

**UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS**



TESIS DOCTORAL

**DAÑO CEREBRAL AGUDO:
DE LOS MECANISMOS PATOGENICOS
A LA PRÁCTICA CLÍNICA**

M^a Isabel Rubio López

Directores:

Dr. Francisco Javier Llorca Díaz

Dra. M^a Ángeles Ballesteros Sanz

Santander 2013

DON FRANCISCO JAVIER LLORCA DÍAZ, Doctor por la Universidad de Cantabria, y **DOÑA MARÍA DE LOS ÁNGELES BALLESTEROS SANZ**, Doctora por la Universidad de Cantabria,

HACEMOS CONSTAR:

Que **M^a ISABEL RUBIO LÓPEZ** ha llevado a cabo bajo nuestra dirección el trabajo titulado “**DAÑO CEREBRAL AGUDO: DE LOS MECANISMOS PATOGENICOS A LA PRÁCTICA CLÍNICA**” que reúne las características de rigor y originalidad necesarias para una Tesis Doctoral.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos y certificamos en Santander, a 16 de Enero de 2013.

D. FRANCISCO JAVIER LLORCA DÍAZ

D^a. M^a ÁNGELES BALLESTEROS

Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano.

Isaac Newton (1642-1727).

A mi madre, quien siempre ha creído en mí y ha estado a mi lado en los buenos y malos momentos guiándome y enseñándome el valor de la constancia, el trabajo, la sinceridad y el coraje.

A mi abuelo Julián, quién ya no se encuentra entre nosotros, por enseñarme a escuchar y a tener paciencia. Siempre está presente en mi corazón.

A mi hermana, por su vitalidad e inconformismo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. M^a Ángeles Ballesteros, codirectora de esta tesis, por su entusiasmo. Confió en mí para poner en marcha este proyecto y me permitió acercarme al mundo de la investigación.

Al Dr. Francisco Javier Llorca, codirector de la presente tesis, por su valioso asesoramiento. Con su rigor científico y capacidad de trabajo ha sido un estímulo.

Al Dr. Eduardo Miñambres, por darme la oportunidad de trabajar en un tema apasionante. Sin su apoyo este trabajo no habría podido llevarse a cabo.

Al Dr. Marcos López Hoyos, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo e integrarme en el Servicio de Inmunología.

A la Dra. M^a José Marín por su apoyo, sabios consejos y ayuda científica prestada. Su generosidad ha facilitado el desarrollo de este trabajo en el laboratorio de Inmunología.

A la Dra. Ana Padilla por su colaboración en las técnicas realizadas en el laboratorio de Bioquímica.

A María Sierra, técnico de Inmunología, por ayudarme en la realización de las técnicas de laboratorio.

A Marta López, por su amistad y sus enseñanzas.

A mis compañeros Juan Carlos Rodríguez y Camilo González, por animarme cuando el camino se hacía difícil.

Al Dr. Quesada, por su apoyo y por facilitarme el trabajo.

A los médicos, enfermeras y técnicos del laboratorio de Inmunología del Hospital de Liencres que me acogieron e integraron en el grupo mostrándome las técnicas y los diferentes recursos del laboratorio. Me he sentido una más.

A los médicos y enfermeras del Servicio de Medicina Intensiva del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla por su colaboración en la toma de muestras de los pacientes afectos de daño cerebral agudo.

A la Fundación “Marqués de Valdecilla” (IFIMAV) (API 07/05), al Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI080058), a la Fundación Mutua-Madrileña, por su ayuda logística y económica, prestada a través de proyectos de investigación financiados. Su colaboración ha resultado central para el desarrollo de este trabajo.

Al laboratorio Roche Diagnostics (Mannheim, Germany) por el soporte técnico facilitado en las determinaciones sanguíneas de la proteína S100B.

A los pacientes y familiares que en momentos duros y difíciles accedieron a escucharme y colaborar. Sin su ayuda este trabajo no hubiera sido posible.

A mis profesores de escuela, instituto y universidad por contribuir a mi formación no sólo profesional sino también humana. Con ellos empezaron los primeros pasos.

A Tatina Simal y Covadonga González, por su amistad.

Como no quiero olvidar a nadie, gracias a todas las personas que han pasado por mi vida y han dejado huella. De todo el mundo se puede aprender.

ABREVIATURAS

AAE	Aminoácidos excitatorios
ATP	Adenosín trifosfato
BHE	Barrera hematoencefálica
DCA	Daño cerebral agudo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FSC	Flujo sanguíneo cerebral
HIC	Hemorragia intracraneal
IP3	Inositol trifosfato
LCR	Líquido cefalorraquídeo
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetasa
PBS	Solución salina fosfatada
PIC	Presión intracraneal
PTPM	Poros de transición de membrana mitocondrial
RMN	Resonancia magnética nuclear
SNC	Sistema nervioso central
SVC	Sangre venosa central
SvyO₂	Saturación venosa yugular
TAC	Tomografía axial computarizada
TCE	Traumatismo craneoencefálico
UCI	Unidad de cuidados intensivos
VYI	Vena yugular interna

INDICE

1. Introducción	1-49
1.1. Impacto del daño cerebral agudo	2
1.1.1. Traumatismo craneoencefálico	2
1.1.2. Accidentes cerebrovasculares	5
1.2. Fisiopatología del daño cerebral agudo	8
1.2.1. Muerte celular	14
1.2.2. Papel de los astrocitos	19
1.3. Marcadores biológicos	23
1.3.1. Proteína S100B	28
1.3.1.1. Producción de la proteína S100B	29
1.3.1.2. Liberación de la proteína S100B	30
1.3.1.3. Determinación de la proteína S100B ...	32
1.3.1.4. Funciones de la proteína S100B	34
1.4. Drenaje venoso cerebral	35
1.5. Aplicación del estudio del drenaje venoso cerebral en neurocríticos	43
1.5.1. Oximetría yugular	44

2. Objetivos	50-51
2.1. Objetivos generales	50
2.2. Objetivos específicos	50
2.2.1. S100B	50
2.2.2. Modulación de la apoptosis	51
3. Justificación	52-53
4. Material y métodos	54-65
4.1. Pacientes	54
4.2. Criterios de exclusión	55
4.3. Recogida de datos clínicos	56
4.4. Muestras sanguíneas	58
4.5. Medición de la proteína S100B	58
4.6. Situación funcional y pronóstico	59
4.7. Cultivos celulares	59
4.7.1. Inducción de la apoptosis en los cultivos celulares	62
4.7.2. Modulación de la apoptosis en los cultivos celulares: hipotermia y cicloprina	62
4.8. Determinación de la apoptosis	63
4.8.1. Método TUNEL	63
4.8.2. Citometría de flujo	64
4.9. Análisis estadístico	65

5. Resultados	66-94
5.1. Población a estudio	66
5.2. S100B y daño cerebral agudo	68
5.2.1. Determinación de la S100B	68
5.2.2. Relación entre las determinaciones sistémicas y regionales de las S100B	68
5.2.3. Patrón temporal de las determinaciones de S100B	70
5.2.4. Cinética de la S100B de los pacientes que desarrollaron muerte encefálica	72
5.2.5. Cinética de la S100B de los pacientes que presentaron mal pronóstico (GOS1-3) a los 6 meses .	74
5.2.6. Determinaciones de la S100B dependiendo del género de los pacientes.....	77
5.2.7. Determinaciones de la S100B dependiendo del tipo de daño cerebral agudo	78
5.2.7.1. Determinaciones regionales de S100B dependiendo del tipo de daño cerebral	80
5.2.7.2. Determinaciones sistémicas de S100B dependiendo del tipo de daño cerebral	80
5.2.8. Capacidad de las determinaciones de S100B para el diagnóstico de mala situación funcional al 6º mes del daño cerebral agudo	81
5.2.9. Capacidad de las determinaciones de S100B para el diagnóstico de muerte encefálica	85
5.3. Modulación de la apoptosis	88

5.3.1. Dopamina induce apoptosis en las células SH-SY5Y	88
5.3.2. Efecto de la hipotermia sobre la apoptosis inducida por dopamina en las células SH-SY5Y	89
5.3.3. Efecto de la ciclosporina sobre la apoptosis inducida por dopamina en las células SH-SY5Y	92

6. Discusión	95-125
---------------------	---------------

6.1. La proteína S100B como marcador de daño cerebral	96
6.1.1. Relación entre las determinaciones sistémicas y regionales de la S100B	97
6.1.2. Cinética de la proteína S100B en muestras regionales y sistémicas	99
6.1.3. Influencia del tipo de DCA sobre las determinaciones de S100B	102
6.1.4. Influencia del género y la edad sobre los niveles de S100B	105
6.1.5. Papel del gradiente yugulo-sistémico	107
6.1.6. Determinaciones de S100B y pronóstico	109
6.1.7. Limitaciones.....	112
6.2. Modulación de la apoptosis	114
6.2.1. Inducción de la apoptosis con dopamina	116
6.2.2. Actividad antiapoptótica de la hipotermia	117
6.2.3. Modulación de apoptosis con ciclosporina	121
6.2.4. Limitaciones	123

7. Conclusiones	126-127
------------------------	----------------

8. Bibliografía	128-168
------------------------	----------------

9. Anexos	169-173
------------------	----------------

9.1. ANEXO I: Consentimiento informado para extracción de muestras sanguíneas en pacientes con daño cerebral agudo	169
9.2. ANEXO II: Índice acute physiology and chronic health evaluation II (APACHE II)	170
9.3. ANEXO III: Producción científica	172

1 INTRODUCCIÓN

El daño cerebral agudo (DCA), ya sea de origen traumático, hemorrágico o isquémico, es un grave problema de salud a nivel mundial por su alta incidencia y elevada morbimortalidad. Su prevalencia e incidencia están incrementándose progresivamente debido a la mayor esperanza de vida de la población y al aumento de la supervivencia de todos los procesos neurológicos graves. El coste que supone para la sociedad en términos de sufrimiento y en términos económicos es enorme. La diversidad en los sistemas de recogida de datos, la heterogeneidad en las definiciones y las diferencias de las poblaciones a estudio representan los principales problemas para describir el impacto global de esta patología.

El DCA se caracteriza por su dinamismo y por la dificultad en su evaluación clínica y diagnóstico. La exploración neurológica puede verse artefactada por fármacos o tóxicos. El diagnóstico por imagen se basa en pruebas como la tomografía axial computarizada o la resonancia magnética cerebral. En ocasiones, no es posible trasladar al paciente a la sala de radiodiagnóstico para efectuar la prueba de imagen porque su inestabilidad clínica lo contraindica. Además, la tomografía axial computarizada no tiene alta sensibilidad para la detección de la lesión axonal difusa y la resonancia magnética nuclear no está disponible en todos los centros ni en todas las

frangas horarias del día. En los últimos años ha aumentado el interés por disponer de indicadores pronósticos para decidir el nivel de asistencia, facilitar la toma de decisiones, evitar la futilidad terapéutica y el consumo de recursos innecesarios (Escudero y cols., 2008).

La fisiopatología del DCA es compleja y en ella participan múltiples factores genéticos, moleculares, celulares... pendientes de dilucidar. Además el DCA es un proceso muy heterogéneo, lo cual dificulta el desarrollo de trabajos multicéntricos de los que se puedan extraer “conclusiones inequívocas”. Probablemente todo ello contribuye a que en la actualidad no se disponga de un tratamiento específico que permita la recuperación del tejido dañado o que aminore la progresión del daño.

1.1. IMPACTO DEL DAÑO CEREBRAL AGUDO

1.1.1. Traumatismo craneoencefálico

El daño cerebral traumático se define como la lesión cerebral de origen traumático que conduce al deterioro temporal o permanente de las funciones cerebrales. El traumatismo craneoencefálico (TCE) se caracteriza por su alta mortalidad y morbilidad convirtiéndose en un verdadero problema de salud pública. Los TCE son importante causa de muerte (León-Carrión y cols., 2005). La distribución del daño cerebral traumático es bimodal, afectando sobre todo a individuos por debajo de los 25 años y por encima de

los 65 años. La incidencia global es de 200 casos por cada 100000 habitantes y año (Murillo y cols., 1996; Brell e Ibañez, 2001; Tagliaferri y cols., 2006; Reilly, 2007). Si bien varía de unos países a otros, oscilando entre 91-430 casos por cada 100000 habitantes, con una mortalidad de 9-89 fallecidos cada 100000 habitantes (Fearnside y Simpson, 2005). Según León-Carrión y cols. (2005) en los países industrializados el 5% de los pacientes que requieren ingreso hospitalario presentan TCE grave. De todos los pacientes con TCE que acuden a urgencias sólo el 10% ingresa en una unidad de cuidados intensivos (UCI). La prevalencia del TCE varía de unas regiones a otras, no obstante tiende a ser parecida en zonas de similar situación socioeconómica (León-Carrión y cols., 2005).

El desarrollo tecnológico conlleva un incremento de los riesgos traumáticos. Estos riesgos están relacionados con el tráfico, el desarrollo industrial, la construcción, la violencia o determinadas actividades deportivas y/o de ocio. Los TCE dentro de estas actividades ocupan un lugar destacado por su morbimortalidad.

La mortalidad varía según la edad, las comorbilidades, la gravedad y las lesiones añadidas. Existen resultados dispares en los diferentes estudios que abordan la relación entre la mortalidad y la edad en TCE graves, no obstante se ha visto que existe una relación lineal entre ambas variables para edades comprendidas entre 25 y 75 años. Según un estudio realizado por Gómez y cols. (2000) la mortalidad por TCE grave oscila desde el 4,3% en las personas con edades comprendidas entre 15-20 años, al 86,8% en

los pacientes mayores de 65 años. Según un trabajo publicado por Tagliaferri y cols. (2006), la mortalidad media por TCE es de 15 fallecidos por cada 100000 habitantes y año en Europa.

La recuperación en los pacientes con TCE severo (puntuación en la escala de coma de Glasgow ≤ 8) no suele ser completa y depende en parte de la atención especializada recibida. En los pacientes con TCE moderado (puntuación en la escala de coma de Glasgow 9-13) suelen recuperarse el 80-90% y las secuelas son menores si se instaura de forma precoz un adecuado tratamiento (León-Carrión y cols., 2005). Las principales secuelas son cognitivas, motoras, emocionales y sociales, siendo la depresión la más frecuente (León-Carrión y cols., 1999; León-Carrión y cols., 2001). Se estima que por cada paciente con daño cerebral severo hay 17 enfermos con daño cerebral leve o moderado (Kay y Teasdale, 2001). Sin embargo, a pesar de los numerosos pacientes con lesión cerebral leve/moderada y las potenciales secuelas que pueden presentar, estos enfermos con frecuencia son infratratados.

Además de las incapacidades permanentes o transitorias, los TCE generan enormes costes económicos, sociales y familiares (Adekoya y cols., 2002; Hyder y cols., 2007). La mayoría de los estudios se centran en el TCE grave. La información disponible del coste del daño cerebral traumático en Europa es escasa y generalmente se refiere sólo al consumo de recursos hospitalarios, lo cual probablemente es sólo una pequeña parte del coste total (Berg cols., 2005). La *Brain Injury Association of America* estima que

en Estados Unidos el daño cerebral traumático cuesta a la comunidad 48.300 millones de dólares por año (Reilly, 2007).

1.1.2. Accidentes cerebrovasculares

Consideramos accidentes cerebrovasculares a la lesión neurológica aguda debida a procesos patológicos que afectan a los vasos sanguíneos intracraneales. Los accidentes cerebrovasculares se clasifican en dos grupos:

- Accidentes isquémicos
- Hemorragias

Dentro de las hemorragias intracraneales (HIC) se incluyen la hemorragia subaracnoidea y la hemorragia intracerebral o intraparenquimatosa. El interés creciente por los accidentes cerebrovasculares se debe a su elevada prevalencia, mortalidad, comorbilidad, efectos secundarios, consumo de recursos sanitarios y población diana a la que afecta. A nivel mundial, la incidencia de las enfermedades cerebrovasculares es de 240-600 casos por cada 100000 habitantes por año (Grysiewicz y cols., 2008).

Los accidentes cerebrovasculares constituyen la segunda causa de muerte a nivel mundial. En España de cada 1000 fallecidos, 104,3 de ellos mueren por accidente cerebrovascular (Ruíz-Jiménez y cols., 2002). En los países desarrollados este tipo de enfermedades son la primera causa de discapacidad grave en adultos.

El 80% de los accidentes cerebrovasculares son isquémicos (80% aterotrombóticos y 20% embólicos), es decir, por interrupción del flujo sanguíneo. La incidencia por accidentes cerebrovasculares isquémicos es de 172 casos por cada 100000 habitantes y año (Alzamora y cols., 2008).

Los accidentes vasculares hemorrágicos constituyen sólo el 20% del total e implican la rotura de un vaso dentro del cerebro. La hemorragia intracerebral no traumática es un sangrado intraparenquimatoso que puede extenderse a los ventrículos y ocasionalmente, al espacio subaracnoideo. La hemorragia intracerebral no traumática supone el 8-15% de los accidentes cerebrovasculares y es responsable del 16-26% de todas las muertes relacionadas con accidentes cerebrovasculares. La incidencia varía dependiendo de la edad, género, región y raza, pero en líneas generales se estima que la incidencia anual de la misma es de 16 a 33 casos por cada 100000 habitantes y año (Sacco y cols., 2009). En España la incidencia asciende hasta los 15 casos por cada 100000 habitantes y año, siendo más frecuente en varones mayores de 55 años (Escudero y cols., 2008). Dependiendo de la etiología, la hemorragia se clasifica en primaria y secundaria. La hemorragia intracerebral primaria representa el 78-80% de los casos y se origina por la ruptura de pequeños vasos, mientras que la secundaria aparece en un grupo minoritario y se asocia a malformaciones vasculares, tumores, trastornos de la coagulación... (Rubiano y Angarita, 2008).

La hemorragia subaracnoidea es la extravasación de sangre al espacio subaracnoideo. La incidencia de la hemorragia subaracnoidea es de 4-23 casos por cada 100000 habitantes y año (De Rooij y cols., 2007; Van Asch y cols., 2010), manteniéndose estable en las últimas tres décadas. El pico de edad aparece a los 60 años, presentando las mujeres 1,6 veces más riesgo que los hombres (Fonnegra y cols., 2008).

La hemorragia intracraneal se considera entre todos los accidentes cerebrovasculares, la que tiene un efecto más devastador, ocasionando una alta morbimortalidad. La mortalidad a los 30 días del evento oscila entre 35 y 52% y la mitad de estas muertes, ocurre dentro de los dos primeros días (Fogelholm y cols., 2005; Flaherty y cols., 2006; Sacco y cols., 2009; Zia y cols., 2009; Van Asch y cols., 2010). En la revisión sistemática realizada por Van Asch y cols. (2010) se estimó que del 12 al 39% de los pacientes con hemorragia intracerebral logran ser funcionalmente independientes. El pronóstico depende de la localización de la misma, del tamaño del hematoma, del nivel de conciencia inicial, de la edad del paciente y de las comorbilidades previas (Fogelholm y cols., 2005; Broderick y cols., 2007; Sacco y cols., 2009).

La mortalidad de la hemorragia subaracnoidea se acerca al 50%. De los pacientes con hemorragia subaracnoidea que sobreviven, el 20-30% de ellos queda con un compromiso neurológico severo y menos de un tercio recupera el mismo estilo de vida que tenían antes del evento vascular (Fonnegra y cols., 2008).

1.2. FISIOPATOLOGÍA DEL DAÑO CEREBRAL AGUDO

En la fisiopatología del DCA se pueden distinguir desde un punto de vista académico dos entidades diferentes pero relacionadas, el daño cerebral primario y el daño cerebral secundario (Haddad y Arabi, 2012). La lesión primaria se produce en el momento del insulto como resultado de la agresión directa bien sea traumático, hemorrágico o isquémico. En las horas y días siguientes se producen una serie de reacciones bioquímicas, moleculares y celulares que condicionan diferentes formas de muerte celular como apoptosis, necrosis o autofagia, lo cual acaba generando la lesión cerebral secundaria (Miñambres y cols., 2005; Ballesteros y cols., 2007). Los múltiples mecanismos que se inician tras la agresión cerebral inicial pueden ser agravados por factores locales y sistémicos, contribuyendo

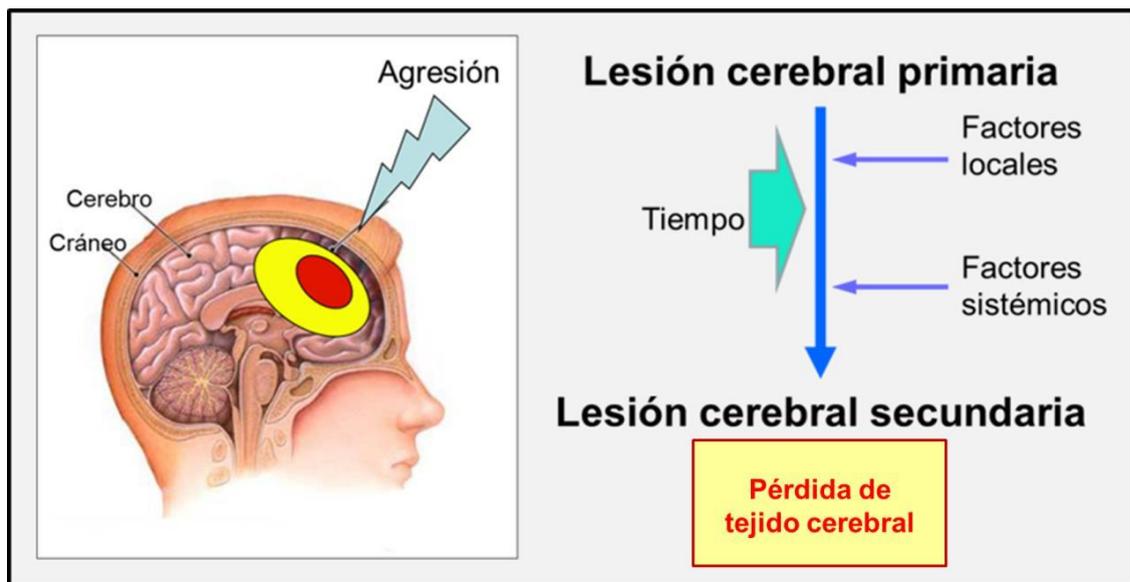


Figura 1.1. Daño cerebral primario y secundario.

al daño cerebral secundario (Figuras 1.1 y 1.2). Los factores sistémicos y locales interaccionan y se potencian entre sí. La lesión secundaria es responsable de un porcentaje importante de las muertes por DCA y es potencialmente prevenible con medidas terapéuticas apropiadas. En la génesis del daño cerebral agudo destacan 4 procesos (Alted y Toral, 2006):

- Isquemia, excitotoxicidad y déficit energético
- Cascadas neuroquímicas que conducen a la muerte neuronal y glial por necrosis o por apoptosis
- Inflamación local
- Edema cerebral

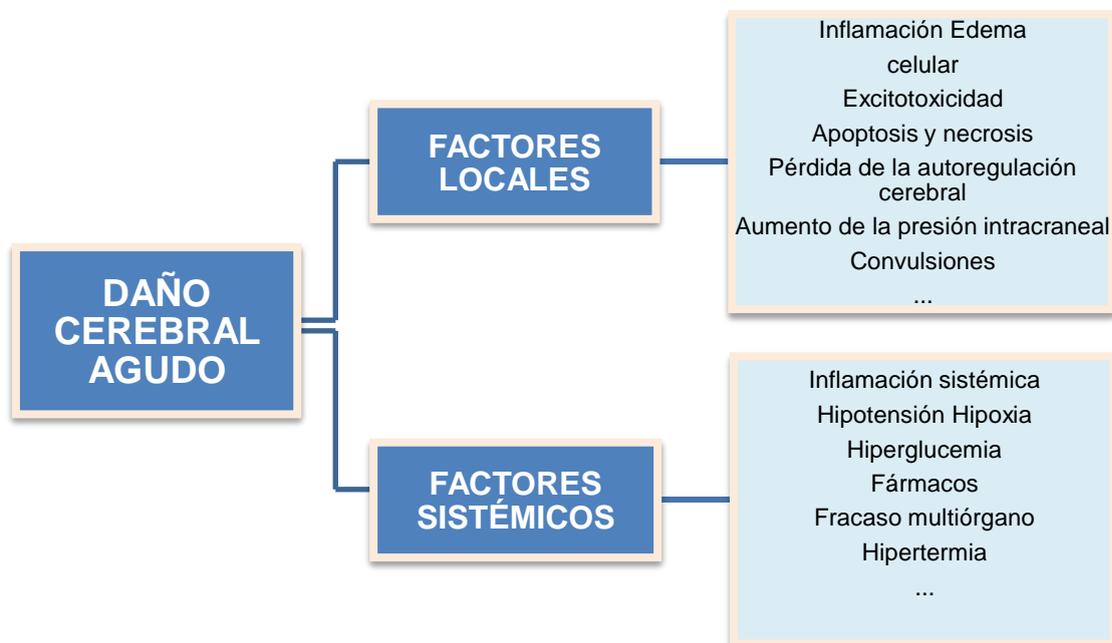


Figura 1.2. Factores que intervienen en el DCA.

La lesión primaria desencadena una serie de alteraciones en el metabolismo cerebral que comprometen su homeostasis. Inmediatamente después del daño directo, se produce isquemia e hipoxia cerebral. Apoyando estos hechos, se ha objetivado que el 90% de los pacientes que fallecen con un TCE grave presentan hallazgos compatibles con isquemia (Rovegno y cols., 2012). Se ha observado que la hipotensión y la hipoxia son predictores de mortalidad en pacientes con TCE (Chesnut, 2007). Hay diferentes mecanismos implicados en la hipoperfusión postdaño cerebral. Así por ejemplo, se ha descrito un aumento en la producción de sustancias vasoconstrictoras como la endotelina-1 (Alted y Toral, 2006) y una disminución de sustancias vasodilatadoras, como el óxido nítrico. La isquemia juega un papel fundamental en el desarrollo del daño cerebral secundario. Como consecuencia de ello la producción de energía va a depender de la glicolisis anaeróbica, mecanismo poco eficiente de producción de energía, por lo que la producción de ATP celular disminuye. Se ha observado que los niveles de ATP empiezan a disminuir de forma significativa unos minutos después del inicio de la hipoxia (Lipton, 1999). La disminución de ATP conduce al fallo de la bomba Na-K, produciéndose disminución del potasio y aumento del sodio a nivel intracelular, lo cual ejerce un efecto osmótico e induce la entrada de agua al espacio intracelular. Además, el aumento de sodio intracelular genera un gradiente de concentración de sodio que impide el intercambio pasivo de iones, situación que favorece el acúmulo de hidrogeniones y calcio en el interior de

la célula. La bomba de calcio también es dependiente de ATP, por lo que en situaciones de déficit de éste, el calcio no sale al espacio extracelular y se acumula dentro de la célula.

Tras la agresión cerebral inicial, el aumento del sodio intracelular hace que el interior de la célula sea menos electronegativo y ello acerca el potencial de reposo al umbral de disparo generando la despolarización de membrana. Como consecuencia de la despolarización neuronal masiva y el déficit energético, se libera glutamato en grandes cantidades. Éste actúa sobre receptores específicos de pared, alterando distintos canales iónicos. Ello induce incremento del agua intracelular, salida de potasio al medio extracelular y entrada de calcio y sodio en las células. El aumento de calcio intracelular da lugar a la activación de proteasas, lipasas y endonucleasas, desencadenando en último término la apoptosis.

Cuando el cerebro ha sido sometido a hipoxia, el restablecimiento del flujo sanguíneo cerebral produce lesión por reperfusión debido a radicales libres (Figura 1.3). El estrés oxidativo por la producción de radicales libres de oxígeno y de nitrógeno puede producir daño mitocondrial y del DNA, destrucción del citoesqueleto y necrosis celular. También induce la relajación vascular originando mayor incremento del flujo sanguíneo. Además hay una disminución de las sustancias antioxidantes (Alted y Toral, 2006). El aumento de calcio intracelular y la lesión mitocondrial inducen la expresión de genes que activan proteínas apoptóticas e inhiben las proteínas antiapoptóticas, produciendo muerte celular (Alted y Toral, 2006).

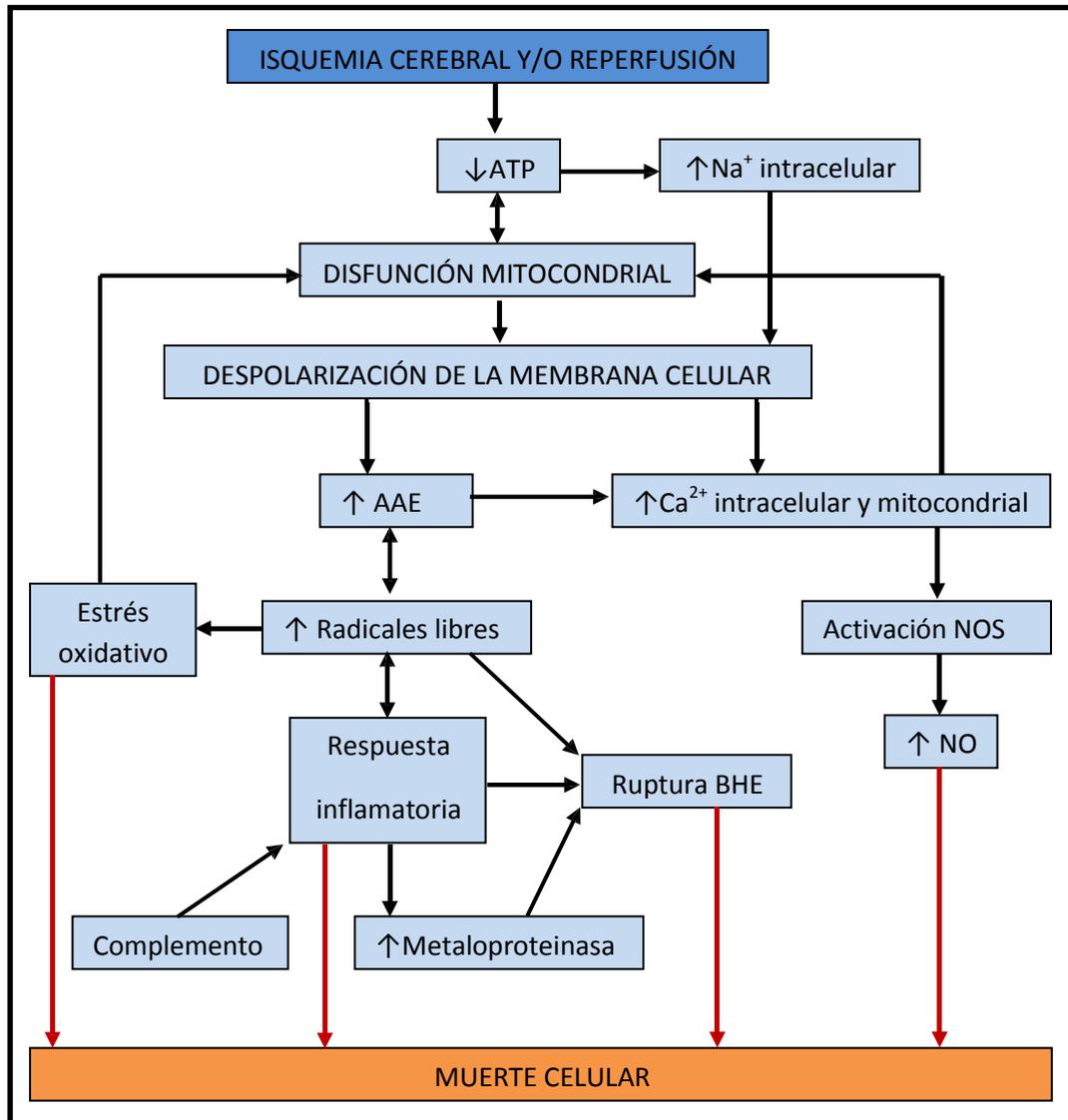


Figura 1.3. Muerte celular en el daño cerebral agudo por isquemia-reperfusión. AAE: aminoácidos excitatorios; NO: óxido nítrico; NOS: óxido nítrico sintetasa; BHE: barrera hematoencefálica.

Otro mecanismo que interviene en la génesis del daño cerebral secundario es la inflamación. La respuesta inflamatoria está mediada tanto por leucocitos circulantes reclutados en el área lesionada como por células nerviosas. La ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) desencadena la

activación endotelial y el reclutamiento de leucocitos circulantes. La microglía es responsable de la respuesta inmune innata del sistema nervioso central (Ransohoff y Perry, 2009; Kettenmann y cols., 2011; Marín-Teva y cols., 2011). Al estimularse migra al lugar de la lesión, produce fagocitosis, presenta el antígeno y libera citocinas, radicales libres y otros factores solubles. Los astrocitos también participan en la respuesta inflamatoria local, pues se produce una astrocitosis reactiva caracterizada por una hipertrofia, hiperplasia y un aumento de la expresión de su filamento intermedio. Cuando el daño es leve esta astrocitosis favorece la remodelación, pero cuando es grave puede producir una cicatriz glial, que posteriormente dificulta la remodelación neuroplástica necesaria para la recuperación (Laird, 2008). En función de la magnitud de la respuesta neuroinflamatoria, ésta puede tener efectos neuroprotectores o neurotóxicos.

El edema cerebral es una lesión secundaria frecuente en el DCA, independientemente de su etiología. Se caracteriza por un incremento del agua cerebral que conlleva un incremento del volumen del tejido cerebral. Está influido por complejos cambios moleculares, celulares, estructurales, funcionales y vasculares. Hay varios tipos de edema cerebral:

- Edema citotóxico
- Edema vasogénico
- Edema intersticial
- Edema osmótico

El edema citotóxico y el edema vasogénico están relacionados con el acúmulo intracelular o extracelular de agua, secundario a la lesión cerebral o ruptura de la BHE, respectivamente. El edema intersticial normalmente se utiliza para describir el acúmulo de agua cerebral en pacientes con hidrocefalia, el cual se localiza sobre todo en la sustancia blanca periventricular. El edema cerebral osmótico se produce por hipoosmolalidad plasmática, lo cual da lugar a la entrada de agua al interior de la célula.

El resultado final del daño cerebral depende tanto del daño cerebral primario como del secundario, sobre el que interactúan multitud de factores locales y sistémicos. Esto explica la gran variabilidad en la evolución del daño y la dificultad a la hora de establecer estrategias terapéuticas óptimas.

1.2.1. Muerte celular

La célula tiene una capacidad extraordinaria de adaptación. Cuando una célula sufre la agresión de un agente externo o interno que sobrepasa su capacidad de adaptación se produce la muerte celular. Hay varios tipos de muerte celular: la apoptosis, la necrosis y la autofagia. La necrosis es un proceso de desintegración celular pasivo desde el punto de vista energético. Se caracteriza por el aumento del tamaño celular, la pérdida de integridad de la membrana celular y la salida del contenido intracelular al medio extracelular. Esto pone en marcha una respuesta inflamatoria, que es iniciada por enzimas proteolíticas y radicales libres que la célula contiene en

su interior (Majno y Joris, 1995). La necrosis es un proceso irreversible que condena a la célula a perder su función específica y a convertirse en restos celulares que serán fagocitados por los macrófagos.

Tabla 1.1. Diferencias entre necrosis y apoptosis.

	NECROSIS	APOPTOSIS
Desencadenante	Patológico	Fisiológico/Patológico
Requerimiento de energía	No	Sí
Membrana citoplasmática	Lisis	Expresión de glucoproteínas
Núcleo	Edema	Retracción
Mitocondria	Hinchazón	Funcional
Degradación DNA	Aleatoria	Ordenada
Reacción inflamatoria	Sí	No

La apoptosis es la muerte celular programada, caracterizada por la autodigestión controlada de la célula. La célula inicia su propia muerte, mediante la activación de proteasas endógenas que causan la lisis del citoesqueleto. Disminuye el volumen celular. Se produce una pérdida de la función mitocondrial, la cromatina del núcleo se condensa y el DNA se degrada. Las endonucleasas lisan el material genético generando fragmentos de tamaño múltiplo de 180 pares de bases, que originan un

patrón en escalera en un gel de agarosa, característico de la apoptosis (Kerr y cols, 1972; Martin y cols, 1994). La célula se colapsa produciéndose una escisión en múltiples estructuras, denominadas cuerpos apoptóticos, constituidos por partes del citoplasma y orgánulos rodeados de membrana plasmática. Finalmente estos cuerpos apoptóticos son fagocitados y digeridos por células fagocíticas vecinas, sin liberar su contenido al espacio extracelular por lo que a diferencia de la necrosis la célula apoptótica no genera una reacción inflamatoria (Lizarbe, 2007). En la Tabla 1.1 se pueden observar las diferencias entre necrosis y apoptosis.

La apoptosis está regulada genéticamente, es decir precisa de un programa genético de muerte celular. Existen diferentes señales que activan el programa de muerte celular y también existen numerosas señales cuya misión es detener este proceso (Vaux y Korsmeyer, 1999). Las células expresan moléculas que actúan como efectoras de la apoptosis, las cuales son inhibidas de forma activa para permitir la supervivencia de dichas células. La apoptosis puede ser desencadenada por estímulos externos (vía extrínseca) o por una serie de estímulos intracelulares (vía intrínseca).

La vía extrínseca se activa cuando ciertas moléculas se unen a unos receptores situados en la membrana plasmática. Estos receptores pueden ser de dos tipos:

- Por un lado aquéllos cuya activación siempre conduce a la muerte celular, conocidos como “receptores de muerte”.

- Por otro lado, aquéllos que ejercen una función fisiológica pero su sobreactivación puede inducir la muerte celular (receptores de glutamato, de trombina y canales iónicos dependientes de voltaje).

Los receptores de muerte son proteínas que se expresan en muchas células del organismo y pertenecen a la superfamilia de genes del receptor del factor de necrosis tumoral. De ellos, destaca en cuanto a inducción de apoptosis se refiere el Fas, que se activa al unirse a su ligando FasL. Una vez establecida la unión ligando-receptor se producen una serie de alteraciones en el dominio de muerte, que conducen a un reclutamiento de moléculas adaptadoras permitiendo el inicio de la apoptosis.

La vía intrínseca, también llamada vía mitocondrial, es activada por la ruptura de la membrana mitocondrial y es mediada por múltiples factores (especies reactivas del oxígeno, translocación del citocromo C, calcio, rayos ultravioleta). Esta vía está regulada por proteínas de la familia Bcl-2. Como consecuencia del daño mitocondrial diferentes moléculas implicadas en la apoptosis son liberadas al citoplasma, como por ejemplo el citocromo C y el factor inductor de apoptosis AIF. La mitocondria no es el único orgánulo subcelular implicado en la muerte celular. Hay otras vías de inducción de apoptosis. Los liposomas y el retículo endoplásmico desempeñan una función importante en la liberación de otros factores de muerte. El daño en el DNA también puede inducir el proceso de apoptosis.

Tanto la vía intrínseca como la extrínseca confluyen en las caspasas, que son una de las familias proteicas claves en la apoptosis. Estas proteasas son cistein dependientes y al activarse lisan elementos de la infraestructura celular y a su vez, activan factores implicados en el daño celular. Esta familia de proteasas puede clasificarse en caspasas ejecutoras y en caspasas iniciadoras. Las ejecutoras son responsables de la degradación del DNA del núcleo celular y las iniciadoras activan a las ejecutoras. Las caspasas son responsables de:

- Degradación de moléculas implicadas en proteger a la célula de los fenómenos de apoptosis.
- Degradación de moléculas implicadas en la estructura celular.
- Degradación de proteínas relacionadas con la reparación del DNA y con los procesos de replicación y transcripción del DNA.

El DCA es un proceso dinámico que se inicia en el momento de la agresión cerebral y continua en los días posteriores. Ésto implica un abanico de opciones y momentos donde poder intervenir, para interrumpir, modular o limitar la lesión cerebral. Uno de los procesos sobre los que se puede actuar es la apoptosis (Nathoo y cols., 2004; Piao y cols., 2012). La apoptosis ocurre en zona de penumbra isquémica donde se requiere que el daño alcance el umbral mínimo necesario para iniciar la cascada de las caspasas, mientras que en el centro de la lesión se produce la necrosis celular. Diversos investigadores consideran que la muerte apoptótica contribuye al desarrollo del DCA, así hay trabajos que han mostrado la existencia células

apoptóticas en modelos experimentales de cerebro de ratas sometidas a una agresión cerebral aguda (Rink y cols., 1995; Pravdenkova y cols., 1996). También en cerebros humanos con DCA se han observado la presencia de células apoptóticas (Ng y cols., 2000; Nathoo y cols., 2004; Dressler y cols., 2007; Miñambres y cols., 2008a).

El estudio de la muerte celular por apoptosis, su implicación en el DCA, así como los beneficios terapéuticos que su modulación puede suponer en estos pacientes ha despertado un gran interés entre los diferentes grupos de investigación en los últimos tiempos.

1.2.2. Papel de los astrocitos

En las últimas décadas se han efectuado avances en el conocimiento de la fisiopatología, el diagnóstico y el tratamiento del DCA. Las investigaciones recientes se han centrado en el estudio de los procesos que generan esa lesión cerebral secundaria ante la posibilidad de que el conocimiento de los mismos permita el diseño de futuras opciones terapéuticas que lo modulen. Se ha postulado que el conocimiento de esos procesos permitiría identificar marcadores bioquímicos que ayudarían a determinar el pronóstico, la respuesta al tratamiento, la valoración de opciones terapéuticas... (Wang y cols., 2005). La mayoría de los estudios del DCA se han centrado en el papel de las neuronas y sólo de forma excepcional han prestado atención a otras células del sistema nervioso

central. Se ha visto que la interacción neuronas-astrocitos es importante para el normal funcionamiento cerebral. Recientes publicaciones han demostrado la vulnerabilidad de los astrocitos a la agresión cerebral. La afectación de estas células puede comprometer la interacción neurona-glía y por tanto, jugar un papel significativo en los resultados del daño cerebral (Floyd y Lyeth, 2007). Por esa razón, diversas líneas de investigación se han centrado en el comportamiento de estirpes celulares nerviosas diferentes de las neuronas durante el DCA, así como los mediadores que se liberan durante el mismo.

El sistema nervioso central (SNC) está constituido por células nerviosas y por la glía. La glía engloba los astrocitos, los oligodendrocitos, las células ependimarias y las células de la microglia. Clásicamente los astrocitos se consideraban únicamente células de soporte de las neuronas. Sin embargo, no sólo sirven de almacén para otras células sino que también mandan prolongaciones alrededor de los capilares con el fin de mantener la BHE, tapizan la membrana basal y forman la *glía limitans* que rodea todo el SNC. En condiciones normales pueden transportar iones y líquidos desde el espacio extracelular perineuronal a los vasos sanguíneos. Además interaccionan con el endotelio vascular cerebral, haciéndolo muy impermeable, de modo que actúan como una barrera al intercambio entre la sangre y el cerebro (Stevens y Lowe, 1998).

En la actualidad, se sabe que los astrocitos desempeñan una importante función en varios aspectos del desarrollo, metabolismo y

patología del sistema nervioso. Sin embargo, no está claro su papel en el DCA. Se postula que los astrocitos contribuyen a determinar la viabilidad del tejido vulnerable en este tipo de pacientes ya que modulan el flujo sanguíneo, participan en la respuesta inflamatoria, contribuyen a la homeostasis hidroelectrolítica y liberan diferentes sustancias que pueden tener efecto neuroprotector o perjudicial (Rovegno y cols., 2012).

Hay diferentes mecanismos por los que los astrocitos podrían contribuir a la progresión de la lesión cerebral (Figura 1.4). Algunos autores sugieren que son capaces de transmitir señales de apoptosis por transferencia intercelular a través de canales, mediando así, el daño de las células vecinas (Lin y cols., 1998). La transmisión de señales eléctricas en los astrocitos está mediada por la molécula mensajera inositol trifosfato (IP3) y el calcio. El IP3 activa los canales de calcio en los orgánulos celulares, liberándolo en el citoplasma del astrocito. Los iones de calcio así liberados estimulan la producción de más IP3 y el efecto neto es una onda eléctrica que se propaga de astrocito a astrocito. A nivel extracelular es la liberación de ATP, y la consecuente activación de receptores purinérgicos de los astrocitos vecinos, la que interviene y media la comunicación con células distales.

Parece que los astrocitos pueden intervenir en la excitotoxicidad por glutamato. En los primeros momentos, los astrocitos son capaces de captar el glutamato extracelular y tamponarlo, pero pasado un tiempo, si persisten los altos niveles extracelulares disminuyen los transportadores del mismo y

la sobrecarga de sodio intracelular invierte el transporte de dicho aminoácido, lo cual favorece el daño por excitotoxicidad. Además los astrocitos participan en el proceso inflamatorio y contribuyen a la aparición de edema citotóxico (Zhao y Rempe, 2010). También pueden liberar moléculas con efectos neurotóxicos como la S100B y el óxido nítrico. De forma tardía, la expresión de proteoglicanos puede reducir la plasticidad neuronal. No obstante, también pueden liberar neuroprotectores como la eritropoyetina, el factor de crecimiento endotelial vascular y el factor glial neurotrófico, lo cual puede aminorar el daño neuronal y mejorar la recuperación.

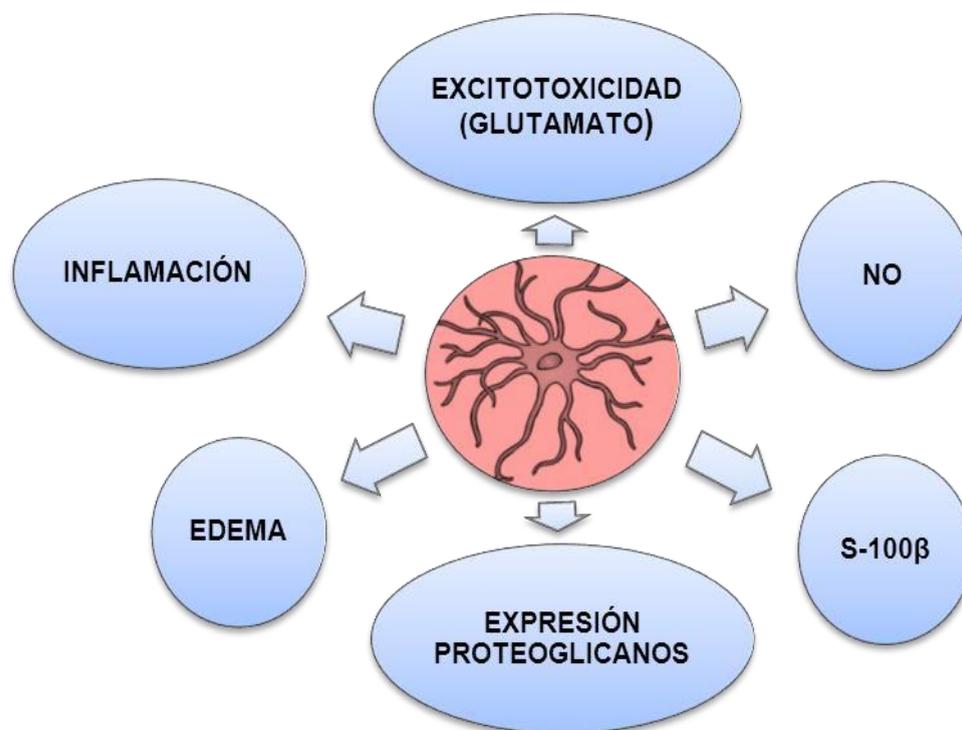


Figura 1.4. Efectos nocivos de los astrocitos en pacientes con DCA. NO: óxido nítrico.

1.3. MARCADORES BIOLÓGICOS

Un marcador biológico o biomarcador es una característica que se puede medir objetivamente y que puede actuar como indicador de procesos biológicos normales, de procesos patológicos o de respuestas biológicas a intervenciones terapéuticas (Atkinson y cols., 2000). El estudio de marcadores específicos de lesiones orgánicas tiene una larga trayectoria (Ingebrigtsen y Rommer, 2002). Uno de los ejemplos clásicos es el infarto de miocardio donde el daño tisular puede ser evaluado mediante las determinaciones séricas de proteínas cardíacas como la troponina. Sin embargo en el caso del DCA el interés por encontrar marcadores es relativamente reciente. En los últimos años, diversos investigadores han intentado desarrollar marcadores que permitan estratificar la severidad del daño cerebral, identificar los pacientes con un alto riesgo de mortalidad y morbilidad, detectar de forma precoz las complicaciones y evaluar la respuesta al tratamiento. Por ello, estamos asistiendo a un aumento exponencial de investigaciones relacionadas con los marcadores de daño cerebral. Las bases de datos ilustran esta realidad. La estrategia de búsqueda bibliográfica en PubMed con los términos MeSH *biomarker* AND *brain injury* muestra más de 1200 publicaciones durante el periodo de tiempo comprendido entre 2002-2011. La distribución de esas publicaciones en el tiempo está reflejada en la Figura 1.5.

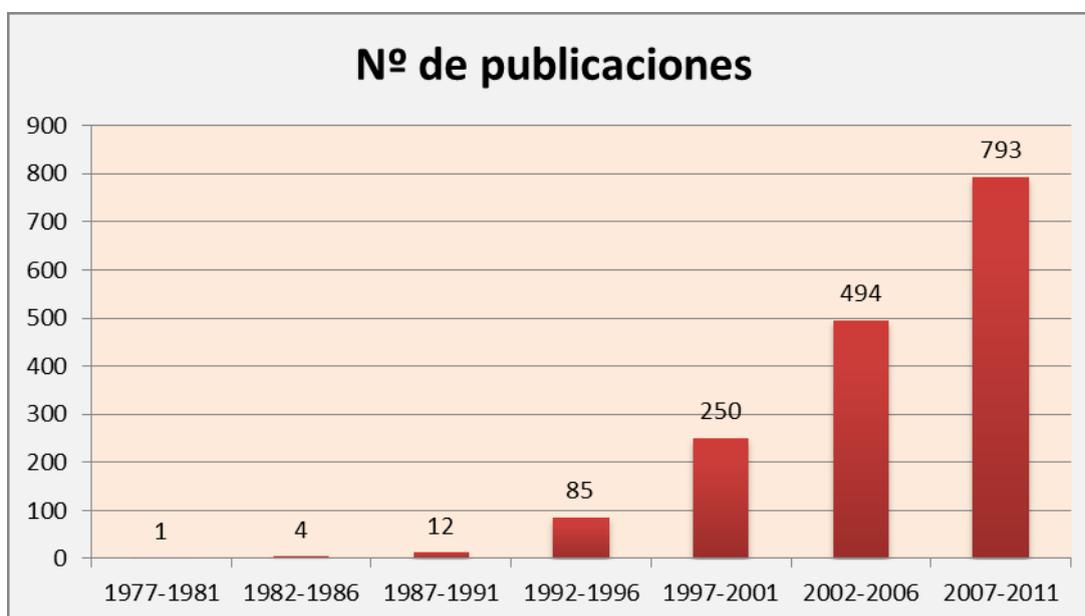


Figura 1.5. Número de publicaciones hallada en la base PubMed con los términos MeSH biomarker AND brain injury.

En 1983 Bakay y Ward describieron las características ideales que debería mostrar un biomarcador de daño cerebral. Para estos autores los marcadores biológicos de DCA deberían tener una alta especificidad para el cerebro y una alta sensibilidad para detectar el daño cerebral, elevarse sólo tras la destrucción irreversible del tejido cerebral y aparecer en sangre de forma precoz. Es importante que la variabilidad interpersonal sea mínima. El análisis debería poder hacerse de forma inmediata y su resultado debería ser rápido y fidedigno. No hay que olvidar, que dicho biomarcador debería ser relevante en la práctica clínica diaria.

A pesar de los avances en la medicina, todavía hay muchos aspectos del paciente neurocrítico pendientes de dilucidar. La identificación de

marcadores biológicos en el contexto del DCA, permitiría mejorar la precisión del diagnóstico y pronóstico, sería de utilidad en la toma de decisiones terapéuticas y ayudaría a evaluar la respuesta al tratamiento (Figura 1.6) (Wang y cols., 2005). Estos marcadores deberían informar no sólo de la existencia del daño cerebral y su extensión, si no que además deberían ser capaces de detectar la lesión cerebral secundaria y la aparición de nuevas complicaciones cerebrales. El entendimiento de la respuesta fisiológica al daño cerebral, así como el conocimiento de los factores protectores o nocivos puede ayudar a desarrollar nuevas terapias que mejoren el pronóstico de los pacientes. Los resultados del DCA son variables y no son fácilmente predecibles. Conocer el pronóstico es importante para la toma de decisiones, para la planificación del tratamiento y rehabilitación y para la comunicación con el paciente y su familia. Varios estudios sugieren que los biomarcadores de afectación cerebral pueden ser potencialmente útiles como factores pronósticos en el DCA (Wilson y Montgomery, 2007).

El daño cerebral es un proceso complejo en el que interaccionan distintas moléculas, dando lugar a diferentes procesos biológicos que no están perfectamente definidos. Son numerosas las líneas de investigación que se están realizando a este respecto, describiéndose diversos biomarcadores de lesión cerebral aguda (Ingebrigtsen y Romner, 2002; Begaz y cols., 2006; Wilson y Montgomery, 2007; Kochanek y cols., 2008; Kowëdsi y cols., 2010).

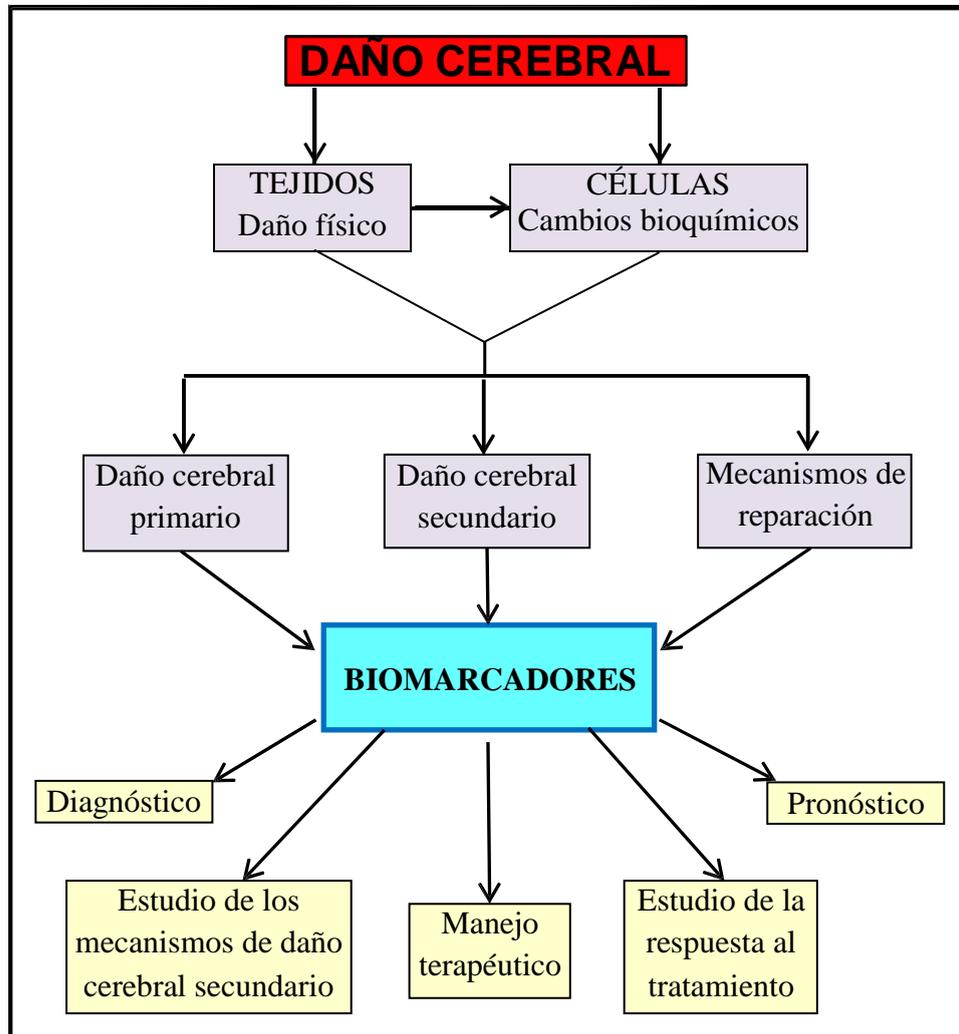


Figura 1.6. Uso potencial de los biomarcadores en cuidados neurointensivos.

Dado que la gran variabilidad en los resultados, no puede explicarse sólo por la severidad del daño y las comorbilidades del paciente, algunos autores han propuesto que los factores genéticos pueden tener un importante papel en la respuesta fisiopatológica al daño cerebral y por ello se están estudiando diferentes polimorfismos, como por ejemplo la ApoE

(Nathoo y cols., 2003; Waters y Nicoll, 2005; Houlden y cols., 2006; Martínez-González y cols., 2006; Ariza y cols., 2006; Willemse-van Son y cols., 2008).

Uno de los procesos que tiene lugar en los pacientes con DCA y que contribuye a la aparición de la lesión cerebral secundaria es la inflamación. Por ésta razón, algunos investigadores han estudiado como biomarcadores diferentes factores relacionados con la respuesta inflamatoria al insulto cerebral (Miñambres y cols., 2003; Gopcevic y cols., 2007). Diferentes grupos han centrado su interés en el estudio de los mecanismos de muerte celular, lo cual puede representar el primer paso para la identificación de moléculas que pudieran considerarse marcadores (Miñambres y cols., 2005; Ballesteros y cols., 2007; Miñambres y cols., 2008a). Numerosas líneas de investigación han intentado predecir los resultados analizando diferentes proteínas que se expresan fundamentalmente en el cerebro y que son liberadas predominantemente por las células cerebrales dañadas. Las proteínas que más interés han despertado son la proteína S100B, la proteína básica de mielina, la enolasa neuronal específica y fragmentos proteolíticos de microtúbulos asociados a proteínas Tau (De Kruijk y cols., 2001; Ingebrigtsen y Romner, 2002; Geyer y cols., 2009; Kövesdi y cols., 2010; Vos y cols., 2010). El estudio de los biomarcadores de DCA está en pleno desarrollo y su utilidad en la práctica clínica futura todavía está por determinar (Mondello y cols., 2011).

1.3.1. Proteína S100B

La S100 es una proteína dimérica perteneciente a la familia de proteínas fijadoras del calcio (Zimmer y cols., 1995; Donato, 2001). Tiene un bajo peso molecular de (9-13 kilodaltons) (Kleindienst y cols., 2007). Fue aislada por primera vez en 1965 por Moore y la llamó S100 porque tenía una solubilidad del 100% en sulfato de amonio. En 1978 Isobe y cols. demostraron la existencia de dos proteínas diferentes: la S100 α y S100 β . Más tarde se modificó la nomenclatura: S100 α pasó a llamarse S100A1 y S100 β pasó a llamarse S100B (Schafer y cols., 1995). Posteriormente se han ido identificando más de 20 miembros de la familia S100 (Donato, 2003; Michetti y cols., 2012). Estas proteínas se caracterizan por tener 2 regiones de unión al calcio. Además algunos miembros de la familia S100 presentan sitios de unión con el zinc y/o cobre, por lo que se cree que estos metales pueden tener algún papel en su actividad biológica (Michetti y cols., 2012).

Las mayoría de las proteínas S100 están codificadas en la región cromosómica 1q21 (Sedaghat y Notopoulos, 2008). Sin embargo el gen que codifica la proteína S100B está ubicado en la región 21q22 (Michetti y cols., 2012). En general, se suelen encontrar tres tipos de dímeros: 1 homodímero constituido por 2 isómeros S100A1 (S100A1A1), 1 heterodímero formado por la combinación de 1 isómero α y 1 isómero β (S100A1B) y por último 1 homodímero constituido por 2 isómeros S100B (S100BB). Habitualmente al heterodímero S100BB se le denomina S100B (Bloomfield y cols., 2007).

Hay una gran diversidad entre los distintos miembros de la familia de proteínas S100 y ello probablemente explique la amplia variedad de procesos celulares en los que están involucradas. A través de su interacción con distintos efectores intervienen en la contracción, motilidad, crecimiento celular, diferenciación celular, organización de la membrana celular... (Sedaghat y Notopoulos, 2008).

1.3.1.1. Producción de la proteína S100B

La producción de la proteína S100B puede ser intracerebral o extracerebral. En el SNC se encuentra fundamentalmente en el interior de los astrocitos, los cuales parecen desempeñar un importante papel en la fisiopatología del daño cerebral, tal como se ha descrito con anterioridad. También puede hallarse en otras células como los oligodendrocitos, células de Schwann, células ependimales, e incluso puede estar en neuronas (Kleindienst y cols., 2007). Por otro lado, varios estudios demuestran la producción extracerebral de la S100B. Puede encontrarse en melanocitos, células de Langerhans, condrocitos, células dendríticas de órganos linfoides, células satélite de la médula suprarrenal, células de Leyding, células satélite de músculo esquelético y adipocitos (Arcuri y cols., 2002; Tubaro y cols., 2010). Michetti y cols. (1983) realizaron un estudio en ratas y observaron sólo en el tejido adiposo alcanza una concentración comparable al sistema nervioso. Posteriormente, Haimoto y cols. (1987) estudiaron la distribución

de las proteínas S100A y S100B en diferentes tejidos humanos y observaron que la concentración de la proteína S100B en células nerviosas era de 3500 ng/ml, mientras que en otras células como los adipocitos y los condrocitos era muy inferior (100-200 ng/ml).

1.3.1.2. Liberación de la proteína S100B

Hay varios estudios experimentales que muestran que la S100B es secretada desde la astroglia, sin embargo el mecanismo exacto de liberación no se conoce. Se han descrito diferentes mecanismos de liberación (Shasboua y cols., 1984). En 1990 Whitaker-Azmitia y cols., apreciaron que la serotonina al estimular los receptores 5-HT_{1A} de la astroglia podía aumentar la liberación de esta proteína. También la hormona adrenocorticotrópica puede inducir su liberación. En el DCA se han realizado múltiples estudios para identificar el mecanismo por el que se produce la liberación de la proteína S100B. Inicialmente se pensaba que la S100B pasaba al espacio extracelular por ruptura de la célula. Ellis y cols. (1995) realizaron estudios microscópicos de cultivos de astrocitos y observaron que inmediatamente después del daño celular y alteración de la permeabilidad celular, se producía la liberación de S100B. Más tarde, en 1999, Ciccarelli y cols. observaron que el tejido cerebral dañado inducía la liberación de ATP y glutamato y éstos activaban receptores localizados en los astrocitos, lo cual inducía la liberación de S100B. En diferentes estudios experimentales se ha

observado que el aumento de esta proteína puede aparecer unos segundos después del daño y posteriormente continuar aumentando hasta 48 horas después de la agresión (Ellis y cols., 1995; Slemmer y cols., 2002; Willoughby y cols., 2004). Seguramente no hay un único mecanismo que induzca su liberación durante la lesión cerebral aguda. Probablemente la liberación de esta proteína es una respuesta metabólica a corto y medio plazo del daño cerebral e incluso puede que su liberación se autoperpetúe.

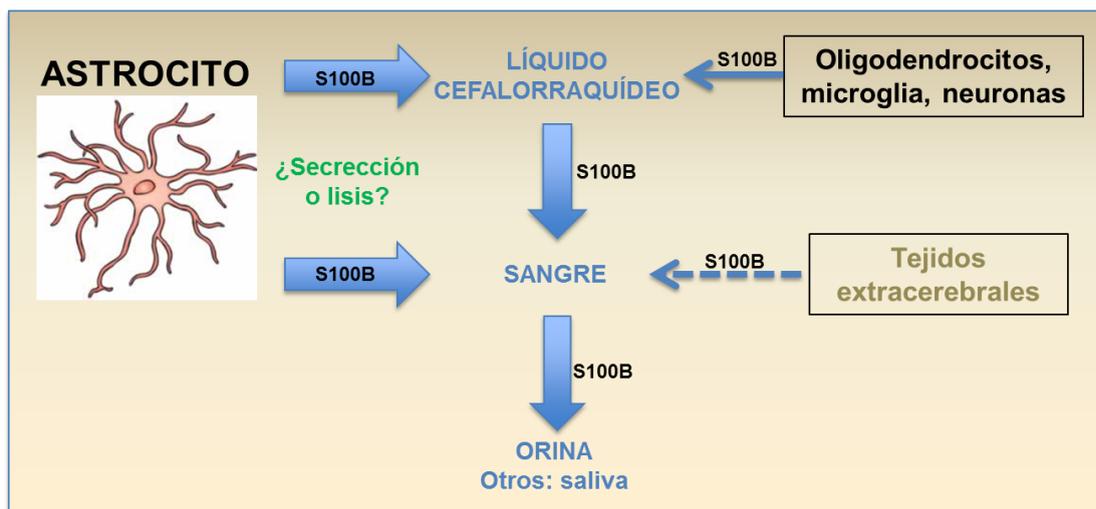


Figura 1.7. Cinética de la proteína S100B.

La S100B puede ser liberada al espacio intracelular y al espacio extracelular próximo al tejido cerebral dañado (Petzold y cols., 2003). Y posteriormente puede pasar a la sangre a través de la BHE dañada. También puede pasar al líquido cefalorraquídeo y luego a la sangre a través

de las vellosidades aracnoideas. La vida media de la S100B varía de 20 a 113 minutos y es eliminada por vía renal (Figura 1.7).

1.3.1.3. Determinación de la proteína S100B

Tabla 1.2. Relación de entidades en las que se ha estudiado la S100B en muestras sanguíneas.

Entidad clínica	Tipo de muestra	Referencia
DCA	Sanguíneas	Elting y cols., 2000
	Sanguíneas	Regner, 2001
	Sanguíneas	Savola, 2004
	Sanguíneas	Foerch y cols., 2005
	Sanguíneas	Beer y cols., 2010
Cardiopatía	Sanguíneas	Missler y cols., 2002
	Sanguíneas	Mazzini y cols., 2007
	Sanguíneas	Li y cols., 2011
Metástasis cerebrales	Sanguíneas	Vogelbaum y cols., 2005
Melanoma	Sanguíneas	Bouwuis y cols., 2011
Enfermedades psiquiátricas	Sanguíneas	Lara y cols., 2001
	Sanguíneas	Rothermundt y cols., 2001
	Sanguíneas	Machado-Vieira y cols., 2002
	Sanguíneas	Andreazza y cols., 2007
Obesidad	Sanguíneas	Steiner y cols., 2010

Tabla 1.3. Relación de entidades en las que se ha estudiado la S100B en muestras de orina.

Entidad clínica	Tipo de muestra	Referencia
DCA	LCR	Persson y cols., 1987
	LCR	Aurell y cols., 1991
Enf Alzheimer	LCR	Peskind, 2001
Enf psiquiátric	LCR	Rothermundt y cols., 2004
	LCR	Graabe y cols., 2001
Esclerosis	LCR	Massaro, 1985

LCR: líquido cefalorraquídeo.

La S100B se ha cuantificado en diferentes muestras biológicas (Michetti y cols., 2012). En la mayor parte de los estudios ha sido determinada en sangre venosa central o periférica. Se ha objetivado incremento de la S100B sanguínea en pacientes con daño cerebral agudo, cardiopatía, metástasis cerebrales, melanoma, patología psiquiátrica u obesidad (Tabla 1.2). También hay estudios en los que se ha medido la concentración de la proteína S100B en líquido cefalorraquídeo y se ha visto que está aumentada en pacientes con DCA, tumores cerebrales, trastornos psiquiátricos, enfermedad de Alzheimer o esclerosis (Tabla 1.3). Otras muestras biológicas en las que se ha analizado la proteína S100B son la orina (Gazzolo y cols., 2003a; Gazzolo y cols., 2009; Gazzolo y cols., 2010; Liu y cols., 2010), la saliva (Michetti y cols., 2011), el líquido amniótico (Tort

y cols., 2004; Florio y cols., 2004) y la leche materna (Gazzolo y cols., 2003b).

1.3.1.4. Funciones de la proteína S100B

El papel de la proteína S100B en el interior de las células todavía no está claro. A nivel intracelular parece que puede interactuar con el citoesqueleto, afectar diversas actividades enzimáticas, regular la homeostasis del calcio e intervenir en la diferenciación, proliferación y supervivencia/muerte celular (Mbele y cols., 2002; Raponi y cols., 2007; Tsoporis y cols., 2009).

Una vez secretada, la proteína S100B tiene funciones autocrinas y paracrinas. Su acción es dosis dependiente. A bajas concentraciones (nanomolar) parece que tiene un efecto neuroprotector y neurotrófico. Diversos estudios sugieren que a concentraciones nanomolares promueve el crecimiento y disminuye el estrés oxidativo, la muerte neuronal y la disfunción mitocondrial (Ahlemeyer y cols., 2000; Brewton y cols., 2001; Businaro y cols., 2006; Kleindienst y Ross Bullock, 2006). A concentraciones más elevadas (micromolares) puede activar los astrocitos y microglia, inducir la activación de la óxido-nítrico sintetasa, favorecer la liberación del óxido nítrico por parte de los astrocitos, afectar la homeostasis del calcio, alterar la homeostasis de lípidos e inducir la muerte celular (Huttunen y cols., 2000; Petrova y cols., 2000; Adami y cols., 2001; Esposito y cols., 2008;

Shanmugam y cols., 2008; Bernardini y cols., 2010; Bianchi y cols., 2010; Reali y cols., 2012). Parece que también interviene en la cascada inflamatoria, aunque su papel no está claramente esclarecido. Varios autores consideran que la proteína S100B tiene una actividad proinflamatorio (Adami y cols., 2001; Koppal y cols., 2001), aunque también hay algunos que han descrito un posible papel antiinflamatorio (Sorci y cols., 2011). A nivel de los melanocitos parece que puede inducir la proliferación de determinadas líneas celulares del melanoma (Klein y cols., 1989). En definitiva, actualmente hay muchos aspectos acerca del metabolismo y comportamiento de la proteína S100B que necesitan ser aclarados.

1.4. DRENAJE VENOSO CEREBRAL

Conocer los aspectos básicos de la anatomía y de la circulación cerebral es fundamental para el manejo del paciente neurocrítico. Los sistemas de drenaje venoso pueden apreciarse en las fases venosas de los estudios angiográficos (Figura 1.8). Las venas del encéfalo no tienen tejido muscular en sus delgadas paredes y no poseen válvulas. Salen del encéfalo y se ubican en el espacio subaracnoideo. Perforan las aracnoides y la capa meníngea de la duramadre y drenan en los senos venosos craneales (Snell, 1999).

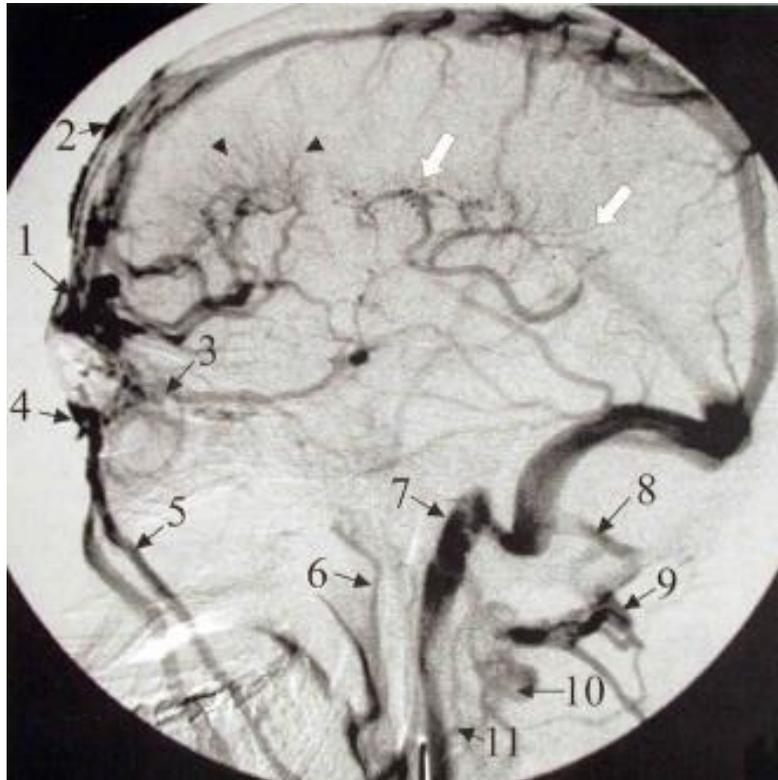


Figura 1.8. Angiografía por carótida interna derecha, fase venosa, visión lateral. 1: Senos pericraneales; 2: Venas frontales; 3: Vena oftálmica superior; 4: Vena angular; 5: Vena facial anterior; 6: Vena facial posterior; 7: Bulbo de la vena yugular interna; 8: Vena emisaria; 9: Plexos venosos suboccipitales; 10: Plexos venosos transversales; 11: Vena yugular externa. (Osborn, 1999).

Entre 8 y 12 pares de venas corticales pasan por la superficie medial y convexa de cerebro y se vacían en el seno sagital superior. Además profundizan por debajo de la capa cortical y establecen comunicaciones con las venas cerebrales internas (Stocchetti, 1996). El seno sagital superior o también llamado longitudinal superior se ubica en toda la línea media y va desde el polo frontal hasta la prominencia occipital. Allí confluye en la

denominada prensa de Herófilo o tórcula. Este seno forma unos espacios denominados lagunas venosas, cuando las venas meníngeas confluyen en él.

La vena cerebral media superficial drena la superficie lateral del hemisferio cerebral. Ésta vena transcurre por la cisura silviana y se vacía en el seno cavernoso. Los senos cavernosos se sitúan a los lados de la silla turca y se comunican entre sí gracias a los senos intercavernosos. Los senos cavernosos comunican anteriormente con el seno esfeno-parietal y la vena oftálmica y posteriormente con el seno basilar. La vena anastomótica superior o de Trolard cruza la superficie de los lóbulos frontal y parietal, creando una anastomosis entre la vena vertebral media superficial y el seno sagital superior. La vena anastomótica inferior o de Labbe cruza el temporal uniendo las venas cerebrales medias superficiales con el seno transversal. A veces la vena de Trolard y la vena de Labbe pueden estar duplicadas. La vena silviana superficial une la vena de Trolard y la vena de Labbe con el seno esfenoparital, aunque a veces pasa directamente al seno cavernoso. Los senos transversos discurren paralelos al borde externo tentorial y a nivel de la cresta de la pirámide petrosa desde la prominencia occipital. Confluyen junto al seno petroso superior para formar los senos sigmoideos. Estos senos discurren por el borde inferior del peñasco y al unirse con el seno petroso inferior entran en el foramen yugular para formar la vena yugular interna (golfo o bulbo de la vena yugular) (Krayenbühl y Yasargil, 1968; Osborn, 1999). Los senos transversos no son especulares, si no que el seno

transverso derecho suele ser mayor que el izquierdo. Hatiboglu y Anil (1992) objetivaron que el seno lateral era mayor en el lado derecho en el 62% de las personas, en el lado izquierdo en el 26% y era igual en ambos lados en el 12% de las personas. Mientras que el seno transverso derecho recibe el drenaje del seno longitudinal superior, el izquierdo recibe el drenaje del seno recto. Esto debe tenerse en cuenta en la monitorización de la yugular, ya que a la vena yugular interna drenan los senos sigmoides, por lo que la yugular derecha representa el drenaje cortical y la izquierda el profundo (Rubiano y Salas, 2008).

Las venas de la superficie inferior del lóbulo frontal conectan parcialmente con el seno longitudinal inferior y con el seno cavernoso. El seno longitudinal o sagital inferior va anterior al cuerpo calloso desde el borde inferior de la hoz cerebral al seno recto. Recoge sobretodo el drenaje de las venas pericallosas. El seno recto se origina a nivel del esplenio del cuerpo calloso, en la confluencia de la vena de Galeno y del seno longitudinal inferior. Transcurre en sentido portero-inferior hasta confluir generalmente en el seno transverso izquierdo.

Las venas temporales inferiores drenan parcialmente al seno transverso y al seno petroso superior. Los senos petrosos superiores discurren junto al tentorio por el borde del peñasco y comunican lateralmente con la confluencia del seno transverso y el seno sigmoide y medialmente con el seno cavernoso.

La superficie occipital inferior tiene una gran vena (vena cerebral posterior) que transcurre sobre el pedúnculo cerebral hasta unirse con la gran vena cerebral de Galeno, justo antes de que este último entre en el seno recto (Stocchetti, 1996).

El par de venas cerebrales internas, una de cada hemisferio, al unirse forman la gran vena cerebral. Esta última recibe la gran vena cerebral posterior y las venas de la superficie superior del cerebelo, fluyendo después en el seno recto. El par de venas cerebrales internas se forman por detrás del foramen de Monro por la confluencia de la vena coroidea y la vena terminalis. La vena cerebral posterior también recibe la vena basal, la vena talámica y las venas del plexo coroideo del tercer ventrículo, cuerpo caloso, región pineal y área del cuerno posterior del ventrículo lateral. La vena terminalis drena la región del cuerpo estriado, tálamo, fornix, septum pellucidum y el cuerno anterior del ventrículo lateral. La vena coroidea drena el plexo coroideo del ventrículo lateral, el hipocampo, el cuerno inferior del ventrículo lateral, el fornix y en parte el cuerpo caloso. La vena basal drena la ínsula, el opérculo, el cuerpo estriado, la vena cerebral anterior y estructuras interpedunculares (Stocchetti, 1996).

Las venas cerebelosas se dividen en dos grupos, uno superior y otro inferior. El inferior es mayor que el superior y aboca parcialmente en los senos petroso, transverso y occipital. Las venas cerebelosas superiores drenan parcialmente al seno recto, transverso y petroso superior. Las venas medulares y pontinas terminan en los senos petrosos inferior y transverso.

Los principales senos duros al unirse forman la prensa de Herófilo. Así, el seno longitudinal superior y el seno recto, representan la unión del seno sagital superior y la gran vena cerebral. Los dos senos sigmoideos laterales se originan en la región torcular, alcanzando finalmente el bulbo yugular. También los senos circular y cavernoso, en la base del cráneo, tienen comunicación libre de un lado a otro a través del seno petroso al bulbo de la vena yugular. El seno basilar es una red venosa que descansa sobre el *clivus*, y se comunica con el seno cavernoso permitiendo la comunicación de los dos grupos de senos venosos, tanto superiores como inferiores (Osborn, 1999; Stocchetti, 1996; Rubiano y Salas, 2008).

En resumen, el sistema de drenaje cerebral está compuesto por múltiples venas de mayor o menor calibre que, en última instancia, acaban desembocando en el bulbo de la vena yugular interna del hemisferio cerebral correspondiente (Figura 1.9). Por esa razón las muestras de sangre del retorno venoso se convierten en una fuente de medición de diferentes parámetros que informan de los eventos que acontecen en un tejido cerebral agredido por un insulto traumático, isquémico, hipóxico o metabólico. De modo mayoritario, la circulación venosa cerebral superficial y profunda drena en el lado derecho, especialmente a través del seno sagital o longitudinal superior, el cual desemboca en el lado derecho hasta un 70% de las veces. Del total de la sangre que llega al bulbo de la vena yugular 2/3 provienen del hemisferio ipsilateral, y 1/3 del hemisferio contralateral (Shenkin y cols., 1948; Stocchetti, 1996). No hay que olvidar que el drenaje venoso cerebral

tiene multitud de comunicaciones, con vías extracerebrales. Se trata de las venas emisarias (frontal, parietal y mastoidea), las venas que atraviesan los forámenes de la base del cráneo de las órbitas y las venas que comunican con los plexos pterigoideos. A pesar de ello, en términos cuantitativos la contribución sobre el flujo cerebral total es insignificante, aproximadamente un 2% (Krayenbühl y Yasargil, 1968; Stocchetti, 1996). Hace 6 décadas Gibbs y cols. (1942) realizaron mediciones de las diferencias del contenido de oxígeno entre la sangre arterial y la sangre procedente del bulbo de la vena yugular, constituyendo el primer paso para el conocimiento y el control del metabolismo cerebral. En la actualidad, la obtención de muestras sanguíneas del bulbo de la vena yugular en los pacientes con un daño cerebral agudo es una actividad rutinaria en las unidades de pacientes neurocríticos. En función de la información obtenida de las muestras sanguíneas procedentes del bulbo de la yugular interna se pueden adoptar distintas decisiones terapéuticas (Robertson y cols., 1989; Cruz y cols., 1991; Dearden, 1991; Cruz, 1992; Cruz y cols., 1992; Sheinberg y cols., 1992; Díaz-Regañón y cols., 1998; Díaz-Regañón y cols., 2002). Muchas líneas de investigación se llevan a cabo a partir del análisis de la sangre procedente del bulbo de la vena yugular interna (Miñambres y cols., 2003; Miñambres y cols., 2005; Ballesteros y cols., 2007; Bouvier y cols., 2012).

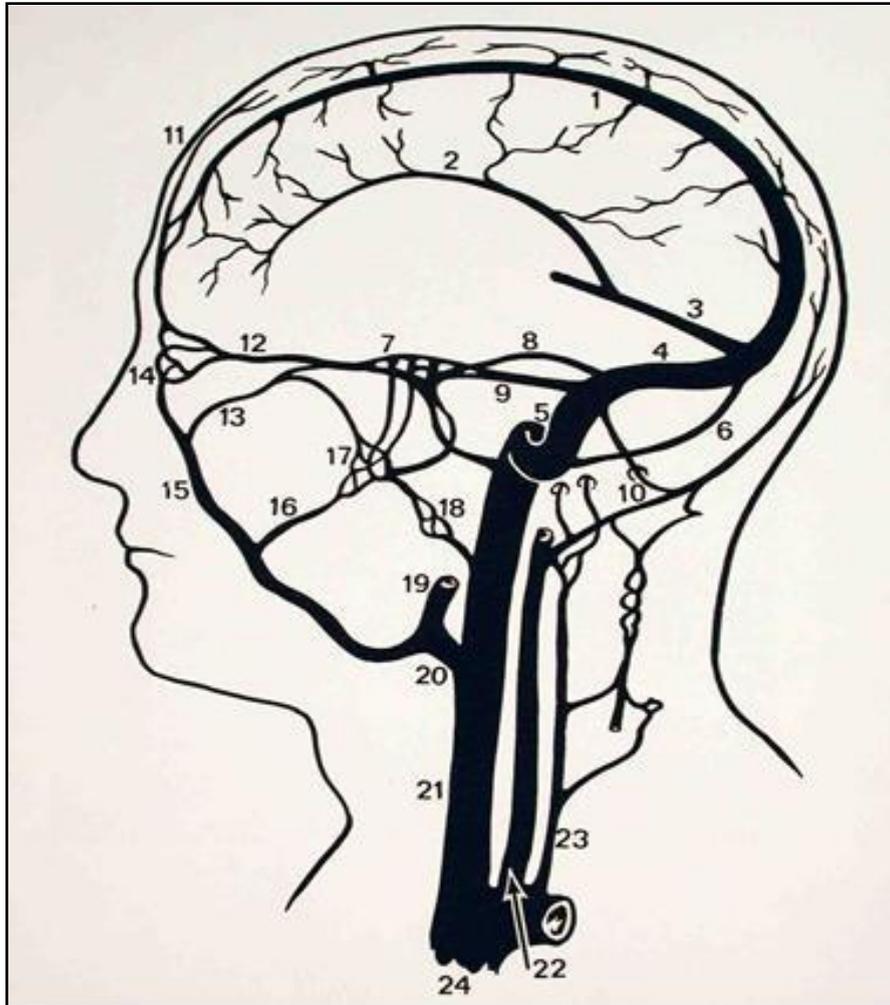


Figura 1.9. Drenaje venoso cerebral. 1: Seno sagital superior; 2: Seno sagital inferior; 3: Seno recto; 4: Seno transverso; 5: Seno sigmoideo; 6: Seno occipital; 7: Seno cavernoso; 8: Seno petroso superior; 9: Seno petroso inferior; 10: Venas emisarias; 11: Venas frontales; 12: Vena oftálmica superior; 13: Vena oftálmica inferior; 14: Vena angular; 15: Vena facial anterior; 16: vena facial profunda; 17: Plexos venosos pterigoideos; 18: Plexos venosos faríngeos; 19: Vena facial posterior; 20: Vena facial común; 21: Vena yugular interna; 22: Vena yugular externa; 23: Vena vertebral; 24: Vena subclavia. (Osborn, 1999).

1.5. APLICACIÓN DEL ESTUDIO DEL DRENAJE VENOSO CEREBRAL EN NEUROCRÍTICOS

La monitorización continua de los pacientes con patología neurológica cuyo denominador común es la isquemia o hiperemia cerebral grave es de gran valor en el abordaje diagnóstico y terapéutico (Ballesteros-Flores y cols., 2011). En el manejo del DCA es importante detectar y prevenir el déficit de oxígeno en el cerebro. De hecho uno de los objetivos a conseguir es restaurar de forma precoz y constante una adecuada oxigenación del parénquima cerebral para proporcionar un medio favorable que favorezca la recuperación del tejido cerebral con daño reversible. La monitorización de las funciones neurológicas y del metabolismo cerebral en pacientes con lesiones cerebrales puede ser difícil. En la actualidad existen diferentes métodos que pueden ser invasivos o no invasivos, o bien globales o regionales (Tabla 1.4) (Ciro, 2008). Todos estos métodos permiten detectar el metabolismo cerebral, valorar el flujo sanguíneo cerebral y evaluar el pronóstico (Lynne y cols., 2006; Bhatia y cols., 2007; Bullock y cols., 2007). A pesar de esta diversidad en herramientas de monitorización, ningún sistema ha demostrado superioridad clara sobre el resto, sino que en realidad todos ellos se complementan. La neuromonitorización multimodal surge en respuesta a las diferentes situaciones en las que el examen clínico del paciente no es suficiente para el correcto manejo diagnóstico-terapéutico.

Tabla 1.4. Técnicas de neuromonitorización.

MONITORIZACIÓN GLOBAL	MONITORIZACIÓN LOCAL
Presión intracraneal	Presión intracraneal parenquimatosa
Oximetría yugular	Microdiálisis cerebral
Electroencefalograma	Presión tisular de oxígeno
Potenciales evocados	EcoDoppler transcraneal
TAC, RMN, Arteriografía, Ganmagrafía	Espectroscopia cercana al infrarrojo
Mediciones sanguíneas de productos de liberación encefálica	Técnicas de flujo regional (Xenón 133, flujometría laser doppler...)

TAC: tomografía axial computarizada; RMN: resonancia magnética nuclear.

1.5.1. Oximetría yugular

La monitorización de la oxigenación cerebral puede aportar información sobre la situación del paciente y puede ayudar en el manejo del mismo. La oximetría yugular es una de las primeras técnicas que se empleó para valorar la isquemia cerebral. La medición de la saturación venosa yugular (S_{vyO_2}), a través de un catéter en el golfo de la vena yugular, brinda información del metabolismo cerebral, ya que mide la relación entre el flujo sanguíneo cerebral (FSC) y la tasa metabólica cerebral de oxígeno ($TMCO_2$) (Ballesteros-Flores y cols., 2011). La S_{vyO_2} fue determinada por primera vez por Gibbs en 1942. En 1963 fue validada por Datsur. Las primeras determinaciones de la S_{vyO_2} se obtuvieron por punción directa de la vena

yugular interna (1 cm por debajo y delante de la mastoides) (Rubiano y cols., 2008). Posteriormente se realizó la cateterización por técnica de Sheldinger y finalmente se incorporó el uso de fibra óptica que permitió la monitorización continua (Dearden y Midgley, 1993).

Las diferencias anatómicas que presenta el drenaje venoso condicionan que la decisión del lado a canalizar no sea indiferente, debiendo individualizarse cada caso. Se han realizado estudios en los que se han colocado catéteres yugulares bilaterales y se ha observado que puede haber diferencias de hasta un 10% entre ambos valores (Stochetti y cols., 1994). Una de las formas de elegir el lado a canalizar es comprimir cada una de las venas yugulares internas y evaluar la elevación de la presión intracraneal (PIC). Se canaliza la yugular cuya compresión eleva más la PIC, ya que es el lado de mayor drenaje venoso (Ciro, 2008). Otra forma de elegir el lado a canalizar es evaluando el flujo yugular con doppler venoso. En los pacientes con daño cerebral difuso la saturación tiende a ser similar en ambos lados, sin embargo en los pacientes con daño cerebral focal la diferencia de la SvO_2 entre ambas venas se incrementa (Davies y Lindley, 2010). Por ello, en pacientes con lesión unilateral se suele ubicar en el lado de la lesión.

En manos experimentadas la canulación retrograda de la vena yugular interna es un procedimiento simple y seguro. Tras colocar al paciente en posición supina y rotar la cabeza hacia el lado opuesto (neutral si existe lesión cervical) se realiza una meticulosa asepsia del cuello. Se inserta una aguja en el vértice de un triángulo creado por los dos vientres del

esternocleidomastoideo con un ángulo de 30° en relación con la piel. La aguja de punción se introduce en dirección cefálica hacia la apófisis mastoides ipsilateral hasta que se aspira sangre venosa. Luego se introduce la guía metálica (técnica de Seldinger) y se avanza a través de ella un catéter oximétrico de fibra óptica hasta el bulbo de la yugular (aproximadamente de 12 a 15 centímetros). Al chocar la punta del catéter con el domo del bulbo de la vena yugular se nota una resistencia. En ese momento se retira el catéter 1-2 cm, de modo que su extremo distal de dicho catéter se ubica en el mencionado bulbo (Hanson, 2009; Burón y cols., 2009). A este nivel el porcentaje de sangre extracerebral oscila entre 3-5%. Si la punta distal del catéter estuviera 3 cm por debajo del bulbo de la yugular el porcentaje de sangre extracraneal podría alcanzar el 20% (Rubiano y cols., 2008). Por ello, siempre se debe efectuar una prueba de imagen para confirmar la correcta colocación del catéter y valorar posibles complicaciones. Se puede realizar una radiografía anteroposterior o lateral de cuello. El catéter debe quedar por encima de la unión C1-C2 para minimizar la contaminación de la vena facial (Macmillan y Andrews, 2000). Además, si el tiempo de monitorización es largo, sería conveniente repetir control radiológico para asegurar que el catéter no se ha desplazado.

La $Sv\text{yO}_2$ puede ser medida mediante el principio de infrarrojos (Gopinath, 1994). Basándose en que la oxihemoglobina y la hemoglobina no oxigenada absorben la luz de forma diferente, el catéter emite una luz a 2 o 3 longitudes de onda y dispone de un detector fotoeléctrico que cuantifica la

cantidad de luz absorbida y determina el porcentaje de hemoglobina oxigenada.

Las complicaciones son infrecuentes. Entre ellas están las infecciones asociadas al catéter, la trombosis de la vena yugular y las relacionadas con la punción (punción arterial, hematoma) (Berlot y cols., 1996; Coplin y cols., 1997).

El cerebro representa el 2% del peso total del cuerpo, sin embargo recibe el 20% del volumen total de eyección del ventrículo izquierdo. En condiciones normales hay un mecanismo de autorregulación cerebral que permite que dentro de unos límites el flujo sanguíneo cerebral se adapte según las necesidades del cerebro. En pacientes con daño cerebral agudo es frecuente que este mecanismo de adaptación esté alterado.

Usando el principio de Fick se puede determinar de forma global la adaptación del flujo sanguíneo cerebral a las necesidades metabólicas del cerebro. La S_{vyO_2} depende de la saturación arterial, el flujo sanguíneo y la extracción cerebral de oxígeno (Macmillan y Andrews, 2000). La ecuación de Fick relaciona estas variables:

$$FSC = CMRO_2 / AVDO_2$$

FSG es el flujo sanguíneo cerebral

$CMRO_2$ es la tasa metabólica cerebral de oxígeno

$AVDO_2$ es la diferencia arteriovenosa de oxígeno.

$$AVDO_2 = 1,34 \times Hb \times [(Sat_aO_2 - S_{vyO_2}) / 100]$$

Para determinar la $AVDO_2$ es necesario determinar el valor de la hemoglobina (Hb), la saturación arterial de oxígeno (Sat_aO_2) y la saturación yugular de oxígeno ($SvyO_2$).

La utilización de la oximetría del bulbo de la vena yugular interna aporta una información determinante sobre la oxigenación cerebral. Hay debate acerca del valor normal de la $SvyO_2$. En general, se considera como límite inferior de la normalidad 50-54% (Cruz, 1988; Sheinberg y cols., 1992; Gopinath y cols., 1994; Lewis y cols., 1995; Poca y cols., 2005) y como límite superior 75%. Los valores de $SvyO_2 > 75\%$ se relacionan con hiperemia, es decir hay un exceso de flujo sanguíneo respecto a los requerimientos cerebrales. La hipoperfusión ($SvyO_2 < 55\%$) implica un flujo sanguíneo insuficiente para suplir las necesidades de oxígeno del cerebro. La caída de la $SvyO_2$ por debajo del 50% se relaciona con mal pronóstico y los valores superiores al 75% pueden en ocasiones deberse a una disminución del consumo por un coma barbitúrico, isquemia generalizada e incluso muerte encefálica (Cormio y cols., 1999; Fandino y cols., 2000; McMillan y cols., 2001; Díaz-Regañon y cols. 2002; Poca y cols., 2005; Haitisma y Maas, 2007). Es importante recordar que es una técnica que no debe interpretarse de forma aislada, sino en conjunto con otros sistemas de monitorización.

La colocación de un catéter de oximetría en el bulbo de la vena yugular interna no sólo aporta información de la oxigenación cerebral, si no que además permite tener acceso a la sangre venosa procedente del cerebro. En muestras sanguíneas procedentes del bulbo de la yugular se

han determinado diferentes mediadores con el fin de valorar los procesos fisiopatológicos que tienen lugar en el DCA. En este sentido se han realizado diferentes estudios que intentan evaluar la producción de mediadores inflamatorios por parte del cerebro en los pacientes con lesión cerebral aguda. Mc Keating y cols. (1997) objetivaron que existía una diferencia significativa entre los niveles de interleucina 6 (IL-6) en sangre procedente del bulbo de la yugular y sangre sistémica en pacientes con TCE o hemorragia subaracnoidea. De esta manera demostraron la producción de IL-6 en el cerebro tras un TCE o hemorragia subaracnoidea. Miñambres y cols. (2003) demostraron que la diferencia yugulo-sistémica de IL-6 se relaciona con el pronóstico del daño cerebral agudo. Murshid y Gader (2002) estudiaron mediadores de la hemostasia en pacientes con daño cerebral y vieron que los niveles medios de algunos de ellos, como por ejemplo el complejo trombina-antitrombina, eran mayores en sangre yugular que en sangre periférica. Ballesteros y cols. (2007) obtuvieron sangre del bulbo yugular de pacientes con DCA y observaron que ésta inducía la apoptosis de células neuronales PC12 y además vieron que el porcentaje de apoptosis era un factor predictor de mortalidad a los seis meses del DCA. En la actualidad muchas líneas de investigación se llevan a cabo a partir de las muestras sanguíneas procedentes del bulbo de la vena yugular interna.

2 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GENERALES

Los objetivos generales perseguidos son:

- Estudiar la relación de las determinaciones de S100B en muestras de sangre venosa procedente del bulbo de la yugular interna (muestras regionales) y sangre venosa procedente de aurícula derecha (muestras sistémicas), así como determinar su correlación con los resultados.
- Determinar si la ciclosporina y la hipotermia son capaces de inhibir la apoptosis neuronal en un modelo *in vitro*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. S100B

- Cuantificar la S100B en sangre venosa central y sangre procedente del bulbo de la yugular interna en enfermos con DCA.
- Valorar si existe correlación entre los niveles de S100B en muestras regionales y muestras sistémicas.

- Analizar si las determinaciones de S100B están influidas por el tipo de daño cerebral o el género del paciente.
- Determinar el perfil temporal de la S100B en pacientes con DCA.
- Analizar la relación entre determinaciones sanguíneas de S100B y la situación funcional al sexto mes del DCA, así como el desarrollo de muerte encefálica.
- Analizar la relación entre gradiente yugulo-sistémico de S100B y el desarrollo de muerte encefálica.

2.2.2. Modulación de la apoptosis

- Evaluar si la dopamina induce apoptosis en la línea celular SH-SY5Y.
- Investigar si la hipotermia puede inhibir la apoptosis inducida por dopamina en células SH-SY5Y.
- Analizar si la ciclosporina puede inhibir la inducción de apoptosis por parte de la dopamina en células SH-SY5Y.

3 JUSTIFICACIÓN

A pesar de los avances en las unidades de cuidados intensivos y de los esfuerzos por mejorar los resultados en los pacientes con DCA, el porcentaje de enfermos que fallecen o quedan con secuelas neurológicas graves es todavía alto. La aproximación al DCA a distintos niveles (celular, metabólico o genético) es importante para un mejor entendimiento que ayude a relacionar los procesos fisiopatológicos y las implicaciones clínicas que éstos conllevan. Los modelos experimentales en el DCA tienen un valor incuestionable en la investigación de mencionados procesos y en el desarrollo de estrategias terapéuticas

Los estudios *in vitro* permiten aislar los diferentes elementos que como consecuencia de los procesos que tienen lugar después de la agresión son liberados al espacio extracelular pasando posteriormente al torrente sanguíneo. La determinación de éstos, puede permitir en la práctica clínica una mejor comprensión de lo que está ocurriendo en el cerebro dañado e incluso, vaticinar el pronóstico de los pacientes con DCA. El uso de un biomarcador capaz de predecir los resultados y detectar de forma precoz las complicaciones podría ayudar a la toma de decisiones en el manejo de este tipo de pacientes. Uno de los elementos que aumenta durante la agresión cerebral y que puede pasar al torrente circulatorio es la S100B. Este trabajo

pretende valorar la utilidad en la práctica clínica de la determinación sanguínea de S100B como marcador del DCA.

El daño cerebral secundario contribuye de forma importante al empeoramiento del pronóstico de pacientes con DCA. De ahí el interés por identificar nuevas terapias que disminuyan su desarrollo. La apoptosis juega un papel importante en su génesis. Cuanto mayor es la tasa de apoptosis, mayor es el daño y peor el pronóstico de los pacientes. Los estudios *in vitro* permiten valorar los efectos a nivel celular de los distintos tratamientos que se utilizan en la práctica o son susceptibles de ser usados. Ello puede ayudar a establecer estrategias preventivas y terapéuticas que contribuyan a mejorar los resultados. En el presente trabajo se pretende evaluar la capacidad de la hipotermia y de la ciclosporina para modular la apoptosis en un modelo neuronal.

4 MATERIAL Y MÉTODOS

Los aspectos ético-legales planteados en el presente trabajo de investigación han sido sometidos a la aprobación del Comité de Ética e Investigación Clínica del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, que aprobó su realización.

4.1. PACIENTES

En el presente trabajo se han incluido los pacientes que fueron admitidos en la unidad de cuidados intensivos (UCI) del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla con DCA. Todos los enfermos incluidos en el estudio precisaron intubación orotraqueal por deterioro de su nivel de consciencia (ECG < 9). La gravedad del daño cerebral se confirmó mediante la realización de TAC. Todos los pacientes fueron sedados con midazolam y/o propofol en perfusión continua según necesidades. El fentanilo se empleó como analgésico en perfusión continua.

A todos los pacientes se les colocó como parte de la neuromonitorización un catéter en el bulbo de la vena yugular interna para la medida de la saturación de oxígeno de la hemoglobina, ipsilateral a la lesión,

cuando ésta era focal, y en el lado derecho, cuando era difusa (Opticath 5,5 F Abbott Laboratorio North Chicago IL. USA), siguiendo la técnica descrita por otros autores (Andrews y cols., 1991). La posición correcta del extremo, se confirmó mediante radiografía anteroposterior del cuello.

Los pacientes fueron atendidos por el equipo médico de intensivistas de la UCI, de modo independiente a la realización de este estudio.

Se solicitó el consentimiento informado a los familiares de los pacientes, para la obtención de las muestras sanguíneas procedentes del catéter localizado en bulbo de la vena yugular y procedentes del catéter venoso central (ANEXO I). En todos los pacientes la primera muestra sanguínea (muestra 0) se obtuvo en las primeras 8 horas tras el DCA.

Se obtuvieron muestras venosas periféricas de sujetos sanos, para su posterior comparación con los pacientes estudiados.

4.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Se descartaron los pacientes que presentaban alguna de las siguientes características:

- Menores de 14 años
- Daño de partes blandas o esquelético
- Neoplasias (tumores del SNC y melanoma)
- Enfermedades neurodegenerativas

4.3. RECOGIDA DE DATOS CLÍNICOS

De todos los pacientes se recogieron los datos de filiación (edad y sexo) y el tipo de DCA. Se recogió la estancia en UCI, la estancia hospitalaria, los días de ventilación mecánica, la mortalidad en UCI y la mortalidad hospitalaria fuera de UCI. Se cuantificaron los pacientes que presentaron muerte encefálica de acuerdo con los criterios clínicos y legales aceptados en España (Real Decreto, 1999).

Tabla 4.1. Escala de resultados de Glasgow (Jennet y Bond, 1975).

VALORACIÓN FUNCIONAL	PUNTUACIÓN
Buena recuperación. Se reincorpora a sus actividades normales. Pueden quedar déficit neurológicos o psicológicos menores.	5
Discapacidad moderada (discapacitado pero independiente). Independiente para las actividades de la vida diaria, aunque discapacitado como consecuencia de déficit como hemiparesia, disfasia, ataxia, alteraciones intelectuales, déficit de memoria o cambios de personalidad.	4
Discapacidad grave (consciente pero dependiente). Depende de otros para la vida cotidiana debido a déficits físicos, mentales o ambos.	3
Estado vegetativo persistente	2
Muerte	1

Se valoró el estado funcional de los pacientes a los 6 meses mediante la escala de resultados de Glasgow (Jennet y Bond, 1975) (Tabla 4.1).

La gravedad de los pacientes se valoró mediante 2 clasificaciones, la escala de coma de Glasgow (ECG) (Teasdale y cols., 1975) y el índice Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (Knaus, 1985) (Ver ANEXO II).

Tabla 4.2. Escala de coma de Glasgow (Teasdale y cols., 1974).

PARÁMETRO CLÍNICO	RESPUESTA	PUNTUACIÓN
Apertura ocular	Espontánea	4
	Al estímulo verbal	3
	Al estímulo doloroso	2
	Ninguna	1
Mejor respuesta verbal	Conversación orientada	5
	Conversación confusa	4
	Palabras inapropiadas	3
	Ruidos incomprensibles	2
	Ninguna	1
Mejor respuesta motora	Obedece Localiza	6
	el dolor Retira al	5
	dolor Flexión al	4
	dolor Extensión al	3
	dolor	2
	Ninguna	1

Se registró el tiempo de retraso desde el momento del DCA y la obtención de la primera muestra. Se valoró la presencia de sensores o drenajes intracraneales y se registró el momento de su colocación. También se tuvo en consideración la realización de cirugía intracraneal y el momento en el que ésta se realizó.

4.4. MUESTRAS SANGUÍNEAS

Se recogieron de forma simultánea 5 ml de sangre procedente del bulbo de la vena yugular interna (regional) y 5 ml de sangre procedente de un catéter venoso central (sistémica) en el momento de ingreso, a las 24, 48 y 72 h después. Se extrajo el suero mediante centrifugación de la muestra sanguínea a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se conservó a -40°C hasta su posterior utilización.

4.5. MEDICIÓN DE LA PROTEÍNA S100B

Las muestras de suero almacenadas se descongelaron a temperatura ambiente. Luego se cuantificó la concentración de proteína S100B mediante un test de electroquimioluminiscencia por el sistema de inmunoensayo Elecsys 2010 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Se siguieron las recomendaciones técnicas del fabricante para la realización del test. El

análisis de las muestras requirió 18 minutos. El límite superior e inferior detectable fue 0,005 y 39 µg/l, respectivamente. Los valores < 0,105 µg/l son considerados como normales por el fabricante, basándose en estudios previos.

4.6. SITUACIÓN FUNCIONAL Y PRONÓSTICO

Se analizó si existía correlación entre los diferentes niveles de S100B en sangre procedente del bulbo de la yugular y en sangre sistémica con la mortalidad en UCI, la mortalidad intrahospitalaria y la mortalidad a los 6 meses en los pacientes con DCA secundario a trauma o a hemorragia no traumática. También se comparó los niveles de S100B con el desarrollo o no de muerte encefálica.

Se evaluó la relación entre los niveles de S100B y la situación funcional de los pacientes a los 6 meses del DCA.

4.7. CULTIVOS CELULARES

Las células de cultivos de neuroblastoma muestran respuestas electrofisiológicas similares a las neuronas estándar, como la generación de potenciales de acción, síntesis de neurotransmisores... La SH-SY5Y es una línea derivada de células humanas utilizada en la investigación científica. Es

un clon de neuroblastoma humano proveniente de la sublínea celular SK-N-SH, la cual fue obtenida de un neuroblastoma metastásico humano de la cresta neural del sistema nervioso simpático (Raguenez y cols., 1999).

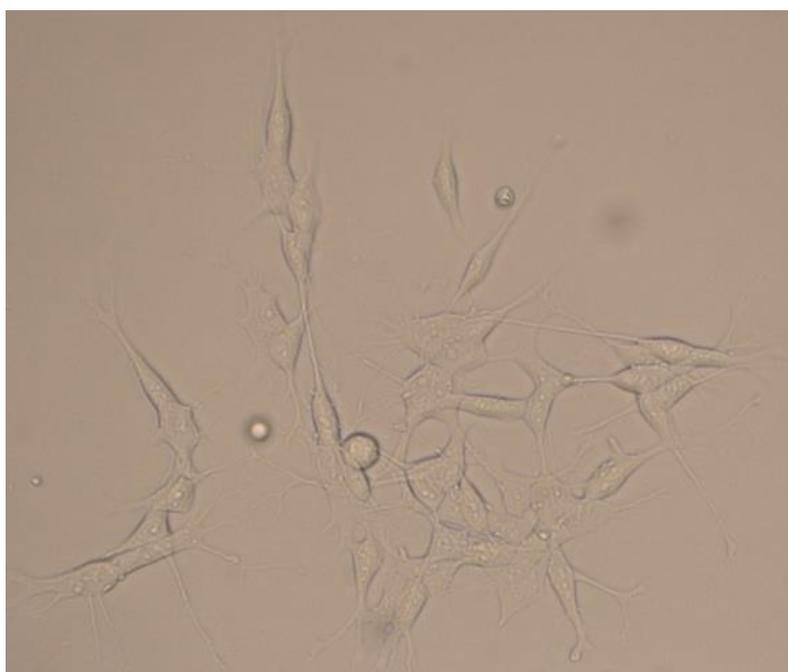


Figura 4.1. Células SH-SY5Y, a las 20 horas de cultivo con medio DMEN. Aumento 80x.

Para realizar los ensayos de apoptosis inducida por dopamina se utilizaron cultivos de células SH-SY5Y no diferenciadas. Para ello, las células SH-SY5Y se cultivaron en placas de 12 pocillos a una concentración de 1×10^5 / ml en DMEM suplementado con un 10% suero bovino fetal, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina en condiciones basales a 37°C en una atmósfera que contenía un 5% de CO₂ (Figura 4.1). El medio

fue cambiado cada 48-72 horas hasta que las células formaron una monocapa en cada pocillo (Figura 4.2). Alcanzado este momento se procedió a realizar los ensayos.

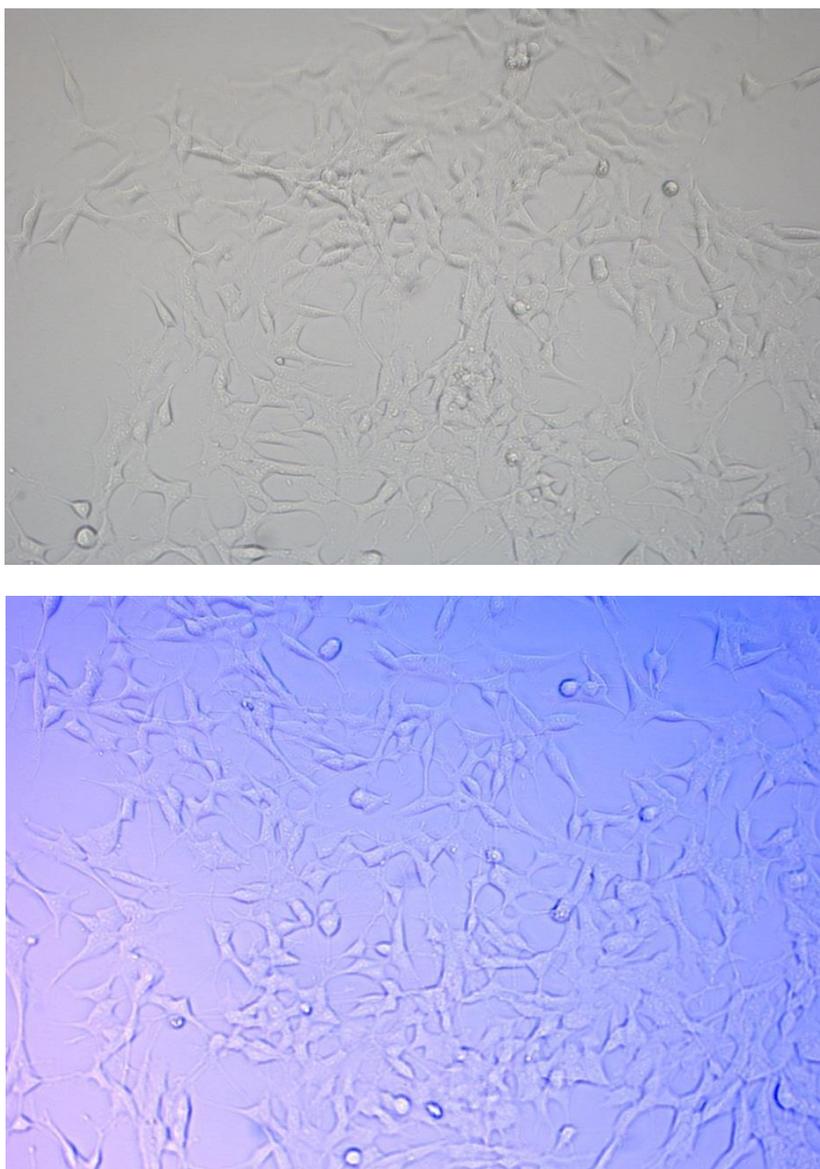


Figura 4.2. Células SH-SY5Y, a las 30 horas de cultivo. Aumento 40x.

4.7.1. Inducción de apoptosis en los cultivos celulares

Para realizar los experimentos de apoptosis inducida por dopamina, a la monocapa las células SH-SY5Y se añadió dopamina a diferentes concentraciones (50, 100 y 300 μM). Como control negativo, en algunos pocillos no se agregó dopamina. Las células así tratadas fueron cultivadas a 37°C con 5% de CO_2 . Al cabo de 24 horas, se realizaron los estudios de apoptosis por citometría de flujo.

4.7.2. Modulación de apoptosis en los cultivos celulares:

hipotermia y ciclosporina

Para evaluar los efectos de la hipotermia en la modulación de la apoptosis inducida por dopamina en las células SH-SY5Y, se realizaron cultivos paralelos de células tratados con dopamina a concentraciones de 100 μM y 300 μM . En cada una de las placas se incluyeron pocillos no tratados con dopamina como control negativo. Estos cultivos fueron sometidos a diferentes temperaturas de cultivo (32°C y 37°C) durante 24 horas. Después de este período de incubación, las células fueron recogidas de los pocillos para evaluar los porcentajes de células apoptóticas en cada condición. El porcentaje de células apoptóticas se cuantificó por citometría de flujo.

Para evaluar el efecto de la ciclosporina en la modulación de la apoptosis inducida por la dopamina, las células SH-SY5Y fueron incubadas

con ciclosporina a concentraciones de 1 μM o 10 μM durante 2 y 6 horas antes de ser tratadas con la dopamina. Después de este período de incubación, los cultivos fueron tratados con dopamina a una concentración de 100 μM , mantenidos a 37°C y con 5% de CO_2 durante 24 horas. Como control se utilizaron cultivos celulares sin ciclosporina tratadas con dopamina. Posteriormente se cuantificó el porcentaje de células apoptóticas por citometría de flujo.

En todos los experimentos, las diferentes condiciones de cultivo se ensayaron por triplicado.

4.8. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS

4.8.1. Método TUNEL

Las células apoptóticas fueron evaluadas por el método TUNEL (transferasa-mediated dUTP nick end labeling) basado en la detección del ADN internucleosomal fragmentado típico de apoptosis. Esta técnica es una de las más empleadas en la detección y cuantificación de la apoptosis.

La tinción TUNEL se efectuó siguiendo las especificaciones del fabricante. Las células a estudio fueron fijadas con paraformaldehído al 1% (Sigma-Aldrich) en una solución salina fosfatada (PBS, Phosphate Buffered Saline) a una concentración de $1-2 \times 10^6$ células/ml durante 1 hora en hielo. Después se efectuaron lavados con PBS. Luego fueron resuspendidas en

etanol frío al 70% y mantenidas durante 30 minutos o toda la noche a - 20°C. Antes de realizar la tinción las células se lavaron dos veces con PBS.

Se utilizaron control células positivas y negativas incluidas en el kit proporcionado por el fabricante. Fijadas las células SH-SY5Y y las células control fueron incubadas con la solución de tinción que contenía terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) durante una hora a 37°C. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS y centrifugadas. Al pellet resultante se añadió Anti-FITC labeled-antiBr-dUTP y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego, las células fueron tratadas con ioduro de propidio y analizadas por citometría de flujo.

4.8.2. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica de análisis celular que implica medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme se las hace pasar a través de un rayo de luz.

Las células fueron analizadas usando el citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose,CA,). De cada muestra se adquirieron 10000 células que fueron evaluadas mediante citometría para determinar la proporción de células viables, necróticas y apoptóticas. Las determinaciones se realizaron por triplicado y de forma independiente. Los resultados se expresaron como porcentaje de células apoptóticas.

4.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se efectuó un análisis descriptivo empleando pruebas paramétricas o no paramétricas dependiendo de las características que presentaron las variables. Se empleó el test χ^2 o el test exacto de Fisher para las variables categóricas según estuviera indicado.

Para estudiar la correlación entre variables continuas se empleó el coeficiente de correlación de Spearman.

Se empleó la prueba ANOVA de medidas repetidas para evaluar las diferencias entre los grupos (buen pronóstico vs. mal pronóstico y muerte encefálica vs. no muerte encefálica) en las muestras tomadas en los cuatro puntos temporales.

Se desarrollaron curvas ROC para evaluar el valor óptimo de corte de la S100B medidos en diferentes momentos para la predicción de resultados desfavorables. Los resultados desfavorables incluyen mal pronóstico a los seis meses (GOS) y desarrollo de muerte encefálica. La obtención de esos puntos de corte permitió el cálculo de la sensibilidad y especificidad para las determinaciones de este biomarcador en los diferentes puntos temporales.

5 RESULTADOS

5.1. POBLACIÓN A ESTUDIO

Se incluyeron 83 pacientes con HIC (43) y TCE (40), todos ellos ingresados en la UCI del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Hubo un predominio masculino (57 varones y 26 mujeres). No se incluyeron pacientes con los criterios de exclusión que se detallaron en el apartado Material y Métodos.

La mortalidad fue del 55,4% (46 pacientes) y al sexto mes del DCA, 22 pacientes (26,5%) tenían una buena situación funcional (puntuaciones en escala GOS de 4 ó 5). Se diagnosticó muerte encefálica en 25 pacientes (30,1%). La Tabla 6.1 muestra las características de la población incluida. El tiempo transcurrido desde el evento cerebral hasta la obtención de la primera muestra sanguínea fue siempre menor de 8 horas (5,4 horas; SD 3,3 horas).

Así mismo se obtuvieron muestras sanguíneas de 10 sujetos sanos, que se tomaron como controles.

No se detectaron diferencias en las características de la población dependiendo del género.

Tabla 5.1. Características demográficas de la población analizada.

	Muestra (N=83)
Edad (años)	55 (IQR: 30)
Género (femenino)	26 (31,3%)
Tipo de DCA	
• TCE	40 (48,2%)
• HIC	43 (51,8%)
Neurocirugía	12 (14,5%)
Sensor de PIC	36 (43,4%)
Drenaje ventricular	15 (18,1%)
APACHE II	17,1 (5,2)
ECG	6 (IQR 4)
ECG ≤ 4	21 (25,5%)
Pupilas	
• Reactivas	47 (56,6%)
• Alteradas	36 (43,4%)
Muerte encefálica	25 (30,1%)
GOS al 6 ^o mes	1 (IQR:3)
GOS 4 y 5 (buen pronóstico)	22 (26,5%)
Tiempo DCA-UCI (horas)	2,3 (IQR: 2,2)

Todos los valores se expresan como mediana (rango intercuartil) o valor absoluto (porcentaje). DCA: daño cerebral agudo. UCI: Unidad Cuidados Intensivos; ECG: Escala de Coma de Glasgow; GOS: Glasgow Outcome Score.

5.2. S100B Y DAÑO CEREBRAL AGUDO

5.2.1. Determinación de la S100B

Se efectuó la obtención de muestras sanguíneas de los pacientes incluidos tal como se describe en el apartado material y métodos. Mencionadas muestras se conservaron a -40°C y se descongelaron minutos antes de su empleo para la determinación de la proteína S100B.

5.2.2. Relación entre las determinaciones sistémicas y regionales de la S100B

Interesaba conocer si el suero procedente del drenaje venoso cerebral presentaba unas determinaciones superiores a las sistémicas y si existía correlación entre ambas determinaciones. Corroborar esa superioridad confirmaría el origen cerebral de dicha determinación de S100B.

Se objetivó que los niveles de S100B eran más elevados en las muestras regionales que en las sistémicas. Estas diferencias alcanzaron significación en todos los momentos temporales excepto a las 48 horas.

Se compararon las determinaciones regionales y las sistémicas en los diferentes momentos temporales. Se objetivó que en todos los puntos temporales (0 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas) existía una correlación positiva entre ambas mediciones ($r > 0,79$; $p < 0,001$).

Tabla 5.2. Determinaciones de S100B en las diferentes muestras.

	Regional VYI ($\mu\text{g/l}$) *	Sistémica SVC ($\mu\text{g/l}$) *	Diferencia VYI-SVC ($\mu\text{g/l}$)	p
0 horas	0,23 (0,36)	0,21 (0,27)	0,04 (IC95%: 0,02 a 0,06)	0,027
24 horas	0,22 (0,34)	0,21 (0,35)	0,03 (IC95%: 0,02 a 0,07)	0,009
48 horas	0,15 (0,17)	0,14 (0,20)	0,03 (IC95%: 0,01 a 0,05)	0,267
72 horas	0,11 (0,13)	0,07 (0,12)	0,02 (IC95%: 0,01 a 0,06)	0,001

VYI: vena yugular interna. SVC: sangre venosa central. IC95%: intervalo de confianza al 95%. * Datos se muestran como mediana (rango intercuartil). p: nivel de significación estadística.

Tabla 5.3. Correlaciones bivariadas entre las determinaciones regionales de S100B (VYI) y las determinaciones sistémicas (SVC).

	r	IC 95% de r	p
VYI vs SVC (0 horas)	0,793	0,687 a 0,866	0,0001
VYI vs SVC (24 horas)	0,799	0,963 a 0,987	0,0001
VYI vs SVC (48 horas)	0,720	0,565 a 0,825	0,0001
VYI vs SVC (72 horas)	0,941	0,884 a 0,970	0,0001

r: coeficiente de correlación. IC 95%: intervalo de confianza al 95%. p: nivel de significación estadística.

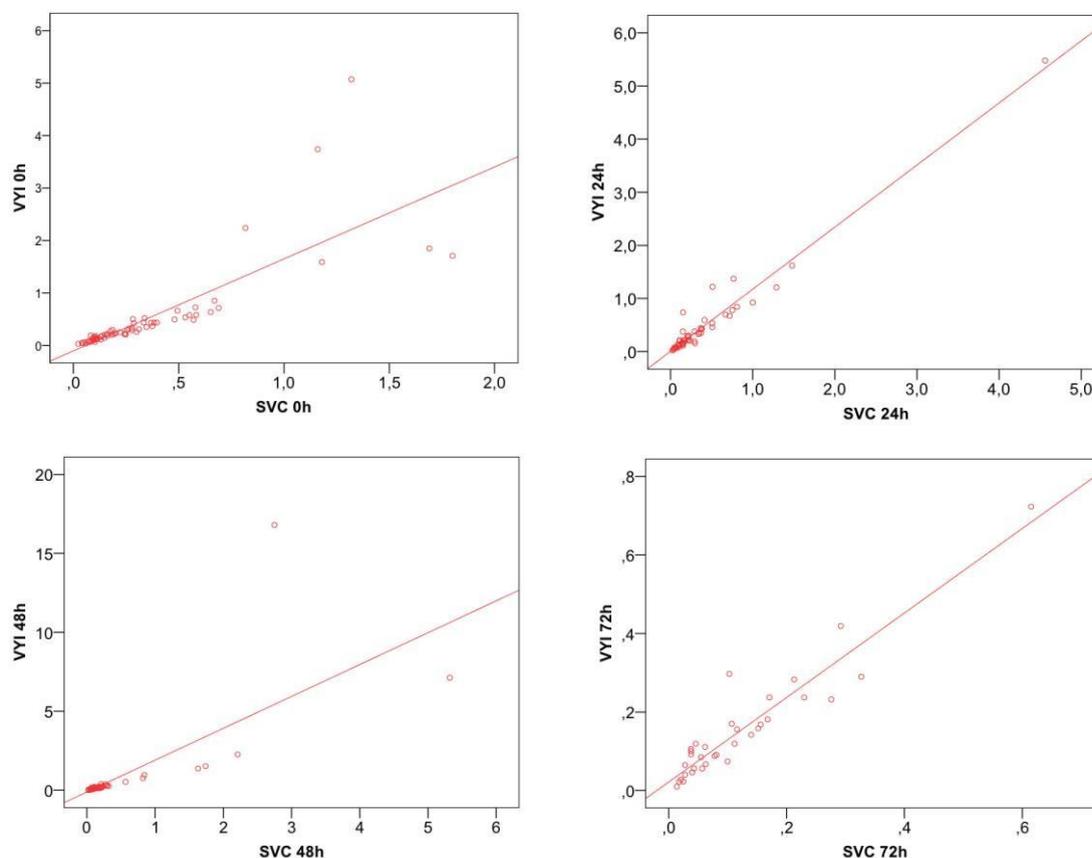


Figura 5.1. Correlación entre las relaciones regionales (VVI) y sistémicas (SVC) en los diferentes puntos temporales (0 horas, 24 horas, 48 horas, 72 horas).

5.2.3. Patrón temporal de las determinaciones de S100B

La cinética de las determinaciones de esta proteína refleja una elevación durante las primeras 48 horas tras el daño cerebral. Este patrón fue observado tanto en las determinaciones regionales ($F 10,518$; $p: 0,0001$) como en las sistémicas ($F 7,366$; $p: 0,001$) (Figura 5.2).

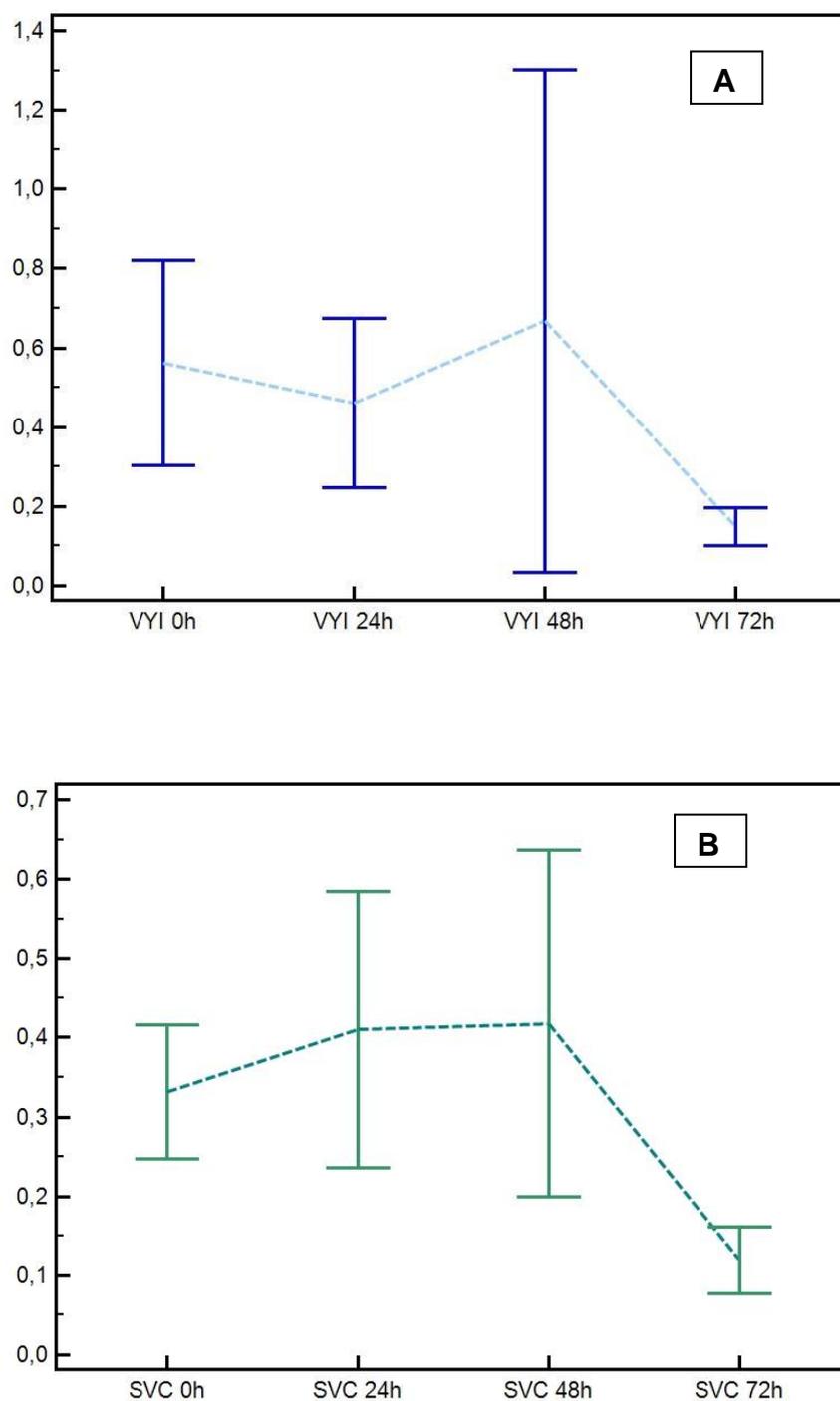


Figura 5.2. Curso temporal de las determinaciones de S100B en muestras regionales (gráfico A) y sistémicas (gráfico B). Las barras de error representan el intervalo de confianza 95% de la media.

5.2.4. Cinética de la S100B de los pacientes que desarrollaron muerte encefálica

Se diagnosticó muerte encefálica en 25 pacientes (30,1%). Las determinaciones sistémicas de S100B de estos pacientes mostraron dos elevaciones; al ingreso y a las 48 horas del DCA. Este comportamiento fue diferente al detectado con las determinaciones sistémicas de los pacientes que no desarrollaron muerte encefálica (F: 2,847; p: 0,042).

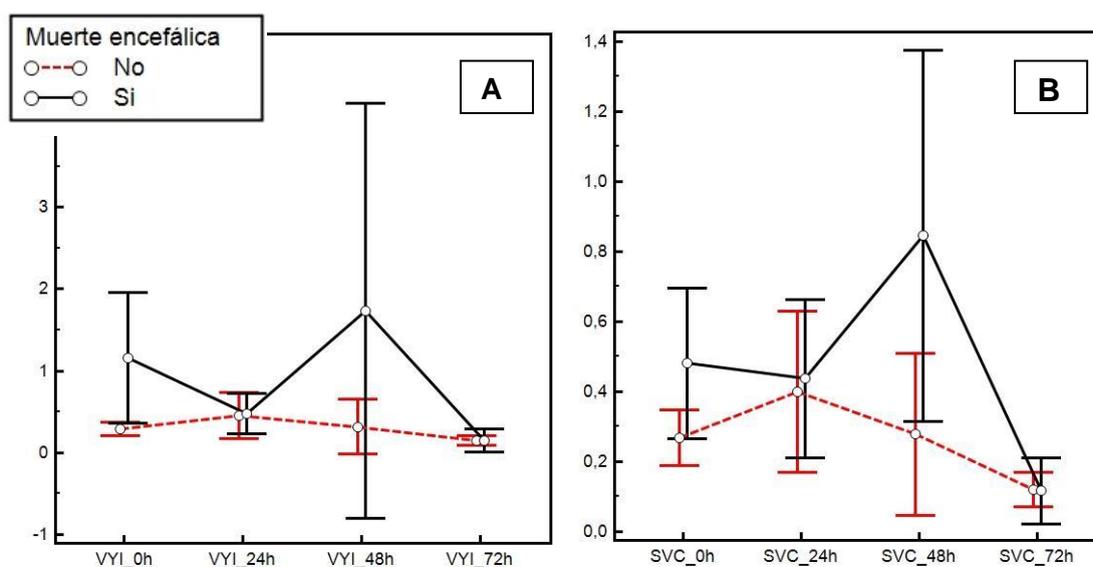


Figura 5.3. Patrón temporal de las terminaciones regionales (gráfico A) y sistémicas (gráfico B) dependiendo del desarrollo de muerte encefálica. Las barras de error representan el intervalo de confianza 95% de la media.

El patrón detectado con las determinaciones de muestras sanguíneas procedentes del golfo de la vena yugular (muestras regionales) fue similar resaltando los dos ascensos tanto al ingreso como al 2º día. Las muestras

regionales de los que no desarrollaron mencionado tipo de fallecimiento tuvieron un comportamiento constante difiriendo significativamente respecto a los que sobrevivieron (F: 4,859; p: 0,003).

Paralelamente el gradiente regional-sistémico presentó un comportamiento parecido. Se detectaron dos elevaciones al ingreso y al 2º día en aquellos pacientes que evolucionaron hacia muerte encefálica. Por el contrario, los pacientes que no desarrollaron muerte encefálica presentaron un gradiente regional-sistémico que se mantuvo constante en todos los momentos temporales y menor que el detectado en los pacientes con muerte encefálica (F: 0,951; p: 0,346).

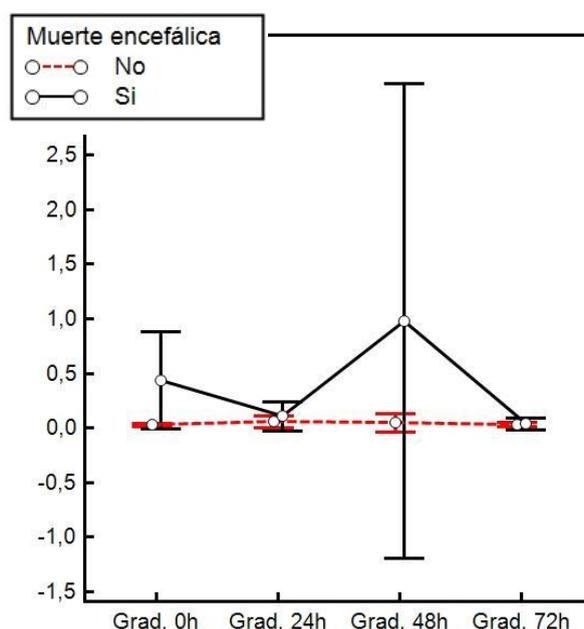


Figura 5.4. Patrón temporal del gradiente dependiendo del desarrollo de muerte encefálica. Las barras de error representan el intervalo de confianza 95% de la media.

Tabla 5.4. Diferencia media entre las determinaciones regionales y sistémicas de S100B en función del desarrollo de muerte encefálica.

	Diferencia Muerte Encefálica vs. No Muerte Encefálica	
	Muestras regionales (VYI)	Muestras sistémicas (SVC)
0 horas	0,866 (IC95%: 0,064 a 1,668)	0,212 (IC95%: 0,014 a 0,439)
24 horas	0,211 (IC95%: -0,461 a 0,503)	0,038 (IC95%: -0,353 a 0,429)
48 horas	1,416 (IC95%: -1,131 a 3,965)	0,566 (IC95%: -0,001 a 1,134)
72 horas	0,006 (IC95%: -0,123 a 0,135)	-0,002 (IC95%: -0,114 a 0,110)

VYI: vena yugular interna. SVC: sangre venosa central. IC95%: intervalo de confianza al 95%. Datos se muestran como diferencia media.

5.2.5. Cinética de la S100B en los pacientes que presentaron mal pronóstico (GOS 1-3) a los seis meses

El 73,5% de los pacientes evolucionó hacia mal pronóstico a los seis meses del DCA. Se empleó la escala GOS para evaluar la situación funcional al cabo de seis meses, y se consideró mal pronóstico la puntuación menor ó igual a 3 puntos.

Las determinaciones regionales de S100B en este grupo de pacientes presentaron dos elevaciones: al ingreso y al 2º día del DCA. Sin embargo las muestras regionales de aquellos pacientes que evolucionaron positivamente

no presentaron cambios en las mediciones sucesivas ($F:6,872$; $p:0,001$). Paralelamente el gradiente regional-sistémico presentó un comportamiento similar. Se detectaron dos elevaciones, una al ingreso y otra al 2º día en aquellos pacientes que evolucionaron hacia una situación funcional desfavorable a los seis meses del DCA. En los pacientes que presentaron buena evolución al 6º mes del DCA, el gradiente se mantuvo constante ($F:0,174$; $p:0,914$). Las diferencias fueron significativas en todos los momentos excepto en el punto temporal de 72 horas.

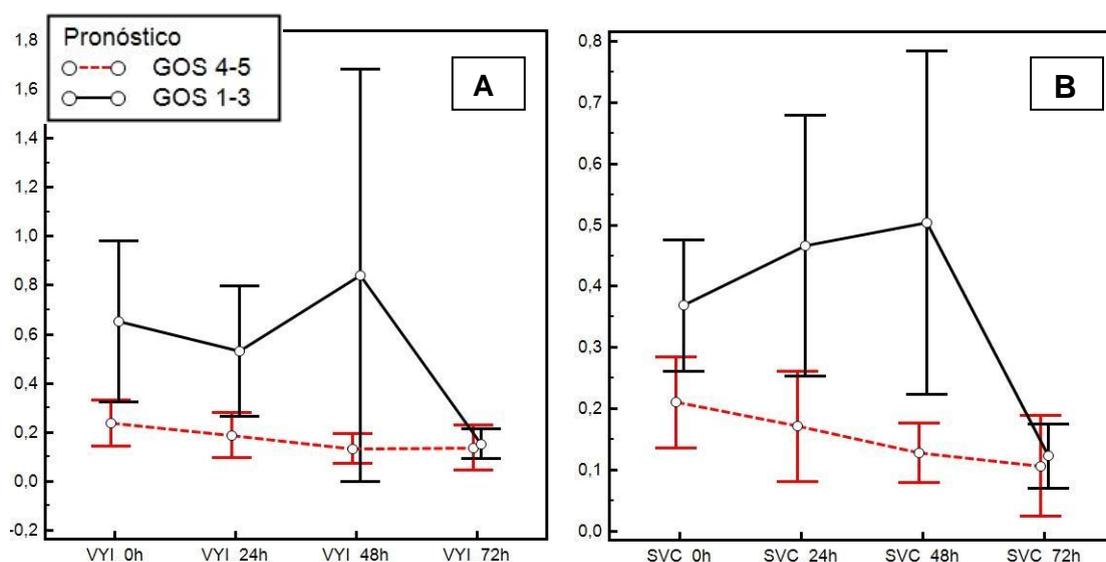


Figura 5.5. Patrón temporal de las determinaciones sistémicas (gráfico A) y regionales (gráfico B) dependiendo de la situación funcional al 6º mes del DCA. Las barras de error representan el intervalo de confianza 95% de la media.

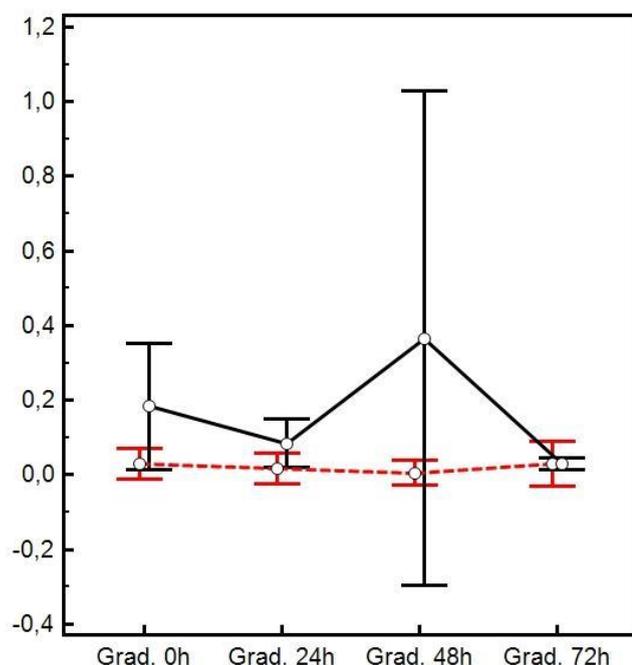


Figura 5.6. Patrón temporal del gradiente regional-sistémico de las determinaciones de S100B dependiendo del pronóstico al 6º mes. Las barras de error representan el intervalo de confianza 95% de la media.

Respecto a las determinaciones sistémicas, se detectó un pico a las 48 horas en aquellos pacientes con mala evolución, mientras que los que presentaron buena situación funcional, mantuvieron niveles similares a lo largo del tiempo ($F:4,420$; $p:0,006$) (Figura 5.5). Además los casos de mala evolución clínica tuvieron niveles superiores en todos los momentos temporales que aquéllos que tuvieron buena evolución al 6º mes del DCA (significación al ingreso y a las 48 horas) (Tabla 5.5).

Tabla 5.5. Diferencia media entre las determinaciones regionales y sistémicas en función de la evolución funcional al 6º mes del DCA.

	Diferencia Mal pronóstico vs. Buen pronóstico	
	Muestras regionales (VYI)	Muestras sistémicas (SVC)
0 horas	0,414 (IC95%: 0,076 a 0,752)	0,158 (IC95%: 0,031 a 0,285)
24 horas	0,343 (IC95%: -0,184 a 0,870)	0,295 (IC95%: -0,142 a 0,737)
48 horas	0,700 (IC95%: -0,767 a 0,218)	0,376 (IC95%: 0,092 a 0,659)
72 horas	0,015 (IC95%: -0,100 a 0,931)	0,016 (IC95%: -0,085 a 0,117)

VYI: vena yugular interna. SVC: sangre venosa central. IC95%: intervalo de confianza al 95. Buen pronóstico: GOS 1-3. Mal pronóstico: GOS 4-5.

5.2.6. Determinaciones de la S100B dependiendo del género de los pacientes

Se estudió si el género podía influir en las determinaciones de la proteína S100B. No se observaron diferencias significativas en los valores de la S100B en las muestras sanguíneas de sangre regional y sistémica según el género (Tabla 5.6).

Tabla 5.6. Determinaciones de S100B según género (en $\mu\text{g/l}$).

Tipo de muestra	Varón	Mujer	p
SVC 0h	0,24 (0,25)	0,17 (0,48)	0,728
VYI 0h	0,25 (0,31)	0,20 (0,46)	0,686
SVC 24h	0,16 (0,27)	0,30 (0,52)	0,370
VYI 24h	0,21 (0,30)	0,29 (0,60)	0,811
SVC 48h	0,18 (0,19)	0,16 (0,22)	0,901
VYI 48h	0,13 (0,16)	0,16 (0,19)	0,412
SVC 72h	0,06 (0,11)	0,10 (0,17)	0,314
VYI 72h	0,10 (0,11)	0,11 (0,21)	0,252

SVC: muestras sistémicas. VYI: muestras regionales. Valores muestran la mediana (rango intercuartil)

5.2.7. Determinaciones de la S100B dependiendo del tipo de daño cerebral agudo

Se quiso determinar si el tipo de daño podía influir en las determinaciones de la proteína S100B. Se incluyeron 40 pacientes con TCE, mientras que los 43 enfermos restantes presentaron HIC como causa del DCA. Ambos grupos fueron similares en gravedad (ECG y APACHE) si bien existió un predominio del género masculino en el grupo de origen traumático (80% vs 58,1%) y una mayor edad entre los pacientes con hemorragia

cerebral (57,4 años vs. 45,3 años). La Tabla 5.7 muestra las características demográficas de ambos grupos.

En cuanto a la evolución de ambos tipos de DCA, se objetivó un peor pronóstico en los pacientes con hemorragia cerebral, reflejado tanto en el desarrollo de muerte encefálica como en la situación funcional al 6º mes (Tabla 5.7).

Tabla 5.7. Características de la población dependiendo del tipo de DCA.

	TCE (n = 40)	HIC (n = 43)	p
Género (varón)	32 (80%)	25 (58,1%)	0,040
Edad (años)	46,5 (IQR 45)	56 (IQR 18)	0,002
ECG	7 (IQR 4)	5 (IQR 3)	0,059
Apache II	15,9 (6)	18,2 (4,1)	0,056
Muerte encefálica	10 (25%)	15 (34,9%)	0,350
GOS 6 meses	2 (IQR 4)	1 (IQR 1)	0,002
Buen pronóstico (GOS 4-5)	18 (45%)	4 (9,3%)	0,001
Mortalidad a 6 m	18 (45%)	28 (65,1%)	0,080

Todos los valores se expresan como media (desviación estándar), mediana (rango intercuartil) o valor absoluto (porcentaje). TCE: traumatismo craneoencefálico. HIC: hemorragia intracraneal.

5.2.7.1. Determinaciones regionales de S100B dependiendo del tipo de daño cerebral

Las determinaciones de S100B en muestras venosas intracraneales fueron similares en los pacientes con TCE y en los pacientes con HIC, sin detectarse diferencias significativas (Tabla 5.8) en los diferentes momentos temporales.

Tabla 5.8. Determinaciones regionales de S100B según tipo de DCA ($\mu\text{g/l}$).

Momento de la determinación	Determinaciones de S100B en muestras regionales (VYI) ($\mu\text{g/l}$)		p
	TCE	HIC	
0 horas	0,30 (IQR 0,36)	0,20 (IQR 0,31)	0,108
24 horas	0,21 (IQR 0,35)	0,31 (IQR 0,38)	0,481
48 horas	0,15 (IQR 0,24)	0,14 (IQR 0,19)	0,219
72 horas	0,14 (IQR 0,23)	0,09 (IQR 0,09)	0,098

Datos expresados como mediana (rango intercuartil). TCE: traumatismo craneoencefálico. HIC: hemorragia intracraneal.

5.2.7.2. Determinaciones sistémicas de S100B dependiendo del tipo de daño cerebral

No se objetivaron diferencias en los niveles de S100B medidos en muestras sanguíneas sistémicas dependiendo del tipo de DCA. Tanto en los

pacientes con DCA como con HIC las determinaciones de S100B no difirieron de modo significativo en los distintos puntos temporales (Tabla 5.9).

Tabla 5.9. Determinaciones sistémicas de S100B según tipo de DCA ($\mu\text{g/l}$).

Momento de la determinación	Determinaciones de S100B en muestras sistémicas (SVC) ($\mu\text{g/l}$)		p
	TCE	HIC	
0 horas	0,26 (IQR 0,35)	0,15 (IQR 0,24)	0,108
24 horas	0,20 (IQR 0,29)	0,26 (IQR 0,40)	0,479
48 horas	0,15 (IQR 0,26)	0,10 (IQR 0,18)	0,189
72 horas	0,10 (IQR 0,23)	0,06 (IQR 0,12)	0,218

Datos expresados como mediana (rango intercuartil). TCE: traumatismo craneoencefálico. HIC: hemorragia intracraneal.

5.2.8. Capacidad de las determinaciones de S100B para el diagnóstico de mala situación funcional al 6º mes del daño cerebral agudo

Interesaba evaluar la capacidad diagnóstica de los niveles de S100B en las diferentes muestras y en los diferentes momentos temporales. Se elaboraron curvas ROC con relación a la situación de mala situación funcional al sexto mes del DCA, medida mediante escala GOS como puntuaciones comprendida entre 1 a 3.

Respecto al diagnóstico de mala evolución clínica a los seis meses del DCA, las determinaciones de 100B en las muestras tomadas al ingreso (sistémicas y regionales) presentaron un área bajo la curva ROC similares, sin detectarse diferencias entre ambas. Para la determinación periférica el área bajo la curva ROC fue de 0,59 (IC95% 0,46-0,73) y para los niveles regionales el área fue de 0,61 (IC95% 0,46-0,75).

Las mediciones sistémicas a las 24 horas del DCA presentaron un área bajo la curva ROC de 0,68 (IC95% 0,53-0,84), mientras que para los niveles regionales en el mismo momento temporal presentaron un área bajo curva ROC de 0,70 (IC95% 0,54-0,84). La diferencia entre ambas no fue significativa.

Similar comportamiento presentaron las determinaciones de S100B a las 48 horas, pues para los niveles periféricos el área bajo la curva ROC para diagnóstico de mal pronóstico fue de 0,63 (IC95% 0,47-0,79) y para los niveles regionales el área bajo la curva fue de 0,63 (IC95% 0,46-0,80). La diferencia detectada entre ambas no fue significativa (Figura 5.7).

Los niveles de S100B a las 72 horas tanto periféricos como regionales presentaron un área bajo la curva ROC similar, siendo de 0,51 (IC95% 0,28-0,74) para las primeras y 0,52 (IC95% 0,26-0,77) para las segundas. La diferencia entre áreas no alcanzó significación estadística.

Se estimaron los puntos de corte que proporcionan mejor sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de muerte encefálica, tanto para las

determinaciones regionales y sistémicas en los diferentes momentos temporales. Las Tablas 5.10 y 5.11 muestran mencionados puntos de corte.

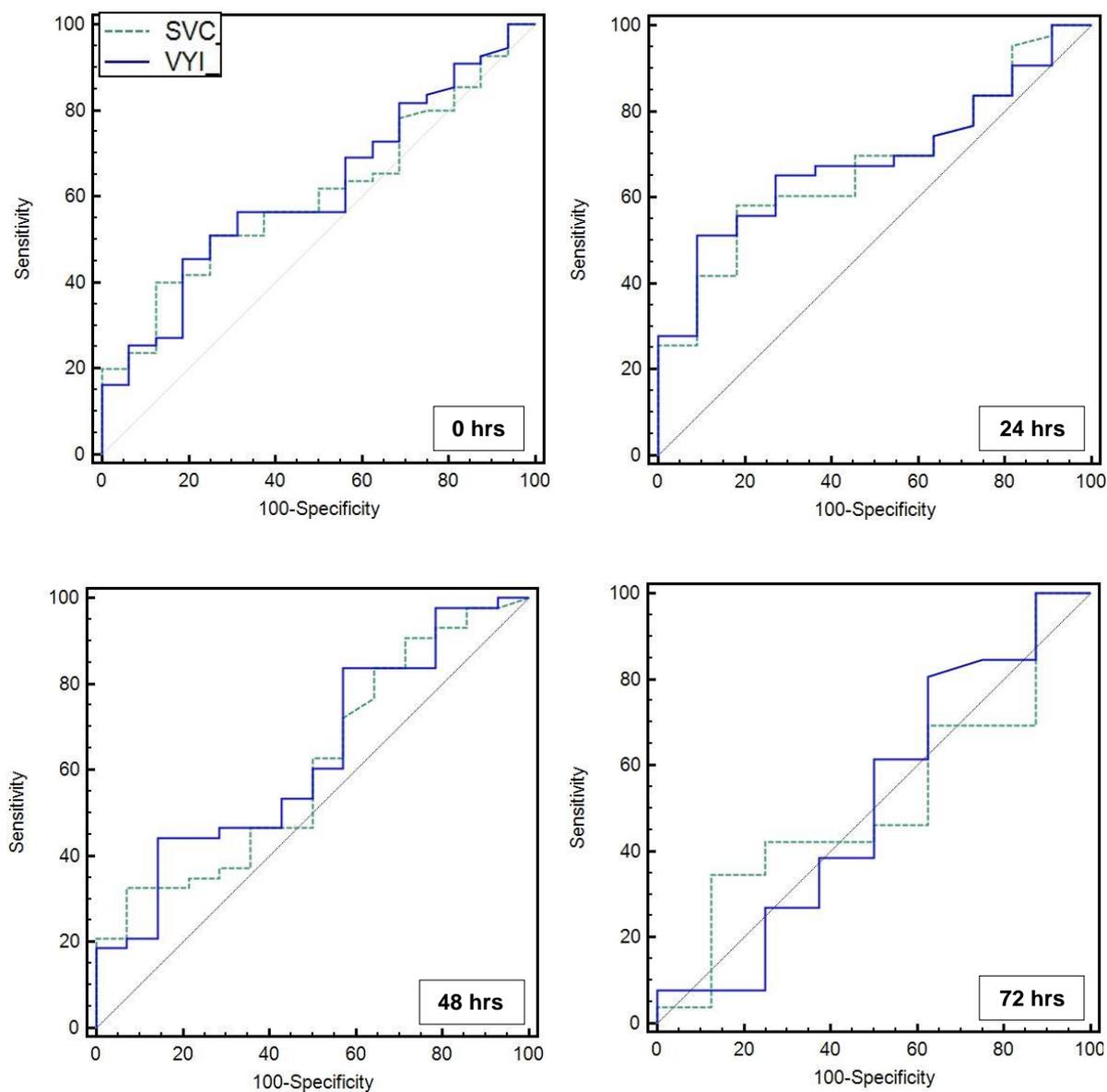


Figura 5.7. Curvas ROC de las determinaciones regionales (VYI, trazado azul) y sistémicas (SVC, trazado verde discontinuo) en los diferentes puntos temporales para el diagnóstico de mala situación funcional al 6º mes del DCA.

Tabla 5.10. Puntos de corte, sensibilidad y especificidad de las determinaciones regionales (VYI) para el diagnóstico de mal pronóstico.

Tipo de muestra y momento de determinación	Mal pronóstico (GOS 1-3)		
	Punto de corte (µg/l)	Sensibilidad	Especificidad
VYI 0 horas	0,60	17,2	93,8
VYI 24 horas	0,63	25,6	100
VYI 48 horas	0,15	46	64,03
VYI 72 horas	0,21	23,1	75

VYI: muestras regionales.

Tabla 5.11. Puntos de corte, sensibilidad y especificidad de las determinaciones sistémicas (SVC) para el diagnóstico de mal pronóstico.

Tipo de muestra y momento de determinación	Mal pronóstico al 6º mes del DCA		
	Punto de corte (µg/l)	Sensibilidad	Especificidad
SVC 0 horas	0,26	47,3	76,5
SVC 24 horas	0,32	43,5	90,9
SVC 48 horas	0,30	27,7	92,9
SVC 72 horas	0,20	12,5	100

SVC: muestras sistémicas.

5.2.9. Capacidad de las determinaciones de S100B para el diagnóstico de muerte encefálica

Los niveles periféricos al ingreso de S100B mostraron un área bajo la curva ROC de 0,65 (IC95% 0,52-0,79) para diagnóstico de muerte encefálica. Los niveles regionales en el mismo momento temporal presentaron un área de 0,67 (IC95% 0,53-0,80). Con relación a las determinaciones sistémicas y regionales tomadas a las 24 horas, se objetivaron áreas bajo la curva para el diagnóstico de muerte encefálica de 0,60 (IC95% 0,43-0,76) y 0,57 (IC95% 0,40-0,75) respectivamente. La diferencia entre ambas no fue estadísticamente significativa.

Los niveles periféricos de S100B a las 48 horas del DCA presentaron un área bajo la curva de 0,73 (IC95% 0,60-0,88) para el diagnóstico de muerte encefálica. En el caso de las muestras regionales a las 48 horas, el área abajo la curva fue de 0,73 (IC95% 0,58-0,90). Tampoco fue significativa la diferencia entre ambas curvas ROC.

En el caso de las determinaciones efectuadas con muestras tomadas a las 72 horas, se objetivaron áreas bajo la curva de 0,60 (IC95% 0,40-0,80) para las determinaciones sistémicas y 0,53 (IC95% 0,30-0,77) para las regionales, sin detectarse diferencias entre dichas curvas ROC.

Se estudiaron los puntos de corte que proporcionan mejor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de muerte encefálica, tanto para las

determinaciones regionales y sistémicas en los diferentes momentos temporales (Tablas 5.12 a 5.14).

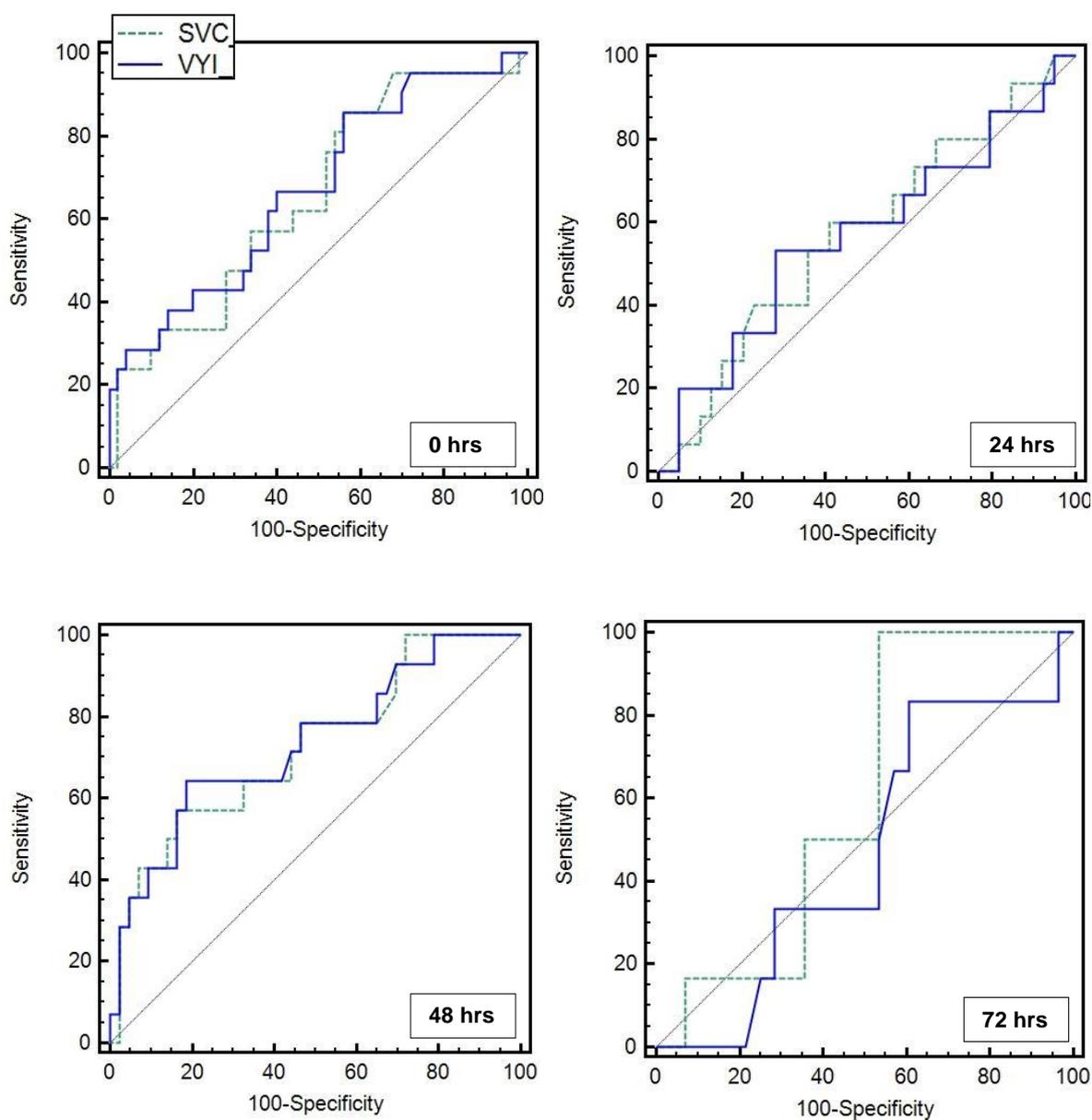


Figura 5.8. Curvas ROC de las determinaciones regionales (VYI; trazado azul) y sistémicas (SVC, trazado verde discontinuo) en los diferentes puntos temporales para el diagnóstico de muerte encefálica.

Tabla 5.12. Puntos de corte, sensibilidad y especificidad de las determinaciones regionales (VYI) para el diagnóstico de muerte encefálica.

Tipo de muestra y momento de determinación	Muerte encefálica		
	Punto de corte ($\mu\text{g/l}$)	Sensibilidad	Especificidad
VYI 0 horas	0,72	30,4	96
VYI 24 horas	1,07	20	94,8
VYI 48 horas	0,62	35,7	95,35
VYI 72 horas	0,36	11,7	96,43

VYI: muestras regionales.

Tabla 5.13. Puntos de corte, sensibilidad y especificidad de las determinaciones sistémicas para el diagnóstico de muerte encefálica.

Tipo de muestra y momento de determinación	Muerte encefálica		
	Punto de corte ($\mu\text{g/l}$)	Sensibilidad	Especificidad
SVC 0 horas	0,75	23,8	98,04
SVC 24 horas	1,10	12,5	95,12
SVC 48 horas	0,70	40	95,65
SVC 72 horas	0,20	16,6	92,86

SVC: muestras sistémicas.

Tabla 5.14. Puntos de corte, sensibilidad y especificidad del gradiente regional-sistémico de S100B para el diagnóstico de muerte encefálica.

Tipo de muestra y momento de determinación	Muerte encefálica		
	Punto de corte ($\mu\text{g/l}$)	Sensibilidad	Especificidad
Grad 0 horas	0,32	10	100
Grad 24 horas	0,16	26,7	94,9
Grad 48 horas	0,99	9,9	97,4
Grad 72 horas	0,12	16,7	96,43

Grad: gradiente (determinación regional – determinación sistémica).

5.3. MODULACIÓN DE LA APOPTOSIS

5.3.1. Dopamina induce apoptosis en las células SH-SY5Y

Se empleó dopamina para inducir apoptosis. Las células fueron cultivadas en presencia de concentraciones crecientes de dopamina (50 μM , 100 μM y 300 μM). Se objetivó que la proporción de células apoptóticas eran dosis dependientes, de modo que a mayor concentración de dopamina, mayor porcentaje de células apoptóticas. Para la concentración de 50 μM , se objetivó una media de 10,5% de células apoptóticas, mientras que para la concentración de 100 μM fue de 37% y en el caso de dopamina a 300 μM , la proporción de apoptosis fue de 58,3%. Las diferencias entre estas últimas

concentraciones con relación a la primera fueron significativas (Figura 5.9).

Las células que fueron cultivadas sin dopamina, no mostraron apoptosis.

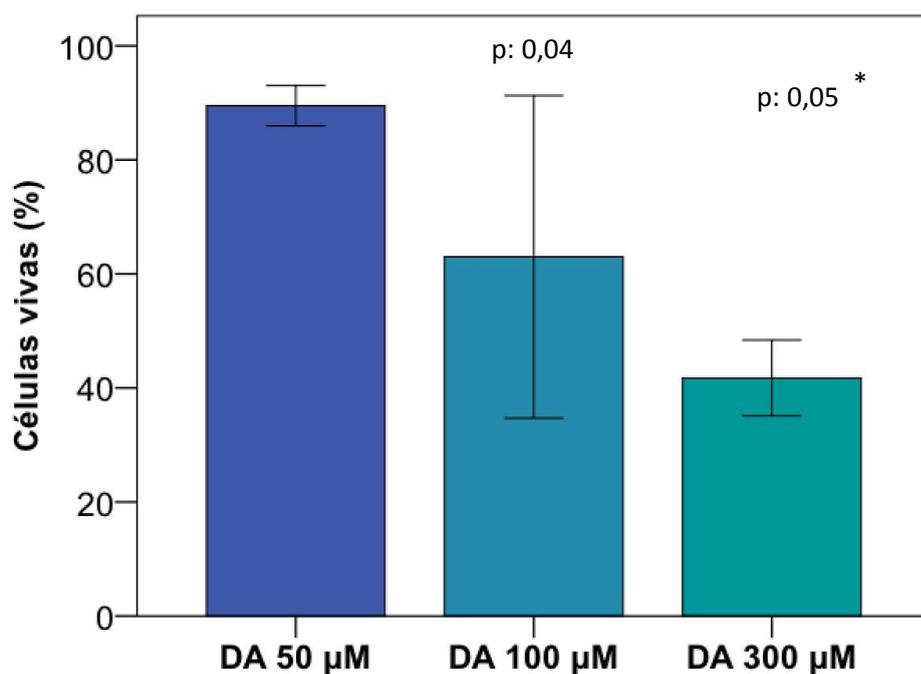


Figura 5.9. Efecto de las diferentes concentraciones de dopamina como estímulo apoptótico sobre la población de células vivas. Las barras de error representan el error estándar de la media. DA: dopamina. p*: significación respecto a la concentración menor de dopamina (50 µM).

5.3.2. Efecto de la hipotermia sobre la apoptosis inducida por dopamina en las células SH-SY5Y

Para evaluar el efecto que la hipotermia pudiera tener sobre la apoptosis inducida por dopamina en mencionada línea celular, se efectuaron

cultivos a concentraciones crecientes de dopamina en condiciones ambientales diferentes. Se utilizaron dos rangos de temperatura: 37°C y 32°C. La Figura 5.10 muestra un ejemplo de la tinción para evaluar las diferentes poblaciones celulares bajo las diferentes condiciones ambientales.

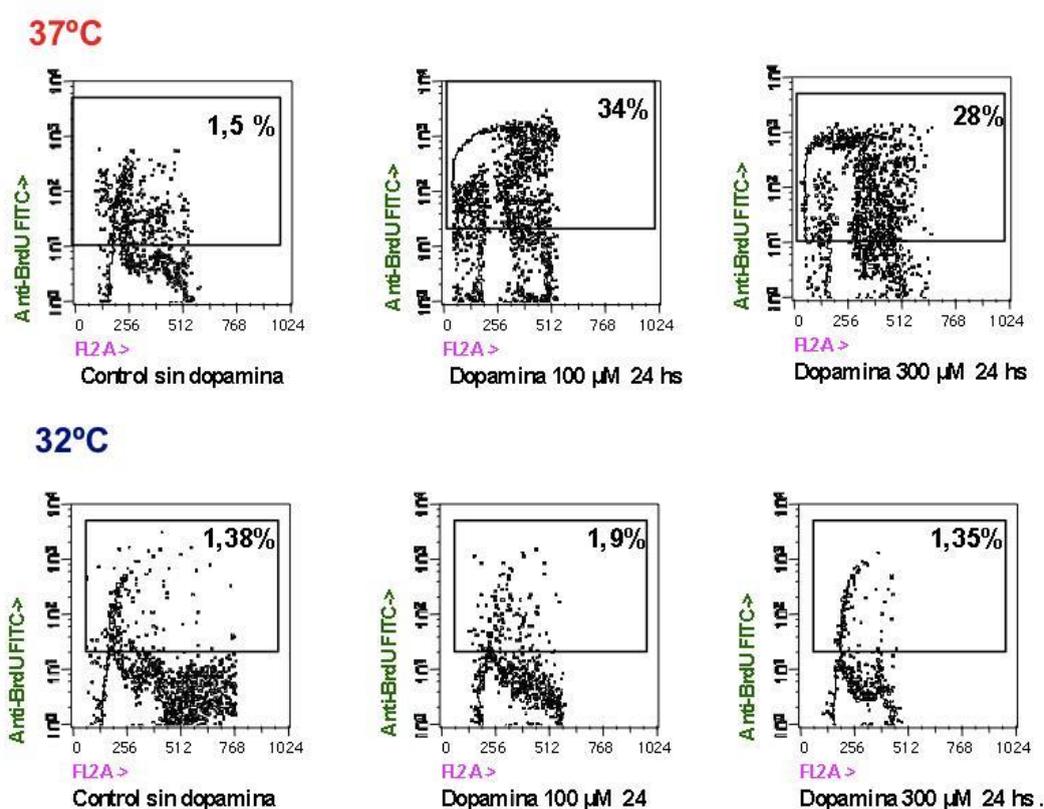


Figura 5.10. Ejemplo de la citometría de flujo de cultivos celulares efectuados con dopamina a diferentes concentraciones como estímulo apoptótico y en condiciones ambientales de hipotermia (32°C) o a 37°C. El recuadro superior de cada gráfica muestra el porcentaje de células apoptóticas.

A la temperatura de 32°C la proporción de células apoptóticas fue 7% (1,4%), y 3,45% (1,1%) para las concentraciones de 100 µM y 300 µM de dopamina respectivamente. Cuando los cultivos se efectuaron a temperaturas más elevadas (37°C), la proporción de células apoptóticas fue mayor [42% (SD:21%) y 58% (SD:7,9%) respectivamente]. A la concentración de 300 µM las diferencias en el porcentaje de células apoptóticas según temperatura de cultivo, alcanzaron la significación estadística (Figura 5.11).

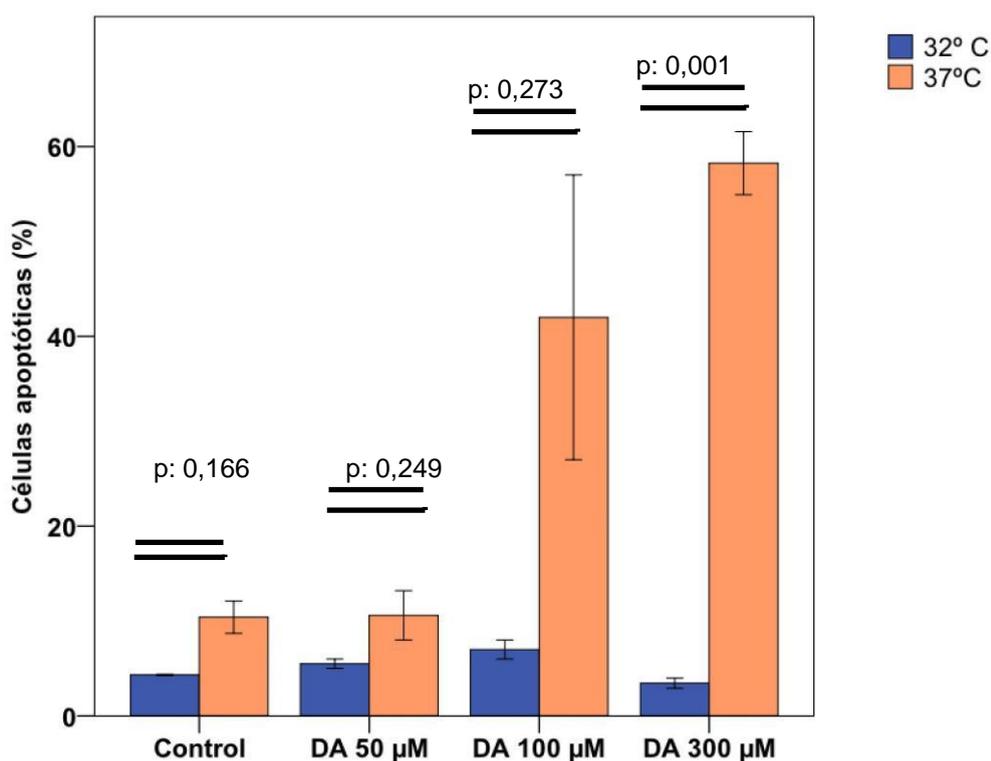


Figura 5.11. Diagrama de barras mostrando la media de células apoptóticas en los cultivos efectuados con diferentes concentraciones del estímulo apoptótico y bajo las dos condiciones térmicas. Las barras de error representan el error estándar de la media. DA: dopamina.

5.3.3. Efecto de la ciclosporina sobre la apoptosis inducida por dopamina en las células SY-SY5Y

Se empleó ciclosporina en los cultivos celulares de SH-SY5Y para evaluar el papel que este agente inmunosupresor podría ejercer sobre la apoptosis inducida por dopamina en mencionada línea celular. Para esta experiencia las células fueron cultivadas con ciclosporina a concentración de 1 y 10 μM por periodos de 2 o 6 horas, previo a la administración de dopamina.

No se detectaron diferencias en la población de células apoptóticas dependiendo del tiempo de incubación con ciclosporina (Figura 5.12).

La proporción de células apoptóticas después de 2 horas de incubación con ciclosporina a dosis 1 μM y 10 μM , fueron significativamente superiores que las detectadas en los cultivos sin ciclosporina (48,3% vs 74,5% p 0,034; y 48,3% vs 76% p 0,016). Similares resultados se apreciaron cuando los cultivos se realizaron con 6 horas de incubación con ciclosporina. La proporción de células apoptóticas en los cultivos con ciclosporina a 1 μM fueron superiores que la detectada en los cultivos sin el agente inmunosupresor. Si se incrementaba la dosis de ciclosporina (10 μM), la población apoptótica también era superior que la detectada en los cultivos sin ciclosporina (42,5% vs 87,8% p 0,004) (Tabla 5.15).

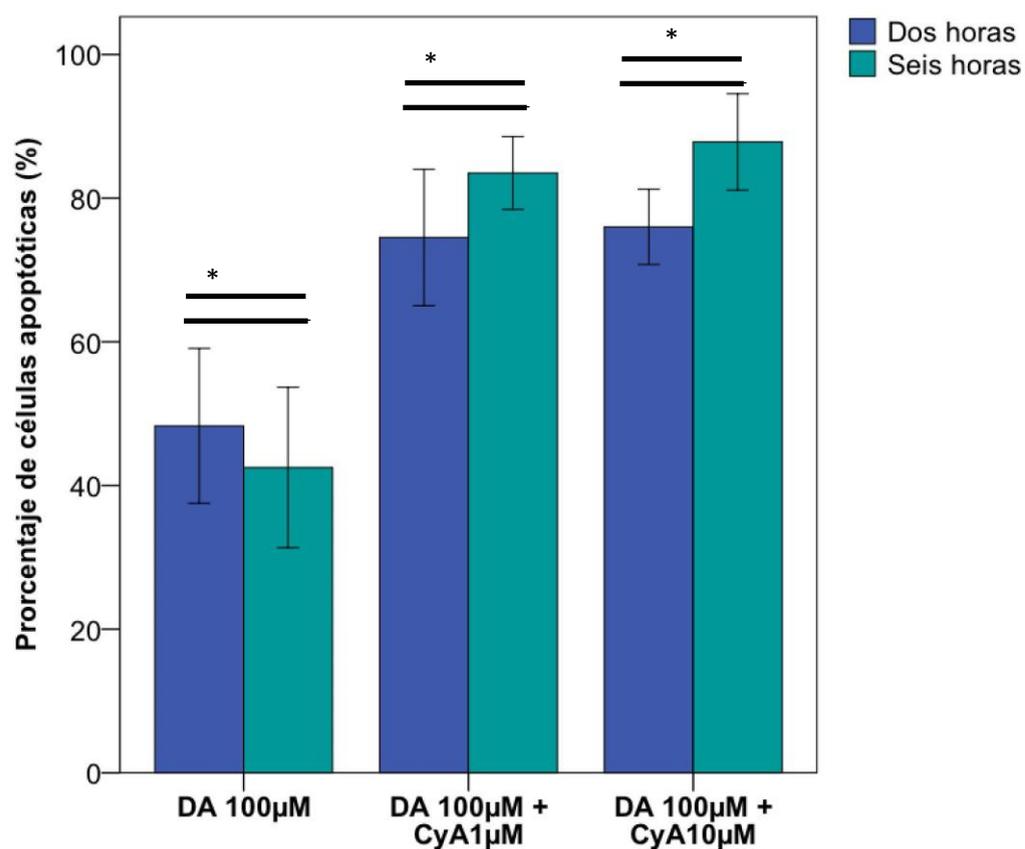


Figura 5.12. Diagrama de barras mostrando la media de células apoptóticas en los diferentes cultivos. La línea representa la desviación estándar de la media. No se detectaron diferencias entre los cultivos con ciclosporina a las diferentes concentraciones y bajo diferentes tiempos de incubación. DA: dopamina. CyA: ciclosporina. * $p > 0,05$.

Tabla 5.15. Población de células apoptóticas en los cultivos celulares en los que se evaluó la ciclosporina como agente modulador de la apoptosis.

Tiempo incubación ciclosporina	Condiciones de cultivo	Población de células apoptóticas (%)	p
2 horas	DA vs. DA CyA 1µM	48,3 vs. 74,5	0,034
	DA vs. DA CyA 10µM	48,3 vs. 76	0,016
	DA CyA 1µM vs. DA CyA 10 µM	74,5 vs. 76	0,826
6 horas	DA vs. DA CyA 1 µM	42,5 vs. 83,4	0,004
	DA vs. DA CyA 10 µM	42,5 vs. 87,8	0,004
	DA CyA 1µM vs. DA CyA 10µM	83,5 vs. 87,8	0,423
2 vs. 6 horas	DA (2h vs. 6h)	48,3 vs. 42,5	0,678
	DA CyA 1µM (2h vs. 6 h)	74,5 vs. 83,5	0,144
	DA CyA 10 µM (2h vs. 6 h)	76 vs. 87,8	0,210

DA: dopamina. CyA: ciclosporina.

6 DISCUSIÓN

El DCA es un grave problema de salud a nivel mundial. Conlleva un importante coste socioeconómico y humano. La agresión cerebral pone en marcha una cascada de procesos fisiopatológicos que conducen de forma progresiva al daño y a la pérdida neuronal. Como consecuencia de esos procesos, diferentes elementos son liberados al espacio intersticial y de ahí pueden pasar al LCR y a la sangre. La detección de un marcador capaz de medir los cambios celulares, bioquímicos y moleculares que tienen lugar durante el DCA podría ayudar a afinar el diagnóstico y el pronóstico, así como a evaluar la evolución de los pacientes y su respuesta a los tratamientos efectuados. Se han desarrollado diferentes modelos pronósticos para predecir los resultados en este tipo de enfermos. La mayoría de ellos se basan en datos clínicos y radiológicos. Ninguno de ellos permite predecir los resultados al 100%.

En la actualidad existe un gran interés por desarrollar nuevas terapias que minimicen el daño cerebral. El conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos también puede ayudar a establecer dianas terapéuticas que ayuden a mejorar los resultados. La apoptosis es uno de los fenómenos que intervienen en la génesis del daño y por ello uno de los posibles abordajes terapéuticos podría ser la inhibición de la misma.

El presente trabajo se ha centrado en la fisiopatología para evaluar que una proteína liberada por los astrocitos, proteína S100B puede ser empleada como un potencial marcador pronóstico en los pacientes con DCA y que la hipotermia al modular la apoptosis en un modelo neuronal podría convertirse en una potencial herramienta terapéutica.

6.1. LA PROTEÍNA S100B COMO MARCADOR DE DAÑO CEREBRAL

En el presente trabajo se ha observado que la proteína S100B es liberada después del DCA. Tras el daño cerebral primario se produce una activación de los astrocitos, principales reguladores de la homeostasis cerebral. Esta activación genera la liberación de la proteína S100B al espacio intersticial y desde ahí pasa al líquido cefalorraquídeo y a la sangre. La elevación de S100B en sangre tras un insulto cerebral sugiere por un lado, la presencia de daño cerebral y por otro, un incremento de la permeabilidad vascular (Brondani da Rocha y cols., 2006), convirtiéndole en un potencial marcador biológico.

La fisiología de esta proteína en el DCA permite que pueda ser detectada en muestras sanguíneas y en muestras de LCR. En nuestro trabajo se obtuvieron muestras sanguíneas, con una cadencia en el tiempo determinada: al ingreso, a las 24 horas, 48 horas y 72 horas del mismo. Se

optó por muestras sanguíneas por dos motivos. Por un lado porque aunque los niveles de S100B en muestras de LCR suelen ser más altos, parece que existe buena correlación, de tal manera que el análisis de S100B en sangre puede ser suficiente para determinar el pronóstico y detectar la aparición de complicaciones secundarias (Moritz y cols., 2010). Por otro lado el acceso a muestras de LCR no siempre es factible, pues no todos los pacientes tienen colocado un drenaje ventricular y si no es preciso no está justificada su colocación. Además, en aquellos que si lo tienen, la manipulación para la obtención de muestras de líquido cefalorraquídeo favorece la aparición de infecciones del SNC. En cualquier nivel asistencial la obtención de muestras sanguíneas es mucho más factible, característica que apoya la determinación sanguínea de S100B como potencial marcador.

6.1.1. Relación entre las determinaciones sistémicas y regionales de la S100B

En nuestro trabajo los niveles de S100B en sangre del bulbo de la yugular (regionales) fueron ligeramente superiores que en las muestras sistémicas. Este hallazgo apoya la idea de que el origen de la S100B es cerebral. Se ha objetivado que existe una buena correlación entre las muestras sistémicas y regionales, por lo que ambas podrían utilizarse en la práctica clínica. La mayoría de los estudios han analizado los niveles de S100B en sangre periférica (venosa o arterial). La S100B se libera en el

lugar en el que acontece el daño, por lo cual se genera un gradiente de concentración entre la sangre procedente de esa región y la sangre periférica como consecuencia de la dilución. La alteración de la barrera hematoencefálica favorece el paso de la dicha proteína a la sangre. Astrand y cols. (2012), compararon las concentraciones de S100B en sangre capilar, sangre venosa y sangre arterial, objetivando que las determinaciones capilares no eran equiparables a las venosas, pero las arteriales sí aunque sus valores eran ligeramente inferiores. Tan solo 3 trabajos han empleado la sangre venosa procedente del bulbo de la yugular, es decir muestras regionales para la determinación de S100B en pacientes con DCA (McKeating y cols., 1998; Raabe y cols., 1998; Bouvier y cols., 2012). Según el trabajo de Raabe y cols. (1998), las determinaciones de S100B en sangre arterial se correlacionan bien con las determinaciones en vena yugular, existiendo un gradiente medio de 8.2%. Sin embargo, Bouvier y cols. (2012), observaron un aumento en los niveles de S100B en sangre venosa yugular 24 horas después del TCE sin que se acompañara de un aumento de dicha proteína en sangre arterial, en un paciente con edema cerebral secundario.

Nuestros resultados apoyan el empleo de muestras sistémicas para el seguimiento de pacientes con DCA. Tal como se desarrollará en apartados venideros, la capacidad pronóstica de ambos tipos de muestras no difirió y ello va a favor de usar muestras sistémicas. La obtención de las mismas está al alcance de cualquier área hospitalaria (Urgencias, Unidades de Cuidados Intensivos, plantas de hospitalización) y de cualquier hospital, sea

cual sea su nivel de complejidad. Este hecho permitiría hacer realidad el empleo de un hipotético marcador.

6.1.2. Cinética de la proteína S100B en muestras regionales y sistémicas

La cinética de la proteína S100B fue similar en las muestras regionales y en las muestras sistémicas. Este hecho avalaría el empleo indistinto de ambos tipos de muestras. En la literatura los resultados son heterogéneos, pero hay trabajos con hallazgos similares. Petzold y cols. (2003) analizaron los niveles de S100B en LCR y en sangre, observando que los pacientes con hemorragia subaracnoidea (4 pacientes) o hemorragia intraparenquimatosa (2 pacientes) presentaban un pico de S100B al segundo día después del daño y otro entre el 4º y 5º día. Sin embargo los pacientes con daño cerebral traumático (14 pacientes) tenían niveles iniciales altos y luego, éstos tendían a disminuir los días posteriores. En esta línea, Murillo y cols. (2010), en pacientes con TCE grave documentaron que la S100B se mantenía elevada en las primeras 24 horas y posteriormente descendía. Brea y cols. (2009) evaluaron los niveles de enolasa específica de neuronas y S100B en pacientes con accidente cerebrovascular agudo, observando que el valor pico en el accidente cerebrovascular isquémico de la enolasa específica de neuronas se producía a las 72h y el de la S100B a las 24h. En este mismo trabajo observaron que en hemorragia intracraneal

ambos marcadores presentaban su máxima concentración a las 24 horas. Esta diversidad en la precisión del momento en el que se produce el valor máximo de S100B puede deberse a la gran heterogeneidad en el tipo de daño, intensidad de la lesión entre otros factores.

La elevación detectada a las 48 horas en el presente trabajo, podría justificarse por el daño cerebral secundario. La vida media de la S100B oscila aproximadamente entre 30 y 113 minutos, por lo que al cabo de unas horas la S100B liberada por el daño cerebral primario debería volver a niveles basales (Mussack y cols., 2006). Por ello, las elevaciones posteriores pueden ser reflejo del daño cerebral secundario o la aparición de nuevas complicaciones. Esto apoya la elevación a las 48 horas del DCA detectada en nuestra serie. El edema cerebral juega un importante papel en la génesis del daño cerebral secundario, con un incremento de la presión intracraneal y en consecuencia una disminución de la perfusión cerebral que conduce a isquemia. Raabe y Seifert (1999) describieron tres casos en los que un incremento secundario de la S100B precedía al incremento de hipertensión intracraneal y se seguía de muerte cerebral en los días posteriores. Nylén y cols. (2008) efectuaron un estudio con 59 pacientes con TCE y observaron que a excepción de dos pacientes, el perfil temporal era similar en pacientes con buenos y malos resultados, objetivando un valor máximo el primer día y en los días posteriores un rápido descenso. Los dos pacientes que presentaron en el estudio de Nylén y cols. (2008) un segunda elevación de S100B en las semanas siguientes al evento cerebral fallecieron por

herniación cerebral en las 48 horas posteriores a dicho incremento. Weiss y cols. (2006), analizaron los niveles de S100B en 74 pacientes con hemorragia subaracnoidea durante 8 días y observaron que en los pacientes que fallecían la S100B continuaba incrementándose varios días.

En nuestra serie una proporción de pacientes (25,5%) presentaban puntuaciones de ECG <4, es decir con graves lesiones cerebrales que condicionaban un pronóstico infausto tal como apoya que se diagnosticara muerte encefálica en el 30,1% de los pacientes de la serie. Nuestro centro es el hospital de referencia de la comunidad para donación y trasplante, de ahí que se ingresen pacientes con DCA grave sin posibilidades de tratamiento quirúrgico. La mayor afectación de tejido condicionaría mayor liberación de S100B. Consideramos por ello, que el patrón temporal no puede ser comparado con otras series donde el perfil del paciente es diferente, ya que incluyen pacientes con menor afectación cerebral.

En este trabajo hemos observado que el perfil temporal de S100B varió dependiendo de la evolución clínica al sexto mes del DCA. Los pacientes con evolución desfavorable presentaron una elevación inicial de S100B y un ascenso a las 48h en las determinaciones regionales. En las determinaciones sistémicas de los pacientes con mala evolución, se produjo un aumento progresivo de la S100B hasta las 48 horas y luego un descenso. Los pacientes que evolucionaron bien (GOS 4-5) sólo presentaron una elevación inicial. En nuestra opinión la determinación de S100B no debería limitarse al momento inicial del daño, si no que debería considerarse su

determinación seriada, ya que ello puede ayudar a identificar los pacientes con progresión del daño cerebral y contribuir al manejo diario del paciente con DCA. El seguimiento de los niveles de S100B en pacientes con daño cerebral, además de detectar el daño cerebral secundario, podría evaluar los efectos neuroprotectores de los tratamientos administrados (Bloomfield y cols., 2007). No obstante es necesario realizar nuevos estudios a este respecto.

6.1.3. Influencia del tipo de DCA sobre las determinaciones de S100B

En el presente trabajo se incluyeron pacientes con dos tipos de DCA: traumático y hemorrágico sin objetivar que la etiología influyera en las determinaciones de S100B. La mayoría de las investigaciones se han centrado en un tipo de daño concreto. Dado que el mecanismo de lesión cerebral varía de unas patologías a otras cabría la posibilidad que también fuera diferente la producción de la proteína S100B, sin embargo en el presente trabajo, no hemos detectado diferencias en función de la etiología del daño. Es posible que los estudios monográficos (centrados sólo en un tipo de daño) permitan hallar asociaciones entre la proteína S100B y determinadas complicaciones específicas del tipo de daño, pero éste no era uno de los objetivos de nuestro trabajo.

Diversos trabajos han estudiado los niveles de S100B en sangre y/o LCR en pacientes con hemorragia subaracnoidea (Kay y cols., 2003; Weiss y cols., 2006; Sanchez-Peña y cols., 2008; Moritz y cols., 2010). Parece que la S100B puede ser un marcador pronóstico en este tipo de hemorragia cerebral. Weiss y cols. (2006) observaron que la S100B era indicador de la severidad y un factor pronóstico independiente en pacientes afectados de este tipo de hemorragia. Una complicación frecuente en la hemorragia subaracnoidea es la aparición de vasoespasmo lo que genera consecuencias deletéreas. La detección precoz es importante para poder adoptar las medidas terapéuticas oportunas. Por esa razón algunos investigadores han analizado la posible relación entre esta proteína y el vasoespasmo, no objetivándose una clara asociación entre ambos (Moritz y cols., 2010). Se ha lanzado la hipótesis de que el seguimiento de los niveles de S100B podría ayudar a evaluar los efectos de los tratamientos aplicados en pacientes con HSA. Varios metaanálisis han investigado la capacidad de las estatinas para disminuir el vasoespasmo y los resultados han sido contradictorios (Sillberg y cols., 2008; Vergouwen y cols., 2010; Kramer y Fletcher, 2010; Castanares-Zapatero y Hantson, 2011). Recientemente, Sanchez-Peña y cols. (2012) apreciaron que los niveles de S100B a los 15 días de la HSA eran más bajos en los pacientes tratados con estatinas, lo cual podría relacionarse con la posible acción de las estatinas en la supresión de la neuroinflamación.

Se han realizado múltiples trabajos focalizados en el papel de la S100B en la hemorragia intraparenquimatosas. Delgado y cols. (2006) analizaron los niveles de S100B en sangre periférica procedente de pacientes con hemorragia intracraneal espontánea y observaron que el incremento de esta proteína se asociaba con peor evolución. Además detectaron una fuerte correlación entre el tamaño del hematoma y el valor de la S100B. Hu y cols. (2010) observaron un aumento de S100B en sangre periférica de pacientes con hemorragia intracraneal y vieron que sus niveles se relacionaban con los niveles de marcadores biológicos relacionados con el estrés. En este estudio los niveles de S100B después de una hemorragia cerebral (<6h), se asociaban con los resultados y se correlacionaban con la puntuación en la escala de Glasgow y la extensión del hematoma en la tomografía axial computarizada.

Diferentes grupos han analizado la S100B en el daño cerebral traumático tanto leve como grave. Algunos investigadores sugieren que los niveles de S100B se relacionan con los hallazgos de la tomografía axial computarizada (Herrmann y cols., 2000). Otros trabajos indican que las concentraciones postraumáticas de S100B reflejan la severidad del DCA y se relacionan con los resultados clínicos (Pleines y cols., 2001; Dimopoulou y cols., 2003; Brondani y cols., 2006; Korfiatis y cols., 2007; Nylén y cols., 2008; Rainey y cols., 2009; Vos y cols., 2010). Petzold y cols. (2002) observaron que la S100B además de ser significativamente más alta en los pacientes que fallecen, es un marcador sensible para predecir el aumento de

presión intracraneal. Unden y cols. (2007) sugieren que el valor medio de la S100B se asocia con complicaciones secundarias.

En nuestro trabajo no se incluyeron pacientes con eventos cerebrales isquémicos, pero en los últimos años ha aumentado el interés por el estudio de marcadores moleculares con fines diagnósticos y pronósticos en ese perfil de pacientes. Hubiera sido interesante haber podido incluir este tipo de enfermos. Parece que algunos marcadores de neurotoxicidad e inflamación como la S100B se pueden asociar al deterioro neurológico, el volumen del infarto o la transformación hemorrágica (Castellanos y cols., 2003; Castellanos y cols., 2004). Foerch y cols. (2007) observaron que determinaciones elevadas de S100B antes de realizar trombolisis eran un factor de riesgo independiente de transformación hemorrágica. Varios estudios relacionan la concentración de S100B con el volumen del infarto (Foerch y cols., 2004; Foerch y cols., 2005; Jauch y cols., 2006) y otros trabajos sugieren que niveles altos de S100B se relacionan con peores resultados (Bertsch y cols., 2001; Wunderlich y cols., 2004; Foerch y cols., 2005).

6.1.4. Influencia del género y la edad sobre los niveles de S100B

En el presente trabajo hubo un predominio de varones para los eventos traumáticos si bien las mujeres fueron más numerosas cuando la

causa del DCA fue la hemorragia cerebral. Sin embargo, el género de los pacientes no influyó en las determinaciones de S100B. Estos hallazgos son concordantes con los aportados por Korfiás y cols. (2007), y Murillo-Cabezas y cols. (2010), quienes en pacientes con daño cerebral traumático apreciaron que los niveles iniciales de S100B no estaban influidos por el género. Por otro lado, algunos investigadores han objetivado que en personas sanas los niveles de S100B en LCR varían según el género y la edad (Nygaard y cols., 1997; Gazzolo y cols., 2003c), pero Wiesmann y cols. (1998), observaron que las concentraciones plasmáticas de dicha proteína en sujetos sanos eran independientes de la edad y género.

En nuestro estudio se excluyeron los pacientes menores de 14 años. No obstante, algunos trabajos sugieren que la evaluación de los niveles de S100B podría ser útil como marcador de patología neurológica prenatal y perinatal. Hasta hace poco, la evaluación de patología prenatal se basaba fundamentalmente en parámetros bioquímicos, diagnóstico por imagen, valoración de patrones de Doppler y de gases. La concentración de la proteína S100B en el sistema nervioso central es muy alta. Se están realizando investigaciones que estudian la posible aplicación de la S100B en la patología perinatal. Se ha documentado que la S100B está elevada en líquido amniótico de fetos con malformaciones y/o daño del sistema nervioso central (Sindic y cols., 1984). Se ha observado que en niños pretérmino con hipoxia perinatal o hemorragia cerebral los niveles de S100B en LCR se relacionan con la extensión de las lesiones cerebrales y el pronóstico a largo

plazo (Blennow y cols., 2001; Whitelaw y cols., 2001). También se ha propuesto la S100B como método de cribaje para la detección de síndromes genéticos que afectan al sistema nervioso central. Por ejemplo, se ha observado que los fetos con trisomía 21 tenían 1,5 veces más alta la proteína S100B que los fetos control (Gazzolo y cols., 2003d; Tort y cols., 2004).

6.1.5. Papel del gradiente yugulo-sistémico

Como ya hemos comentado algunos grupos han medido el gradiente entre sangre yugular y sangre arterial. Sin embargo en ningún trabajo previo se ha analizado si el gradiente entre sangre cerebral y sistémica se relaciona con el pronóstico. La determinación de éste es especialmente interesante en pacientes en los que puede existir una elevación sistémica secundaria a daño extracraneal y en los que la eliminación puede estar disminuida por fallo renal severo.

Hemos observado que aquellos enfermos que evolucionan hacia muerte encefálica presentan dos elevaciones en el gradiente yugulo-sistémico: una al ingreso y otra al 2º día. Por el contrario, los pacientes que no desarrollan muerte encefálica mantienen un gradiente yugulo-sistémico constante en todos los momentos temporales y menor que el detectado en los pacientes con muerte encefálica. Ese patrón bifásico podría explicarse porque al ingreso hay una serie de pacientes con un daño importante lo que

genera una importante liberación de S100B al principio. La segunda elevación podría justificarse por el daño cerebral secundario, que genera liberación de S100B en un segundo tiempo. Como ya hemos comentado, nuestro hospital es un centro trasplantador, lo que condiciona el ingreso en UCI de pacientes con DCA grave sin opciones de tratamiento neuroquirúrgico como potenciales donantes. En el presente trabajo se ha objetivado que el gradiente de S100B en el momento del ingreso, considerando como punto de corte 0,32 µg/l, tiene una alta especificidad (100%) para la determinación de muerte encefálica aunque su sensibilidad es baja. Consideramos que este dato es interesante, ya que la detección precoz de estos pacientes supondría un cambio en el manejo de los mismos y permitiría una mejor optimización de los recursos. Esta apreciación coincide con la aportada por algunos autores, quienes sugieren que la determinación de S100B puede contribuir al diagnóstico precoz de muerte encefálica (Regner y cols., 2001; Dimopoulou y cols., 2003). Dadas las implicaciones que ello conlleva hay que ser cautelosos en la interpretación de este hallazgo y son necesarios nuevos estudios multicéntricos randomizados que lo ratifiquen. Aún con estas limitaciones previamente discutidas, resaltamos el papel del gradiente yugulo-periférico como herramienta pronóstica no sólo para la proteína S100B sino para otros potenciales biomarcadores. Hace una década nuestro grupo estudió el gradiente yugulo-periférico de la IL6 en pacientes con DCA objetivando que podía ser de utilidad como marcador pronóstico (Miñambres y cols., 2003).

6.1.6. Determinaciones de S100B y pronóstico

En el presente trabajo las determinaciones regionales no fueron mejores que las sistémicas para predecir mal pronóstico o muerte cerebral. Por tanto los resultados de nuestro estudio indican que a pesar los valores en sangre periférica son inferiores, éstos podrían ser utilizados como predictores de mal pronóstico. Nuestros resultados muestran que las determinaciones tomadas a las 24 horas son las que mejor predicen el pronóstico a los 6 meses (áreas curva ROC más elevadas). Estos hallazgos concuerdan con lo aportado por autores, como Rainey y cols. (2009), quienes observaron que los niveles de S100B a las 24 horas del TCE eran significativamente más altos en los pacientes que presentaban peores resultados con áreas curva ROC de 0,67 y 0,75 para predecir muerte y malos resultados respectivamente. Sin embargo en un trabajo realizado por Murillo y cols. (2010), las determinaciones sanguíneas de S100B tomadas a las 72 horas eran las que mejor predecían los malos resultados. Nuestra serie tiene la limitación que a las 72 horas, el tamaño de muestra era menor porque hubo pacientes que fallecieron antes. Petzold y cols. (2002), observaron que sólo los dos primeros días había diferencias significativas en la concentración de S100B entre los supervivientes y los fallecidos. En nuestro trabajo, las muestras tomadas a las 48 horas fueron las que presentaron mejor capacidad predictiva, con relación al desarrollo de muerte encefálica. Consideramos que teniendo presente mencionada realidad, el

daño cerebral secundario que tiene lugar horas después de la agresión cerebral, sería el responsable de que las determinaciones tomadas al 2º día permitan pronosticar con mayor atino el desarrollo de muerte encefálica. Nuevamente la heterogeneidad de los trabajos (diferente perfil de pacientes, distintos grados de gravedad, diferente localización de la lesión...) justifican la diversidad de resultados, pues son pocos los trabajos que tienen como variable dependiente el desarrollo de muerte encefálica ya que la población en estudio suelen ser pacientes con DCA leve-moderado. Por este motivo no hallamos en la literatura trabajos comparables al nuestro en cuanto a la capacidad de pronosticar muerte encefálica por parte de la proteína S100B.

Aunque un amplio número de trabajos sugieren que la S100B puede ser un marcador pronóstico de daño cerebral, el punto de corte que determinaría mal pronóstico no está claro. Algunos autores obtienen altos puntos de corte, como por ejemplo Raabe y cols. (2004), los cuales ponen como posible punto de corte 0,5 µg/l. Weiss y cols. (2006) proponen como punto de corte 0,4 µg/l, ya que cuando utilizaban 0,5 µg/l la especificidad subía al 0,92 pero la sensibilidad se reducía considerablemente a 0,29. Otros consideran, que bajando el punto de corte se aumenta la sensibilidad a expensas de la especificidad y consideran puntos de corte todavía más bajos (Foerch y cols., 2004; Murillo-Cabezas y cols., 2010). Como ya se ha comentado esa gran disparidad en los resultados es reflejo de la gran heterogeneidad de los distintos estudios, razón por la que no se pueden comparar los resultados de los diferentes trabajos. Así, Murillo y cols. (2010)

incluyeron pacientes con TCE grave (ECG < 8) y en 72 horas ninguno de ellos falleció mientras que en nuestro trabajo con el mismo criterio de inclusión, tuvimos una mortalidad a las 72 horas de 15,6%. Lo primero que hay que tener en cuenta es la procedencia de la muestra que se analiza y en segundo lugar el momento en el que es tomada. En nuestro trabajo se evaluaron los mejores puntos de corte para determinar mal pronóstico y para diagnosticar muerte cerebral en cada tipo de muestra y en cada momento temporal. Efectivamente se observó que dicho punto es distinto según la procedencia y el momento en el que es realizada la determinación.

El daño cerebral agudo es una patología muy heterogénea y compleja. Diferentes mecanismos intervienen en su fisiopatología, lo que hace difícil encontrar un biomarcador inequívoco de daño cerebral. Probablemente en el futuro se use un panel de múltiples marcadores que aporten información de todos los procesos biológicos que tienen lugar en el cerebro, y en ese panel es probable que se encuentra la S100B. En el presente trabajo hemos analizado el papel de la S100B como potencial marcador valorando el mejor momento y el mejor tipo de muestra biológica.

La proteína S100B se encuentra en pleno apogeo de estudio. De hecho se ha postulado que puede tener un doble papel como agente neuroprotector o neuromodulador. Se ha sugerido que puede participar en el mantenimiento neuronal y en procesos celulares involucrados en el aprendizaje y la memoria (Fazeli y cols., 1990; Marshak, 1990). Mello e Souza y cols. (2000), infundieron S100B en el hipocampo de ratas y vieron

que ello facilitaba la memoria a largo plazo. Kleindienst y cols. (2004) infundieron S100B intraventricular en ratas y observaron una mejoría significativa cognitiva. La proteína S100B producida por los astrocitos es un potencial candidato para incrementar la proliferación de células progenitoras y subsecuentemente la formación de neuronas tras daño cerebral (Kleindienst y cols., 2007). Se ha visto que la S100B incrementa las células progenitoras del hipocampo y la diferenciación neuronal tras daño cerebral traumático y ello se correlaciona con una mejor recuperación (Kleindienst y cols., 2005). Sin embargo también hay estudios experimentales que sugieren que la sobreexpresión de S100B puede exacerbar el daño cerebral (Mori y cols., 2008). Son necesarios nuevos estudios que aclaren el papel de la S100B en los mecanismos de reparación cerebral y evalúen el posible uso de ésta para incrementar los mecanismos innatos de reparación para promover la recuperación del tejido cerebral dañado.

6.1.7. Limitaciones

Una de las posibles limitaciones de este estudio es que las muestras no fueron analizadas inmediatamente después de su extracción. No obstante según un estudio realizado por Raabe y cols. (2003) la concentración de S100B no se ve alterada por el tiempo de almacenamiento, ni por el proceso de congelación y descongelación. Además todas las muestras tomadas se procesaron de la misma manera.

Se consideró el momento de ingreso en la UCI como tiempo cero. Este hecho no implica una demora importante porque nuestro hospital es el único centro sanitario de Cantabria que dispone de Medicina Intensiva y de Neurocirugía, por lo que todo paciente con sospecha o diagnóstico de DCA es inmediatamente trasladado.

La vida media de la proteína S100B es corta (Mussack y cols., 2006) por lo que es posible que aumentos transitorios de esta proteína no hayan sido detectados.

Los niveles de S100B no se determinaron más allá de las 72 horas y pueden aparecer complicaciones posteriores que generen picos secundarios que influyan en el pronóstico.

El pronóstico a los 6 meses no sólo está influido por el daño cerebral agudo. La recuperación de los pacientes puede depender de otros factores como la rehabilitación o la aparición de complicaciones médicas tales como procesos infecciosos nosocomiales.

En el presente trabajo no se incluyeron pacientes politraumatizados. En la práctica diaria los pacientes con TCE pueden presentar daños extracraneales asociados. No obstante según varios estudios, los niveles de S100B no están influidos por la lesión de tejidos extracerebrales (Brondani da Rocha y cols., 2006; Korfiyas y cols., 2007).

El hecho de que sólo se han tenido en consideración pacientes con DCA grave que precisaron ingreso en UCI, puede ser considerado una

limitación porque no se ha valorado la posible utilidad de la S100B en pacientes con DCA que no requieran ingreso en dicha unidad.

6.2. MODULACIÓN DE LA APOPTOSIS

No existen tratamientos eficientes específicos que permitan disminuir/evitar las consecuencias del DCA (Narayan y cols., 2002). Minimizar el daño secundario mediante una actuación terapéutica eficaz constituye un objetivo esencial para mejorar el pronóstico en este tipo de pacientes. La investigación básica puede proporcionar a los clínicos herramientas para mitigar la epidemia silente que representa esta patología. Desentrañar los fenómenos fisiopatológicos iniciados por el DCA y encontrar vías que permitan modularlos es un primer paso para desarrollar intervenciones terapéuticas racionales.

Una cascada de procesos celulares se ponen en marcha unos minutos después del insulto cerebral y continúan durante varios días (Sinclair y Andrews, 2010). Se activan respuestas que inducen la muerte celular por diferentes vías y al mismo tiempo, se activan mecanismos de autoprotección. El balance entre ambas respuestas determinará el destino final del tejido dañado. Durante ese periodo de tiempo se pueden usar terapias que mitiguen el daño. La apoptosis es un mecanismo de muerte celular programada que está involucrado en la homeostasis del tejido

nervioso y por tanto después del DCA. Por razones obvias, la mayoría de los trabajos sobre apoptosis neuronal en el DCA se han efectuado en modelos experimentales empleando diferentes líneas celulares. Entre ellas se encuentran las células SH-SY5Y que han sido ampliamente utilizadas como línea neuronal y que se han empleado en el presente trabajo (Lee y cols., 2000; Shavali y Sens, 2008). También se ha identificado apoptosis después del DCA en investigaciones efectuadas en animales y en humanos (Rink y cols., 1995; Pravdenkova y cols., 1996; Colicos, 1996; Clark y cols., 1999; Ng y cols., 2000; Nathoo y cols., 2004).

Puesto que la apoptosis neuronal juega un papel crucial en la patogenia del DCA, algunos investigadores sugieren que la inhibición de ésta, podría disminuir la lesión cerebral y conducir a una mejoría en los resultados (Nathoo y cols., 2004; Piao y cols., 2012). Estudios previos apoyan mencionada hipótesis, pues se ha objetivado una relación entre la pérdida neuronal y el pronóstico de los pacientes con DCA (Miñambres y cols., 2005; Ballesteros y cols., 2007; Miñambres y cols., 2008a). De ahí que las estrategias para mitigar esa pérdida neuronal se hayan convertido en potenciales opciones terapéuticas. La neuroprotección es entendida como el empleo de cualquier modalidad terapéutica capaz de prevenir, retardar o “revertir” la muerte celular después de una agresión. Aunque hay estudios de terapias neuroprotectoras desde hace más de 50 años, es al final de la década de los ochenta del siglo pasado cuando comienzan a aparecer un gran número de publicaciones tratando de entender los mecanismos

neuroprotectores desencadenados por un insulto cerebral. La neuroprotección despierta un gran interés en el estudio de posibles terapias en pacientes con DCA (Xiong y cols., 2009). En este contexto, la ciclosporina y la hipotermia están siendo investigadas por su potencial papel terapéutico.

6.2.1. Inducción de apoptosis con dopamina

Los modelos neuronales emplean diversos estímulos apoptóticos. La dopamina es un neurotransmisor fisiológico que en determinadas circunstancias puede actuar como un factor neurotóxico. En el presente trabajo se utilizó esta amina como agente inductor de la apoptosis, confirmando esta capacidad. La dopamina puede inducir la muerte celular en cultivos de células neuronales por mecanismos oxidativos y no oxidativos (Ahmadi y cols., 2008). Se considera que al interactuar con receptores celulares pone en marcha una serie de mecanismos que conducen al estrés oxidativo. Algunos de esos productos activan caspasas y por tanto la apoptosis. En el presente trabajo se objetiva que la dopamina induce apoptosis en las células SH-SY5Y y que este efecto es dosis dependiente. Estos resultados coinciden con los aportados por Lee y cols. (2007), quienes emplearon el mismo modelo neuronal (células SH-SY5Y con dopamina como inductor apoptótico) para evaluar el efecto del revestrarol sobre la apoptosis, objetivando que la dopamina inducía apoptosis. La capacidad pro-apoptótica de la dopamina ha sido confirmada en otros modelos neuronales.

Jeon y cols. (2010) mostraron en un modelo con células neuronales humanas HB1.F3 que la inducción de muerte celular por parte de la dopamina y L-Dopa era dosis dependiente. Todos estos hechos apoyan el uso de modelos neuronales con la línea SH-SY5Y y con dopamina como inductor de apoptosis, para el estudio de la modulación de ésta.

6.2.2. Actividad antiapoptótica de la hipotermia

La fiebre es común en los pacientes neurocríticos. Algunos datos apuntan a que la hipertermia tiene un efecto nocivo sobre el cerebro (Axelrod y Diringer, 2007). En modelos experimentales de daño cerebral se ha objetivado que la hipertermia empeora los resultados. En un modelo canino Wass y cols. (1995) observaron que el aumento de 1 o 1,2°C aumenta la pérdida neuronal después de la isquemia. Schwarz y cols. (2000) vieron que la duración de la fiebre en las primeras 72 horas tras hemorragia intracerebral se asociaba con peores resultados. Según un estudio realizado por Andrews y cols. (2002), la fiebre empeora los resultados de pacientes con DCA presumiblemente por agravamiento del daño cerebral secundario. En 2008 Greer y cols., publicaron un meta-análisis que incluía 39 estudios y 14431 pacientes, en el cual se observaba que la fiebre en pacientes con DCA se asociaba a un peor pronóstico. Por todo ello, en la actualidad se recomienda mantener a los pacientes normotérmicos (Haddad y Arabi, 2012).

Se ha tratado de hallar los mecanismos por los que la hipotermia ejerce su papel neuroprotector. Se especula que la hipotermia podría ejercer un efecto neuroprotector por diferentes acciones como descenso de la tasa metabólica cerebral, disminución de la excitotoxicidad, reducción del edema, modulación de la inflamación, inhibición de la muerte celular (Xiong y cols., 2009; Polderman, 2009). Conocer los niveles de actuación de la hipotermia podría ayudar a un uso más racional de la misma.

Varios trabajos experimentales con animales han mostrado que la hipotermia puede interrumpir el proceso de apoptosis. Shibano y cols. (2002) evaluaron la relación entre la hipotermia y la apoptosis neuronal utilizando células PC12 (células derivadas de feocromocitoma de ratas). Estos investigadores observaron que la hipotermia (30-35°C) inhibía la apoptosis de dichas células. Yang y cols. (2009) efectuaron un modelo experimental con células humanas endoteliales umbilicales (HUVECs) sometidas a isquemia/reperfusión y observaron que la hipotermia (33°C) disminuía la apoptosis de dichas células. Esos resultados concuerdan con los hallados en el presente trabajo. Empleando la línea celular SH-SY5Y e induciendo apoptosis mediante el estímulo con dopamina, se ha objetivado cambios en la misma al modificar las condiciones ambientales de temperatura. Las diferencias alcanzaron significación estadística cuando la concentración de dopamina aplicada era mayor (300 µg), no así cuando la dosis del estímulo apoptótico era menor. Por tanto en nuestro modelo experimental, la hipotermia resultó más eficaz cuanto mayor era el estímulo nocivo. Este

aspecto podría indicar que los pacientes con mayor gravedad (mayor daño y por ende mayor apoptosis neuronal) se beneficiarían más que los pacientes con un daño cerebral leve. Nuestros resultados podrían apoyar la hipótesis de que la hipotermia aplicada de forma inmediata al daño puede tener un papel neuroprotector en el DCA inhibiendo la apoptosis. No obstante, su utilidad en la práctica clínica aún está por determinar.

Hay varios estudios clínicos en los que se ha visto que la hipotermia puede disminuir la hipertensión intracraneal, hecho que contribuye de forma importante al aumento del daño cerebral secundario (Jiang y cols., 2000; Polderman y cols., 2002; Jiang, 2009). Por estos motivos la hipotermia puede constituir una posible estrategia terapéutica que ayude a minimizar la lesión cerebral secundaria (Linares y Mayer, 2009; Sadaka y Veremakis, 2012). A nivel clínico varios trabajos han evaluado el posible efecto neuroprotector de la hipotermia, siendo los resultados contradictorios (Marion y Bullock, 2009; Sinclair and Andrews, 2010; Clifton y cols., 2011). En el 2007 según las guías de la Brain Trauma Foundation la hipotermia no reduce la mortalidad en pacientes con DCA pero parece que mejora los resultados funcionales. Esta disparidad de resultados se debe a la heterogeneidad de los trabajos en cuanto a los tipos de pacientes, el tipo de daño cerebral, la monitorización de las complicaciones, los sistemas de enfriamiento. Además, los protocolos de hipotermia (indicación, momento de inicio y finalización, velocidad y modo de inducción y recalentamiento, duración) utilizados son diferentes (Miñambres y cols., 2008b). Por esa

razón en estos momentos se considera sólo una opción terapéutica en el manejo de la hipertensión intracraneal refractaria. En la actualidad se está realizando un estudio multicéntrico que investiga si existe relación entre la hipotermia terapéutica para la reducción de la PIC después de un TCE y el resultado a los 6 meses (Eurotherm3235Trial: www.eurotherm3235trial.eu).

Un hecho probado es que la hipotermia mejora los resultados neurológicos en pacientes con parada cardíaca secundaria a fibrilación ventricular. A pesar del menor nivel de evidencia para su empleo tras parada cardíaca por ritmo no desfibrilable, las Guías para la Resucitación 2010 del Consejo Europeo de Resucitación recomiendan la utilización de la hipotermia terapéutica en los supervivientes comatosos de parada cardíaca asociada inicialmente tanto a ritmos no desfibrilables como a ritmos desfibrilables (Peberdy y cols., 2010).

En la actualidad se considera una medida opcional en el tratamiento de los pacientes con DCA y dado que, la utilización de la hipotermia no es inocua se requieren estudios multicéntricos y aleatorios que precisen el perfil de pacientes y el momento para su aplicación.

Es posible que los más beneficiados sean aquellos con mayor daño. El estudio de los potenciales beneficios así como los diferentes mecanismos de acción de la hipotermia puede ayudar a seleccionar mejor los pacientes y a diseñar el uso adecuado de la misma. En este sentido nuestro trabajo apoya la posible utilización de la hipotermia como terapia neuroprotectora por su efecto antiapoptótico.

6.2.3. Modulación de apoptosis con ciclosporina

La ciclosporina es un péptido no ribosomal cíclico de 11 aminoácidos producido por el hongo *Tolypocladium Inflatum* Gams, aislado inicialmente de una muestra de suelo noruego. Es un fármaco inmunosupresor ampliamente usado en el trasplante de órganos y en enfermedades autoinmunes. Diferente estudios con animales sugieren que el uso de ciclosporina en el DCA puede tener efectos beneficiosos (Okonkwo y Povlishock, 1999; Sullivan y cols., 2000; Riess y cols., 2001; Alessandri y cols., 2002; Fukui y cols., 2003; Fee y cols., 2003; Van Den Heuvel y cols., 2004; Signoretti y cols., 2004; Gabbita y cols., 2005; Redell y cols., 2007; Sullivan y cols., 2011). No está claro si la inhibición de la apoptosis es el mecanismo por el que la ciclosporina podría ejercer un efecto neuroprotector en el DCA. Sin embargo, en nuestro modelo neuronal no se ha objetivado que la ciclosporina inhiba la apoptosis, más aún, la proporción de células apoptóticas era mayor cuanto mayor era la dosis de ciclosporina. Tampoco se ha objetivado en esta investigación que el tiempo de exposición a la ciclosporina influya en la población de células apoptóticas. Estos resultados hay que interpretarlos con cautela; por un lado es un estudio experimental en el que se ha inducido apoptosis mediante dopamina. Consideramos que las vías implicadas en estimular mencionada apoptosis pueden no ser las mismas que las que inhibe la ciclosporina.

Recientemente algunos investigadores han propuesto el uso de la ciclosporina como posible tratamiento del DCA por su capacidad para preservar la integridad mitocondrial en modelos experimentales de daño cerebral. Diferentes trabajos sugieren que el daño mitocondrial juega un papel crucial y central en el desarrollo del daño cerebral, ya que conduce al fallo del metabolismo energético celular y a la activación de la apoptosis y necrosis (Mazzeo y cols., 2009; Soustiel y Larisch, 2010). Diferentes fenómenos que tiene lugar tras el DCA, como por ejemplo el aumento de calcio mitocondrial, modulan la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPM), dando como resultado un fenómeno conocido como transición de la permeabilidad mitocondrial. Éste se caracteriza por la apertura indiscriminada de unos poros proteicos de alta conductancia de la membrana interna de la mitocondria que permiten el paso de sustancias de peso molecular inferior a 1,5 kDa y como consecuencia de ello, se produce una disfunción mitocondrial y finalmente una pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial que induce la liberación de factores pro-apoptóticos responsables de la activación de caspasas (Soustiel y Larisch, 2010). La apertura del PTPM es parte del proceso de apoptosis. La ciclosporina actúa como inhibidor de la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial mediante su unión a la ciclofilina D (Sullivan y cols., 2005; Tsujimoto y Shimizu, 2007; Galluzzi y cols., 2009; Kilbaugh y cols., 2011). De esta forma, protege a la mitocondria del aumento de calcio intracelular, evita el edema mitocondrial, preserva el estado energético

mitocondrial necesario para mantener la producción de ATP y evita la liberación de caspasas (Okonkwo y cols., 1999; Povlishock y Pettus, 1996; Alessandri y cols., 2002; Signoretti y cols., 2004). Algunos autores proponen que la ciclosporina por su unión a la ciclofilina puede bloquear la acción de la calcineurina y de esta manera inhibir la producción de factores que pueden inducir la muerte celular (Lulic y cols., 2011). Por todo ello, se cree que este fármaco puede proteger a las células de los fenómenos que conducen a la muerte celular. Sin embargo en el presente trabajo no se ha podido corroborar que la ciclosporina inhiba la apoptosis neuronal.

Los resultados de nuestro trabajo experimental no descartan a la ciclosporina como potencial agente neuroprotector, tan solo evidencian que la apoptosis inducida en nuestro modelo neuronal no es modulada por este fármaco. Es necesario realizar nuevas investigaciones que ayuden a dilucidar los efectos de la ciclosporina en los fenómenos de muerte celular, para un mejor conocimiento de la misma y para poder determinar el potencial beneficio terapéutico de este fármaco en la lesión cerebral aguda. Tal vez su posible papel neuroprotector esté en relación con su acción inmunosupresora o por su acción en otras vías de muerte celular.

6.2.4. Limitaciones

Este trabajo presenta diferentes limitaciones. Se han analizado los efectos de diferentes estrategias sobre la apoptosis. Las células se han

sometido sólo a dos temperaturas distintas y durante un tiempo limitado. En nuestra opinión sería interesante en futuros trabajos determinar el rango de temperatura en el que la hipotermia disminuye de forma significativa la apoptosis. También sería interesante mantenerlas en las distintas condiciones ambientales y precisar cuando la aplicación de la hipotermia deja de ser efectiva. En este trabajo la temperatura a la que estaban sometidas los cultivos celulares era constante, por lo que no se ha evaluado si pequeñas variaciones de la temperatura pueden modular la apoptosis. En este sentido, resulta atractivo investigarlo ya que ello puede ayudar a orientar sobre la velocidad óptima de enfriamiento y recalentamiento para evitar un incremento de la apoptosis. Las investigaciones experimentales no reproducen la práctica clínica, de ahí que los resultados obtenidos deben ser refrendados por estudios de índole experimental y clínico.

En este trabajo se ha cuantificado la apoptosis pero no se han contemplado otros tipos de muerte celular, los cuales pueden verse afectados por las opciones terapéuticas analizadas. Además, existen diferentes vías para estimular la apoptosis, por lo que en la práctica puede ocurrir que sólo se actúe en algunas de ellas.

El reto de cualquier estrategia terapéutica estudiada a nivel experimental es trasladarla de forma exitosa a la práctica clínica. Muchas de ellas que han mostrado ser eficaces en modelos experimentales, no han sido reproducibles en la práctica. La justificación podemos basarla en la heterogeneidad del DCA que dificulta la puesta en marcha de ensayos

clínicos. Consideramos que trabajos como el nuestro constituyen un primer paso para el planteamiento de posibles tratamientos. Son necesarios estudios multicéntricos randomizados que ayuden a determinar el posible efecto beneficioso de la hipotermia y la ciclosporina en la práctica diaria asistencial.

7 CONCLUSIONES

- En los pacientes con DCA grave, los niveles regionales de S100B son más elevados que los niveles tomados en muestras periféricas, lo que sugiere el origen cerebral de la misma. Existe una buena correlación entre ambos tipos de muestra.
- El tipo de daño o el género de los pacientes no influye en las determinaciones de la proteína S100B.
- El perfil temporal de la proteína S100B varía según la evolución clínica posterior. Los pacientes con mal pronóstico al sexto mes del DCA presentan el pico máximo a las 48 horas.
- La S100B puede ser un biomarcador pronóstico de DCA. Los pacientes que evolucionan de forma desfavorable presentan concentraciones más altas, siendo las determinaciones realizadas a las 24 horas las que mejor predicen el resultado a los 6 meses.
- Las muestras con mayor capacidad predictiva de muerte encefálica son las tomadas en el momento 0 y a las 48 horas.
- Los puntos de corte a considerar para determinar mal pronóstico varían según el tipo de muestra y el momento en que ésta es tomada.

- El gradiente regional-sistémico de S100B tiene un gran interés en el diagnóstico de muerte encefálica.
- En la línea celular SH-SY5Y la dopamina es capaz de inducir apoptosis, siendo este efecto dosis dependiente.
- La hipotermia puede inhibir la apoptosis inducida por dopamina en un modelo experimental empleando la línea SH-SY5Y.
- La ciclosporina incrementa la apoptosis inducida por dopamina en la línea celular SH-SY5Y.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Adami C, Sorci G, Blasi E, Agneletti AL, Bistoni F, Donato R. S100B expression in and effects on microglia. *Glia*. 2001;33:131-42.
- Adekoya N, Thurman DJ, White DD, Webb KW. Surveillance for traumatic brain injury deaths United States, 1989-1998. *MMWR Surveill Summ*. 2002;51:1-14.
- Ahlemeyer B, Beier H, Semkova I, Schaper C, Kriegstein J. S-100beta protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res*. 2000;858:121-8.
- Ahmadi FA, Grammatopoulos TN, Poczobutt AM, Jones SM, Snell LD, Das M, y cols. Dopamine selectively sensitizes dopaminergic neurons to rotenone-induced apoptosis. *Neurochem Res*. 2008;33:886-901.
- Alessandri B, Rice AC, Levasseur J, DeFord M, Hamm RJ, Bullock MR. Cyclosporin A improves brain tissue oxygen consumption and learning/memory performance after lateral fluid percussion injury in rats. *J Neurotrauma*. 2002;19:829-41.
- Alted E, Toral D. Fundamentos diagnósticos y terapéuticos en TCE grave: Pautas para minimizar el desarrollo de la lesión secundaria. En:

- Quesada A y Rabanal JM, editores. Actualización en el manejo del trauma grave. Madrid: Ergon; 2006. p. 167-82.
- Alzamora MT, Sorribes M, Heras A, Vila N, Vicheto M, Forés R, y cols. Ischemic stroke incidence in Santa Coloma de Gramenet (ISISCOG), Spain. A community-based study. *BMC Neurol.* 2008;27;8:5.
 - Andrezza AC, Cassini C, Rosa AR, Leite MC, de Almeida LM, Nardin P, y cols. Serum S100B and antioxidant enzymes in bipolar patients. *J Psychiatr Res.* 2007;41:523-9.
 - Andrews PJ, Dearden NM, Miller JD. Jugular bulb cannulation: description of a cannulation technique and validation of a new continuous monitor. *Br J Anaesth.* 1991;67:553-8.
 - Andrews PJ, Sleeman DH, Statham PF, McQuatt A, Corruble V, Jones PA, y cols. Predicting recovery in patients suffering from traumatic brain injury by using admission variables and physiological data: a comparison between decision tree analysis and logistic regression. *J Neurosurg.* 2002;97:326-36.
 - Arcuri C, Giambanco I, Bianchi R, Donato R. Annexin V, annexin VI, S100A1 and S100B in developing and adult avian skeletal muscles. *Neuroscience.* 2002;109:371-88.
 - Ariza M, Pueyo R, del Mar Matarín M, Junqué C, Mataró M, Clemente I, y cols. Influence of APOE polymorphism on cognitive and behavioural outcome in moderate and severe traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006;77:363-6.

- Astrand R, Romner B, Reinstrup P, Friis-Hansen L, Undén J. Comparison between capillary, venous and arterial levels of protein S100B in patients with severe brain pathology. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50:1055-61.
- Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, y cols. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Therap.* 2000;69:89-95.
- Aurell A, Rosengren LE, Karlsson B, Olsson JE, Zbornikova V, Haglid KG. Determination of S-100 and glial fibrillary acidic protein concentrations in cerebrospinal fluid after brain infarction. *Stroke.* 1991;22:1254-8.
- Axelrod YK, Diringner MN. Temperature management in acute neurologic disorders. *Crit Care Clin.* 2007;22:767-85.
- Bakay RA, Ward AAJ. Enzymatic changes in serum and cerebrospinal fluid in neurological injury. *J Neurosurg.* 1983;58:27-37.
- Ballesteros MA, López-Hoyos M, Muñoz P, Marin MJ, Miñambres E. Apoptosis of neuronal cells induced by serum of patients with acute brain injury: a new in vitro prognostic model. *Intensive Care Med.* 2007;33:58-65.
- Ballesteros-Flores C, De Jesús-Montelongo F, López-Ramírez I, Alarcón-Sánchez LL, González-Arista J, González-Chávez MS. Saturación yugular de oxígeno en pacientes con trauma craneoencefálico. *Archivos de Medicina de Urgencia de México.* 2011;3:62-6.

- Beer C, Blacker D, Bynevelt M, Hankey GJ, Puddey IB. Systemic markers of inflammation are independently associated with S100B concentration: results of an observational study in subjects with acute ischaemic stroke. *J Neuroinflammation*. 2010;7:71-5.
- Begaz T, Kyriacou DN, Segal J, Bazarian JJ. Serum biochemical markers for post-concussion syndrome in patients with mild traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2006;23:1201-10.
- Berg J, Tagliaferri F, Servadei F. Cost of trauma in Europe. *European Journal of Neurology*. 2005; 12 Suppl 1:85-90.
- Berlot G, Nicolazzi G, Viviani M, Tomasini A, Bussani R. Massive cerebral venous thrombosis associated with the bilateral catheterization of the internal jugular veins: a case report. *Eur J Neurol*. 1996;3:373-6.
- Bernardini C, Lattanzi W, Businaro R, Leone S, Corvino V, Sorci G, y cols. Transcriptional effects of S100B on neuroblastoma cells: perturbation of cholesterol homeostasis and interference on the cell cycle. *Gene Expr*. 2010;14:345-59.
- Bertsch T, Casarin W, Kretschmar M, Zimmer W, Walter S, Sommer C, y cols. Protein S-100B: a serum marker for ischemic and infectious injury of cerebral tissue. *Clin Chem Lab Med*. 2001;39:319-23.
- Bhatia A, Gupta A. Neuromonitoring in intensive care unit. Part 1: Intracranial pressure and cerebral blood flow. *Intensive Care Med*. 2007; 33:1263-71.

- Bianchi R, Giambanco I, Donato R. S100B/RAGE-dependent activation of microglia via NF-kappaB and AP-1 Co-regulation of COX-2 expression by S100B, IL-1beta and TNF-alpha. *Neurobiol.* 2010;31:665-77.
- Blennow M, Sävman K, Ilves P, Thoresen M, Rosengren L. Brain-specific proteins in the cerebrospinal fluid of severely asphyxiated newborn infants. *Acta Paediatr.* 2001;90:1171-5.
- Bloomfield SM, McKinney J, Smith L, Brisman J. Reliability of S100B in predicting severity of central nervous system injury. *Neurocrit Care.* 2007;6:121-38.
- Bouvier D, Eisenmann N, Gillart T, Bonneau J, Guelon D, Schoeffler P, y cols. Concentrations sériques jugulaire et artérielle de la protéine S100B chez les patients victimes d'un traumatisme crânien grave. *Ann Biol Clin.* 2012;70:269-75.
- Bouwhuis MG, Suciú S, Kruit W, Salès F, Stoitchkov K, Patel P, y cols. Prognostic value of serial blood S100B determinations in stage IIB-III melanoma patients: a corollary study to EORTC trial 18952. *Eur J Cancer.* 2011;47:361-8.
- Brea D, Sobrino T, Blanco M, Cristobo I, Rodríguez-González R, Rodríguez-Yañez M, y cols. Temporal profile and clinical significance of serum neuron-specific enolase and S100 in ischemic and hemorrhagic stroke. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47:1513-8.
- Brell M, Ibañez J. Manejo del traumatismo craneoencefálico leve en España: Encuesta multicéntrica Nacional. *Neurocirugía.* 2001;12:105-24.

- Brewton LS, Haddad L, Admitia EC. Colchicine-induced cytoskeletal collapse and apoptosis in N-18 neuroblastoma cultures is rapidly reversed by applied S100beta. *Brain Res.* 2001;912:9-16.
- Broderick J, Connolly S, Feldmann E, Hanley D, Kase C, Krieger D, y cols. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage in adults: 2007 update: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, High Blood Pressure Research Council, and the Quality of Care and Outcomes in Research Interdisciplinary Working Group. *Stroke.* 2007;38:2001-23.
- Brondani da Rocha A, Fett Schneider R, de Freitas GR, André C, Grivicich I, Zanoni C, y cols. Role of serum S100B as a predictive marker of fatal outcome following isolated severe head injury or multitrauma in males. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44:1234-42.
- Bullock MR y Povlishock JT. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. Brain trauma foundation 2007. *J of neurotrauma.* 2007;24:S1-106.
- Buron FJ, Quesada A, Rabanal JM. Neuromonitorización invasiva: presión intracraneal, saturación yugular y presión tisular de oxígeno. En: Quesada A, Rabanal JM, editores. *Procedimientos técnicos en urgencias, medicina crítica y pacientes de riesgo.* Madrid: Ergon; 2009. p. 399-412.
- Businaro R, Leone S, Sorci G, Donato R, Lauro GM, Fumagalli LI. S100B protects LAN-5 neuroblastoma cells against Abeta amyloid-induced

- neurotoxicity via RAGE engagement at low doses but increases Abeta amyloid neurotoxicity at high doses. *J Neurosci Res*. 2006;83:897-906.
- Castanares-Zapatero D, Hantson P. Pharmacological treatment of delayed cerebral ischemia and vasospasm in subarachnoid hemorrhage. *Ann Intensive Care*. 2011;1:12.
 - Castellanos M, Leira R, Serena J, Blanco M, Pedraza S, Castillo J, y cols. Plasma cellular-fibronectin concentration predicts hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2004;35:1671-6.
 - Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain I, Castillo J, y cols. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2003;34:40-5.
 - Ciccarelli R, Di Iorio P, Bruno V, Battaglia G, D'Alimonte I, D'Onofrio, y cols. Activation of A1 adenosine or mGlu3 metabotropic glutamate receptors enhances the release of nerve growth factor and S100 beta protein from cultured astrocytes. *Glia*. 1999;27:275-81.
 - Ciro J. Neuromonitoría en cuidado intensivos. En: Rubiano A, Pérez R, editores. *Neurotrauma y neurointensivismo*. Bogotá: Distribuna Editorial Médica; 2008. p. 513-22.
 - Clark RS, Kochanek PM, Chen M, Watkins SC, Marion DW, Chen J, y cols. Increases in Bcl-2 and cleavage of caspase-1 and caspase-3 in human brain after head injury. *FASEB J*. 1999;13:813-21.

- Clifton GL, Valadka A, Zygun D, Coffey CS, Drever P, Fourwinds S, y cols. Very early hypothermia induction in patients with severe brain injury (the National Acute Brain Injury Study: Hypothermia II): a randomised trial. *Lancet Neurol.* 2011;10:131-9.
- Colicos MA, Dash PK. Apoptotic morphology of dentate gyrus granule cells following experimental cortical impact injury in rats: possible role in spatial memory deficits. *Brain Res.* 1996;739:120-31.
- Coplin WM, O'Keefe GE, Grady MS, Grant GA, March KS, Winn HR, y cols. Thrombotic, infectious, and procedural complications of the jugular bulb catheter in the intensive care unit. *Neurosurgery.* 1997;41:101-107.
- Cormio M, Valadka AB, Robertson CS. Elevated jugular venous oxygen saturation after severe head injury. *J Neurosurg.* 1999;90:9-15.
- Cruz J, Gennarelli TA, Alves WM. Continuous monitoring of cerebral hemodynamic reserve in acute brain injury: relationship to change in brain swelling. *J Trauma.* 1992;32:629-35.
- Cruz J, Miner ME, Allen SJ, Alves WM, Gennarelli TA. Continuous monitoring of cerebral oxygenation in acute brain injury: assessment of cerebral hemodynamic reserve. *Neurosurgery.* 1991;29:743-9.
- Cruz J. Continuous versus serial cerebral hemometabolic monitoring: applications in acute brain trauma. *Acta Neurochir Suppl.* 1988;42:35-9.
- Cruz J. Jugular venous oxygen saturation monitoring. *J Neurosurg.* 1992; 77:162-3.

- Chesnut RM. Care of central nervous system injuries. *Surg Clin North Am.* 2007;87:119-56.
- Datsur D, Lane M, Hansen D. Effects of aging on cerebral circulation and metabolism in man. En: Birren J, Butler R, Greenhouse S, editores. *Human aging. A Biological and behavioral study.* Washington, DC: US Government Printing Office; 1963. p. 59-76.
- Davies S, Lindley A. Monitoring in the injured brain. En: Adams J, Bell D, McKinlay J, editores. *Neurocritical Care: A Guide to Practical Management.* London: Springer-verlag; 2010. p. 9-17.
- De Kruijk JR, Leffers P, Menheere PP, Meerhoff S, Twijnstra A. S-100B and neuron-specific enolase in serum of mild traumatic brain injury patients. A comparison with health controls. *Acta Neurol Scand.* 2001;103:175-9.
- De Rooij NK, Linn FH, Van der Plas JA, Algra A, Rinkel GJ. Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2007;78:1365-72.
- Dearden N, Midgley S. Technical considerations in continuous jugular venous oxygen saturation measurement. *Acta Neurochir Suppl (Wien).* 1993;59:91-7.
- Dearden NM. Jugular bulb venous oxygen saturation in the management of severe head injury. *Curr Opin Anaesthesiol.* 1991;4:279-86.

- Delgado P, Alvarez J, Santamarina E, Molina C, Quintana M, Rosell A, y cols. Plasma S100B level after acute spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2006;37:2837-9.
- Díaz-Regañon G, Iribarren-Sarrias JL, Fernández-Rico R, Ortiz-Piquer M, García-Castrillo L. Cociente veno-yugular de oxígeno y muerte encefálica. *Med Intensiva*. 1998;22:250-3.
- Díaz-Regañon G, Miñambres E, Holanda M, González-Herrera S, López-Espadas F, Garrido-Díaz C. Usefulness of venous oxygen saturation in the jugular bulb for the diagnosis of brain death: report of 118 patients. *Intensive Care Med*. 2002;28:1724-8.
- Dimopoulou I, Korfiatis S, Dafni U, Anthi A, Psachoulia C, Jullien G, y cols. Protein S-100b serum levels in trauma induced brain death. *Neurology*. 2003;60:947-51.
- Donato R. Intracellular and extracellular Roles of S100 Proteins. *Microscopy Research and Technique*. 2003;60:540-51.
- Donato R. s-100: a multigenic family of calcium modulated proteins of the EF-hand type with intracelular and extracelular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33:637-68.
- Dressler J, Hanisch U, Kuhlisch E, Geiger KD. Neuronal and glial apoptosis in human traumatic brain injury. *Int J Legal Med*. 2007;121:365-75.

- Ellis EF, McKinney JS, Willoughby KA, Liang S, Povlishok. A new model for rapid stretch-induced injury of cells in culture: characterization of the model using astrocytes. *J Neurotrauma*. 1995;12:325-39.
- Elting JW, De Jager AE, Teelken AW, Schaaf MJ, Maurits NM, Van der Naalt J, y cols. Comparison of serum S-100 protein levels following stroke and traumatic brain injury. *J Neurol Sci*. 2000;181:104-10.
- Escudero Augusto D, Marqués Alvarez L, Taboada Costa F. Up-date in spontaneous cerebral hemorrhage. *Med Intensiva*. 2008;32:282-95.
- Esposito G, Imitola J, Lu J, De Filippis D, Scuderi C, Ganesh VS, y cols. Genomic and functional profiling of human Down syndrome neural progenitors implicates S100B and aquaporin 4 in cell injury. *Hum Mol Gen*. 2008;17:440-57.
- Fandino J, Stocker R, Prokop S, Trentz O, Imhof HG. Cerebral oxygenation and systemic trauma related factors determining neurological outcome after brain injury. *J Clin Neurosci*. 2000;7:226-33.
- Fazeli MS, Errington ML, Dolphin AC, Bliss TV. Extracellular proteases and S100 protein in long-term potentiation in the dentate gyrus of the anaesthetized rat. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1990; 268:369-75.
- Fearnside MR, Simpson DA. Epidemiology. En: Reilly PL, Bullock RB, editores. *Head Injury: Pathophysiology and Manegement (2ªEd)*. London: Hodder Arnold; 2005. p. 3-25.

- Fee D, Crumbaugh A, Jacques T, Herdrich B, Sewell D, Auerbach D, y cols. Activated/effector CD4+ T cells exacerbate acute damage in the central nervous system following traumatic injury. *J Neuroimmunol.* 2003; 136:54-66.
- Flaherty ML, Haverbusch M, Sekar P, Kissela B, Kleindorfer D, Moomaw CJ, y cols. Long-term mortality after intracerebral hemorrhage. *Neurology.* 2006;66:1182-6.
- Florio P, Michetti F, Bruschetti M, Lituania M., Bruschetti P, Severi F M, y cols. Amniotic fluid S100B protein in mid-gestation and intrauterine fetal death. *Lancet.* 2004;364:270-2.
- Floyd C, Lyeth B. Astroglia: Important mediators of traumatic brain injury. En: Weber J, Maas A, editores. *Neurotrauma: New Insights into Pathology and Treatment: 161 (Progress in Brain Research).* Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 61-79.
- Foerch C, Bettina O, Singer OC, Neumann-Haefelin T. Serum S100B predicts a malignant course of infarction in patients with acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 2004;35:2160-4.
- Foerch C, Singer OC, Neumann-Haefelin T, Du Mesnil de Rochemont R, Steinmetz H, Sitzer M. Evaluation of serum S100B as a surrogate marker for long-term outcome and infarct volume in acute middle cerebral artery infarction. *Arch Neurol.* 2005;62:1130-4.
- Foerch C, Wunderlich MT, Dvorak F, Humpich M, Kahles T, Goertler M, y cols. Elevated Serum S100B Levels Indicate a Higher Risk of

- Hemorrhagic Transformation After Thrombolytic Therapy in Acute Stroke. *Stroke*. 2007;38:2491-5.
- Fogelholm R, Murros K, Rissanen A, Avikainen S. Long term survival after primary intracerebral haemorrhage: a retrospective population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2005;76:1534-8.
 - Fonnegra J y Fonnegra A. Manejo integral del paciente con hemorragia subaracnoidea. En: Rubiano A, Pérez R, editores. *Neurotrauma y neurointensivismo*. Bogotá: Distribuna Editorial Medica; 2008. p. 615-43.
 - Fukui S, Signoretti S, Dunbar JG, Marmarou A. The effect of cyclosporin A on brain edema formation following experimental cortical contusion. *Acta Neurochir Suppl*. 2003;86:301-3.
 - Gabbita SP, Scheff SW, Menard RM, Roberts K, Fugaccia I, Zemlan FP. Cleaved-tau: a biomarker of neuronal damage after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2005;22:83-94.
 - Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci*. 2009;10:481-94.
 - Gazzolo D, Bruschetti M, Corvino V, Lituania M, Sarli R, Bruschetti P, y cols. Amniotic fluid levels of S100B protein in normal and trisomy-21 fetuses. *Clin Chim Acta*. 2003d;330:131-3.
 - Gazzolo D, Florio P, Zullino E, Giovannini L, Scopesi F, Bellini C, y cols. S100B protein increases in human blood and urine during stressful activity. *Clin Chem Lab Med*. 2010;48:1363-5.

- Gazzolo D, Frigiola A, Bashir M, Iskander I, Mufeed H, Aboulgar H, y cols. Diagnostic accuracy of S100B urinary testing at birth in full-term asphyxiated newborns to predict neonatal death. *PLoS One*. 2009;4:e4298.
- Gazzolo D, Marinoni E, Di Iorio R, Bruschetti M, Kornacka M, Lituania M, y cols. Measurement of urinary S100B protein concentrations for the early identification of brain damage in asphyxiated full-term infants. *Arch Ped Adolesc Med*. 2003a;157:1163-8.
- Gazzolo D, Michetti F, Bruschetti M, Marchese N, Lituania M, Mangraviti S, y cols. Pediatric concentrations of S100B protein in blood: age- and sex-related changes. *Clin Chem*. 2003c;49:967-70.
- Gazzolo D, Monego G, Corvino V, Bruschetti M, Bruschetti P, Zelano G, y cols. Human milk contains S100B protein. *Biochim Biophys Acta*. 2003b;1619:209-12.
- Geyer C, Ulrich A, Gräfe G, Stach B, Till H. Diagnostic value of S100B and neuron-specific enolase in mild pediatric traumatic brain injury. *J Neurosurg Pediatr*. 2009;4:339-44.
- Gibbs EL, Lennox WG, Nims LF, Gibbs FA. Arterial and cerebral venous blood. Arterial-venous differences in man. *J Biol Chem*. 1942;144:325-32.
- Gómez PA, Lobato RD, Boto GR, De la Lama A, González PJ, De la Cruz J. Age and outcome after severe head injury. *Acta Neurochir (Wien)*. 2000;142:373-81.

- Gopcevic A, Mazul-Sunko B, Marout J, Sekulic A, Antoljak N, Siranovic M, y cols. Plasma interleukin-8 as a potential predictor of mortality in adult patients with severe traumatic brain injury. *Tohoku J Exp Med.* 2007;21:387-93.
- Gopinath SP, Robetson CS, Contant CF, Hayes C, Feldman Z, Narayan RK, y cols. Jugular venous desaturation and outcome after head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatr.* 1994;57:717-23.
- Graabe HJ, Ahrens N, Rose HJ, Kessler C, Freyberger HJ. Neurotrophic factor S100 beta in major depression. *Neuropsychobiology.* 2001;44:88-90.
- Greer DM, Funk SE, Reaven NL, Ouzounelli M, Uman GC. Impact of fever on outcome in patients with stroke and neurologic injury: A comprehensive meta-analysis. *Stroke.* 2008;39:3029-35.
- Grysiewicz RA, Thomas K, Pandey DK. Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke: incidence, prevalence, mortality, and risk factors. *Neurol Clin.* 2008;26:871-95.
- Haddad SH y Arabi YM. Critical care management of severe traumatic brain injury in adults. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2012;20:12.
- Haimoto H, Hosoda S, Kato K. Differential distribution of immunoreactive S100-alpha and S100-beta proteins in normal nonnervous human tissues. *Lab Invest.* 1987;57:489-98.
- Haitsma I, Maas IR. Monitoring cerebral oxygenation in traumatic brain injury. En: Weber J, Maas A, editores. *Neurotrauma New Insights into*

- Pathology and Treatment 161 (Progress in Brain Research). Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 207-16.
- Hanson W. Jugular Venous Oximetry. En: Hanson W, editor. Procedures in critical care. United States of America: McGraw-Hill; 2009. p. 51-2.
 - Hatiboglu MT, Anil A. Structural variations in the jugular foramen of the human skull. *J Anat.* 1992;180:191-6.
 - Herrmann M, Jost S, Kutz S, Ebert AD, Kratz T, Wunderlich MT, y cols. Temporal profile of release of neurobiochemical markers of brain damage after traumatic brain injury is associated with intracranial pathology as demonstrated in cranial computerized tomography. *J Neurotrauma.* 2000; 17:113-22.
 - Houlden H, Greenwood R. Apolipoprotein E4 and traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006;77:1106-07.
 - Hu YY, Dong XQ, Yu WH, Zhang ZY. Change in plasma S100B level after acute spontaneous basal ganglia hemorrhage. *Shock.* 2010;33:134-40.
 - Huttunen HJ, Kuja-Panula J, Sorci G, Agneletti AL, Donato R, Rauvala H. Coregulation of neurite outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through receptor for advanced glycation end products (RAGE) activation. *J Biol Chem.* 2000;275:40096-105.
 - Hyder AA, Wunderlich CA, Puvanachandra P, Gururaj G, Kobusingye OC. The impact of traumatic brain injuries: a global perspective. *NeuroRehabilitation.* 2007;22:341-53.

- Ingebrigtsen T, Romner B. Biochemical serum markers of TBI. *J Trauma*. 2002;52:798-808.
- Isobe T, Tsugita A, Okuyama T. The amino acid sequence and the subunit structure of bovine brain S100 protein (PAP I-b). *J Neurochem*. 1978;30:921-3.
- Jauch EC, Lindsay C, Broderick J, Fagan SC, Tilley BC, Levine SR, NINDS rt-PA Stroke Study Group. Association of serial biochemical markers with acute ischemic stroke: the national institute of neurological disorders and stroke recombinant tissue plasminogen activator stroke study. *Stroke*. 2006;37:2508-13.
- Jennet B, Bond M. Assessment of outcome after severe brain damage: A practical scale. *Lancet*. 1975;1:480-4.
- Jeon SM, Cheon SM, Bae HR, Kim JW, Kim SU. Selective Susceptibility of Human Dopaminergic Neural Stem Cells to Dopamine-Induced Apoptosis. *Exp Neurobiol*. 2010;19:155-64.
- Jiang J, Yu M, Zhu C. Effect of long-term mild hypothermia therapy in patients with severe traumatic brain injury: 1-year follow-up review of 87 cases. *J Neurosurg*. 2000;93:546-9.
- Jiang JY. Clinical study of mild hypothermia treatment for severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2009; 26:399-406.
- Kay A, Petzold A, Kerr M, Keir G, Thompson E, Nicoll J. Decreased cerebrospinal fluid apolipoprotein E after subarachnoid hemorrhage:

- Correlation with injury severity and clinical outcome. *Stroke*. 2003; 34:637-42.
- Kay A, Teasdales G. Head injury in the United Kingdom. *World J Surg*. 2001;25:1210-20.
 - Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26: 239-57.
 - Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011;91:461-553.
 - Kilbaugh TJ, Bhandare S, Lorom DH, Saraswati M, Robertson CL, Margulies SS. Cyclosporin A preserves mitochondrial function after traumatic brain injury in the immature rat and piglet. *J Neurotrauma*. 2011;28:763-74.
 - Klein JR, Hoon DS, Nangauyan J, Okun E, Cochran AJ. S100 protein stimulates cellular proliferation. *Cancer Immunol Immunother*. 1989;29:133-8.
 - Kleindienst A, Harvey HB, Rice AC, Müller C, Hamm RJ, Gaab MR, et al. Intraventricular infusion of the neurotrophic protein S100B improves cognitive recovery after fluid percussion injury in the rat. *J Neurotrauma*. 2004;21:541-7.
 - Kleindienst A, Hesse F, Bullock MR, Buchfelder M. The neurotrophic protein S100B: value as a marker of brain damage and possible therapeutic implication. En: Weber J, Maas A, editores. *Neurotrauma*:

- New Insights into Pathology and Treatment: 161 (Progress in Brain Research). Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 317-26.
- Kleindienst A, McGinn MJ, Harvey HB, Colello RJ, Hamm RJ, Bullock MR. Enhanced hippocampal neurogenesis by intraventricular S100B infusion is associated with improved cognitive recovery after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2005;22:645-55.
 - Kleindienst A, Ross Bullock M. A critical analysis of the role of the neurotrophic protein S100B in acute brain injury. *J Neurotrauma*. 2006;23:1185-200.
 - Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: A severity of disease classification system. *Crit Care Med*. 1985;13:818-29.
 - Kochanek PM, Berger RP, Bayir H, Wagner AK, Jenkins LW, Clark RS. Biomarkers of primary and evolving damage in traumatic and ischemic brain injury: diagnosis, prognosis, probing mechanisms, and therapeutic decision making. *Curr Opin Crit Care*. 2008;14:135-41.
 - Koppal T, Lam AG, Guo L, Van Eldik LJ. S100B proteins that lack one or both cysteine residues can induce inflammatory responses in astrocytes and microglia. *Neurochem Int*. 2001;39:401-7.
 - Korfiatis S, Stranjalis G, Boviatsis E, Psachoulia C, Jullien G, Gregson B, y cols. Serum S-100B protein monitoring in patients with severe traumatic brain injury. *Intensive Care Med*. 2007;33:255-60.

- Kövesdi E, Lückl J, Bukovics P, Farkas O, Pál J, Czeiter E. Update on protein biomarkers in traumatic brain injury with emphasis on clinical use in adults and pediatrics. *Acta Neurochir.* 2010;152:1-17.
- Kramer AH, Fletcher JJ. Statins in the management of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A systematic review and meta-analysis. *Neurocrit Care.* 2010;12:285-96.
- Krayenbühl HA, Yasargil MG. The cerebral veins. En: Krayenbühl HA, Yasargil G, Huber P, editores. *Cerebral angiography*, 2ª edición. London: Butterworth 1968. p. 85-123.
- Laird MD, Vender JR, Dhandapani KM. Opposing roles for reactive astrocytes following traumatic brain injury. *Neurosignals.* 2008;16:154-64.
- Lara DR, Gama CS, Belmonte-de-Abreu P, Portela LV, Gonçalves CA, Fonseca M, y cols. Increased serum S100B protein in schizophrenia: a study in medication-free patients. *J Psychiatr Res.* 2001;35:11-4.
- Lee HS, Park CW, Kim YS. MPPp increases the vulnerability to oxidative stress rather than directly mediating oxidative damage in human neuroblastoma cells. *Exp Neurol.* 2000;165:164-71.
- Lee MK, Kang SJ, Poncz M, Song KJ, Park KS. Resveratrol protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from apoptosis induced by dopamine. *Exp Mol Med.* 2007;30;39:376-84.
- León-Carrión J, De Serdio-Arias ML, Cabezas FM, Roldan JM, Dominguez-Morales R, Matin JM, y cols. Neurobehavioural and cognitive

- profile of traumatic brain injury patients at risk for depression and suicide. *Brain Inj.* 2001;15:175-81.
- León-Carrión J, Dominguez-Morales MR, Barroso JM, Murillo-Cabezas F. Epidemiology of traumatic Brain Injury and Subarachnoid Hemorrhage. *Pituitary.* 2005;8:197-202.
 - León-Carrión J, Machuca Murga F, Murga Sierra M, Domínguez-Morales R. Eficacia de programas CRECER de tratamiento intensivo, integral y multidisciplinar de pacientes con traumatismo craneoencefálico valores médico-legales. *Revista Española de Neuropsicología.* 1999;1:75-88.
 - Lewis SB, Myburg JA, Reilly PL. Detection of cerebral venous desaturation by continuous jugular bulb oximetry following acute neurotrauma. *Anaesth Intensive Care.* 1995;23:307-14.
 - Li JP, Lu L, Wang LJ, Zhang FR, Shen WF. Increased serum levels of S100B are related to the severity of cardiac dysfunction, renal insufficiency and major cardiac events in patients with chronic heart failure. *Clin Biochem.* 2011;44:984-8.
 - Lin JH, Weigel H, Cotrina ML, Liu S, Bueno E, Hansen AJ, y cols. Gap-junction-mediated propagation and amplification of cell injury. *Nat Neurosci.* 1998;1:494-500.
 - Linares G, Mayer SA. Hypothermia for the treatment of ischemic and hemorrhagic stroke. *Crit Care Med.* 2009;37:S243-9.
 - Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev.* 1999;79:1431-568.

- Liu L, Zheng CX, Peng SF, Zhou HY, Su ZY, He L, y cols. Evaluation of urinary S100B protein level and lactate/creatinine ratio for early diagnosis and prognostic prediction of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Neonatology*. 2010;97:41-4.
- Lizarbe MA. El suicidio y la muerte celular. *Rev R Acad Cienc Exact Fis Nat*. 2007;101:419-54.
- Lulic D, Burns J, Bae EC, Loveren HV, Borlongan CV. Review of Laboratory and Clinical Data. Supporting the Safety and Efficacy of Cyclosporin A in Traumatic Brain Injury. *Neurosurgery*. 2011;68:1172-86.
- Lynne Moore, Andre L, Camden S. Statistical Validation of the Glasgow Coma Score. *J Trauma*. 2006;60:1238-44.
- Machado-Vieira R, Lara DR, Portela LV, Gonçalves CA, Soares JC, Kapczinski F, y cols. Elevated serum S100B protein in drug-free bipolar patients during first manic episode: a pilot study. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2002;12:269-72.
- Macmillan CSA y Andrews PJD. Cerebrovenous oxygen saturation monitoring: practical considerations and clinical relevance. *Intensive Care Med*. 2000;26:1028-36.
- Majno G and Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995;146:3-15.
- Marín-Teva JL, Cuadros MA, Martín-Oliva D, Navascués J. Microglia and neuronal cell death. *Neuron glia biology*. 2011;7:25-40.

- Marion D, Bullock MR. Current and future role of therapeutic hypothermia. *J Neurotrauma*. 2009;26:455-67.
- Marshak DR. S100 beta as a neurotrophic factor. *Prog Brain Res*. 1990; 86:169-81.
- Martin SJ, Mearns PM, Vyakarnam A. HIV-1 infection of human CD4+ T cells in vitro. Differential induction of apoptosis in these cells. *J Immunol*. 1994;152:330-42.
- Martínez-González NA, Sudlow CLM. Effects of apolipoprotein E genotype on outcome after ischaemic stroke, intracerebral haemorrhage and subarachnoid haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2006;77: 1329-35.
- Massaro AR, Michetti F, Laudisio A, Bergonzi P. Myelin basic protein and S-100 antigen in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis in the acute phase. *Ital J Neurol Sci*. 1985;6:53-6.
- Mazzeo AT, Beat A, Singh A, Bullock MR. The role of mitochondrial transition pore, and its modulation, in traumatic brain injury and delayed neurodegeneration after TBI. *Experimental Neurology*. 2009;218:363-70.
- Mazzini GS, Schaf DV, Vinadé ER, Horowitz E, Bruch RS, Brunm LM, y cols. Increased S100B serum levels in dilated cardiomyopathy patients. *J Card Fail*. 2007;13:850-4.
- Mbele GO, Deloulme JC, Gentil BJ, Delphin C, Ferro M, Garin J, y cols. The zinc- and calcium-binding S100B interacts and co-localizes with

- IQGAP1 during dynamic rearrangement of cell membranes. *J Biol Chem.* 2002;277:49998–50007.
- Mc Keating EG, Andrews PJ, Signorini DF, Mascia L. Transcranial cytokine gradients in patients requiring, intensive care after acute brain injury. *Br J Anaesth.* 1997;78:520-3.
 - McKeating E, Andrews P, Mascia L. Relationship of neuron specific enolase and S100 concentrations in systemic and jugular venous serum to injury severity and outcome after traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl (Wein).* 1998;71:117-9.
 - McMillan CS, Andrews PJ, Easton VJ. Increased jugular bulb saturation is associated with poor outcome in traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2001;70:101-4.
 - Mello e Souza T, Rohden A, Meinhardt M, Gonçalves CA, Quillfeldt JA. S100B infusion into the rat hippocampus facilitates memory for the inhibitory avoidance task but not for the open-field habituation. *Physiol Behav.* 2000;71:29-33.
 - Michetti F, Bruschetti M, Frigiola A, Abella R, Giamberti A, Marchese N, y cols. Saliva S100B in professional sportsmen: high levels at resting conditions and increased after vigorous physical activity. *Clin Biochem.* 2011;44:245-7.
 - Michetti F, Corvino V, Geloso MC, Lattanzi W, Bernardini C, Serpero L, y cols. The S100B protein in biological fluids: more than a lifelong biomarker of brain distress. *J Neurochem.* 2012;120:644-58.

- Michetti F, Dell'Anna E, Tiberio G, Cocchia D. Immunocytochemical and immunocytochemical study of S100B protein in rat adipocytes. *Brain Res.* 1983;262:352-6.
- Miñambres E, Ballesteros MA, Mayorga M, Marin MJ, Muñoz P, Figols J, y cols. Cerebral apoptosis in severe traumatic brain injury patients: an in vitro, in vivo, and postmortem study. *J Neurotrauma.* 2008a;25:581-91.
- Miñambres E, Cemborain A, Sanchez-Velasco P, Gandarillas M, Díaz-Regañón G, Sánchez-González U, y cols. Correlation between transcranial interleukin-6 (IL-6) gradient and outcome in patients with acute brain injury. *Crit Care Med.* 2003;31:933-8.
- Miñambres E, Lopez-Escribano H, Ballesteros MA, Peña M, López-hoyos M. Apoptosis of Jurkat cells induced by serum of patients with acute severe brain injury. *Intensive Care Med.* 2005;31:791-8.
- Miñambres E, Holanda MS, Domínguez Artigas MJ, Rodríguez Borregán JC. Therapeutic hypothermia in neurocritical patients. *Med Intensiva.* 2008b;32:227-35.
- Missler U, Orłowski N, Nötzold A, Dibbelt L, Steinmeier E, Wiesmann M. Early elevation of S-100B protein in blood after cardiac surgery is not a predictor of ischemic cerebral injury. *Clin Chim Acta.* 2002;321:29-33.
- Mondello S, Muller U, Jeromin A, Streeter J, Hayes RL, Wang KK. Blood-based diagnostics of traumatic brain injuries. *Expert Rev Mol Diagn.* 2011;11:65-78.

- Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Comm.* 1965;19:739-44.
- Mori T, Tan J, Arendash GW, Koyama N, Nojima Y, Town T. Overexpression of human S100B exacerbates brain damage and periinfarct gliosis after permanent focal ischemia. *Stroke.* 2008;39:2114-21.
- Moritz S, Warnat J, Bele S, Martin B, Woertgen C. The prognostic value of NSE and S100B from serum and cerebrospinal fluid in patients with Spontaneous subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg Anesthesiol.* 2010; 22:21-31.
- Murillo F, Gilli M, Muñoz M. Epidemiología del traumatismo craneoencefálico. En: Net A, Marruecos-Sant L, editores. *Traumatismo craneoencefálico grave.* Barcelona: Springer-Verlag Ibérica; 1996. p. 10-19.
- Murillo-Cabezas F, Muñoz-Sánchez MA, Rincón-Ferrari MD, Martín-Rodríguez JF, Amaya-Villar R, García-Gómez S, y cols. The prognostic value of the temporal course of S100beta protein in post-acute severe brain injury: A prospective and observational study. *Brain Inj.* 2010;24:609-19.
- Murshid WR, Gader AG. The coagulopathy in acute head injury: comparison of cerebral versus peripheral measurements of haemostatic activation markers. *Br J Neurosurg.* 2002;16:362-9.

- Mussack T, Kirchhoff C, Buhmann S, Biberthaler P, Ladurner R, Gippner-Steppert C, y cols. Significance of Elecsys S100 immunoassay for real-time assessment of traumatic brain damage in multiple trauma patients. *Clin Chem Lab Med.* 2006;44:1140-5.
- Narayan RK, Michael ME, Ansel B, Baethmann A, Biegon A, Bracken MB, y cols. Clinical trials in head injury. *J Neurotrauma.* 2002;19:503-57.
- Nathoo N, Chetty R, Van Dellen JR, Barnett GH. Genetic vulnerability following traumatic brain injury: the role of apolipoprotein E. *Mol Pathol.* 2003;56:132-6.
- Nathoo N, Narotam PK, Agrawal DK, Connolly CA, Van Dellen JR, Barnett GH, y cols. Apoptosis influences neurological outcome following traumatic cerebral contusions. *J Neurosurg.* 2004;101:233-40.
- Ng I, Yeo TT, Tang WY, Soong R, Ng PY, Smith DR. Apoptosis occurs after cerebral contusions in humans. *Neurosurgery.* 2000;46:949-56.
- Nygaard O, Langbakk B, Romner B. Age- and sex-related changes of S-100 protein concentrations in cerebrospinal fluid and serum in patients with no previous history of neurological disorder. *Clin Chem.* 1997; 43:541-3.
- Nylén K, Ost M, Csajbok LZ, Nilsson I, Hall C, Blennow K, y cols. Serum levels of S100B, S100A1B and S100BB are all related to outcome after severe traumatic brain injury. *Acta Neurochir (Wien).* 2008;150:221-7.

- Okonkwo DO, Povlishock JT. An intrathecal bolus of Cyclosporin A before injury preserves mitochondrial integrity and attenuates axonal disruption in traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:443-51.
- Osborn AG. The extracranial veins and dural venous sinuses. En Osborn editor. *Diagnostic cerebral angiography, 2ª edición.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. p. 195-216.
- Peberdy MA, Callaway CW, Neumar RW, Geocadin RG, Zimmerman JL, Donnino M, y cols. Part 9: Post Cardiac Arrest Care: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation.* 2010;122;S768-86.
- Persson L, Hårdemark HG, Gustafsson J, Rundström G, Mendel-Hartvig I, Esscher T, y cols. S-100 protein and neuron-specific enolase in cerebrospinal fluid and serum: markers of cell damage in human central nervous system. *Stroke.* 1987;18:911-8.
- Peskind ER, Griffin WS, Akama KT, Raskind MA, Van Eldik LJ. Cerebrospinal fluid S100B is elevated in the earlier stages of Alzheimer's disease. *Neurochem Int.* 2001;39:409-13.
- Petrova TV, Hu J, Van Eldik LJ. Modulation of glial activation by astrocyte-derived protein S100B: differential responses of astrocyte and microglial cultures. *Brain Res.* 2000;853:74-80.
- Petzold A, Green A, Keir G, Fairley S, Kitchen N, Smith M, y cols. Role of serum S100B as an early predictor of high intracranial pressure and mortality in brain injury: a pilot study. *Crit Care Med.* 2002;30:2705-10.

- Petzold A, Keir G, Lim D, Smith M, Thompson EJ. Cerebrospinal fluid (CSF) and serum S100B: release and wash-out pattern. *Brain Res Bull.* 2003;61:281-5.
- Piao CS, Loane DJ, Stoica BA, Li S, Hanscom M, Cabatbat R, y cols. Combined inhibition of cell death induced by apoptosis inducing factor and caspases provides additive neuroprotection in experimental traumatic brain injury. *Neurobiol Dis.* 2012;46:745-58.
- Pleines UE, Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Joller H, Trentz O, Kossmann T. S100B reflects the injury and outcome, whereas neuronal specific enolase is a better indicator of neuroinflammation in patients with severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2001;18:491-98.
- Poca M, Sahuquillo J, Monforte R, Vilalta A. Métodos globales de monitorización de la hemodinámica cerebral en el paciente neurocrítico: fundamentos, controversias y actualizaciones en las técnicas de oximetría jugular. *Neurocirugía.* 2005;16:301-22.
- Polderman KH, Tjong Tjin Joe R, Peerdeman SM, Vandertop WP, Girbes AR. Effects of therapeutic hypothermia on intracranial pressure and outcome in patients with severe head injury. *Intensive Care Med.* 2002; 28:1563-73.
- Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Crit Care Med.* 2009;37:S186-202.

- Povlishock JT, Pettus EH. Traumatically induced axonal damage: evidence for enduring changes in axolemmal permeability with associated cytoskeletal change. *Acta Neurochir.* 1996;66:S81-6.
- Pravdenkova SV, Basnakian AG, James SJ, Andersen BJ. DNA fragmentation and nuclear endonuclease activity in rat brain after severe closed head injury. *Brain Res.* 1996;729:151-5.
- Raabe A, Kopetsch O, Gross U, Zimmermann M, Gebhart P. Measurements of serum S-100B protein: effects of storage time and temperature on pre-analytical stability. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41:700-3.
- Raabe A, Kopetsch O, Woszczyk A, Lang J, Gerlach R, Zimmermann M, et al. S-100B protein as a serum marker of secondary neurological complications in neurocritical care patients. *Neurol Res.* 2004;26:440-5.
- Raabe A, Menon DK, Gupta S, Czosnyka M, Pickard JD. Jugular venous and arterial concentrations of serum S-100B protein in patients with severe head injury: a pilot study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1998;65:930-2.
- Raabe A, Seifert V. Fatal secondary increase in serum S-100B protein after severe head injury. Report of three cases. *J Neurosurg.* 1999;91:875-7.
- Raguenez G, Desire L, Lantrua V, Courtois Y. BCL-2 is upregulated in human SHSY5Y neuroblastoma cells differentiated by overexpression of

- fibroblast growth factor 1. Biochemical and biophysical research communications. 1999;258:745-51.
- Rainey T, Lesko M, Sacho R, Lecky F, Charmaine Childs C. Predicting outcome after severe traumatic brain injury using the serum biomarker: Results using a single (24 h) time-point. Resuscitation. 2009;80:341-45.
 - Ransohoff RM, Perry VH. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. Annu Rev Immunol. 2009;27:119-45.
 - Raponi E, Agenes F, Delphin C, Assard N, Baudier J, Legraverend C, y cols. S100B expression defines a state in which GFAP-expressing cells lose their neural stem potential and acquire a more mature developmental stage. Glia. 2007;55:165-77.
 - Real Decreto 20707/1999, de 30 de diciembre, BOE nº 3 de 4 de enero de 2000 que desarrolla la ley 30/1979 de 27 octubre reguladora de la extracción y trasplante de órganos.
 - Reali C, Pillai R, Saba F, Cabras S, Michetti F, Sogos V. S100B modulates growth factors and costimulatory molecules expression in cultured human astrocytes. J Neuroimmunology. 2012;243:95-99.
 - Redell JB, Zhao J, Dash PK. Acutely increased cyclophilin a expression after brain injury: a role in blood-brain barrier function and tissue preservation. J Neurosci Res. 2007;85:1980-8.
 - Regner A, Kaufman M, Friedman G, Chemale I. Increased serum S100beta protein concentrations following severe head injury in humans: a biochemical marker of brain death? Neuroreport. 2001;12:691-4.

- Reilly P. The impact of neurotrauma on society: an international perspective. En: Weber J, Maas A, editores. Neurotrauma: New Insights into Pathology and Treatment: 161 (Progress in Brain Research). Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 3-9.
- Riess P, Bareyre FM, Saatman KE, Cheney JA, Lifshitz J, Raghupathi R, y cols. Effects of chronic, post-injury Cyclosporin A administration on motor and sensorimotor function following severe, experimental traumatic brain injury. Restor Neurol Neurosci. 2001;18:1-8.
- Rink A, Fung KM, Trojanowski JQ, Lee VM, Neugebauer E, McIntosh TK. Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. Am J Pathol. 1995;147:1575-83.
- Robertson CS, Narayan RK, Gokalan ZL, Pahwa R, Grossman RG, Caram P, y cols. Cerebral arteriovenous oxygen difference as an estimate of cerebral blood flow in comatose patients. J Neurosurg. 1989;70:222-30.
- Rothermundt M, Falkai P, Ponath G, Abel S, Bürkle H, Diedrich M, y cols. Glial cell dysfunction in schizophrenia indicated by increased S100B in the CSF. Mol Psychiatry. 2004;9:897-9.
- Rothermundt M, Missler U, Arolt V, Peters M, Leadbeater J, Wiesmann M, y cols. Increased S100B blood levels in unmedicated and treated schizophrenic patients are correlated with negative symptomatology. Mol Psychiatry. 2001;6:445-9.

- Rovegno M, Sotob PA, Sáez JC, Von Bernhardic R. Mecanismos biológicos involucrados en la propagación del daño en el traumatismo encéfalo craneano. *Med Intensiva*. 2012;36:37-44.
- Rubiano A y Salas J. Anatomía básica del sistema nervioso central. En: Rubiano A, Pérez R, editores. *Neurotrauma y neurointensivismo*. Bogotá: Distribuna Editorial Medica; 2008. p. 431-54.
- Rubiano A, Angarita J. Enfermedad cerebrovascular hemorrágica. En: Rubiano A, Pérez R, editores. *Neurotrauma y neurointensivismo*. Bogotá: Distribuna Editorial Medica; 2008. p. 609-614.
- Rubiano A, Poca MA y Bullock R. Monitoría neurológica en el trauma craneoencefálico. En: Rubiano A, Pérez R, editores. *Neurotrauma y neurointensivismo*. Bogotá: Distribuna Editorial Médica; 2008. p. 129-50.
- Ruíz-Jiménez N, González P, Suárez C. Abordaje del accidente cerebrovascular. *Inf Ter Nac Salud*. 2002;26:93-106.
- Sacco S, Marini C, Toni D, Olivieri L, Carolei A. Incidence and 10-year survival of intracerebral hemorrhage in a population-based registry. *Stroke*. 2009;40:394-9.
- Sadaka F, Veremakis C. Therapeutic hypothermia for the management of intracranial hypertension in severe traumatic brain injury: a systematic review. *Brain Inj*. 2012;26:899-908.
- Sánchez Mejía R, Ona V, Li M, Friedlander RM. Minocycline reduces traumatic brain injury-mediated caspase-1 activation, tissue damage, and neurological dysfunction. *Neurosurgery* 2001; 48:1393-1401.

- Sanchez-Peña P, Nouet A, Clarençon F, Colonne C, Jean B, Le Jean L, y cols. Atorvastatin decreases computed tomography and S100-assessed brain ischemia after subarachnoid aneurysmal hemorrhage: A comparative study. *Crit Care Med.* 2012; 40:594-602.
- Sanchez-Peña P, Pereira AR, Sourour NA, Biondi A, Lejean L, Colonne C, y cols. S100B as an additional prognostic marker subarachnoid aneurysmal hemorrhage. *Crit Care Med.* 2008;36:2267-73.
- Savola O, Pyhtinen J, Leino TK, Siitonen S, Niemelä O, Hillbom M. Effects of head and extracranial injuries on serum protein S100B levels in trauma patients. *J Trauma.* 2004;56:1229-34.
- Schafer BW, Wicki R, Engelkamp D, Mattei MG, Heizmann CW. Isolation of a YAC clone covering a cluster of nine S100 genes on human chromosome 1q21: rationale for a new nomenclature of the S100 calcium-binding protein family. *Genomics.* 1995;25:638-43.
- Schwarz S, Häfner K, Aschoff A, Schwab S. Incidence and prognostic significance of fever following intracerebral hemorrhage. *Neurology.* 2000; 54:354-61.
- Sedaghat F, Notopoulos A. S100 protein family and its application in clinical practice. *Hippokratia.* 2008;12:198-204.
- Shanmugam N, Reddy MA, Natarajan R. Distinct roles of heterogeneous nuclear ribonuclear protein K and microRNA-16 in cyclooxygenase-2 RNA stability induced by S100b, a ligand of the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem.* 2008;283:36221-3.

- Shasboua V, Hesse G, Moore B. Proteins of the brain extracellular fluid: evidence for release of S-100 protein. *J Neurochem.* 1984;42:1536-41.
- Shavali S y Sens DA. Synergistic Neurotoxic Effects of Arsenic and Dopamine in Human Dopaminergic Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Toxicological sciences.* 2008;102:254-61.
- Sheinberg M, Kanter MJ, Robertson CS, Contant CF, Narayan RK, Grossman RG. Continuous monitoring of jugular venous oxygen saturation in head-injured patients. *J Neurosurg.* 1992;76:212-17.
- Shenkin HA, Harmel MH, Kety SS. Dynamic anatomy of the cerebral circulation. *Arch Neurol Psychiatr.* 1948;60:240-52.
- Shibano T, Morimoto Y, Kemmotsu O, Shikama H, Hisano K, Hua Y. Effects of mild and moderate hypothermia on apoptosis in neuronal PC12 cells. *Br J Anaesth.* 2002;89:301-5.
- Signoretti S, Marmarou A, Tavazzi B, Dunbar J, Amorini AM, Lazzarino G, y cols. The protective effect of cyclosporin A upon N-acetylaspartate and mitochondrial dysfunction following experimental diffuse traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* 2004;21:1154-67.
- Sillberg VA, Wells GA, Perry JJ. Do statins improve outcomes and reduce the incidence of vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A meta-analysis. *Stroke.* 2008;39:2622-6.
- Sinclair HL, Andrews PJ. Bench-to-bedside review: Hypothermia in traumatic brain injury. *Crit Care.* 2010;14:204.

- Sindic CJ, Freund M, Van Regemorter N, Verellen-Dumoulin C, Masson PL. S-100 protein in amniotic fluid of anencephalic fetuses. *Prenat Diagn.* 1984;4:297-302.
- Slemmer JE, Matser EJ, De Zeeuw CI, Weber JT. Repeated mild injury causes cumulative damage to hippocampal cells. *Brain.* 2002;125:2699-709.
- Snell RS. Irrigación del encéfalo. En: Snell RS, editor. *En: Neuroanatomía clínica.* Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1999. p. 547-70.
- Sorci G, Giovannini G, Riuzzi F, Bonifazi P, Zelante T, Zagarella S, y cols. The danger signal S100B integrates pathogen- and danger-sensing pathways to restrain inflammation. *PLoS Pathog.* 2011;7:e1001315
- Soustiel JF y Larisch S. Mitochondrial damage: a target for new therapeutic horizons. *Neurotherapeutics.* 2010;7:13-21.
- Steiner J, Schiltz K, Walter M, Wunderlich MT, Keilhoff G, Brisch R, y cols. S100B serum levels are closely correlated with body mass index: an important caveat in neuropsychiatric research. *Psychoneuroendocrinology.* 2010;35:321-4.
- Stevens A, Lowe J, editores. *Histología humana.* 2ª Ed. Madrid: Harcourt Brace:1998.
- Stocchetti N. Monitorización de la saturación yugular: ¿qué lado?. En: *Net A, Marruecos-Sant L, editores. Traumatismo craneoencefálico grave.* Barcelona: 1ª ed. Springer-Verlag Ibérica; 1996. p. 125-30.

- Stochetti N, Paparella A, Bridelli F, Bachi M, Piazza M, Zuccoli P. Cerebral venous oxygen saturation studied with bilateral samples in the internal jugular veins. *Neurosurgery*. 1994;34:38-44.
- Sullivan PG, Rabchevsky AG, Waldmeier PC, Springer JE. Mitochondrial permeability transition in CNS trauma: cause or effect of neuronal cell death? *J Neurosci Res*. 2005;79:231-9.
- Sullivan PG, Sebastian AH, Hall ED. Therapeutic window analysis of the neuroprotective effects of cyclosporine A after traumatic brain injury. *J Neurotrauma*. 2011;28:311-8.
- Sullivan PG, Thompson M, Scheff SW. Continuous infusion of cyclosporin A postinjury significantly ameliorates cortical damage following traumatic brain injury. *Exp Neurol*. 2000;161:631-7.
- Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir (Wien)*. 2006;148:255-68; discussion 268.
- Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. *Lancet*. 1974;2:81-4.
- Tort AB, Portela LV, da Purificação Tavares M, Gonçalves CA, Netto C, Giugliani R, y cols. Specificity and sensitivity of S100B levels in amniotic fluid for Down syndrome diagnosis. *Life Sci*. 2004;76:379-84.
- Tsoporis JN, Overgaard CB, Izhar S, Parker TG. S100B modulates the hemodynamic response to norepinephrine stimulation. *Am J Hypertens*. 2009;22:1048-53.

- Tsujimoto Y, Shimizu S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis*. 2007;12:835-40.
- Tubaro C, Arcuri C, Giambanco I, Donato R. S100 protein in myoblast modules myogenic differentiation via NF-kappaB-dependent inhibition of MyoD expression. *J Cell Physiol*. 2010;223:270-82.
- Uden J, Astrand R, Waterloo K, Ingebrigtsen T, Bellner J, Reinstrup P, y cols. Clinical significance of serum S100B levels in neurointensive care. *Neurocrit Care*. 2007;6:94-9.
- Van Asch CJ, Luitse MJ, Rinkel GJ, Van der Tweel I, Algra A, Klijn CJ. Incidence, case fatality, and functional outcome of intracerebral haemorrhage over time, according to age, sex, and ethnic origin: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol*. 2010;9:167-76.
- Van Den Heuvel C, Donkin JJ, Finnie JW, Bumbergs PC, Kuchel T, Koszyca, y cols. Downregulation of amyloid precursor protein (APP) expression following post-traumatic cyclosporin-A administration. *J Neurotrauma*. 2004;21:1562-72.
- Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell*. 1999;96:245-254.
- Vergouwen MD, de Haan RJ, Vermeulen M, Roos YB. Effect of statin treatment on vasospasm, delayed cerebral ischemia, and functional outcome in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis update. *Stroke*. 2010;41:e47-e52.

- Vogelbaum MA, Masaryk T, Mazzone P, Mekhail T, Fazio V, McCartney S, y cols. S100beta as a predictor of brain metastases: brain versus cerebrovascular damage. *Cancer*. 2005;104:817-24.
- Vos PE, Jacobs B, Andriessen TM, Lamers KJ, Borm GF, Beems T, y cols. GFAP and S100B are biomarkers of traumatic brain injury: an observational cohort study. *Neurology*. 2010;75:1786-93.
- Wang KK, Ottens AK, Liu MC, Lewis SB, Meegan C, Oli MW, y cols. Proteomic identification of biomarkers of traumatic brain injury. *Expert Rev Proteomics*. 2005;2:603-14.
- Wass CT, Lanier WL, Hofer RE, Scheithauer BW, Andrews AG. Temperature changes of ≥ 1 degree C alter functional neurologic outcome and histopathology in a canine model of complete cerebral ischemia. *Anesthesiology*. 1995; 83:325-35.
- Waters RJ, Nicoll J. Genetic influences on outcome following acute neurological insults. *Current Opinion in Critical Care*. 2005;11:105-10.
- Weiss N, Sanchez-Peña P, Roche S, Beaudeau J, Colonne C, Coriat P, y cols. Prognosis value of plasma S100B levels after subarachnoid aneurysmal Hemorrhage. *Anesthesiology*. 2006;104:658-66.
- Whitaker-Azmitia P, Murphy R, Azmitia E. Stimulation of astroglial 5-HT1A receptors releases the serotonergic growth factor, protein S-100, and alters astroglial morphology. *Brain Res*. 1990;528:155-8.

- Whitelaw A, Rosengren L, Blennow M. Brain specific proteins in posthaemorrhagic ventricular dilatation. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2001;84:F90-1.
- Wiesmann M, Missler U, Gottmann D, Gehring S. Plasma S-100b protein concentration in healthy adults is age- and sexindependent. *Clin Chem.* 1998;44:1056-8.
- Willemse-van Son AH, Ribbers GM, Hop WC, Van Duijn CM, Stam HJ. Association between apolipoprotein-epsilon4 and long-term outcome after traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2008;79:426-30.
- Willoughby KA, Kleindienst A, Muller C, Chen T, Muir JK, Ellis EF, y cols. S100B protein is released by in vitro trauma and reduces delayed neuronal injury. *J Neurochem.* 2004;91:1284-91.
- Wilson M, Montgomery H. Impact of genetic factors on outcome from brain injury. *British Journal of Anesthesia.* 2007;99:43-8.
- Wunderlich MT, Wallesch CW, Goertler M. Release of neurobiochemical markers if brain damage is related to the neurovascular status on admission and the site of arterial occlusion in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci.* 2004;227:49-53.
- Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Emerging treatments for traumatic brain injury. *Expert Op Emerging Drugs.* 2009;14:67-84.
- Yang D, Guo S, Zhang T, Li H. Hypothermia attenuates ischemia/reperfusion-induced endothelial cell apoptosis via alterations in apoptotic pathways and JNK signaling. *FEBS Lett.* 2009;583:2500-6.

- Zhao Y, Rempe DA. Targeting astrocytes for stroke therapy. *Neurotherapeutics*. 2010;7:439-51.
- Zia E, Engström G, Svensson PJ, Norrving B, Pessah-Rasmussen H. Three-year survival and stroke recurrence rates in patients with primary intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2009;40:3567-73.
- Zimmer DB, Cornwall EH, Landar A, Song W. The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull*. 1995;19:739-44.

9 ANEXOS

ANEXO I. CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EXTRACCIÓN DE MUESTRAS SANGUÍNEAS EN PACIENTES CON DAÑO CEREBRAL AGUDO

Su familiar..... ha sufrido un TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO. De forma rutinaria se le extraerán muestras sanguíneas que facilitarán el tratamiento de su familiar.

Le solicitamos que nos permita extraerle 5 cc de sangre para estudios científicos acerca de pacientes con la misma patología que su familiar. El uso realizado con la sangre extraída solamente será utilizado con fines científicos. Asimismo, los resultados que se pudieran obtener son totalmente confidenciales, avalados por la ley orgánica de protección de datos.

Yo..... DNI..... en calidad de..... de..... autorizo a extraer 5 cc de sangre para estudios científicos relacionados con agresiones cerebrales.

Firma familiar

Firma médico

Nombre y N° colegiado.

ANEXO II. ÍNDICE ACUTE PHYSIOLOGY AND CHRONIC HEALTH EVALUATION II (APACHE II)

1.1. PARÁMETROS CLÍNICOS

	4	3	2	1	0	1	2	3	4
T (°C)	≥41	39-40,9		38,5-39,5	36 -38,4	34-35,9	32-33,9	30 -31,9	≤29,9
TAM	≥160	130-159	110-129		70- 109		50-69		≤49
FC	≥180	160-179	110-139		70-109		55-69	40-54	≤39
A-a DO₂	≥500	350-499	200-349		<200				
pH	≥7,7	7,6-7,69		7,7-7,59	7,33-7,49		7,25-7,32	7,15-7,24	<7,15
Na	≥180	160-179	155-159	150-154	130-149		120-129	111-119	≤110
K	>7	6-6,9		5,5-5,9	3,5-5,4	3-3,4	2,5-2,9		≤2,5
Cr	≥3,5	2-3,4	1,5-1,9		0,6-1,4		<0,6		
Hcto	≥60		50-59,9	46-49,9	30-45,9		20-29,9		<20
Leu	≥40		20-39,9	15-19,9	3-14,9		1-2,9		<1

T: temperatura; TAM tensión arterial media; FC: frecuencia cardíaca; A-a DO₂: gradiente alveolo arterial de oxígeno (mmHg); Na: sodio sérico (mMol/L); K: potasio sérico (mMol/L); Cr: creatinina sérica (mg/100ml); x 2 si hubiera insuficiencia renal aguda; Hcto: hematocrito (%); Leu: leucocitos x 1000.

A esta puntuación se le añade el cómputo de la escala de coma de Glasgow.

1.2. EDAD DEL PACIENTE

Si < 44 años se añaden 0 puntos; 45-54 años se sumarían 2 puntos; 55-64 años, serían 3 puntos; 65-74 años 5 puntos; <75 años, 6 puntos.

1.3. ESTADO PREVIO DE SALUD

Pacientes con historia previa de insuficiencia de algún sistema o inmunosupresión, se les asignará 5 puntos si precisan intervención quirúrgica urgente. En caso de cirugía electiva, se sumarán 2 puntos.

La suma global de los tres apartados, corresponde a la puntuación final.

ANEXO III. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

1.1. COMUNICACIONES ORALES

- Ballesteros MA, Marín MJ, San Martín M, López- Hoyos M, Miñambres E.
“Effect of neuroprotective therapies (hypothermia and cyclosporine a) in apoptotic neuronal death in an in vitro neuronal model”.
Eighth World Congress on Brain Injury. International Brain Injury Association.
Washington DC, USA. Marzo 10-14, 2010.
- MA Ballesteros, I Rubio, AM Padilla, M San Martín, M López- Hoyos, E Miñambres.
“Serum levels of S100B from jugular bulb as a biomarker of prognosis in patients with severe acute brain injury”.
Ninth World Congress on Brain Injury. International Brain Injury Association.
Edinburgh, Scotland. Marzo, 2012.

1.2. ARTÍCULOS CIENTÍFICOS

- Ballesteros MA, Marín MJ, San Martín M, Rubio-Lopez MI, Lopez-Hoyos M, Miñambres E.

Effect of neuroprotective therapies (hypothermia and cyclosporine a) on dopamine-induced apoptosis in human neuronal SH-SY5Y cells.

Brain Injury 2013. Aceptado 21 Octubre 2012.

[Brain Injury](#) 2013, Vol. 27, No. 3, Pages 354-360 (doi:10.3109/02699052.2012.743184)

- Ballesteros MA, Rubio MI, San Martin M, Padilla A, López-Hoyos M, Llorca J, Miñambres E.

Serum levels of S100B from jugular bulb as a biomarker of poor prognosis in patients with severe acute brain injury.

Enviado a Brain Injury. Pendiente de contestación.

1 58
2 59
3 60
4 61
5 62
6 63

7 **Effect of neuroprotective therapies (hypothermia and**
8 **cyclosporine a) on dopamine-induced apoptosis in**
9 **human neuronal SH-SY5Y cells**
10
11

14 **MARÍA A. BALLESTEROS¹, MARÍA J. MARÍN², MARÍA SAN MARTÍN², MARÍA**
15 **I. RUBIO-LOPEZ¹, MARCOS LÓPEZ-HOYOS², & EDUARDO MIÑAMBRES¹**
16

17 ¹Department of Critical Care Medicine, University Hospital Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander, Spain, and
18 ²Immunology Division, University Hospital Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Barrio de las Mazas, Cantabria, Spain
19

20 (Received 23 January 2012; accepted 21 October 2012)
21
22
23

24 **Abstract**

25 Introduction: This study aimed to evaluate the effect of hypothermia and CyA on neuronal survival after induced injury in a
26 neuronal model.

27 Methods: Human neuroblastoma SH-SY5Y cells were seeded and allowed to grow. To determine whether lower
28 temperatures protect from dopamine-induced apoptosis, cells were treated with dopamine at 100 mM, at 300 mM or without
29 dopamine and incubated at 32 C or 37 C for 24 hours. To assess the effect of CyA, cells were pre-incubated with CyA at
30 37 C and after dopamine was added.

31 Results: After 24 hours of incubation at 37 C, 100 mM and 300 mM dopamine induced 42% (SD ¼ 21) and 58% (SD ¼ 7.9)
32 apoptotic SH-SY5 cells, respectively. In cultures at 32 C dopamine-induced apoptosis could be reversed by hypothermia
33 [7% (SD ¼ 1.4) and 3.45% (SD ¼ 1.1) for 100 mM and 300 mM, respectively], similar to levels obtained in non-treated cells
34 [2.4% (SD ¼ 1.5)]. Cyclosporine A treatment did not render the expected result, since CyA-pre-treated cells and SH-SY5Y
35 cells showed higher levels of apoptosis than those observed with dopamine alone

36 Conclusions: Hypothermia has a marked protective effect against apoptotic cell death induced by dopamine in a human
37 neuroblastic cell line. The neuroprotective effect of CyA described with other apoptotic cell death stimuli was not
38 demonstrated with our experimental conditions.

38 **Keywords:** 222
39
40
41
42

43 **Introduction**

44 The entities that encompass the concept Acute Brain
45 Injury (ABI) (spontaneous cerebral haemorrhage,
46 ischemic stroke, anoxic brain damage) are character-
47 ized by high morbidity and mortality and
48 socio-economic consequences. Knowledge of ABI
49 pathophysiology is considered fundamental to the

ABI justifies the wide variety of therapeutic
approaches that have been tested in experimental
models on animals and in humans in the last 20 years.
It has been postulated that neuronal apoptosis is
present in brain damage and is related to patients
prognosis [1–3]. Since apoptosis is a highly regulated
process, it is possible to modulate it by different

51 options. The complexity of the pathophysiology of patients suffering from ABI.

56 Correspondence: María A. Ballesteros, MD, PhD, Department of Critical Care Medicine, University Hospital Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Avda
57 Valdecilla, s/n 39008 Santander, Spain. Tel: 34 942 203304. Fax: 34 942 203543. E-mail: gelesballesteros@yahoo.es

Q1

115 Brain damage disrupts calcium homeostasis,
116 a fact that leads to neuronal dysfunction and
117 loss. The mitochondrion is a cytoplasmic organelle
118 that is involved in these processes, playing an
119 important role in the pathophysiology of ABI
120 [4, 5]. The mitochondrion is involved in calcium
121 regulation, in the release of cytochrome C and in
122 the activation of caspases, all of them involved at
123 different stages of cell apoptosis. In fact, mito-
124 chondria are split into punctiform organelles
125 during apoptosis, illustrating their involvement in
126 such a process.

127 Cyclosporine is an immunosuppressive agent that
128 has been proposed as neuroprotective therapy.
129 On an experimental level it has been shown that
130 cyclosporine may attenuate axonal injury and trau-
131 matic changes of the cytoskeleton because it main-
132 tains the mitochondrial integrity, including
133 membrane potential and energy homeostasis [6].
134 It is thought that it blocks the transition pore of
135 mitochondria, thus preserving the integrity and
136 functionality of the mitochondria [4]. This neuro-
137 protective effect has been studied in animal models
138 of ABI [6–8] and in clinical trials in patients with
139 ABI [9].

140 On the other hand, hypothermia may attenuate
141 the deleterious effects of ABI as it affects multiple
142 pathophysiological mechanisms [10]. In experimen-
143 tal models of ABI, hypothermia significantly reduces
144 levels of caspase 3 and decreases the release of
145 cytochrome c from mitochondria [11], suggesting
146 that hypothermia modulates apoptosis. It has been
147 shown that hypothermia differentially regulates
148 expression of certain inflammatory cytokines, a
149 fact that may affect the mechanisms of neuronal
150 death [12].

151 Hypothermia has been evaluated in several clinical
152 trials with results not always consistent. It has been
153 shown to be effective in the subsequent recovery of
154 anoxic brain damage after cardiac arrest due to
155 ventricular fibrillation, but the results have been
156 inconclusive in the population affected by traumatic
157 brain injury (TBI). For these reasons, hypothermia
158 remains at the pilot phase in the treatment of
159 acute TBI.

160 The present study assessed the modulation of
161 apoptosis by two treatments (cyclosporine and
162 hypothermia), employing an in vitro model of neu-
163 ronal apoptosis. Dopamine is an agent that is
164 incorporated into neuronal cell cultures of
165 SH-SY5Y generating the intracellular production
166 of reactive oxygen species and disrupting the mito-
167 chondria integrity, which triggers the apoptosis
168 cascade [13]. The SH-SY5Y cell cultures with
169 dopamine have been validated as a model of neuro-
170 nal apoptosis in previous studies.

172 Methods

173 Cells culture

174 Undifferentiated SH-SY5Y cells were used as neu-
175 ronal modelling. They were cultured in 12-well
176 plates at a concentration of 1×10^5 in 1 ml of
177 DMEM supplemented with 10% foetal bovine
178 serum, 100 U ml^{-1} penicillin and 100 mg ml^{-1} strep-
179 tomycin. The cultures were performed in baseline
180 environmental conditions of 37 C in an atmosphere
181 containing 5% CO_2 . Cells were allowed to grow for
182 72 hours until forming a monolayer in each well,
183 changing the medium every 48–72 hours.

184 For induction of apoptosis in the SH-SY5Y cell
185 cultures, dopamine was added at different concen-
186 trations (50, 100 and 300 mM). As a negative
187 control, some wells were not treated.

188 To evaluate the effects of hypothermia in the
189 modulation of dopamine-induced apoptosis, treated
190 cells were incubated in parallel at 32 C and 37 C.
191 After 24 hours, cells were collected from the wells to
192 assess the percentages of apoptotic cells in each
193 condition.

194 The cyclosporine effect in the modulation of
195 dopamine-induced apoptosis was assessed by pre-
196 treating SH-SY5Y cell cultures with 1 or 10 M
197 cyclosporine for 2–6 hours. After the incubation
198 period, dopamine was added to cultures at 100 mM,
199 keeping environmental conditions of 37 C and 5%
200 CO_2 . Every culture condition was performed in
201 triplicate.

202 Measurement of apoptotic cells

203 Apoptotic cells were assessed by TUNEL (trans-
204 ferase-mediated dUTP nick end labelling) method,
205 based on the detection of inter-nucleosomal DNA
206 breakage typical of apoptosis. A two-colour staining
207 method (APO-BrdU kit; BD Pharmingen, CA) for
208 labelling DNA breaks and the total cellular
209 DNA to detect apoptosis by flow cytometry was
210 used. Specifications of the manufacturer were fol-
211 lowed. Briefly, cells were fixed with 1%(w/v) para-
212 formaldehyde (Sigma-Aldrich) in PBS at a
213 concentration of $1-2 \times 10^6$ cells for 1 hour in ice
214 and washed with PBS.

215 Cell pellets were then treated with 70% (v/v) ice-
216 cold ethanol for 30 minutes and washed with PBS or
217 stored overnight at 20 C in ethanol.

218 Positive and negative fixed cells provided in the kit
219 were used as control. Both control and SH-SY5Y
220 fixed cells were incubated with a DNA labelling
221 solution containing TdT enzyme and the Br-dUTP
222 C. After 60 minutes at 37 C, cells were rinsed and
223 centrifuged. Anti-FITC labelled-anti Br-dUTP was
224 added to the resultant pellet that was further
225 incubated for 30 minutes at RT in the dark. After
226

Q2

Q3

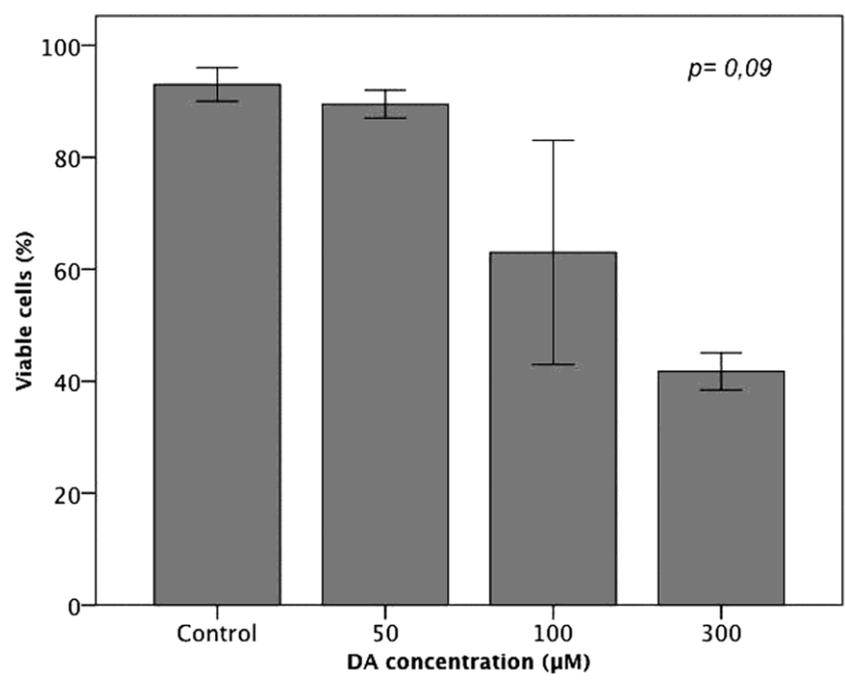


Figure 1. Percentages of viable cells at different dopamine (DA) concentrations. Data are shown as the mean \pm SD of three independent experiments. p^* level of statistical significance respect 50 mM dopamine.

this last incubation, cells were treated with propidium iodide(PI)/RNase staining buffer and analysed by flow cytometry.

Cytometry data

Cells were analysed using a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA). Ten thousand cells were acquired in each sample and each condition was assessed on three independent experiments. Results were expressed as a percentage of apoptotic cells.

Statistical analysis

The results are presented as the mean percentage and standard deviation. For statistical analysis, a t-test was conducted. In addition, one-way ANOVA have been used to evaluate the effect of different dopamine concentrations. Differences at the level of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Data were analysed with SPSS statistical software 15.0 (SPSS, Chicago, IL).

Results

Dopamine induces apoptosis of SH SY5Y cells

Induction of apoptosis was performed at three dopamine concentrations (50, 100 and 300 mM). It was observed that dopamine-induced apoptosis in SH SY5Y cells was dose-dependent and such an effect

was stronger in the dose range of 100–300 mM ($p = 0.09$) (see Figure 1). The data corroborate the findings of previous studies, confirming that dopamine induces apoptosis in the SH-SY5Y cell line [14].

Hypothermia attenuates dopamine-induced apoptosis of SH SY5Y cells

To assess the effect of hypothermia in dopamine-treated SH SY5Y cells, dopamine was added at concentration of 50, 100 and 300 mM to cell cultures that had reached monolayer (see Figure 2). As a negative control of apoptosis some wells were not treated with dopamine. In these conditions, cell cultures were incubated at 32 C (hypothermia) and 37 C. At 32 C the apoptotic cell population was 7% (SD \pm 1.4) and 3.45% (SD \pm 1.1) at concentrations of 100 mM and 300 mM of dopamine, respectively.

However, when cultures were performed at the same conditions but at a temperature of 37 C, the proportions of apoptotic cells were significantly higher (42% (SD \pm 21) and 58% (SD \pm 7.9), respectively).

Figure 3 shows an example of flow cytometry dot plots from an individual experiment. The number in the upper quadrant identifies the percentage of viable cells, showing that the rate of apoptosis induced by the treatment with dopamine is diminished when the temperature decreases to 32 C.

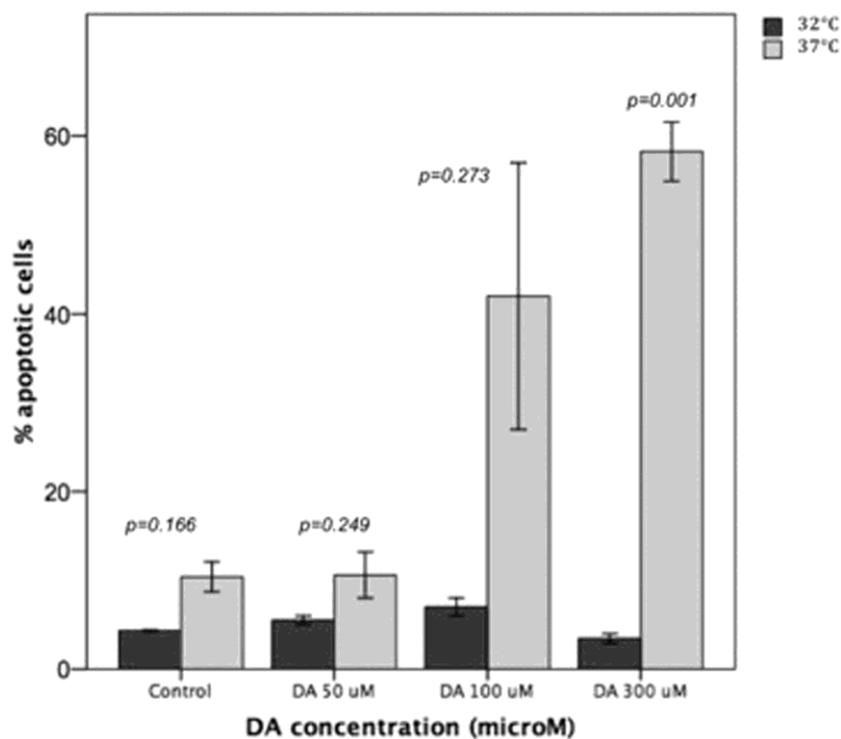


Figure 2. Effect of hypothermia on the percentages of apoptotic cells at different dopamine (DA) concentrations. At the temperature of 37 C with 300 mM DA, the proportions of apoptotic cells were significantly higher than in the control conditions or with DA 50 mM ($p < 0.001$).

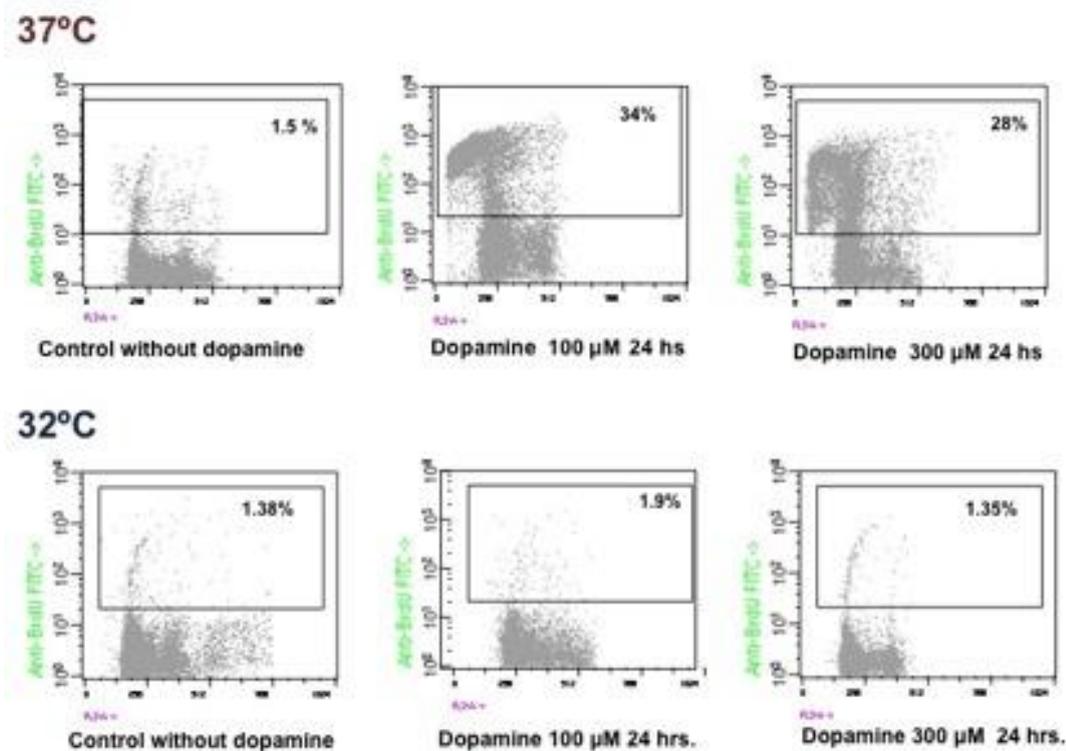
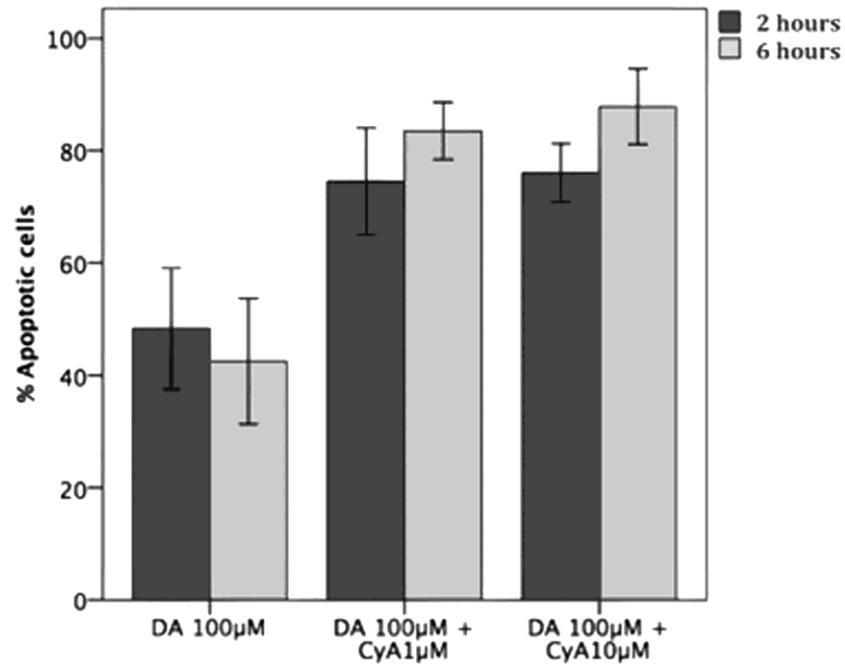


Figure 3. Effect of hypothermia on dopamine-induced apoptosis in SH-SY5Y cells measured by flow cytometry. The number in the quadrant denotes the percentage of early apoptotic cells.

in print
colour online

Q6

Q6



Q6

Figure 4. Data are shown as the mean standard deviation of three independent experiments. No statistical differences were found between the two periods of cultures in several conditions. DA, dopamine; CyA, cyclosporine.

Cyclosporine does not affect the dopamine-induced apoptosis of SH SY5Y cells

This study assessed the effect of cyclosporine in the neuronal model dopamine-induced apoptosis. The proportion of apoptotic cells was similar in cultures performed with and without cyclosporine. In these experiments, cells pre-treated with cyclosporine at doses of 1 mM for 2 or 6 hours showed no resistance to the cell death induced by dopamine. The dose of cyclosporine did not affect the results since cells pre-treated with cyclosporine at doses of 10 mM for 2 or 6 hours did not show changes in apoptotic rates (see Figure 4).

Discussion

physiologically, although it has been shown that, under certain circumstances such as neurodegenerative processes, it may act as a neurotoxin [15]. Several hypotheses have been raised about the mechanisms involved in such a cytotoxicity, but they remain unknown. Oxidative stress induced by intracellular signalling through dopamine receptors or extracellular auto-oxidation [16] have been proposed as possible mechanisms leading to cytotoxicity and/or neuronal loss. The oxidative products of dopamine may activate caspases and, subsequently, trigger apoptosis [17].

These results corroborate the findings of previous works as they have shown that dopamine induces neuronal apoptosis in the model of neuronal SHSY5Y cells [14]. TUNEL was employed to measure apoptosis and it was assumed that this method could show false positive results due to apoptosis. However, given that other authors showed that dopamine induces apoptosis in neuroblastoma cell lines, it was decided to use this method [14]. Nonetheless, if the necrosis were another involved mechanism, it would not be possible to increase the percentage of viable cells with hypothermia, given that necrosis is an irreversible process.

Once the in vitro cell culture was established as a model of neuronal apoptosis, the authors first aimed to evaluate the neuroprotective effect of hypothermia. Importantly, hypothermia was demonstrated to be highly effective in reducing the rates of apoptosis

The neuronal apoptosis has previously been shown as one of the cellular mechanisms involved in neuronal loss in patients suffering from severe ABI and a relationship was found with the prognosis of these patients [1–3]. On a clinical level, various works have evaluated the protective effect of brain hypothermia therapy. The results have been conflicting, with some being favourable [18, 19] and others not [20–23]. Such confusion may be caused because they included different categories of patients with different types of injuries and used different treatment protocols [3]. Despite these limitations,

571 the results of published hypothermia works consider
 572 hypothermia as an attractive therapeutic option.
 573 In clinical practice, the Brain Trauma Foundation
 574 recently described that prophylactic hypothermia did
 575 not reduce mortality in patients with severe TBI, but
 576 was associated with a higher rate of patients with
 577 good functional recovery [24]. The truth is that this
 578 therapeutic option brings practical interest and
 579 recently a European multi-centre study has been
 580 developed to evaluate the effect it could have on
 581 various entities of brain damage, either ischemic or
 582 traumatic [25, 26]. The Eurotherm3235 trial is a
 583 pragmatic, multi-centre randomized controlled trial
 584 examining the effects of hypothermia at 32–35 C,
 585 titrated to reduce intracranial pressure < 20 mmHg,
 586 on morbidity and mortality 6 months after TBI. The
 587 study aims to recruit 1800 patients over 41 months
 588 (April 2011–April 2013) in Europe [26].

589 The clinical trials of hypothermia have allowed
 590 one to relate to other parameters of brain function
 591 and prognosis, but it is considered essential to
 592 understand the mechanisms involved in the neuro-
 593 protective action of hypothermia and it would
 594 facilitate new therapeutic targets [27]. It is proposed
 595 that the mechanisms involved in neuroprotection
 596 may be related to changes in markers of oxidative
 597 stress, vascular reactivity and neuronal toxicity
 598 [28–31]. It is possible that these changes are related
 599 to a lower apoptotic stimulus and, therefore, a better
 600 prognosis. The experimental study highlights the
 601 neuroprotective role of hypothermia and, to the
 602 authors' knowledge, is one of the first works using a
 603 model of a neuronal cell line to study the effect of
 604 hypothermia as a modulator of apoptosis. It is likely
 605 that hypothermia modifies some of the changes that
 606 dopamine produces. It is hypothesized that dopa-
 607 mine alters the membrane potential of mitochondria
 608 from SH-SY5Y cells. This potential is essential for
 609 the preservation of cellular homeostasis and for
 610 energy production. Once modified the membrane
 611 potential of the mitochondria, the release of cyto-
 612 chrome c and caspase-3 is induced, both phenomena
 613 crucial for apoptosis.

614 This work has not demonstrated that cyclosporine
 615 modulates neuronal apoptosis in the model pre-
 616 sented. In this regard, there are authors who have
 617 published the protective effects of cyclosporine,
 618 speculating on the mechanism involved. It is pro-
 619 posed that cyclosporine blocks calcium-permeable
 620 channels of the mitochondria that are crucial in the
 621 molecular cascade of apoptosis [5]. Through this
 622 mechanism, cyclosporine would maintain the integ-
 623 rity of this organelle and prevent the flow of calcium
 624 from the cytoplasm, which may block the induction
 625 of apoptosis. These results suggest that cyclosporine
 626 does not act on the pathway by which dopamine
 627 induces apoptosis, since the immunosuppressant

628 does not diminish the apoptosis of SH SY5Y cells
 629 induced by dopamine. These results do not invali-
 630 date the potential neuroprotective effect, but could
 631 support the findings of Mazzeo et al. [9]. These
 632 authors evaluated cyclosporine as neuroprotective
 633 treatment in patients with traumatic ABI and
 634 appreciated that the safety margin of the immuno-
 635 suppressive was acceptable, but found no differences
 636 in survival between the control group and the
 637 placebo group. Works with animal models of ABI
 638 to assess the neuroprotective role of cyclosporine
 639 have shown its effectiveness when demonstrating a
 640 smaller loss of brain tissue in treated animals. It also
 641 highlights the role of early treatment.

642 It is possible that cyclosporine keeps the mito-
 643 chondria undamaged, avoiding the entry of calcium
 644 from the cytosol, although this is not the only
 645 pathway involved in neuronal apoptosis. The truth is
 646 that, in the clinical trial of Mazzeo et al. [9], as in
 647 most clinical works, the cellular apoptosis is not
 648 quantified because of ethical issues (it is not feasible
 649 to obtain samples of brain tissue to detect apoptosis).

650 Dopamine induces apoptosis in the SH SY5Y cells
 651 and this neuronal loss can be modulated by hypo-
 652 thermia. The fact that hypothermia decreases the
 653 dopamine-induced apoptosis in a neuronal model
 654 strengthens the possible role of such a therapy in
 655 modulating neuronal apoptosis. However, cyclo-
 656 sporine was not as effective in the in vitro model.
 657 This work may represent the starting point for future
 658 studies, bringing the bench to the bedside.

Acknowledgements

661
 662 This work was partially supported by the Fondo de
 663 Investigaciones Sanitarias (grant PI080058), the
 664 Fundación Marques de Valdecilla-IFIMAV (grant
 665 API 07/05) and the Fundación Mutua-Madrileña.
 666

667 Declaration of Interest: The authors report no
 668 conflicts of interest. The authors alone are respon-
 669 sible for the content and writing of the paper.
 670

References

- 671
 672
 673
 674 1. Miñambres E, Lopez-Escribano H, Ballesteros MA, Peñ a M,
 675 López-Hoyos M. Apoptosis of Jurkat cells induced by serum
 676 of patients with acute severe brain injury. *Intensive Care
 Medicine* 2005;31:791–798.
- 677 2. Ballesteros MA, López-Hoyos M, Muñoz P, Marin MJ,
 678 Miñambres E. Apoptosis of neuronal cells induced by serum
 679 of patients with acute brain injury: A new in vitro prognostic
 680 model. *Intensive Care Medicine* 2007;33:58–65.
- 681 3. Miñambres E, Ballesteros MA, Mayorga M, Marin MJ,
 682 Muñoz P, Figols J, López-Hoyos M. Cerebral apoptosis in
 683 severe traumatic brain injury patients: An in vitro, in vivo, and
 684 postmortem study. *Journal of Neurotrauma* 2008;25:
 581–591.

Q4

Q5

685 4. Clausen T, Bullock R. Medical treatment and neuroprotection
 686 in traumatic brain injury. *Current Pharmaceutical Design* 2001;7:1517–1532.

687 5. Fall CP, Bennett Jr. JP. Visualization of cyclosporin A and
 688 Ca²⁺-sensitive cyclical mitochondrial depolarizations in cell
 689 culture. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999;1410:77–84.

690 6. Sullivan PG, Rabchevsky AG, Hicks RR, Gibson TR,
 691 Fletcher-Turner A, Scheff SW. Dose-response curve and
 692 optimal dosing regimen of cyclosporin A alter traumatic brain
 693 injury in rats. *Neuroscience* 2000;101:289–295.

694 7. Alessandri B, Rice AC, Levasseur J, DeFord M, Hamm R,
 695 Bullock MR. Cyclosporin A improves brain tissue oxygen
 696 consumption and learning-memory performance after lateral
 697 fluid percussion injury in rats. *Journal of Neurotrauma*
 698 2002;19:829–841.

699 8. Signoretti S, Marmarou A, Tavazzi B, Dunbar J,
 700 Amorini AM, Lazzarino G, Vagnozzi R. The protective
 701 effect of cyclosporin A upon N-acetylaspartate and mitochon-
 702 drial dysfunction following experimental diffuse traumatic
 703 brain injury. *Journal of Neurotrauma* 2004;21:1154–1167.

704 9. Mazzeo AT, Brophy GM, Gilman CB, Alves OL, Robles JR,
 705 Hayes RL, Povlishock JT, Bullock MR. Safety and tolerabil-
 706 ity of cyclosporin a in severe traumatic brain injury patients:
 707 Results from a prospective randomized trial. *Journal of*
 708 *Neurotrauma* 2009;26:2195–2206.

709 10. Dietrich WD, Bramlett HM. The evidence for hypothermia
 710 as a neuroprotectant in traumatic brain injury. *Neurotherapeutics*
 711 2010;7:43–50.

712 11. Lotocki G, de Rivero Vaccari JP, Perez ER, Alonso OF,
 713 Curbelo K, Keane RW, Dietrich WD. Therapeutic hypo-
 714 thermia modulates TNFR1 signaling in the traumatized brain
 715 via early transient activation of the I κ B pathway and
 716 supresión of XIAP cleavage. *European Journal of*
 717 *Neurosciences* 2006;24:2283–2290.

718 12. Truettner JS, Suzuki T, Dietrich WD. The effect of thera-
 719 peutic hypothermia on the expression of inflammatory
 720 response genes following moderate traumatic brain injury in
 721 the rat. *Brain research molecular brain research* 2005;138:
 722 124–134.

723 13. Blum D, Torch S, Lambeng N, Nissou M, Benabid AL,
 724 Sadoul R, Verna JM. Molecular pathways involved in the
 725 neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP:
 726 Contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease.
 727 *Progress in Neurobiology* 2001;65:135–172.

728 14. Lee MK, Kang SJ, Poncz M, Song KJ, Park KS. Resveratrol
 729 protects SH-SY5Y neuroblastoma cells from apoptosis
 730 induced by dopamine. *Experimental and Molecular*
 731 *Medicine* 2007;39:1007–1014.

732 15. Luo Y, Kokkonen GC, Wang X, Neve KA, Roth GS. D2
 733 dopamine receptors stimulate mitogenesis through pertussis
 734 toxin-sensitive G proteins and Ras-involved ERK and SAP/
 735 JNK pathways in rat C6-D2L glioma cells. *Journal of*
 736 *Neurochemistry* 1998;71:980–990.

737 16. Jiang Y, Pei L, Li S, Wang M, Liu F. Extracellular dopamine
 738 induces the oxidative toxicity of SH-SY5Y cells. *Synapse*
 739 2008;62:797–803.

740 17. Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S,
 741 Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, et al. Requirement
 742 for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced
 743 apoptosis. *Nature* 1996;380:75–79.

744 18. Miñambres E, González-Castro A, Ots E, Ballesteros MA,
 745 Suberviola B, Ortíz-Melón F. Mild hypothermia induction
 746 after cardiac arrest using water-circulating cooling device.
 747 *American Journal of Emergency Medicine* 2007;25:730–732.

748 19. Tokutomi T, Miyagi T, Takeuchi Y, Karukaya T, Katsuki H,
 749 Shigemori M. Effect of 35 degrees C hypothermia on
 750 intracranial pressure and clinical outcome in patients with
 751 severe traumatic brain injury. *Journal of Trauma* 2009;66:
 752 166–173.

753 20. Sinclair HL, Andrews PJ. Bench-to bedside review:
 754 Hypothermia in traumatic brain injury. *Critical Care*
 755 2010;14:204.

756 21. Harris OA, Colford Jr. JM, Good MC, Matz PG. The role
 757 of the hypothermia in the management of severe brain
 758 injury: A metaanalysis. *Arcives of Neurology* 2002;59:
 759 1077–1083.

760 22. Clifton GL, Miller ER, Choi SC, Levin HS, McCauley S,
 761 Smith Jr KR, Muizelaar JP, Wagner Jr FC, Marion DW,
 762 Luessen TG, et al. Lack of effect of induction of hypother-
 763 mia after acute brain injury. *New England Journal of*
 764 *Medicine* 2001;344:556–563.

765 23. Henderson WR, Dhinra VK, Chitton DR, Fenwick JC,
 766 Ronco JJ. Hypothermia in the management of traumatic
 767 brain injury. A systematic review and meta-analysis. *Intensive*
 768 *Care Medicine* 2003;29:1637–1644.

769 24. Brain Trauma Foundation, American Association of
 770 Neurological Surgeons, Congress of Neurological Surgeons,
 771 Joint Section on Neurotrauma and Critical Care, AANS/
 772 CNS. Guidelines for the management of severe traumatic
 773 brain injury. III. Prophylactic hypothermia. *Journal of*
 774 *Neurotrauma* 2007;24(Suppl 1):S21–25.

775 25. Clifton GL, Drever P, Valadka A, Zygun D, Okonkwo D.
 776 Multicenter trial of early hypothermia in severe brain injury.
 777 *Journal of Neurotrauma* 2009;26:393–397.

778 26. Andrews PJ, Sinclair HL, Battison CG, Polderman KH,
 779 Citerio G, Mascia L, Harris BA, Murray GD, Stocchetti N,
 780 Menon DK, et al. European society of intensive care
 781 medicine study of therapeutic hypothermia (32–35 C) for
 782 intracranial pressure reduction after traumatic brain injury
 783 (the Eurotherm3235Trial). *Trials* 2011;12:8.

784 27. Timmons SD. Current trends in neurotrauma care. *Critical*
 785 *Care Medicine* 2010;38(Suppl 9):S431–444.

786 28. Bayir H, Adelson PD, Wisniewski SR, Shore P, Lai Y,
 787 Brown D, Janesko-Feldman KL, Kagan VE, Kochanek PM.
 788 Therapeutic hypothermia preserves antioxidant defenses after
 789 severe traumatic brain injury in infants and children. *Critical*
 790 *Care Medicine* 2009;38:1907–1914.

791 29. Aibiki M, Maekawa S, Yokono S. Moderate hypothermia
 792 improves imbalances of thromboxane A2 and prostaglandin
 793 I2 production after traumatic brain injury in humans. *Critical*
 794 *Care Medicine* 2000;28:3902–3906.

795 30. Li J, Benashski S, McCullough LD. Post-stroke hypothermia
 796 provides neuroprotection through inhibition of AMP-acti-
 797 vated protein kinase. *Journal of Neurotrauma* 2011;28:
 798 1281–1288.

799 31. Truettner JS, Alonso OF, Bramlett HM, Dietrich WD.
 800 Therapeutic hypothermia alters microRNA responses to
 801 traumatic brain injury in rats. *Journal of Cerebral Blood*
 802 *Flow and Metabolism* 2011;31:1897–1907.

