de esta tarea ($r21 = +.44$, $P < .05$). De forma similar, observamos una correlación negativa entre la densidad celular y el rendimiento de aprendizaje espacial durante la segunda fase de análisis MWM ($r21 = -.50$, $P < .05$) que indica que el mantenimiento de los niveles neuronales mediado por progesterona permite una recuperación funcional superior (datos no mostrados). Finalmente, no se observa ninguna correlación significativa entre el tamaño de lesión o densidad celular y las medidas de negligencia sensorial.

Resumen:

[0094] La reducción de la formación de cavidad necrótica inducida por la lesión proporciona evidencias de que una intervención post-lesión con neuroesteroides puede reducir el volumen de la lesión después de TCE en este modelo animal. En el presente estudio, se observa una reducción dependiente de la dosis en la formación de la cavidad necrótica en los animales tratados con progesterona. Específicamente, mientras las cavidades necróticas en los cerebros de los animales tratados con progesterona sólo 3 días (LP3) tendían a ser más pequeñas que en los cerebros de animales dañados, sólo el régimen de tratamiento de 5 días (LP5) tuvo como resultado lesiones significativamente más pequeñas. Nuestro estudio proporciona ahora la primera evidencia de que la progesterona también puede atenuar la pérdida de tejido inducida por TCE.

[0095] En nuestro estudio, la progesterona también protege contra la pérdida secundaria de células en las regiones cerebrales tanto proximales (por ejemplo; STR) como distales (p. ej., GP, DMN, y VMN) a la zona de la lesión. De manera interesante, en el presente estudio, tanto 3 como 5 días de tratamiento con progesterona redujeron la pérdida neuronal en STR, GP, y DMN, pero sólo los tratamientos LP5 produjeron reducciones significativas en la pérdida celular de VMN en comparación con los controles no tratados.

[0096] Y finalmente, en el presente estudio, todos los grupos dañados se vieron perjudicados en la fase de adquisición del análisis MWM. Los animales LP5 mostraron una clara mejoría, sin embargo sin controlar niveles, en el rendimiento espacial durante la fase de retención de esta tarea. Se encontraron correlaciones significativas entre los parámetros neuropatológicos (p. ej., formación de cavidad necrótica y mantenimiento de los niveles neuronales) y el rendimiento MWM que demuestran que las reducciones de muerte celular de tamaño de lesión mediadas por progesterona tienen como resultado reducciones concomitantes en el estado latente para encontrar la plataforma.

Ejemplo 2: Curvas de Respuesta a la Dosis Para la Recuperación Conductual Después de TCE Frente a la Administración de Progesterona en un Vehículo de Ciclodextrina*Métodos:*

[0097] La cirugía para inducir un traumatismo craneoencefálico fue realizada como se describe en el ejemplo 1. El análisis de comportamiento utilizando el laberinto de agua de Morris fue realizado como se describe en el ejemplo 1 y se llevaron a cabo los métodos para la táctica de eliminación de adhesivo.

Resultados:

[0098] Las figuras 1A y 1B demuestran que dosis bajas y moderadas de progesterona (8 mg/kg y 16 mg/kg en un vehículo conteniendo ciclodextrina) producen mejoras consistentes en el rendimiento en el laberinto de agua de Morris, mientras que dosis altas de progesterona (32 mg/kg en un vehículo con ciclodextrina) no han mostrado ningún efecto beneficioso.

[0099] La tarea de eliminación de adhesivos es una prueba para el déficit sensorial que es un déficit primario en lesiones frontales. En esta tarea todas las dosis producen inicialmente una recuperación conductual, no obstante, el grupo que recibió la dosis alta de progesterona degradó a niveles de control de lesión y la dosis moderada, que estaba inicialmente a niveles de control de lesión mejoró a los niveles de placebo el día 21 post-lesión. Véase Figura 2.

Ejemplo 3: Retirada Gradual de la Progesterona Realza la Recuperación Después de un Traumatismo Craneoencefálico.*Métodos:*

[0100] Ratas Sprague-Dawley macho recibieron o bien una lesión de córtex frontal medial o bien una cirugía placebo. Se dieron inyecciones a 1 y 6 horas post-lesión, y cada 24 horas durante 7 días. En los grupos de tratamiento (n=8) se incluyen dañados (I) placebo (S) tratamientos de retirada drástica (AW), retirada gradual (TW) y tratamiento con vehículo (V). Las inyecciones TW se dividieron progresivamente a la mitad en los dos tratamientos finales. El análisis conductual fue conducido post-cirugía, en medio del proceso de retirada y post-retirada. Se utilizaron cajas de actividades para investigar los movimientos verticales y para la exploración. El déficit sensorial y los comportamientos de ansiedad fueron también analizados. El cerebro fue cosechado a 8 días o 3 semanas post-lesión. Las secciones de tejido perfundido fueron analizadas en cuanto a volumen de lesión y respuesta inmunohistoquímica. El tejido cerebral fresco fue congelado rápidamente en 2-metilbutano enfriado, y luego homogeneizado para el análisis de Western blot.

Resultados:

[0101] La retirada aguda y la lesión (AWI) interactuaron para aumentar la ansiedad, los déficits locomotores y sensoriales en comparación con la retirada gradual de la progesterona (TWI). Adicionalmente, los placebos de retiradas agudas (AWS) aumentaron el deterioro motor en comparación con todos los otros placebos, y aumentó la ansiedad en comparación con ratas de progesterona disminuida gradualmente. Los factores neuroprotectores BDNF y HSP70 aumentaron para TWI por encima de AWI por encima de VI a 3 semanas post-lesión. Este efecto beneficioso del tratamiento por disminución gradual de la hormona se correlaciona con la reconstrucción de la lesión y con la tinción GFAP; los animales TWI presentan el volumen de lesión más pequeño y el menor número de astrocitos reactivos, seguidos de AWI, mientras que VI presenta el volumen de lesión más grande y los astrocitos más reactivos. La apoptosis y la inflamación se disminuyeron con TW, como se demuestra por p53, caspasa activa 3, TNF α y NF κ B.

Conclusión:

[0102] La PW aguda tiene un efecto constrictivo tanto en el comportamiento como en la recuperación de tejido después un traumatismo craneoencefálico. En el valor máximo de retirada, los animales que experimentan síndrome de abstinencia de progesterona muestran un aumento de ansiedad, déficits sensoriales, y déficits locomotores; todos estos se ven agravados por la lesión. Una semana más tarde, el aumento de los deterioros conductuales es todavía evidente en los animales AWI. El análisis Western blotting ha revelado una disminución en la expresión de proteínas inflamatorias y apoptóticas con retirada gradual, aunque todos los tratamientos de progesterona condujeron a mejores resultados en comparación con los controles de sólo-vehículo. A 3 semanas post-lesión, el efecto compuesto de las lesiones y la retirada aguda de progesterona continuó causando déficits conductuales por encima de aquellos animales con una reducción gradual en el tratamiento de progesterona. Estas conclusiones se pueden tomar para sugerir que en los análisis clínicos, la retirada gradual de la progesterona será más beneficiosa para la reparación de sistema nervioso central (SNC) que una terminación brusca del tratamiento al final del régimen de dosificación.

Ejemplo 4: La Retirada Gradual de Progesterona Promueve la Recuperación a Largo plazo Después de un Traumatismo Craneoencefálico

[0103] Habiendo demostrado que después de TCE, la AW causa un aumento en los comportamientos de ansiedad e inflamación cerebro-celular en comparación con TW (véase ejemplo 3), este estudio investigó los efectos celulares y

conductuales de AW dos semanas después de la terminación de los tratamientos para determinar la influencia a más largo plazo de la retirada después de la lesión.

[0104] Como se ha descrito anteriormente, el tratamiento con progesterona después de un traumatismo craneoencefálico y derrame cerebral reduce los efectos de las lesiones secundarias y la necrosis (Asbury et al. (1998) Behav. Brain Res., 97:99-106; Attella et al. (1987) Behav. Neural Biol., 48:352-367; Chen et al. (1999) J. Neurol. Sci., 171:24-30; Galani et al. (2001) Restor. Neurol. Neurosci., 18:161-166; Gibson et al. (2005) Exp. Neurol., 193:522-530; Gibson and Murphy (2004) J. Cereb. Blood Flow Metab., 24:805-813; Grossman et al. (2004) Brain Res., 1008:29-39; Kumon et al. (2000) J. Neurosurg., 92:848-852; Roof et al. (1994) Exp. Neurol., 129:64-69; Roof et al. (1994) "Progesterone Reduces BBB Damage Following Bilateral, Medial Frontal Contusion," in Twenty first Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Miami Beach, FL, p. 191; Roof et al. (1997) Mol. Chem. Neuropathol., 31:1-11; Shear et al. (2002) Exp. Neurol., 178:59-67; Vink and Van Den Heuvel (2004) Expert Opin. Investig. Drugs, 13 :1263-1274). La AW, no obstante, produce un aumento en la apoptosis, inflamación y comportamientos de ansiedad durante la fase aguda de recuperación después del TCE en comparación con TW (Cutler et al. (2005) Exp. Neurol., 195(2):423-429). Todos los animales a los que se ha administrado progesterona, independientemente de su régimen de tratamiento, mostraron mejoras por encima de los animales tratados con vehículo, pero aquellos animales con TW tuvieron una mejor recuperación como se evidencia por una menor inflamación, apoptosis y ansiedad funcional. La AW causa ansiedad, depresión, y mayor susceptibilidad de crisis debido a una reducción repentina en las interacciones GABA-A con la alopregnanolona, un metabolito de progesterona (Foldvary-Schaefer et al. (2004) Cleve. Clin. J. Med, 71: S11-18; Gulinello et al. (2003) Eur. J. Neurosci., 17:641-648; Kulkarni y Reddy (1995) Drugs Today, 31:433-455; Rupprecht (2003) Psychoneuroendocrinology, 28:139-168; Smith (2002) Steroids, 67:519-528). El aumento resultante en la activación NMDA conduce a un entorno neuronal de excitación (Lukasiuk and Pitkanen (2000) J. Neurochem., 74:2445-2454; Van Den Polet al. (1996) Neuroscience, 74:653-674). Bajo el estrés adicionado por el traumatismo, este efecto se amplifica a un aumento de la excitotoxicidad. Con la retirada gradual, esta excitotoxicidad, lesión secundaria e inflamación no se ven agravadas.

[0105] En este estudio, los efectos de la AW en la recuperación funcional medidos a las tres semanas post-TCE fueron estudiados. Para el seguimiento en el hallazgo de que la caspasa-3, una proteína clave en la apoptosis (Budihardjo et al. (1999) Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 15: 269-290), se aumenta en el momento de la retirada, la regulación creciente o decreciente del número de un marcador de apoptosis a largo plazo, p53, fue medido (Harris y Levine (2005) Oncogen 24:2899-2908). La proteína p53 altera la permeabilidad de membranas mitocondriales, permitiendo la liberación del citocromo C, que induce la activación de proteasas apoptóticas, incluyendo la caspasa-3 (Mattson (2003) Neuromolecular Med 3:65-94). También, para determinar si la neuroprotección se mejora por TW, se midieron HSP70 y BDNF, al igual que el tamaño de la cavidad de la lesión necrótica y la gliosis reactiva. Tanto BDNF como HSP70 actúan para promover la plasticidad sináptica y la liberación de factores tróficos (Binder y Scharfman (2004) Growth Factors 22:123-131; Feinstein et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:17724-17732), mientras que una reducción en el tamaño de la lesión necrótica indica protección y mantenimiento de los niveles de células neuronales. Además, estudios anteriores han mostrado que la progesterona juega un papel en la reducción de los astrocitos reactivos asociados a edema cerebral e inflamación (Djebaili et al. (2005) J. Neurotrauma 22:106-118); este beneficio también se puede mejorar con la retirada gradual.

[0106] Dados los efectos extendidos de la retirada drástica previamente notados en el valor máximo de la retirada, se predijo que estos efectos se manifestarían ellos mismos en el análisis conductual a largo plazo después de que la cascada inicial de la lesión secundaria haya bajado. Por consiguiente, la actividad locomotora y la déficit somatosensorial fueron evaluadas para grupos de sujetos que experimentan TW frente a AW, de una a tres semanas después de la lesión.

Materiales y métodos:

[0107] Sujetos. En este experimento se utilizaron 60 ratas Sprague-Dawley macho pesando 290-310 g en el momento de la lesión. Se proporcionó alimento y agua ad libitum antes y después de la cirugía. Los animales fueron manejados y pesados diariamente desde su llegada, siete días pre-cirugía para la extracción del cerebro, tres semanas post-cirugía. Los animales fueron manejados en grupos de 12, con n=10 como condición experimental. Todos los procedimientos animales fueron aprobados por el Emory University Animal Care and Use Committee, Protocol #131-2002.

[0108] Cirugía. Se indujo anestesia de isofluorano durante cuatro minutos y 45 segundos al 5% y mantenida al 2.5%. La temperatura corporal normal fue mantenida con una almohadilla eléctrica quirúrgica colocada bajo los vendajes estériles. El área de incisión del cuero cabelludo fue afeitada y esterilizada con yodo e isopropanol. Una incisión en la línea media del cuero cabelludo fue hecha y la aponeurosis se esclareció para exponer la superficie del cráneo. La coordenadas estereotáxicas medial lateral, y dorsales fueron determinadas respecto al bregma, y una craneotomía bilateral de 5-7 mm diámetro fue realizada en el plano medio-sagital, 3 mm anterior a bregma. Una lesión en el córtex frontal medial (MFC) se creó con un dispositivo de contusión cortical neumática (5 mm de diámetro) a una presión de 1.7 psi, sobre 50 ms con una velocidad de 2.25 m/s y a una profundidad de 2.5 mm. Se utilizaron suturas para cerrar la incisión después de que el sangrado cesara. Los animales se colocaron en jaulas de recuperación individuales, con calefacción, limpias hasta que despertaron, y fueron devueltos a jaulas hogar individuales, limpias con gránulos de alimento humedecido accesibles. Los animales de placebo fueron anestesiados, y una incisión fue hecha en el punto

más alto de la cabeza. La aponeurosis fue esclarecida para exponer el bregma, luego la incisión fue cerrada por suturación. Las cirugías placebo se hicieron corresponder con las cirugías de lesión para todas las condiciones experimentales.

5 [0109] Tratamiento de progesterona. Animales de placebo (S) y de lesión (L) fueron asignados de forma aleatoria a uno de los tres grupos de tratamiento: vehículo (VS; VL), retirada aguda (AWS; AWL), y retirada gradual (TWS, TWL). Dieciséis tratamientos de progesterona mg/kg fueron disueltos en 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina (HBC) al 22.5% y administrados como se muestra en tabla 2. La disminución gradual fue inducida como dosificaciones divididas sobre los
10 últimos dos días de tratamiento. Las diluciones para los tratamientos TW se hicieron con stock de HBC. Todas las inyecciones fueron administradas intraperitonealmente a una hora post-lesión, y subcutáneamente a las seis horas post-lesión y cada 24 horas a hasta el final del ciclo de tratamiento. Cinco grupos de 12 animales cada uno fueron usados, para un total n=10 para cada grupo experimental durante el experimento entero. De estos animales, todos fueron usados para adquirir datos conductuales, cuatro muestras fueron usadas para análisis de proteína, y seis muestras fueron usadas para análisis histológicos para cada condición de prueba.

15

Tabla 2. Horario de Tratamiento de Progesterona Post-Cirugía

Administración de Progesterona			
	Días 1-5	Día 6	Día 7
AW	16 mg/kg P	16 mg/kg P	16 mg/kg P
TW	16 mg/kg P	8 mg/kg P	4 mg/kg P
V	22. 5% HBC	22. 5% HBC	22. 5% HBC

20 [0110] Cajas de Actividad Locomotora Digiscan. En orden aleatorio, el ensayo ciego tiene lugar bajo luz roja en un entorno tranquilo un día antes de la lesión, y uno y siete días post-retirada. Hasta cuatro animales fueron evaluados usando el sistema de monitorización de actividad de Digiscan (AccuScan Instruments, Inc. Columbus, OH) en cada prueba, con un total de tres ensayos por día de prueba. Las ratas se colocaron en el rincón izquierdo más lejano de la caja de actividad de Digiscan. Entonces, el interruptor de palanca se tiró a 'on'. A exactamente cinco minutos el ordenador cesó las medidas, asegurando que todas las pruebas fueran de igual longitud independientemente de la hora
25 de comienzo. Los ficheros se guardaron según fecha y número de prueba, y el número de boli fecal registrado. Las cajas de actividad se limpiaron entre ensayos con etanol al 70% y se secaron. El tiempo central fue definido por el ordenador como la cantidad de tiempo que el animal empleó explorando la caja de actividades lejos de las esquinas.

30 [0111] Déficit Somatosensorial de las patas. En orden aleatorio, el ensayo ciego tiene lugar bajo luz roja en un entorno tranquilo un día antes de la lesión, y uno y siete días post-retirada, una hora después del análisis de actividad locomotora. Etiquetas circulares de 1.3 cm de diámetro fueron colocadas en la pata izquierda y la rata se colocó en la caja de análisis de plexiglás transparente. Se registró el estado latente requerido para que cada rata eliminara el adhesivo con su boca, con una duración máxima de la prueba de dos minutos. Cada animal se evaluó tres veces, con un periodo de descanso de dos minutos entre ensayos. La caja de análisis se limpió entre ensayos con etanol al 70% y se secó.
35

[0112] Preparación del Tejido. Todos los animales fueron decapitados después de una inyección letal de 1 mL de Nembutal a tres semanas post-lesión. Los cerebros para el análisis histológico fueron extraídos después de una perfusión transcardial con paraformaldehído al 4%. Después 24 horas de post-fijación en paraformaldehído al 4% , seguida de sacarosa al 10% y luego una solución de sacarosa al 20% en agua DI, los cerebros fueron montados y congelados bajo hielo seco. El cerebro anterior se cortó en secciones de 25 μ m en un criostato y almacenado a -80°C en láminas recubiertas por un 1% de gelatina. Secciones igualmente distanciadas por espacios de 75 μ m fueron lavadas en una serie alcohólica graduada, alcohol al 100% y 95% (2 x 5 min cada una) y alcohol al 70% (1 x 5 min) y teñidas con tionina (1g tionina, 1.2 g acetato sódico, 0.4 mL de ácido acético glacial en 300 mL H₂O DI) para la reconstrucción de la lesión. Las secciones teñidas con tionina entre 4.2 - 2.2 mm anteriores al bregma fueron identificadas y analizadas en cuanto al área de lesión utilizando Software Kodak ID. El área total del cerebro fue determinada por normalización respecto al volumen de las secciones del cerebro de placebo.
40
45

[0113] Los cerebros para el análisis de proteínas fueron seccionados en la área inmediata de la lesión y congelados instantáneamente en 2-metilbutano enfriado en hielo seco. Las muestras se almacenaron a -80°C. Las secciones cerebrales se pesaron para asegurar la consistencia y se homogeneizaron en un vidrio tipo Dounce en 800 mL de tampón de homogeneización Tper (78510, Pierce, Rockford, IL) con 10 μ l/ml de cóctel inhibidor de proteasa (P8340, Sigma, St. Luis, MO). Las muestras de tejido homogeneizado fueron almacenadas a -20°C. Los ensayos de proteína Coomassie y BCA (23235, Pierce) fueron realizados por triplicado a tres diluciones en cada muestra para determinar la concentración de proteína. La cantidad de cerebro homogeneizado necesaria para estandarizar las muestras a 2 μ g/ μ L para el análisis Western blotting fue calculada a partir de los resultados de estos ensayos.
50
55

[0114] Inmunohistoquímica. Las secciones usadas para la tinción inmunofluorescente de GFAP fueron lavadas en PBS, luego incubadas en un 0.2% de TritonX en PBS durante 5-10 minutos y lavadas otra vez. Las secciones fueron luego incubadas en albúmina de suero bovino (BSA) al 1.0% en PBS durante 30 minutos, y se dejaron durante toda la noche a
60

4°C bajo GFAP 1:2000 (MAB3402 Chemicon) en 1% de BSA. Después de un lavado en PBS y una incubación de diez minutos en BSA al 1%, las secciones fueron incubadas en una solución 1:1000 del anticuerpo secundario de ratón conjugado con AlexaFluor 594 (A21125, Invitrogen, Carlsbad, CA) en BSA al 1% durante toda la noche a 4°C. Las láminas fueron cubiertas con un cubre objetos usando Vectashield Mounting Medium (H-1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA). Las láminas fueron procesadas a 40x de ampliación con un microscopio Nikon Olympus equipado con epifluorescencia. Antes de adquirir y analizar imágenes, el microscopio fue calibrado a 1 µm. Cuatro áreas separadas directamente adyacentes al área de la lesión fueron analizadas por sección. La luminosidad fue cuantificada para n=6 por grupo de tratamiento con adobe Photoshop v. 6.0. Para cada imagen de 144k+ píxels, se determina el valor y se calcula el promedio por píxel sobre el total.

[0115] Análisis Western blotting. El tampón reductor de muestra se preparó como Tris 0.625 M, 10% glicerol, 2% SDS, 5% β-mercaptoetanol y 0.001% bromofenol azul. Las muestras se establecieron en una concentración de proteína de 2 µg/µl. Las muestras preparadas fueron sometidas a un 4-20% de geles de gradiente TrisHCL (345-0033, Biorad, Hercules, CA), y mantenidas a 200 mV durante aproximadamente una hora. Las proteínas se transfirieron luego a membranas PVDF en el módulo de transferencia Criterion Western (165-6001 BioRad), bloqueadas durante varias horas en el diluyente de proteína de la leche (50-82-00, KPL, Gaithersburg, MD) y luego incubadas en anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C, incluyendo p53 (SC-1312, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) BDNF (AB1534, Chemicon, Temecula, CA) y HSP70 (33-3800, Zymed, Carlsbad, CA). Anticuerpos secundarios conjugados con HRP (4-18-18,14-13-06 KPL) fueron aplicados los siguientes días durante 2 horas y agitados a temperatura ambiente. Se desarrollaron manchas con el sustrato SuperSignal West Dura (34076, Pierce) usando un escáner de Kodak y software Kodak 1D para el análisis de densitometría. Los controles de carga se realizaron con constitutivos β-actina.

[0116] Estadística. Todos los resultados se expresaron como la media más menos el error típico de la media. La significación estadística se fijó a p<0.05 para pruebas con dos colas, y los datos se analizaron utilizando análisis unidireccional de varianza (ANOVA) seguido de pruebas post hoc LSD. Los valores F se presentan como un prefacio de los análisis post hoc con todos grados de libertad para el análisis Western blotting a (5,18) y para el comportamiento a (5,26). Los resultados LSD se utilizaron para demostrar importancia.

Resultados

[0117] Ensayos Conductuales. Los datos de déficit somatosensorial se muestran a un día (Figura 3A) y una semana (Figura 3B) post-retirada. En ambos puntos temporales, TWS y VS no mostraron ninguna diferencia. A un día post-retirada, AWS mostraban deficiencias sensoriales elevadas en comparación con los grupos TWS y VS (*, p<0,05, F = 8,97), no obstante, a una semana post-retirada estas diferencias ya no fueron evidentes. A ambos puntos temporales, AWL y VL no mostraban diferencias, no obstante, ambas disminuyen de uno a siete días. TWL, no obstante, se mantuvo durante el curso del experimento, y las deficiencias disminuyeron en comparación con VL y AWL (#, p<0.05, F = 10.71,8.85) a ambos tiempos.

[0118] El tiempo central, determinado de las cajas de actividad locomotora Digiscan, siguió un modelo similar al visto en la progresión de la negligencia sensorial entre un día (Figura 4A) y siete días (Figura 4B) post-retirada. A un día, los animales AWS mostraron un tiempo central significativamente menor en comparación con otros placebos (*, p<0,05, F = 6,79); a siete días todos los animales placebo utilizaron un tiempo central equivalente. Los animales TWS aumentaron el tiempo central a un día en comparación con los animales VS (#, p<0.05, F = 10.13). Esto indicaba un efecto anxiogénico de la retirada de la progesterona más allá del valor máximo de retirada. A ambos puntos temporales, los animales TWL mostraron un aumento en el tiempo central sobre los animales AWL (**, p<0,05, F= 7,74, 5,33), que a su vez han aumentado el tiempo central en comparación con los animales de VL (##, p<0,05, F= 8,91, 10,77).

[0119] Análisis de Proteína. La figura 5 muestra p53, marcador de apoptosis a largo plazo. A dos semanas post-retirada, todos los animales tratados con progesterona mostraban niveles de p53 indistinguibles de los placebos de vehículo. Los animales VL, no obstante, tenían niveles de p53 significativamente más altos que todos los otros grupos (*, p<0,05, F = 8,67). HSP70, una proteína neuroprotectora, aumentó en animales TWL (*, p<0,05; F=26,94) sobre tanto VL como AWL (Figura 6). Los animales de placebo no han mostrado ninguna diferencia entre grupos de tratamiento.

[0120] La figura 7 demuestra un aumento en los niveles BDNF en TWL sobre AWL (*, p<0,05; F=6,88) y AWL sobre VL (#, p<0,05, F=6,57). Los animales placebo no han mostrado ninguna diferencia entre grupos de tratamiento. Junto con los datos HSP70, esto indica que las propiedades neuroprotectoras de la progesterona se mejoran con un régimen de tratamiento de administración decreciente.

[0121] Histología. La reconstrucción de la lesión se realizó a +2.2; +3.2, y +4.2 mm del bregma. La proporción del volumen de lesión respecto al volumen total fue determinada para un n=4 para cada profundidad. La figura 8A muestra imágenes representativas de las secciones seleccionadas anteriores al bregma, y los datos cuantificados para cada grupo de lesión se muestran en la Figura 8B. Los cerebros TWL tienen un volumen de lesión más pequeño que los animales AWL y VL (*, #, p<0,05, F = 7,32), mientras que el volumen de lesión de AWL disminuyó en comparación con los animales VL (*, p<0,05, F = 4,55).

[0122] La figura 9 muestra relativos astrocitos reactivos determinados por tinción inmunofluorescente de GFAP a tres semanas post-lesión. La figura 9A muestra vistas representativas de cada grupo en el sitio de lesión o el tejido correspondiente en animales de placebo mientras que la figura 9B muestra la luminosidad cuantificada calculada según el promedio sobre n=6. GFAP fue regulado ascendentemente en animales VL (A) sobre animales AWL (B), y en AWL en comparación con animales TWL (C) (*, p<0,05, F= 16,24, 27,96). Los animales AWS (E) tuvieron un aumento en la reactividad GFAP sobre ambos grupos VS (D) y TWS (F) (#, p<0,05, F = 9.71). Los grupos TWS y VS no mostraron diferencias.

Discusión

[0123] Este estudio investigó los efectos de la retirada drástica de la progesterona tres semanas después de la lesión, y se encontraron repercusiones selectivas a largo plazo. Diferentes medidas de funciones conductuales, anatómicas, y moleculares a largo plazo fueron investigadas para indicar recuperación de actividad, respuesta celular y sensorial.

[0124] Para determinar respuestas conductuales a largo plazo a la retirada gradual de progesterona frente a la retirada drástica, se realizaron pruebas de actividad locomotora y de déficit somatosensorial. Los animales con una retirada gradual de progesterona actuaron mejor un día y una semana post-retirada tanto en la recuperación sensorial de función y en la actividad locomotora. Adicionalmente, a un día post-retirada, los animales operados de placebo que fueron sometidos a retiradas drásticas mostraron más diferencias en estos ensayos que los animales de retirada gradual o animales placebo de vehículo; este efecto desapareció una semana más tarde. Una observación interesante inmediatamente post-retirada fue un aumento en el tiempo consumido en el centro de la caja de actividades para placebos con retirada gradual sobre placebos de vehículo. Este comportamiento exploratorio aumentado se puede deber a un efecto excitatorio moderado de la retirada gradual, a diferencia del efecto excitotóxico y restrictivo más severo de la retirada aguda. Además, la excitación moderada puede mejorar además la recuperación de la función a largo plazo, como el ejercicio retardado después de un TCE mejora la recuperación de la función (Griesbach et al. (2004) Neuroscience, 125:129-139; Kleim et al. (2003) Neurochem. Res., 28:1757- 1769; Will et al. (2004) Prog. Neurobiol., 72:167-182).

[0125] Efectos selectivos de la PW drástica respecto a la gradual fueron también vistos en términos de análisis moleculares tres semanas después de la lesión. Mientras la apoptosis aumentó para la PW drástica en comparación con la gradual en el momento de la retirada (Cutler et al. (2005) Exp. Neurol., 195:423-429), este efecto ya no fue evidente dos semanas más tarde como se determina por niveles de proteína p53. Los animales tratados con el vehículo, no obstante, mantuvieron la apoptosis elevada en comparación con los tratamientos de progesterona.

[0126] Una mayor consecuencia a largo plazo de la retirada drástica fue observada en cuanto a la neuroprotección. BDNF y HSP 70, ambos indicadores de neuroprotección, aumentaron para la retirada gradual en comparación con la retirada drástica, mientras que todos los tratamientos de progesterona resultaron en un aumento de HSP70 en comparación con los animales tratados con vehículo. Específicamente, BDNF actúa para proteger el tejido de agresiones y permite la plasticidad neuronal post-traumática a través de varios mecanismos (Binder and Scharfman (2004) Growth Factors, 22:123-131; Chuang (2004) Crit. Rev.Neurobiol., 16:83-90; Gonzalez et al. (2004) Neuroscience, 125: 605-614), mientras que HSP 70 actúa como un agente neuroprotector suprimiendo respuestas inflamatorias y citotoxicidad (Feinstein et al. (1996) J Biol. Chem., 271:17724-17732). En conjunto, los presentes hallazgos moleculares y el volumen de la lesión necrótica disminuido para la retirada gradual sobre la retirada drástica de progesterona sobre el tratamiento de vehículo, muestran una imagen total de neuroprotección mejorada y neuroplasticidad con la administración decreciente de progesterona.

[0127] La tinción inmunofluorescente de GFAP indicó la extensión de la reactividad de los astrocitos adyacente al sitio de la lesión. Mientras que un aumento en GFAP puede ser una marca del aumento de factores tróficos, también indica cicatrización glial, inflamación, y edema cerebral (Hatten et al. (1991) Glia, 4:233-243; Leme and Chadi (2001) Arq. Neuropsiquiatr., 59:483-492). Según lo predicho, en el presente estudio se observó una respuesta aumentada para animales de lesión tratados con vehículo y una reacción GFAP disminuida para animales de lesión tratados con progesterona de retirada aguda. La respuesta GFAP disminuyó además para animales de lesión tratados con progesterona de forma decreciente.

[0128] Debería asimismo observarse que un aumento en la luminosidad de inmunofluorescencia de GFAP se encontró en el grupo de placebo de PW drástica. Sin estar ligado a la teoría, el mecanismo de respuesta de placebo se puede basar solamente en efectos originados de la PW drástica. Después de la retirada drástica de progesterona, un aumento en la acción de los receptores sigma y NMDA crea un entorno de excitación neuronal. El grado de esta excitación depende de diferentes factores, incluyendo la dosificación y duración de la administración (Rupprecht et al. (2001) Brain Res. Brain Res. Rev., 37:59-67; Rupprecht y Holsboer (2001) Int. Rev. Neurobiol. 46:461-477), y también puede estar compuesto por eventos externos tales como traumatismo. Por consiguiente, un efecto de recuperación de un entorno excitotóxico podría ser una liberación aumentada de factor trófico (Acarin et al. (1999) J. Neuropathol. Exp. Neurol., 58:389-397; Horvath et al. (2000) Eur. J. Pharmacol. 405:33-42), como se observa en los animales placebo de PW drástica.

[0129] Estos datos inmunohistológicos y moleculares combinados sostienen las conclusiones precedentes

anteriormente descritas (véase Experiment 3; Cutler et al. (2005) Exp. Neurol., et al. (2005) Exp. Neurol., 195(2):423-429), que muestran que mientras la progesterona puede ser un tratamiento terapéutico vital, sus efectos beneficiosos son mejorados reduciendo las complicaciones secundarias atribuibles a la PW drástica. Las implicaciones clínicas de estos hallazgos tienen potencial para diseñar una respuesta eficaz para los requisitos rehabilitativos inmediatos y a largo plazo después de un TCE. Para optimizar tratamiento y promover todos estadios de recuperación funcional, el presente estudio podría ser aplicado para abarcar la rehabilitación post-traumática, incluyendo los efectos del ejercicio y ambientes enriquecidos (Griesbach et al. (2004) Neuroscience, 125:129-139; Kempermann et al. (2000) Prog. Brain Res., 127:35-48; Will et al. (2004) Prog. Neurobiol., 72:167-182). También, mientras los adultos jóvenes son el mayor demográfico para TCE, tanto los pacientes mayores como los inmaduros contribuyen significativamente a la estadística TCE a través del síndrome del niño agitado, accidentes, y caídas (CDC; 2004) y también se pueden beneficiar de tales estrategias terapéuticas.

[0130] En conclusión, ambos índices a corto y largo plazo de recuperación se mejoran con tratamientos de administración decreciente de progesterona. Este conocimiento abre la puerta al diseño más eficaz, investigación, e implementación de un tratamiento clínico seguro y eficaz para TCE.

Resumen

[0131] Las ratas Sprague-Dawley adultas macho han recibido una contusión de córtex frontal bilateral (L) o una cirugía placebo (S). Las ratas recibieron inyecciones a una y seis horas post-lesión, luego cada 24 horas durante seis días. Las ratas tratadas con vehículo (V) recibieron 9 inyecciones de ciclodextrina al 22.5%, mientras que las ratas AW recibieron 9 inyecciones de 16 mg/kg progesterona y las ratas TW recibieron 7 inyecciones de 16 mg/kg de progesterona, seguidas de una a 8 mg/kg y una a 4 mg/kg. En el día 8, se iniciaron las pruebas de negligencia sensorial y de actividad de locomotora. Los animales se mataron 22 días post-TCE y los cerebros se prepararon para el análisis histológico o molecular. Los análisis Western blotting revelaron un aumento de BDNF y HSP 70 en animales TW vs. AW. p53 aumentó en los animales VL, mientras que todos los grupos tratados con progesterona fueron equivalentes a los placebos. Los animales TW presentaron un déficit sensorial marcadamente disminuido en comparación con los animales AW, y un mayor tiempo central en los ensayos de actividad locomotora. Además, la reconstrucción de la lesión reveló una disminución del tamaño de lesión para animales TWL sobre AWL sobre VL. La tinción inmunofluorescente de GFAP siguió también este patrón. En conclusión, después de TCE, AW afecta a comportamientos exclusivos y marcadores moleculares en el periodo de recuperación crónica.

[0132] Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en la especificación son indicativas del nivel de expertos en la técnica al que esta invención pertenece.

[0133] Aunque la invención anteriormente mencionada ha sido descrita en algo de detalle a modo de ilustración y ejemplificación con fines de claridad de comprensión, será obvio que determinados cambios y modificaciones pueden ser practicados.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Progestina o metabolito de progestina para el uso en el tratamiento o prevención del daño neuronal o neurodegeneración después de una lesión traumática o isquémica del sistema nervioso central (SNC), donde dicha progestina o metabolito de progestina se prepara para la administración a un sujeto, comprendiendo dicha administración un régimen de dosificación de administración decreciente antes de la terminación de la administración, donde la progestina o metabolito de progestina no es progesterona para el uso en el tratamiento de una lesión traumática del sistema nervioso central.
- 10 2. Progestina o metabolito de progestina según la reivindicación 1 para el uso en el tratamiento o prevención de la neurodegeneración después de una lesión traumática o isquémica del sistema nervioso central (SNC).
- 15 3. Progestina o metabolito de progestina según la reivindicación 1 o 2 para el uso en el tratamiento o prevención del daño neuronal o neurodegeneración después de una lesión traumática del sistema nervioso central (SNC).
- 20 4. Progestina o metabolito de progestina para el uso en el tratamiento de una lesión traumática o isquémica del SNC, comprendiendo dicho tratamiento la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de progestina a un sujeto con necesidad de la misma, donde antes de la terminación de la administración de progestina dicha administración comprende un régimen de dosificación de administración decreciente, donde la progestina no es progesterona para el uso en el tratamiento de una lesión traumática del sistema nervioso central.
- 25 5. Progestina o metabolito de progestina para el uso según la reivindicación 3 o 4, donde la lesión traumática del SNC es un traumatismo craneoencefálico.
- 30 6. Progestina o metabolito de progestina para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el régimen de dosificación de administración decreciente comprende una disminución lineal.
- 35 7. Progestina o metabolito de progestina para el uso según la reivindicación 6, donde la disminución lineal es una disminución lineal de 1% a 40%.
- 40 8. Progestina o metabolito de progestina para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde el régimen de dosificación de administración decreciente comprende una disminución exponencial.
- 45 9. Progestina o metabolito de progestina para el uso según la reivindicación 8, donde la disminución exponencial es una disminución exponencial de 1% a 40%.
- 50 10. Progestina o metabolito de progestina para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el periodo del régimen de dosificación de administración decreciente es de al menos 12 horas.
- 55 11. Progestina o metabolito de progestina para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el periodo del régimen de dosificación de administración decreciente no excede de 48 horas.
- 60 12. Progestina o metabolito de progestina para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la progestina es administrada parenteralmente, preferiblemente por vía intravenosa.
13. Progestina o metabolito de progestina para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la progestina es progesterona o alopregnanolona.
14. Progestina o metabolito de progestina para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la cantidad terapéuticamente efectiva de progestina administrada a dicho sujeto antes del régimen de dosificación de administración decreciente comprende un régimen de dosificación de progestina constante.
15. Progestina o metabolito de progestina para el uso según la reivindicación 14, donde el régimen de dosificación de progestina constante tiene una duración de 1 a 136 horas.
16. Progestina o metabolito de progestina para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la cantidad terapéuticamente eficaz de progestina administrada a dicho sujeto antes del régimen de dosificación de administración decreciente comprende un régimen de dosificación de progestina en dos niveles.
17. Progestina o metabolito de progestina para el uso según la reivindicación 16, donde el régimen de dosificación de progestina en dos niveles tiene una duración combinada de 12 horas a 7 días.

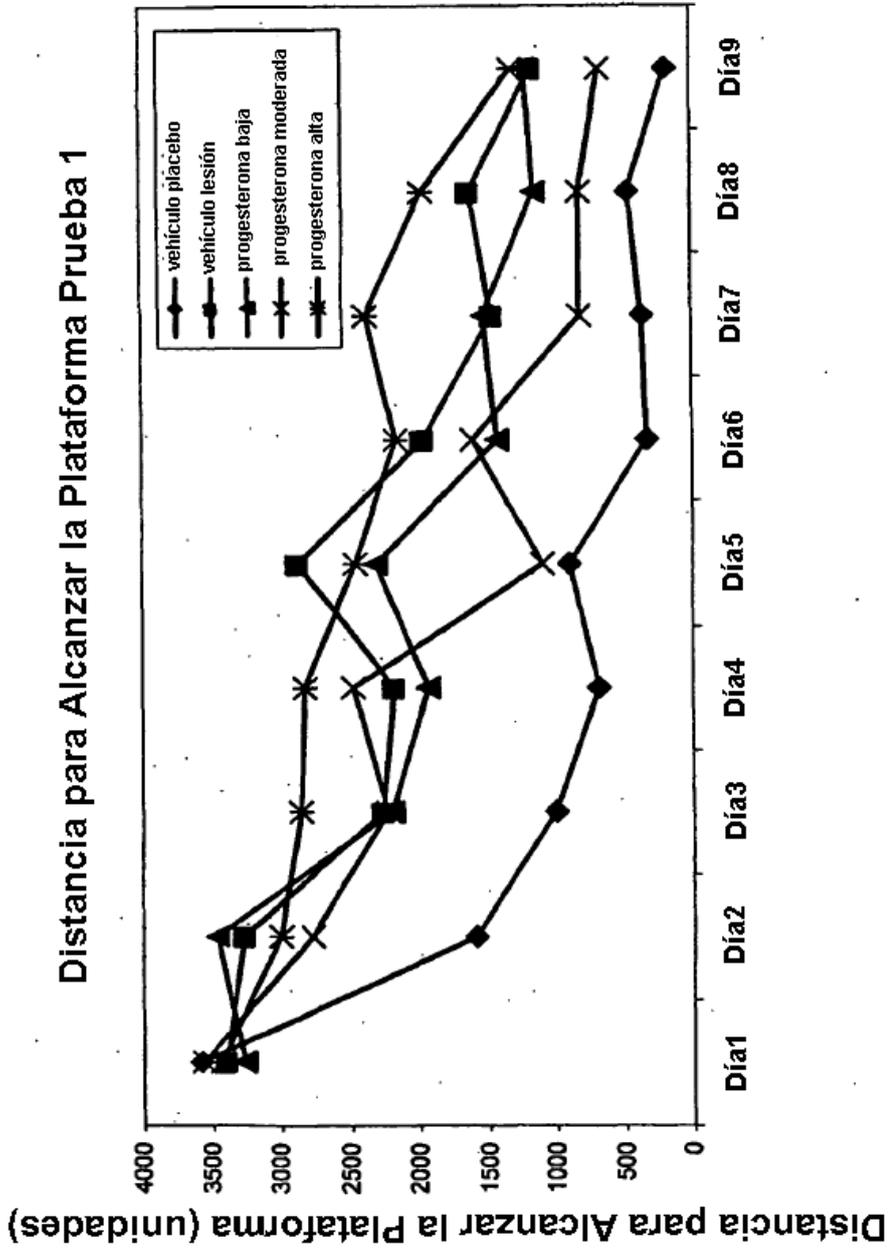


FIGURA 1A

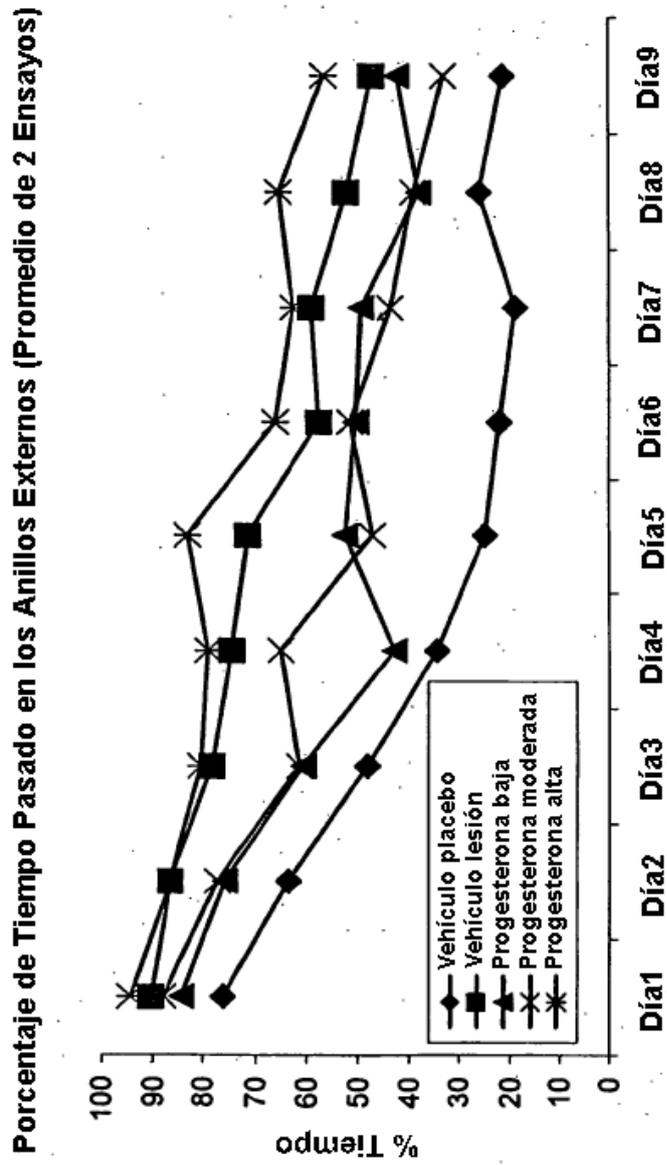


FIGURA 1B

Latencia Media para Eliminar Adhesivo con 600 Segundos de Tiempo Límite

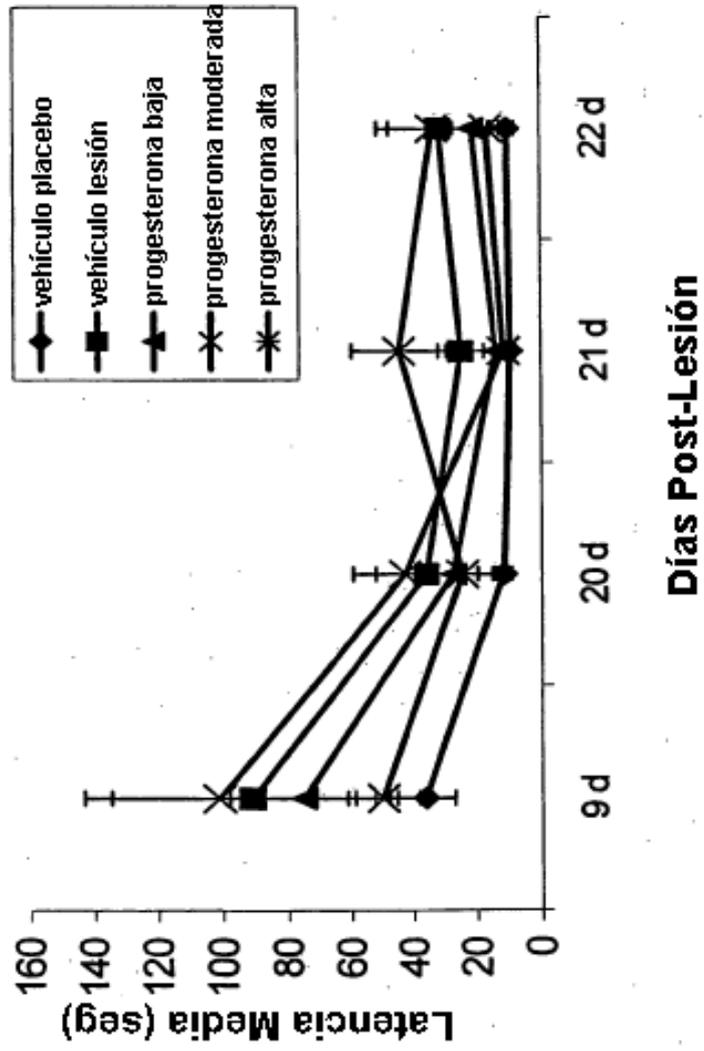
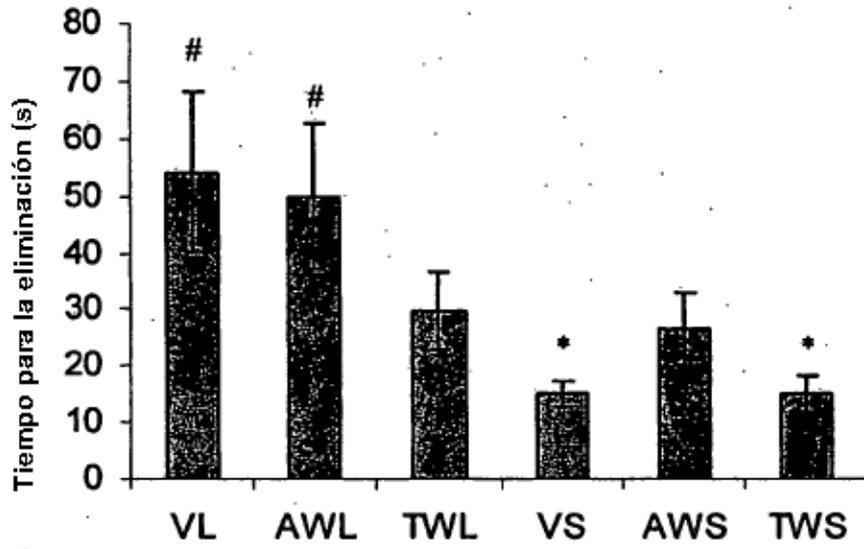


FIGURA 2

Figura 3

A.



B.

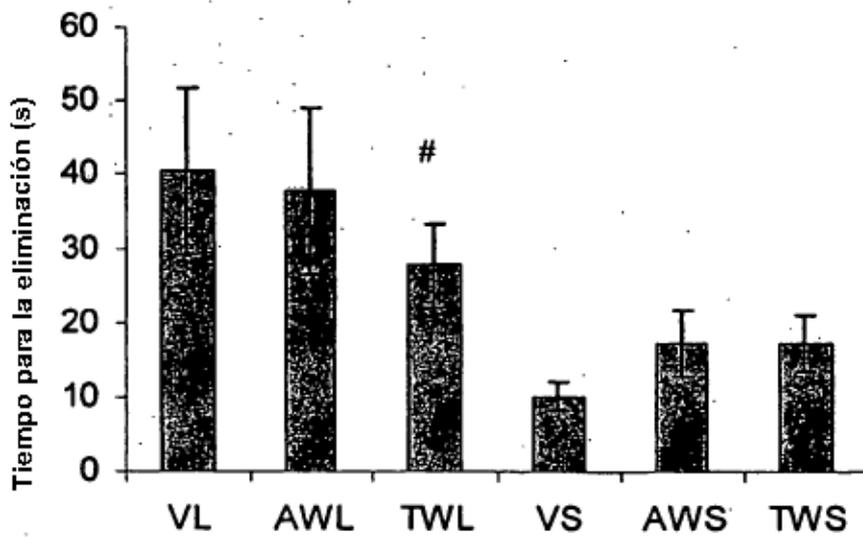
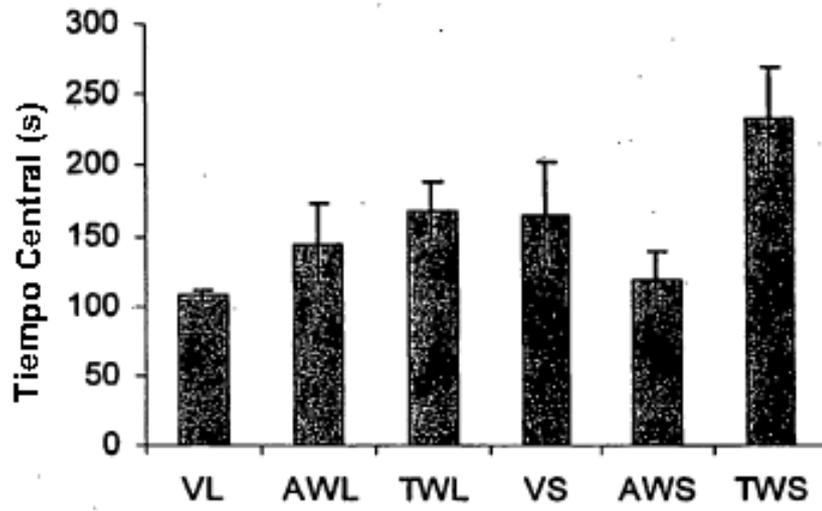


Figura 4

A.



B.

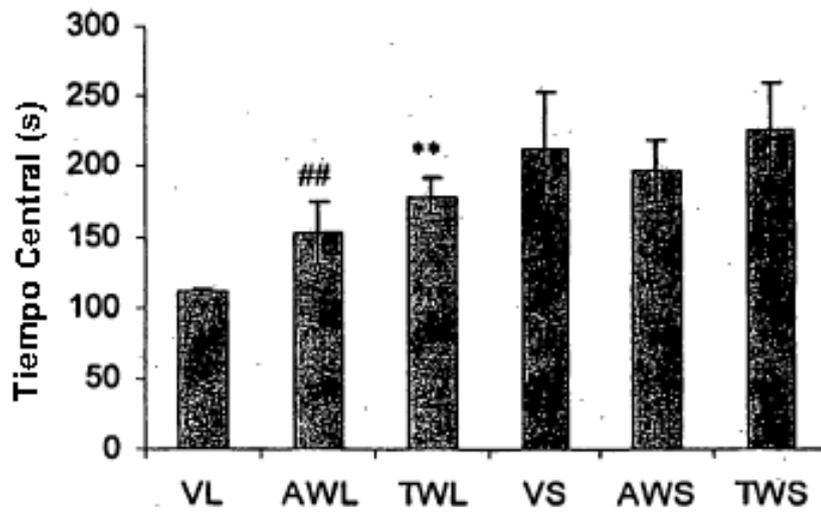


Figura 5

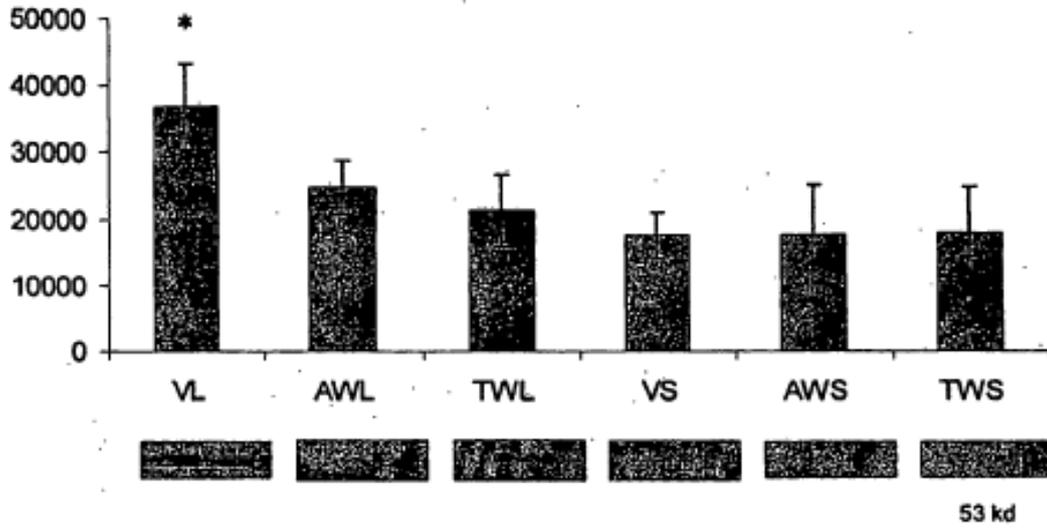


Figura 6

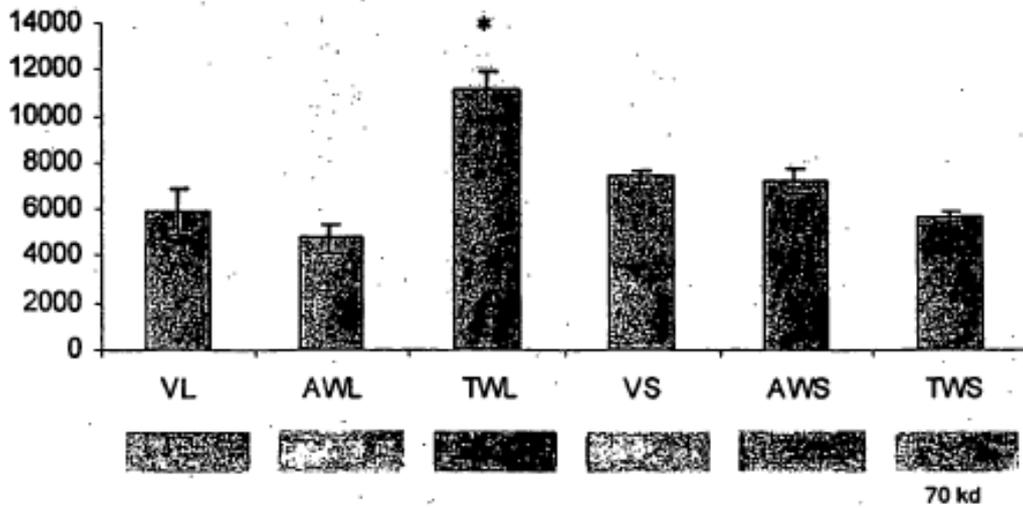


Figura 7

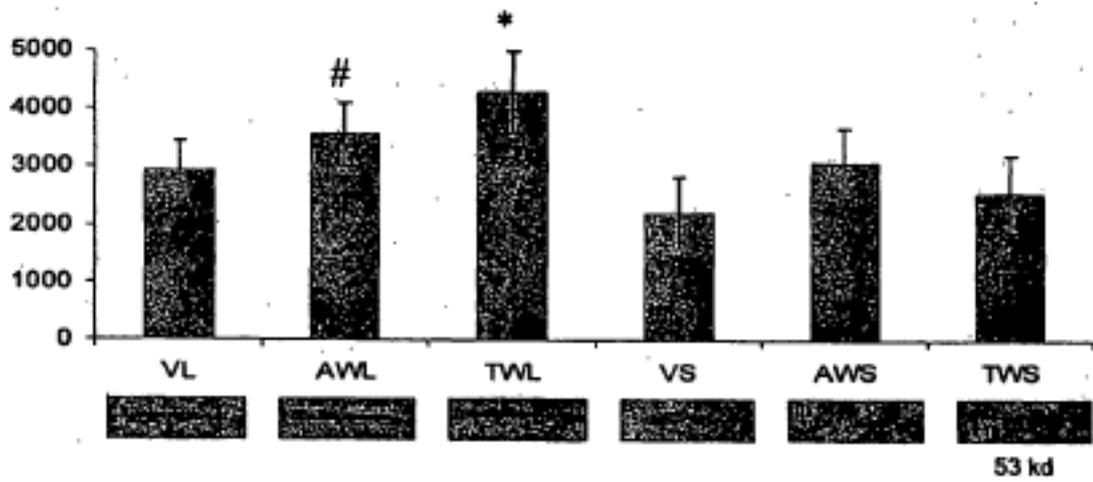


Figura 8

A.



B.

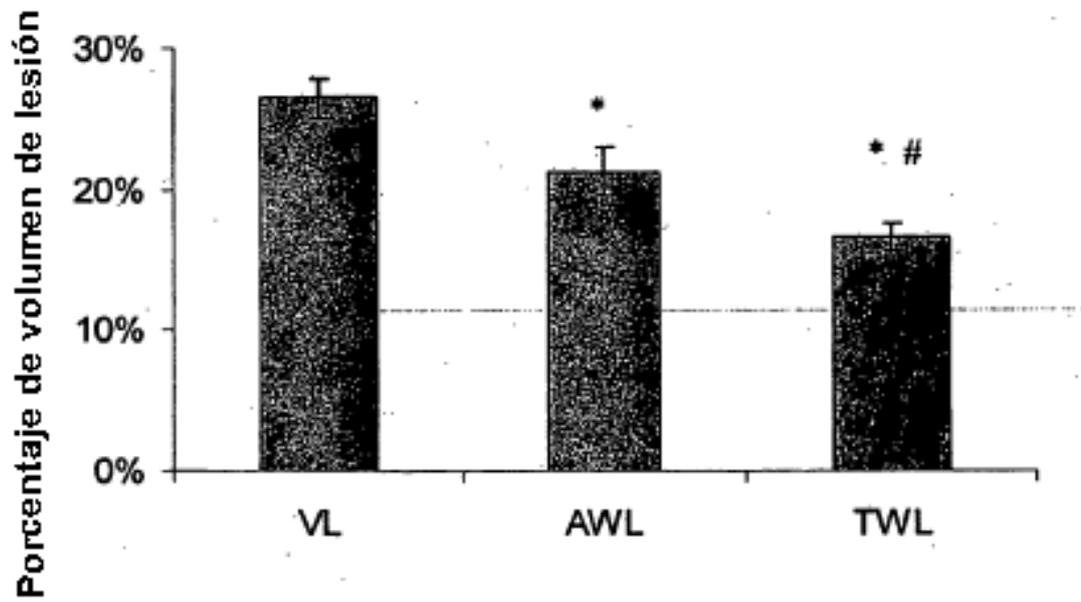


Figura 9

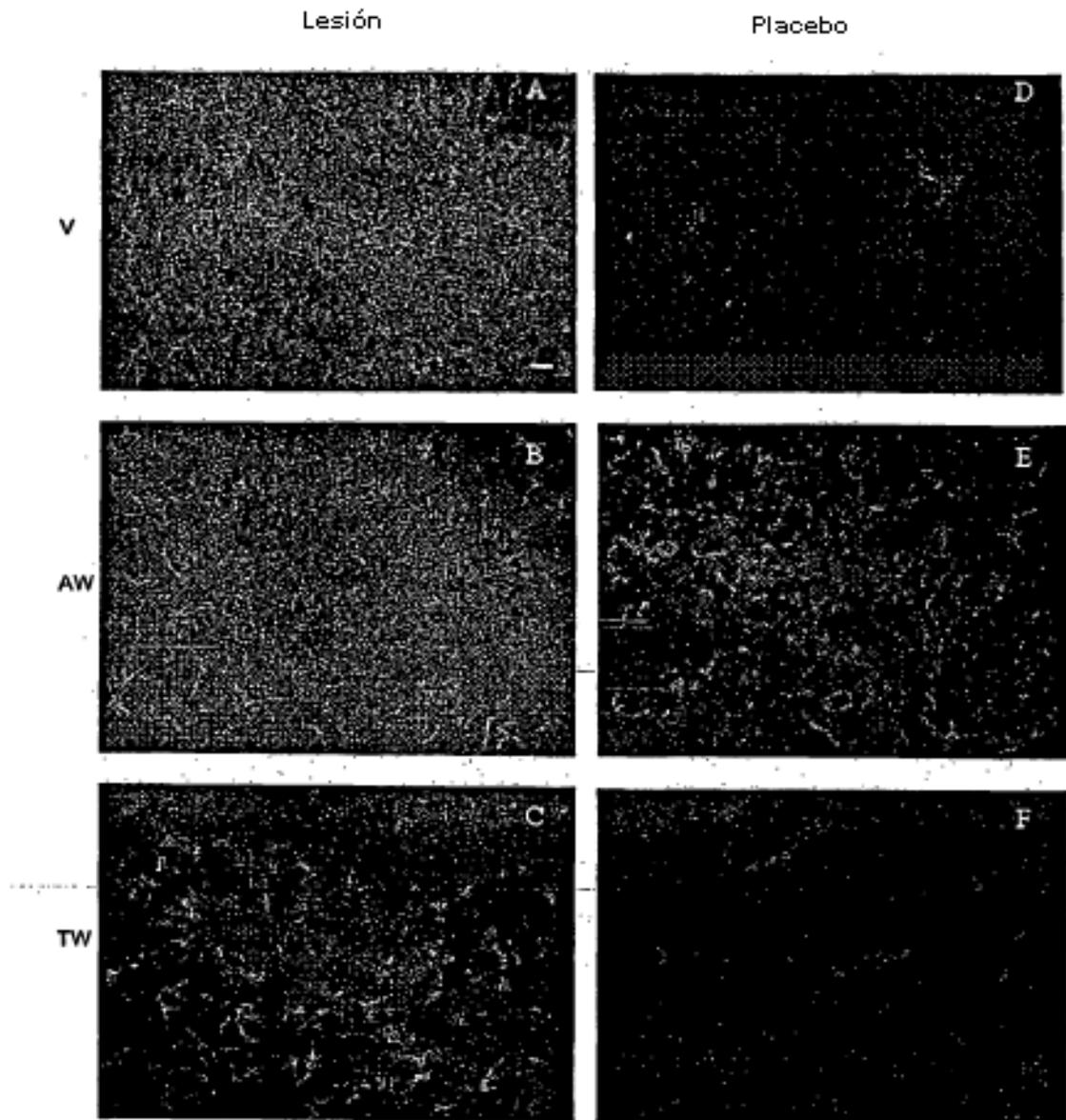


Figura 10

