

TESI DOCTORAL

**APLICACIÓ DE LA MICRODIÀLISI CEREBRAL A L'ESTUDI
DE LA RESPOSTA METABÒLICA I INFLAMATÒRIA EN EL
TRAUMATISME CRANIOENCEFÀLIC MODERAT I GREU**

Anna Vilalta Saura

Aplicació de la microdiàlisi cerebral a l'estudi de la resposta metabòlica i inflamatòria en el traumatisme cranioencefàlic moderat i greu

Memòria presentada per Anna Vilalta Saura per optar al grau de Doctora en Medicina i Cirurgia.

Aquesta tesi ha estat realitzada a la Unitat de Recerca de Neurotraumatologia i Neurocirurgia (UNINN) de l'Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron.



El director

La doctoranda

Juan Sahuquillo Barris

Anna Vilalta Saura

Professor titular
Departament de Cirurgia
Facultat de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona



Departament de Cirurgia
Facultat de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona
Barcelona, Desembre del 2008



Si el cervell fos tant senzill que nosaltres el poguessim comprendre,
aleshores nosaltres seriem tant senzills que no el podríem entendre.

Albert Einstein (1879-1955)

Als meus pares

AGRAÏMENTS

Sóc conscient que aquesta és una de les parts de la tesi que la gent acostuma a llegir només obrir-la, i no vull deixar-me ningú ni res per agrair. Arribar fins aquí no ha estat un passeig ràpid. Durant tots aquests anys he après que amb petits passos al final acabes fent un bon recorregut, i que la constància i la paciència al final et porten al teu objectiu. Aquest camí no només m'ha comportat una evolució professional sinó també personal, fent-me créixer dia a dia. Són moltes les etapes per les que he anat passant i els coneixements han anat arribant progressivament.

M'agradaria agrair primer de tot al Juan Sahuquillo, director d'aquesta tesi, el fet d'haver-me donat l'oportunitat d'endinsar-me en un món que per mi era bastant desconegut. Quan acabes la carrera, el món idíl·lic de la Universitat no sempre el trobes a la realitat, però és el que realment em va motivar en aquell moment, conèixer una altra vessant de la investigació, més clínica i aplicable en un tipus de pacients, molt sovint greument incapacitats. També li vull agrair la seva ajuda en l'assessorament científic d'aquesta tesi, el seu esperit crític i la seva capacitat i entrega a l'estudi dels pacients que han sofert un traumatisme cranioencefàlic, amb l'objectiu de contribuir en la possible millora del seu pronòstic. També s'ha de valorar l'enorme esforç que suposa el poder conciliar la càrrega assistencial amb la científica. A la Dra Poca també li vull agrair l'entusiasme, l'orientació rebuda per part seva i la seva dedicació a la investigació, sense la qual difícilment seguiríem per aquest camí. També cal dir que aprecio molt a tota la resta de la Unitat de Recerca de Neurotraumatologia i Neurocirurgia, que m'hagin acompanyat en part o en tot aquest camí i en diferent mesura. Desde la Sònia, la Maripau, la Gemma Balcells, la Mercè, la Júlia, el Jorge, la Bessy, l'Esther, la Caroline, la Gemma Lobera fins actualment la Joana, l'Eli, la Mariàngels, la Noèlia, l'Aida i la Lidia, entre els quals la Joana és amb la que l'he fet tot i el nucli essencial d'aquesta unitat. Només amb els meus companys predoctorals puc compartir i entenen el significat del dia a dia i les inclusions dels pacients als diferents estudis. Els sopars amb les meves excompanyes Maripau i Gemma també han estat un reforç molt positiu en aquests últims temps, per seguir endavant. També vull fer una menció especial a tots els residents i adjunts del servei de Neurocirurgia,

per la seva dedicació (a tots els ha tocat més d'un cop col·locar un catèter de microdiàlisi a les tantes de la nit, amb guàrdies sovint molt complicades), companyerisme i alguna que altra pujada a la muntanya: el Fuat, el Thomaz, el Ramón, el Fran, el Roberto, la Marina, la Mònica, el JoseDavid, el Quim, el Domínguez, el Javier i el David.

Al Dr Garnacho, cap de la UCI de Traumatologia, li agraeixo enormement la seva aposta per la investigació i el permetre'ns realitzar els estudis a la UCI, però sobretot el seu caràcter conciliador i humà, que molts cops és indispensable per avançar en la bona direcció. No cal dir que agraeixo a tots els metges de la UCI de Trauma (Riveiro, Báguena, Monforte, Robles, Domínguez, Pérez), i especialment la Marilyn que és amb la que he compartit més moments, haver pogut estar tots aquests anys compartint passes de guàrdia, sessions, estudis, el dia a dia i sobretot per la seva tasca assistencial amb els pacients neurotraumàtics. A tot el personal de infermeria i auxiliar, que han treballat a la UCI dedicar-li la meva admiració pel seu esforç i dedicació a aquests pacients i per la seva participació en els diferents estudis que hem realitzat desde la unitat de recerca. Especialment vull donar les gràcies a la Lourdes i la Merche, perquè a part de la seva increïble professionalitat i dedicació tant als malalts, assajos clínics com a qualsevol cosa que es proposin, són sobretot unes grans persones. També cal agrair als anestesistes, patòlegs (en especial la Dra Ortega), neurorradiòlegs i rehabilitadors de l'hospital la seva tasca assistencial diària en els pacients neurotraumàtics. Al Joan Montaner li agraeixo la motivació que ha generat en mi, primer en conèixer el món de les metaloproteïnases i després per fomentar el meu creixent interès en la recerca. També per la seva disposició a orientar científicament en tot moment. I a l'Anna Rosell, que va estar en aquest inici i que sempre ha estat disposada a ajudar-me al laboratori quan ha estat necessari. També estic contenta d'haver compartit moments, cates, coneixements i reunions amb tots els becaris, tècnics i alguns ja postdocs de la unitat de neurovascular (Anita, Eloy, Isra, Miri, Laura, Alberto, Lidia, etc, cada cop el grup es fa més gran). Del Toni aprecio molt la seva ajuda, tot i ser molt lluny, que m'ha ofert en tot moment, ja sigui per la tesi o per qualsevol cosa, a

part de ser com és i del seu sentit de l'humor, molts cops el millor antídoto contra l'estancament mental. Gràcies a internet les distàncies es fan curtes.

Són molts els amics i la família que han hagut de suportar, sobretot al final, el meu monotema anomenat tesi i la llista és llarga. Gràcies per oxigenar-me i donar-me suport quan ho he necessitat: la Cris, la Sandra, la Yoye, l'Ester, el Parra, l'Ignasi, el Diego, el Salva, el Jordi, les Sònies, la Lu, l'Eli, la Yoli, la Meri, la Bilma, el Jack i molts altres més, en els que algú moment o altre he atabalat una mica. Gràcies a tots per la paciència!

I per acabar, dir que la família sempre està al teu costat quan la necessites i que tots han estat pendents durant aquest temps donant suport moral, moltes gràcies a tots. Vull agrair i dedicar aquesta tesi als meus pares, un exemple a seguir, el recolzament indispensable per seguir lluitant per un objectiu, i també l'empenta necessària en els moments més difícils. Sobretot per haver confiat en mi en tot moment i dels quals em sento molt orgullosa.

Finalment m'agradaria dir als familiars i pacients que espero que amb la contribució progressiva per part dels diferents investigadors es pugui en un futur minimitzar al màxim les seqüeles del traumatisme cranioencefàlic, i es pugui millorar la qualitat de vida d'aquests pacients.

LLISTAT D'ABREVIATURES I ACRÒNIMS

Aβ:	proteïna β amiloide
ATP:	adenosin trifosfat
AVDL:	diferències arterio-jugulars de lactat
AVDO₂:	diferències arterio-jugulars d'oxigen
BHE:	barrera hematoencefàlica
Ca²⁺:	calci
CEO₂:	coeficient d'extracció d'oxigen
c-fos:	proteïna fos
c-jun:	proteïna jun
CMRO₂:	consum metabòlic d'oxigen
Cox-2:	cicle-oxigenasa de tipus 2
DAPI:	4'6-diamidino-2-phenylindole
DTC:	doppler transcranial
EEG:	electroencefalograma
EDTA:	àcid etilendiaminotetraacètic
FiO₂:	frequència inspirada d'oxigen
FSC:	fluxe sanguini cerebral
Fx:	fractures
GCS:	de l'anglès, Glasgow Coma Score (Escala del Coma de Glasgow)
GR:	de l'anglès, good recovery; bona recuperació
Hb:	hemoglobina
HIC:	hipertensió intracranial
HIF:	de l'anglès; <i>hypoxia inducing factor</i> , factor inductor de hipòxia
HPLC:	de l'anglès; High performance liquid chromatography, cromatografia líquida d'elevada eficàcia
HSA:	hemorragia subaracnoidea
IL:	interleucina
IL-1β:	interleucina 1 β
IL-6:	interleucina 6
IL-18:	interleucina 18
Índex L/P:	índex lactat/piruvat
kDa:	quilo daltons
LCR:	líquid cefaloraquidi
LPS:	lipopolisacàrid
LOI:	índex lactat oxigen
MD:	de l'anglès, moderate disability; discapacitat moderada
MEC:	matriu extracel·lular
MMP:	metal·loproteïnasa de matriu
MT-MMP:	metal·loproteïnasa d'unió a membrana
mRNA:	àcid ribonucleic missatger
NIRS:	de l'anglès, near-infrared reflectance spectroscopy; espectroscopia per infrarojos
NO:	òxid nítric
O₂:	oxigen
OMS:	Organització Mundial de la Salut
PaO₂:	pressió arterial d'oxigen
PCO₂:	pressió de diòxid de carboni

PET:	de l'anglès <i>positron emission tomography</i> ; tomografia per emissió de positrons
PMB:	proteïna mielínica bàsica
PIC:	pressió intracranial
PM:	pes molecular
PMSF:	de l'anglès; phenylmethanesulphonyl fluoride
PPC:	pressió de perfusió cerebral
PtiO₂:	pressió tissular d'oxigen
RR:	recuperació relativa
RM:	ressonància magnètica
SPECT:	de l'anglès <i>Single Photon Emission Computed Tomography</i> ; tomografia computeritzada per emissió de fotó únic
SD:	de l'anglès; severe disability; discapacitat severa
SjO₂:	saturació al bulb de la jugular
SNC:	sistema nerviós central
TAM:	tensió arterial mitja
TC:	tomografia computeritzada
TCDB:	traumatic coma data bank
TCE:	traumatisme cranioencefàlic
TGF-β:	factor de creixement transformant β
TIMP:	Inhibidor tissular de la metal·loproteïnasa
TIMP-1:	Inhibidor tissular de la metal·loproteïnasa tipus 1
TIMP-2:	Inhibidor tissular de la metal·loproteïnasa tipus 2
TIMP-3:	Inhibidor tissular de la metal·loproteïnasa tipus 3
TNF-α	factor de necrosi tumoral alfa
tPA:	activador del plasminògen tipus tissular
UCI:	Unitat de Cures Intensives
uPA:	activador del plasminògen tipus urocinasa
uPAR:	receptor de l'activador del plasminògen tipus urocinasa
VS:	de l'anglès, vegetative status; estat vegetatiu
WB:	western blot
Zn:	zinc

SUMARI

AGRAÏMENTS	I
LLISTAT D'ABREVIATURES I ACRÒNIMS	V
SUMARI	VII
TAULES.....	X
FIGURES.....	X
INTRODUCCIÓ	1
1. El traumatisme cranioencefàlic	5
1.1. <i>Epidemiologia</i>	5
1.2. <i>Concepte de traumatisme cranioencefàlic greu</i>	6
1.2.1. Definició de coma	7
1.3. <i>Classificació de Marshall</i>	7
1.4. <i>Monitoratge del pacient neurocrític</i>	9
1.4.1. Monitoratge sistèmic.....	10
1.4.2.1. Pressió intracranial (PIC).....	10
1.4.2.2. Saturació d'oxigen al bulb de la jugular (SjO ₂).....	11
Les diferències arterio-jugulars de lactat i l'índex lactat oxigen	13
1.4.2.3. Pressió tissular d'oxigen (PtiO ₂) i microdiàlisi cerebral.....	14
1.4.3. Monitoratge cerebral no invasiu.....	14
1.4.3.1. Espectroscopia per rajos propers als infrarojos (NIRS).....	15
1.4.3.2. Doppler transcranial.....	15
1.4.3.3. Monitoratge electroencefalogràfic.....	16
1.4.3.4. Neuroimatge	16
2. Neuromonitoratge avançat: PtiO₂ i microdiàlisi.....	18
2.1. <i>Microdiàlisi cerebral</i>	18
2.1.1. Principi bàsic de la tècnica	18
2.1.2. Aspectes tècnics: concepte de recuperació	19
2.1.2.1. Factors que afecten la recuperació relativa.....	21
Velocitat d'infusió del líquid de perfusió i longitud de la membrana.....	21
Alteracions tissulars induïdes per la implantació del catèter	22
Coeficients de difusió.....	22
Propietats de la membrana.....	23
Composició química del líquid de perfusió i drenatge local	23
Pressió hidrostàtica i col·loïdosmòtica.....	23
2.1.3. Monitoratge bioquímic.....	24
2.1.3.1. Glucosa	25
2.1.3.2. Lactat.....	25
2.1.3.3. Índex lactat/piruvat (L/P)	27
2.1.3.4. Glicerol.....	28
2.1.3.5. Glutamat	28
2.1.3.6. Urea.....	29
2.1.4. Aplicació de la microdiàlisi al traumatisme cranial.....	29
2.1.4.1. Microdiàlisi "d'alta resolució"	31
2.2. <i>Monitoratge de la PtiO₂</i>	31

2.2.1. Aspectes tècnics	31
2.2.2. Fiabilitat, seguretat i estabilitat dels sensors de PtiO ₂	33
2.2.3. Valors de normalitat.....	34
2.2.4. Factors que afecten els valors de PtiO ₂	36
2.2.5. Principis d'alliberació d'O ₂ al teixit cerebral.....	37
2.2.6. Aplicacions clíniques del monitoratge de la PtiO ₂	39
2.2.6.1. PtiO ₂ i SjO ₂	40
2.2.6.2. Hiperòxia normobàrica	41
Resposta cerebral a la hiperòxia	44
3. Neuroinflamació en el traumatisme cranioencefàlic.....	46
3.2. <i>La matriu extracel·lular</i>	49
3.2.1. La matriu extracel·lular al sistema nerviós central	51
3.3. <i>La barrera hematoencefàlica (BHE)</i>	52
3.4. <i>Metal·loproteïnases de matriu (MMPs)</i>	53
3.4.2. Les gelatinases	55
3.4.2.1. Estructura de les gelatinases.....	56
3.4.2.2. Regulació i activació de les gelatinases	57
Els inhibidors tissulars de les metal·loproteïnases (TIMPs)	59
3.5. <i>Les MMPs en els processos de isquèmia cerebral</i>	59
3.6. <i>Les metal·loproteïnases de matriu a la lesió neurotraumàtica</i>	61
3.6.1. Estudis <i>in vitro</i>	61
3.6.2. Estudis <i>in vivo</i>	62
3.6.2. Estudis en pacients amb TCE.....	63
HIPÒTESI DE TREBALL	65
OBJECTIUS	65
PACIENTS I MÈTODES.....	67
1. Pacients.....	67
1.1. <i>Tractament mèdic general</i>	67
1.2. <i>Protocols de recollida i processament de mostres biològiques</i>	68
1.2.1. Mostres sanguínies.....	68
1.2.2. Mostres de teixit cerebral.....	68
1.2.3. Mostres de microdialitzat cerebral i subcutani.....	69
1.3. <i>Selecció de pacients: criteris d'inclusió i d'exclusió</i>	69
1.4. <i>Variables clíniques i radiològiques</i>	70
2. Neuromonitoratge avançat: PtiO₂ i microdialisi cerebral	70
2.1. <i>Monitoratge de la PtiO₂</i>	70
2.1.1. Implantació del sensor de PtiO ₂	71
2.2. <i>Microdialisi cerebral</i>	71
2.2.1. Catèters cerebrals i subcutanis.....	71
2.2.2. Líquid de perfusió	72
2.2.3. Implantació dels catèters de microdialisi.....	73
2.3. <i>Protocol de hiperòxia normobàrica</i>	74
3. Tècniques de laboratori.....	75

3.1. Zimografia en gelatina.....	75
3.1. Zimografia in situ	76
4. Anàlisi estadístic	76
RESULTATS	77
DISCUSSIÓ	139
1. La microdiàlisi cerebral com a eina diagnòstica i guia terapèutica.....	139
2. El lactat com indicador de metabolisme anaeròbic	140
3. Utilitat del lactat en el càlcul de les AVDL i el LOI en la detecció de la isquèmia cerebral.....	142
4. Efectes de la hiperòxia normobàrica en els nivells extracel·lulars del lactat i de l'índex L/P cerebral	144
5. Efectes de la hiperòxia normobàrica en la P_{tiO_2} i la PaO_2	147
6. Metabolisme aeròbic en el pacient amb una lesió cerebral.....	149
7. Mecanismes tissulars de regulació de l' O_2	151
8. La neuroinflamació al traumatisme cranial.....	153
9. Perfil temporal de les gelatinases al plasma	153
10. Les gelatinases a l'espai extracel·lular cerebral	154
11. Presència de les gelatinases a les contusions cerebrals	157
CONCLUSIONS	159
ANNEXES.....	162
1. Escala del Coma de Glasgow (GCS).....	162
2. Traumatic Coma Data Bank (TCDB).....	163
3. Injury Severity Score (ISS).....	163
<i>Escala AIS pel càlcul de l'ISS.....</i>	<i>164</i>
4. Glasgow Outcome Scale Extended (GOSE)	165
BIBLIOGRAFIA.....	167

TAULES

Taula 1. Valors acceptats com a normals i com a líndars de isquèmia i hiperèmia per les AVDO ₂ , CEO ₂ i l'SjO ₂ en pacients amb un TCE.	12
Taula 2. Concentracions intersticials de glucosa, lactat, piruvat, glicerol, urea i glutamat al teixit normal del cervell humà.	24
Taula 3. Causes del desacoblament entre el FSC i el metabolisme cerebral.....	26
Taula 4. Llistat de diferents marcadors de lesió cerebral secundària al líquid intersticial cerebral.....	30
Taula 5. Valors normals de la PtiO ₂ en diferents estudis en models experimentals animals i en humans.	35
Taula 6. Estratègies per millorar l'oxigenació cerebral.....	38
Taula 7. Classificació de la hipòxia segons la causa, d'acord amb la classificació de Siggaard-Andersen.	41
Taula 8. Membres de la família de les MMPs.	54

FIGURES

Figura 1. Imatges representatives de cada categoria de la classificació de Marshall o TCDB. En groc es mostra la categoria de la classificació.....	8
Figura 2. Fórmules pel càlcul dels diferents paràmetres utilitzats en les tècniques d'oximetria jugular.....	11
Figura 3. Gràfiques de regressió lineal que mostren una correlació no significativa entre els valors de LOI i els valors de lactat obtinguts per microdiàlisi cerebral	14
Figura 4. Esquema de la similitud d'un catèter de microdiàlisi amb un vas sanguini.....	18
Figura 5. Intercanvi de soluts a través del catèter de microdiàlisi.....	19
Figura 6. Esquema del metabolisme de la glucosa al cervell.	27
Figura 7. Difusió simple de l'urea a favor de gradient.....	29
Figura 8. Àrea sensible del sensor de PtiO ₂ i esquema del Revoxode.....	33
Figura 9. Esquema de la matriu extracel·lular amb els seus components.....	51
Figura 10. Estructura de la BHE.	53
Figura 11. Estructura cristal·litzada de les gelatinases MMP-2 i MMP-9.....	56
Figura 12. Estructura bàsica de les gelatinases.....	57
Figura 13. Representació esquemàtica de l'activació de la MMP-9.....	58
Figura 14. Representació esquemàtica de les múltiples vies activades per la hipòxia/isquèmia.	60
Figura 15. Esquema amb la resposta inflammatòria sistèmica i la resposta inflammatòria cerebral.....	64
Figura 16. Analitzador CMA600 i microvials.....	69
Figura 17. Sensor de PtiO ₂ i components licox CMP.....	70
Figura 18. TC cerebral i pacient polimonitoritzat.....	71
Figura 19. Catèter CMA70 i material implantació.....	72
Figura 20. Bomba de perfusió CMA106 i ampolles de líquid de perfusió.....	73
Figura 21. Catèter subcutani CMA60 i col·locació catèter subcutani.....	73
Figura 22. Exemple d'un test de hiperòxia.....	74
Figura 23. Zimografia en gel de gelatina i in situ	76

INTRODUCCIÓ

Els traumatismes cranioencefàlics (TCE) són la primera causa de mort i discapacitat en la població menor de 40 anys de qualsevol país industrialitzat. Les xifres de mortalitat en centres considerats "d'excel·lència" són encara elevades i molt similars a les publicades al 1991 per l'estudi cooperatiu americà (Traumatic Coma Data Bank), oscil·lant, en la majoria de centres, entre el 30-40%. Els mals resultats neurològics (pacients greument incapacitats, vegetatius o morts) supera en molts casos el 55%, tant en centres Europeus com d'EEUU. Aquests resultats comporten importants repercussions sanitàries, econòmiques i socials (Murillo et al., 1999; Sahuquillo et al., 1987), i expliquen el progressiu interès en la investigació traslacional de les lesions neurotraumàtiques.

Malgrat el millor coneixement de la fisiopatologia del TCE i de l'avenç en les tècniques de neuromonitoratge i en el tractament, el pronòstic d'aquests pacients ha arribat a assolir una meseta (Sahuquillo et al., 2001). És conegut que tot i que una part considerable de les lesions es produeixen de forma immediata a l'impacte (lesions primàries), moltes d'elles apareixen en un període variable de temps després del traumatisme (lesions secundàries). Els processos secundaris activats per l'impacte desencadenen una sèrie de cascades metabòliques anòmals de gran complexitat que promouen la disfunció i en alguns casos la mort cel·lular, amb la consegüent pèrdua de la funció neurològica.

La hipòxia tissular d'origen isquèmic o no isquèmic, causada per fenòmens com la hipertensió intracranial (HIC), la reducció de la pressió de perfusió cerebral (PPC), l'edema cerebral, la disfunció mitocondrial o per complicacions sistèmiques originades fonamentalment a la fase pre-hospitalària (hipòxia, hipotensió arterial o anèmia), constitueix la lesió secundària de major prevalència als TCE. La hipòxia tissular cerebral, a més, genera o potencia l'aparició de processos metabòlics anòmals i pot induir una resposta inflamatòria a nivell tissular.

Les dades obtingudes d'estudis en models experimentals i clínics han demostrat de forma inequívoca que la resposta inflamatòria cerebral juga un paper predominant en la lesió secundària postraumàtica, facilitant l'alteració de la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica (BHE), l'edema cerebral i secundàriament la tumefacció cerebral i l'augment de la pressió intracranial (PIC).

En els darrers anys, la introducció de noves tecnologies en l'àmbit clínic ha permès utilitzar tècniques revolucionàries de neuromonitoratge a la capçalera del pacient, històricament només factibles en el camp de l'experimentació animal. Una de les tècniques esmentades ha estat la microdiàlisi cerebral, que permet el monitoratge neuroquímic *quasi on-line* dels nivells extracel·lulars de certs metabolits. El principi bàsic d'aquesta tècnica és la introducció al parènquima cerebral d'un catèter que conté una membrana semipermeable al seu extrem distal, i que actua de forma similar a un capil·lar. La membrana de diàlisi permet la difusió lliure d'aigua i soluts entre la solució d'interès (espai extracel·lular cerebral) i una solució salina perfosa mitjançant una microbomba, a una velocitat predeterminada.

La possibilitat d'obtenir informació del metabolisme cerebral a la capçalera del pacient ens permet estudiar la resposta metabòlica a determinats procediments terapèutics, així com preveure l'establiment del dany tissular degut a la hipòxia tissular cerebral. A més, la recent aparició al mercat de noves membranes de microdiàlisi, amb porus de filtratge majors, ha obert la possibilitat d'estudiar proteïnes de major tamany, implicades en els processos neuroinflamatoris desencadenats després d'un TCE.

Per una banda, desde el punt de vista tradicional, la producció excessiva de lactat a nivell cerebral s'ha considerat un indicador de disfunció del metabolisme energètic i conseqüentment de hipòxia tissular d'origen isquèmic o no isquèmic. Així, la utilització de les diferències arterio-jugulars de lactat (AVDL) i l'índex lactat oxigen (LOI) s'han utilitzat com indicadors de metabolisme anaeròbic cerebral. La utilització combinada amb la microdiàlisi

cerebral ens permet analitzar la sensibilitat, especificitat i valor predictiu de les AVDL i el LOI com indicadors de metabolisme anaeròbic.

Des d'el punt de vista terapèutic la hiperòxia normobàrica s'ha presentat com un procediment simple, relativament segur i potencialment beneficiós per reduir la lesió cerebral. Aquest procediment s'aplica augmentant la fracció inspirada d'oxigen (F_{iO_2}), amb la finalitat d'aconseguir un augment de la pressió tissular d'oxigen (P_{tiO_2}) i així de la quantitat d'oxigen (O_2) que arribaria al mitocondri. En aquest cas la utilització combinada de la microdiàlisi amb el monitoratge de la P_{tiO_2} ens permet estudiar els efectes de la hiperòxia normobàrica en el metabolisme cerebral i per tant, determinar el potencial benefici per millorar el resultat neurològic dels pacients amb un TCE.

Des d'el punt de vista de la neuroinflamació, un dels avenços més significatius en l'última dècada ha estat el coneixement del paper que les metal·loproteïnases de matriu (MMPs) juguen en la lesió cerebral traumàtica. Les MMPs són una família de proteases encarregades de remodelar la matriu extracel·lular (MEC). A part de la funció fisiològica ben coneguda, diversos estudis han demostrat la seva participació en processos patològics com el càncer, l'Alzheimer, l'esclerosi múltiple i la isquèmia cerebral. En els últims anys, a més, s'ha observat que poden tenir un paper rellevant en la fisiopatologia de les lesions neurotraumàtiques, principalment alterant la BHE i potenciant la resposta neuroinflamatòria provocada pel TCE.

La present tesi pretèn aportar noves aplicacions de la microdiàlisi cerebral en l'estudi del metabolisme i de la neuroinflamació del pacient neurotraumàtic. En primer lloc l'aplicació de la microdiàlisi com a eina diagnòstica en la detecció de la hipòxia cerebral isquèmica, ens permet validar per una banda la superioritat d'aquesta tècnica respecte una altra de més convencional, com és el cas del càlcul de les AVDL i el LOI. A més, la utilització combinada de la microdiàlisi amb la P_{tiO_2} ens permet determinar l'efecte de la hiperòxia normobàrica en el metabolisme cerebral d'aquests pacients. En segon lloc, la tesi aprofundeix en l'estudi d'unes proteases que es sobreexpressen com a conseqüència dels processos inflamatoris

desencadenats a la fase aguda del TCE, les MMPs. Aquests enzims poden ser detectats directament al microdialitzat cerebral d'aquests pacients, així com al plasma i al teixit procedent de contusions cerebrals. La possibilitat de poder recuperar proteïnes amb un pes molecular (PM) superior al dels catèters de primera generació, obre pas a múltiples opcions terapèutiques. Una d'elles seria dissenyar estratègies farmacològiques per bloquejar o modular la sobreexpressió d'aquestes proteases a la fase aguda del TCE, amb la finalitat de limitar l'alteració de la barrera hematoencefàlica i el dany tissular postraumàtic cerebral.

1. El traumatisme cranioencefàlic

1.1. Epidemiologia

L'organització Mundial de la Salut (OMS) ha manifestat que a Europa la meitat dels anys que viu una persona amb discapacitat són causats per malalties neurològiques (Olesen and Leonardi, 2003). A l'any 2000, entre les deu primeres causes d'anys perduts per discapacitats, la primera va ser la isquèmia miocàrdica, la segona l'accident vascular cerebral i la setena els accidents de trànsit.

Els traumatismes cranioencefàlics (TCE) són la primera causa de mort i discapacitat a la població menor de 45 anys a l'Unió Europea i la causa més freqüent de mort i discapacitat després d'un accident de trànsit. El 10% dels pacients que pateixen un TCE, presenten un TCE greu i són els pacients que presenten una puntuació a l'Escala del Coma de Glasgow (GCS) inferior o igual a 8 punts (annexe 1). En aquest grup els mals resultats neurològics (pacients greument incapacitats, vegetatius o morts) excedeix en molts centres el 55% dels pacients afectes (Murray et al., 1999). Els TCEs no només representen un greu problema socioeconòmic i de salut a la Comunitat Europea sinó arreu del món (Cole, 2004; Ghajar, 2000). La incidència global està augmentant, en part degut a l'increment en l'utilització de vehicles de motor en països subdesenvolupats (Maas et al., 2008). L'OMS ha estimat que cap a l'any 2020 els accidents de trànsit seran la tercera causa més important de la càrrega global per malaltia i lesió (Finfer and Cohen, 2001). En països desenvolupats les lleis de seguretat vial i les mesures preventives han reduït la incidència de traumatismes cranials degut a accidents de trànsit (Redelmeier et al., 2003), mentre que la incidència de les caigudes ha augmentat en la mateixa mida que l'edat de la població, fet que provoca un augment en l'edat mitja de la població que sofreix un TCE a l'actualitat.

Les seqüeles neurològiques al TCE són una conseqüència de la suma de lesions primàries (produïdes de forma immediata a l'impacte) i de les lesions secundàries que apareixen de forma diferida a l'impacte mecànic. La

hipertensió intracranial (HIC) és la primera causa de mort en els pacients amb un TCE greu. Dels pacients que presenten una HIC, la majoria presenten lesions focals o una tumefacció cerebral difusa uni o bilateral, l'etiologia i patologia de la qual encara estan poc definides.

Cap teràpia neuroprotectora ha demostrat fins el moment actual la seva eficàcia en estudis controlats, i per tant, malgrat els enormes avenços en el tractament d'aquests pacients a la fase aguda, els TCE i especialment els greus, deixen discapacitats permanents en els supervivents, amb importants repercussions mèdiques, econòmiques, emocionals, familiars i socials. S'han realitzat diversos assajos clínics en fase III però cap d'ells ha mostrat eficàcia, una de les causes podria ser la inclusió de pacients amb un pronòstic de mort molt precoç, i que poden ser identificats amb l'aplicació de models pronòstics de risc elevat de mort (Boto et al., 2006; Vilalta et al., 1992).

1.2. Concepte de traumatisme cranioencefàlic greu

Els TCEs constitueixen lesions físiques que generen alteracions del contingut cranial degut a un intercanvi brusc d'energia provocat per qualsevol mecanisme físic (accident de trànsit, caiguda casual, agressió, etc). Tradicionalment, el TCE s'ha classificat pel mecanisme (tancat *versus* penetrant), per la severitat clínica (Escala del Coma de Glasgow: GCS; (Teasdale and Jennett, 1974)) i per l'avaluació del dany estructural (neuroimatge).

La valoració del nivell de consciència és probablement l'aspecte més important a tenir en compte i el de major valor predictiu. S'ha demostrat que la severitat i duració de la disminució del nivell de consciència és el signe neurològic aïllat més important en la determinació de l'alteració de la funció cerebral (Frowein R.A. and Firsching R, 2008). El sistema més acceptat actualment per valorar el nivell de consciència d'un pacient que ha sofert un TCE és el GCS (annexe 1). L'exploració neurològica d'un pacient que acaba de sofrir un TCE es pot veure dificultada per la presència d'agitació psicomotriu, per l'intoxicació residual deguda a la ingesta d'alcohol o de

drogues o per la presència de fàrmacs (sedants, relaxants). En els casos en els que es requereixi una sedació, relaxació i intubació del malalt, l'exploració inicial serà decisiva pel posterior tractament del pacient.

1.2.1. Definició de coma

Jennett i Teasdale van afirmar que un pacient està en coma quan no és capaç d'obeir ordres, no pot emetre paraules intel·ligibles i no obre els ulls a cap estímul dolorós (Jennett and Teasdale, 1977). Respecte la classificació del GCS, un pacient estarà en coma si presenta una puntuació igual o inferior a 8 punts. En general s'accepta que un malalt surt del coma quan obre els ulls. El GCS també s'utilitza per classificar la gravetat dels TCEs. Així, s'inclou sota la denominació de TCE greu a aquells pacients que presentin una puntuació en el GCS igual o inferior a 8 punts dins les primeres 48 hores després del traumatisme i després de les maniobres de reanimació no quirúrgiques. Els TCEs moderats presentaran una puntuació en el GCS entre 9 i 13, i els TCEs lleus tindran puntuacions de 14 o 15.

1.3. Classificació de Marshall

La valoració del dany estructural mitjançant la neuroimatge no presenta les limitacions abans esmentades. Els pacients neurotraumàtics constitueixen un grup heterogeni de malalts que poden presentar diferents tipus de lesions cerebrals. Marshall i col. (Marshall L.F. et al., 1991) van proposar al 1991 un sistema descriptiu per classificar les tomografies computeritzades (TC) cerebrals, la classificació del Traumatic Coma Data Bank (TCDB). Aquesta classificació es centra en la presència o absència d'una lesió de massa i diferencia les lesions difuses gràcies a els senyals indirectes d'augment de la pressió intracranial (PIC), com la compressió de les cisternes basals i la desviació de la línia mitja. Així, ens trobem amb quatre tipus de lesions difuses (lesió difusa tipus I, II, III, IV) i dos tipus de lesions focals (massa evacuada, massa no evacuada), com es pot observar a la figura 1 (annexe 2).

Les diferents categories d'aquesta classificació són les següents:

- ❖ **Lesió difusa tipus I:** la TC cerebral no mostra cap imatge patològica.
- ❖ **Lesió difusa tipus II:** les cisternes són visibles. La línia mitja està centrada o existeix una desviació de 0-5mm. No existeixen lesions hemàtiques superiors a 25cc.
- ❖ **Lesió difusa tipus III:** les cisternes estan comprimides o absents. La línia mitja està centrada o desviada entre 0-5 mm. No existeixen lesions hemàtiques superiors a 25cc.
- ❖ **Lesió difusa tipus IV:** la línia mitja es troba desviada més de 5 mm. No existeixen lesions hemàtiques superiors a 25cc.
- ❖ **Massa evacuada:** lesió que ha estat evacuada quirúrgicament.
- ❖ **Massa no evacuada:** lesió superior a 25cc no evacuada quirúrgicament.

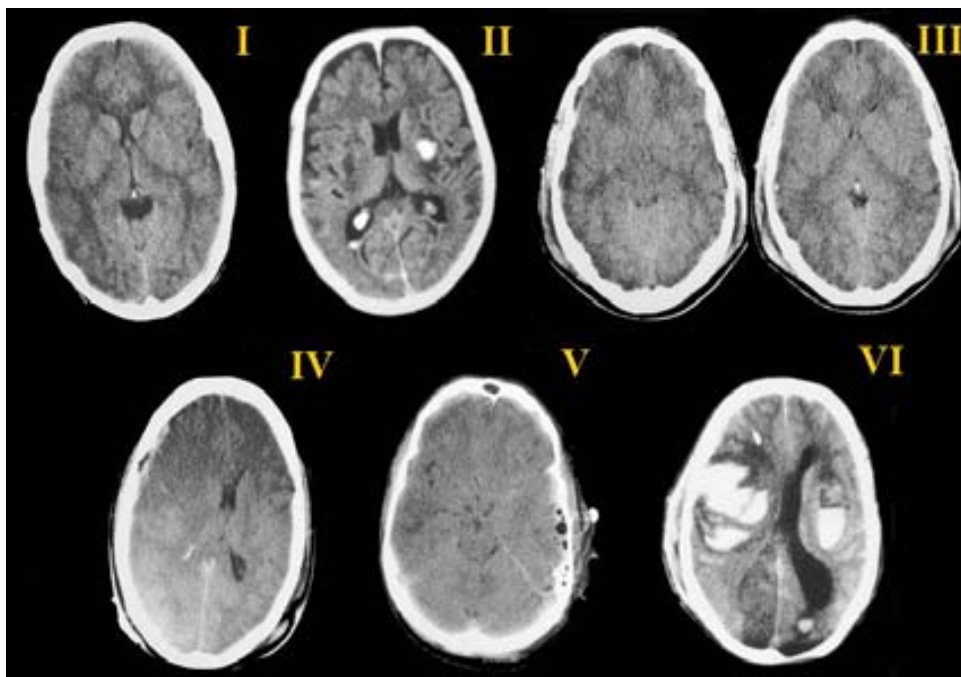


Figura 1. Imatges representatives de cada categoria de la classificació de Marshall o TCDB. En groc es mostra la categoria de la classificació.

1.4. Monitoratge del pacient neurocrífic

Malgrat la disponibilitat de diverses eines pel monitoratge del sistema nerviós central (SNC), no existeixen estudis que demostrin que el monitoratge continuat de qualsevol variable aïllada, millori significativament el resultat dels pacients que han sofert un TCE (Sahuquillo, 2008). Recentment s'ha suggerit que el monitoratge i el control de la PIC i de la PPC després del TCE incrementa la terapia intensiva sense millorar-ne el resultat (Cremer et al., 2005). De totes formes, aquestes eines són diagnòstiques i no poden ser considerades intervencions, per tant no podem esperar que millorin el resultat a no ser que disposem d'un tractament que millori l'abnormalitat diagnosticada, i per tant el resultat funcional i/o cognitiu del malalt (Sahuquillo, 2008).

Les raons principals per les que els pacients neurocrítics són monitoritzats són les següents:

1. Detectar el deteriorament neurològic abans de l'instauració d'una lesió cerebral irreversible.
2. Individualitzar les decisions en les cures dels pacients.
3. Guiar el tractament del pacient.
4. Analitzar la resposta terapèutica d'algunes intervencions i evitar els efectes adversos.
5. Permetre els clínics de ser capaços d'entendre la fisiopatologia de trastorns complexos.
6. Dissenyar i posar en pràctica protocols de tractament.
7. Millorar el resultat neurològic i la qualitat de vida en els supervivents d'un TCE greu.

Per assolir aquests objectius és necessari un personal preparat per interpretar les dades obtingudes pels diferents monitors, així com unes dades de qualitat òptima. El monitoratge clínic (nivell de consciència i reactivitat pupilar) és imprescindible, però els pacients més greus amb traumatisme cranial es troben sedats i ventilats mecànicament i requereixen un monitoratge cerebral objectiva i avançada.

1.4.1. Monitoratge sistèmic

Donat que les complicacions secundàries en el cervell traumatitzat poden ser d'origen sistèmic o cerebral, el monitoratge per detectar-les ha de constar del component sistèmic i cerebral.

El monitoratge sistèmic és la que es realitza en qualsevol pacient crític i consisteix en el monitoratge de la morfologia de l'electrocardiograma, la saturació d'oxigen arterial, la pressió arterial, la pressió venosa central, la temperatura central, les gasometries arterials sanguínies i els nivells d'electròlits al sèrum (Cremer et al., 2005).

1.4.2. Monitoratge cerebral invasiu

Entre les variables que es poden monitoritzar de forma invasiva les més freqüents són la PIC, la saturació d'oxigen al bulb de la jugular (SjO_2), la pressió tissular d'oxigen ($PtiO_2$) i la microdiàlisi cerebral.

1.4.2.1. Pressió intracranial (PIC)

La medicació de la PIC és molt important per l'aplicació de les teràpies dirigides al control de la HIC (Bullock et al., 2000; Sahuquillo et al., 2002b), fenomen molt freqüent en algunes categories del TCDB (Poca et al., 1998), i al control de la PPC, que és la diferència entre la tensió arterial mitja (TAM) i la PIC. Existeixen principalment dos mètodes per monitoritzar la PIC. El patró or és la PIC intraventricular, ja que mesura la pressió global, es pot calibrar externament i a més permet el drenatge terapèutic de líquid cefaloraquídi (LCR). No obstant això, no sempre és possible insertar un catèter de PIC intraventricular degut a l'edema cerebral. El sistema intraparenquimatós, i en concret el sistema Camino®, per altra banda presenta un baix nombre de complicacions (Gelabert-Gonzalez et al., 2006; Poca et al., 2002). Les guies de pràctica clínica de la Brain Trauma Foundation indiquen que la PIC constitueix l'únic paràmetre encefàlic que s'hauria de monitoritzar de forma obligada als pacients amb un TCE greu i que presenten una TC cerebral anormal (evidència classe II) (2007).

1.4.2.2. Saturació d'oxigen al bulb de la jugular (SjO_2)

El monitoratge de la SjO_2 és una tècnica que ens permet estimar el balanç entre l'aport cerebral global d' O_2 i la seva utilització (Tisdall and Smith, 2007). El catèter s'inserta en el bulb de la vena jugular interna, minimitzant així la contaminació del retorn venós extracerebral, que és aproximadament un 3% si el catèter està implantat adequadament (Lam et al., 1996). Un cop s'ha confirmat la correcta posició amb una radiografia cervical lateral, la medició de la SjO_2 es pot realitzar de forma contínua utilitzant un catèter de fibra òptica o directament extraient una mostra sanguínia cada cert període de temps i utilitzant un co-oxímetre per realitzar l'anàlisi.

A diferència de la $PtiO_2$ es tracta d'una tècnica de monitoratge de l'oxigenació global. A part de ser útil per mesurar la saturació d' O_2 jugular, també ens permet fer una estimació del fluxe sanguini cerebral (FSC). Aquesta estimació es pot realitzar en determinades condicions, a partir de la medició de les diferències arterio-jugulars d'oxigen ($AVDO_2$) o d'altres variables hemometabòliques derivades del valor de l'oxihemoglobina obtinguda a nivell del bulb de la jugular interna (extracció cerebral d' O_2 : CEO_2 , o saturació de l'oxihemoglobina jugular; (Cruz et al., 1993; Dearden and Midgley, 1993; Robertson et al., 1992). A la figura 2 es poden observar les diferents fórmules pel càlcul dels paràmetres més utilitzats amb l'oximetria del bulb de la jugular.

$$AVDO_2 = 1.34 * Hb [(SaO_2 - SjO_2) / 100] + (PaO_2 - PjO_2) * 0.0031$$

$$FSC = \frac{CMRO_2}{AVDO_2} = \frac{CMRO_2}{CEO_2}$$

$$CEO_2 = SaO_2 - SjO_2 \quad CMRO_2 = AVDO_2 \times FSC$$

Figura 2. Fórmules pel càlcul dels diferents paràmetres utilitzats en les tècniques d'oximetria jugular. $AVDO_2$: diferències arterio-jugulars d'oxigen; Hb: hemoglobina; SaO_2 : saturació arterial d'oxigen, SjO_2 : saturació jugular d'oxigen, PaO_2 : pressió arterial d'oxigen; PjO_2 : pressió jugular d'oxigen; FSC: fluxe sanguini cerebral; $CMRO_2$: consum metabòlic d'oxigen; CEO_2 : coeficient d'extracció d'oxigen.

En condicions fisiològiques el FSC augmenta o disminueix en funció dels requeriments metabòlics tissulars. En aquesta situació existeix un perfecte acoblament entre el FSC i el consum metabòlic d'oxigen ($CMRO_2$) que fa que les $AVDO_2$ romanguin constants (Robertson et al., 1989). No obstant això, un gran nombre de pacients amb un TCE presenten una alteració dels mecanismes reguladors del FSC (Golding et al., 1999; Nordstrom et al., 1988) i poden presentar un FSC reduït o elevat, independentment de la reducció de $CMRO_2$ (Cruz et al., 1990).

En general s'accepten les situacions següents, que també es troben esquematitzades a la taula 1:

- **Normoperfusió:** $AVDO_2$ normals. Correcte acoblament entre el FSC i el $CMRO_2$.
- **Hiperèmia:** $AVDO_2$ baixes. El FSC és excessiu respecte als requeriments metabòlics cerebrals.
- **Hipoperfusió:** $AVDO_2$ elevades. El FSC es troba disminuït, ja que el cervell compensa el descens en el fluxe sanguini a través d'una major extracció d' O_2 (CEO_2). Una saturació d' O_2 en el bulb de la jugular per sota dels valors fisiològics (< 55%) indica que l'aport d' O_2 al cervell és insuficient per suplir les demandes energètiques cerebrals.

Situació	$AVDO_2$ ($\mu\text{mol/ml}$)	CEO_2 (%)	SjO_2 (%)
Isquèmia	> 3	> 40	< 55
Normal	1-3	24-40	55-75
Hiperèmia	< 3	< 24	> 75

Taula 1. Valors acceptats com a normals i com a líndars de isquèmia i hiperèmia per les $AVDO_2$, CEO_2 i la SjO_2 en pacients amb un TCE.

Valors baixos de SjO_2 (50-55%) s'han associat amb un pitjor resultat neurològic (Fandino et al., 2000; Gopinath et al., 1994; Perez et al., 2003). De la mateixa manera, valors superiors al 75% (Cormio et al., 1999; Macmillan et al., 2001) també s'han relacionat amb un resultat funcional pitjor.

Les diferències arterio-jugulars de lactat i l'índex lactat oxigen

Des d'el punt de vista tradicional es va acceptar que el metabolisme anaeròbic també podia ser estudiat utilitzant les diferències arterio-jugulars de lactat (AVDL) i l'índex lactat oxigen (LOI) (Robertson et al., 1987; Robertson et al., 1989). Segons Robertson i col. (Robertson et al., 1987), un procés isquèmic estaria acompanyat d'un augment en la producció de lactat cerebral, augment que seria detectat en les determinacions sanguinies al bulb de la jugular. Els mateixos autors, en un treball posterior (Robertson et al., 1989), van calcular la quantitat de glucosa que es metabolitzava per la via anaeròbica i l'aeròbica, establint un nou paràmetre: el LOI, que s'obté a partir del cocient entre les AVDL i l'AVDO₂ (mesurat en μmol) segons la fórmula: $\text{LOI} = -[\text{AVDL}]/\text{AVDO}_2$. El valor normal de LOI va quedar establert per sota de 0,03. Un $\text{LOI} \geq 0,08$ era indicatiu d'un augment en la producció cerebral de lactats i, per tant, d'una situació de isquèmia/infart o d'una hipoperfusió suficientment important com per alterar el metabolisme cerebral (Robertson et al., 1989).

Fins fa poc temps el càlcul de les AVDL ha estat utilitzat per múltiples investigadors (Robertson et al., 1987; Robertson et al., 1989; Sahuquillo et al., 1993; Sahuquillo et al., 2000). No obstant això, el lactat necessita transportadors específics, el transportador de monocarboxilat (Price et al., 1998), per atravesar la BHE i les membranes de neurones i astròcits. El càlcul de les AVDL i del LOI es basen en l'aplicació del principi de Fick a l'encèfal. Segons aquest principi l'element a quantificar hauria d'accedir al compartiment sanguini per difusió simple. Per tant, els nivells de lactat que es quantifiquen al bulb de la jugular no reflecteixen una situació real del metabolisme cerebral. Això explicaria les discrepàncies que s'observen en determinar de forma simultània la concentració extracel·lular de lactat cerebral per tècniques de microdialisi i les AVDL (Vespa et al., 2003). A la figura 3 es mostra un exemple de la falta de

concordància entre les AVDL y el LOI respecte el lactat cerebral mesurat per microdiàlisis.

D'altra banda, i com es descriurà amb més detall a l'apartat de microdiàlisi cerebral, no tot el lactat produït durant un procés isquèmic arriba al compartiment vascular, sinó que part es consumeix per les propies cèl·lules productores i part es transfereix a cèl·lules adjacents per ser utilitzat com a substrat energètic. A més, la mesura simple de lactat ens pot confondre davant de situacions metabòlicament antagòniques com és l'hipermetabolisme i la isquèmia, on també s'observa un augment de la producció de lactat.

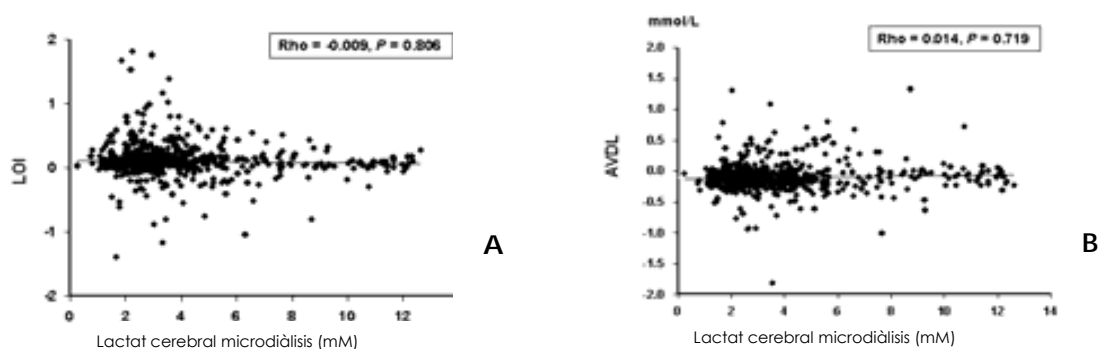


Figura 3. Gràfiques de regressió lineal que mostren una correlació no significativa entre els valors de LOI i els valors de lactat obtinguts per microdiàlisi cerebral (A) i els valors de les AVDL amb els valors de lactat obtinguts per microdiàlisi cerebral (B).

1.4.2.3. Pressió tissular d'oxigen (PtiO₂) i microdiàlisi cerebral

Aquests tipus de monitoratges es troben desenvolupats en el següent apartat "Neuromonitoratge avançat: PtiO₂ i microdiàlisi cerebral".

1.4.3. Monitoratge cerebral no invasiu

A continuació es descriuen breument els principals tipus de monitoratge cerebral no invasiu.

1.4.3.1. Espectroscopia per rajos propers als infrarojos (NIRS)

Es tracta d'un sistema de monitoratge no invasiu que mesura l'oxigenació de l'hemoglobina (Hb) principalment. Com el seu nom indica, utilitza la llum infraroja propera a l'espectre dels rajos infrarojos, la qual pot atravesar el crani. Al seu pas, aquesta llum és absorvida per mol·lècules cromòfores com l'oxihemoglobina (HbO₂), la deoxihemoglobina i el citocrom c oxidasa. A partir d'una emissió inicial de fotons, un fotodetector analitza el senyal lluminós reflectit i quantifica la llum que ha estat reabsorvida, permetent determinar la concentració de certs cromòfors continguts en un teixit o una mostra biològica (Poca et al., 2005). La informació referent a l'Hb pot ser proporcionada en percentatge de saturació d'Hb, en els canvis absoluts d'HbO₂, deoxihemoglobina i d'Hb total, en concentracions micromolars, referenciades a un valor basal arbitrari (Cho et al., 2000).

Els problemes tècnics han reduït el seu ús. Per exemple, si la font i el detector no estan suficientment allunyats, les mesures estan influïdes pel fluxe sanguini subcutani (Haitsma and Maas, 2007). A més s'han trobat valors normals en situacions de isquèmia, possiblement relacionades per la sang venosa "segrestada" a la zona infartada (Gomersall et al., 1997). Gràcies a algunes modificacions tècniques realitzades recentment, el NIRS sembla tenir un futur molt més prometedor (Al Rawi, 2005).

1.4.3.2. Doppler transcranial

El Doppler transcranial (DTC) és una tècnica no invasiva que utilitza les ones d'ultrasons per obtenir la velocitat del FSC, a partir del desplaçament de la ona d'ultrasó, que és provocat pel moviment dels eritròcits a través del camp de monitoratge. Una ona polsada de baixa freqüència (2MHz) és utilitzada per insonar un vas cerebral basal a través d'una finestra cranial acústica, una àrea poc densa del crani, que proporciona poca atenuació i dispersió del senyal. L'ona de velocitat del fluxe del DTC és similar a una ona de pols arterial i s'ha de quantificar en un pic sistòlic, un final diastòlic, i en velocitats mitges de fluxe. El DTC no és capaç d'obtenir valors absoluts de FSC però si l'angle d'insonació i el diàmetre del vas es mantenen constants, els

canvis en les velocitats de FSC mesurades pel DTC reflecteixen canvis en el FSC (Valdúeza et al., 1997). El DTC també s'ha utilitzat per diagnosticar i monitoritzar el vasoespasme cerebral després d'una HSA i permet una estimació de la PIC (Czosnyka et al., 1998).

1.4.3.3. Monitoratge electroencefalogràfic

Les crisis comicials són una font de complicacions secundàries en el cervell traumatitzat, que tendeixen a ocórrer en els primers dies després d'un TCE, i que es troben associades amb la severitat de la lesió i amb un pitjor resultat. Dades recents d'estudis provinents de l'electroencefalografia (EEG) contínua han demostrat que les crisis comicials ocorren en aproximadament un 20% dels pacients amb TCE durant l'estada a la UCI (Vespa et al., 1999). Algunes d'aquestes crisis comicials són de naturalesa no convulsiva i no poden ésser detectades clínicament, i algunes d'elles ocorren malgrat la utilització d'anticomicials profilàctics.

1.4.3.4. Neuroimatge

Les tècniques de neuroimatge (TC, tomografia computeritzada d'emissió per positrons: PET, tomografia computeritzada per emissió de fotó únic: SPECT, ressonància magnètica: RM) poden proporcionar informació detallada sobre l'hemodinàmica i el metabolisme cerebral en múltiples regions de interès. La seva limitació principal és que només proporcionen "captures" del cervell en el moment de la realització i per tant no poden monitoritzar l'evolució de les lesions cerebrals, o guiar el tractament amb estratègies neuroprotectores a temps real. A més, requereixen el trasllat del pacient a instal·lacions especialitzades, la qual cosa pot ser perjudicial pel malalt quan no es troba en condicions estables per ser traslladat (Tisdall and Smith, 2007).

No obstant això, la pràctica de TCs seqüencials és una rutina assistencial en els pacients amb un TCE greu, tot i que no existeix consens en quin seria el nombre adient i la freqüència d'aquests controls, sobretot en pacients amb una lesió del tipus I o II (Lobato et al., 2005). En un estudi realitzat per Lobato i col. (Lobato et al., 2005) es van analitzar els canvis en la PIC durant la fase

aguda postraumàtica en una sèrie de pacients amb TCE greu i lesions difuses tipus I i II, amb l'objectiu d'intentar dissenyar la pauta més adient per la realització dels TCs seqüencials i el monitoratge de la PIC. Aquests investigadors van determinar que en més de la meitat dels pacients amb una lesió inicial tipus I o II es desenvolupaven canvis patològics al TC, i quasi el 50% presentaven hipertensió intracranial. En aquest estudi van concloure que és raonable monitoritzar la PIC desde l'inici i realitzar un TC a les 2-4, 12, 24, 48 y 72 hores després del traumatisme en tots els pacients, i sempre que l'evolució clínica o la PIC ho requereixin. A més, diversos estudis han analitzat la relació entre les troballes al TC i la seva relació amb el resultat i el pronòstic dels pacients amb TCE (Lobato et al., 1983; Lobato et al., 1988; Lobato et al., 1991; Lobato et al., 1997).

2. Neuromonitoratge avançat: PtiO₂ i microdiàlisi

2.1. Microdiàlisi cerebral

2.1.1. Principi bàsic de la tècnica

La microdiàlisi cerebral és una tècnica que permet el monitoratge de l'espai intersticial del teixit cerebral. El fonament bàsic d'aquest sistema de neuromonitoratge és la introducció al parènquima cerebral d'un catèter de petit calibre, que conté una membrana semipermeable al seu extrem distal, i que actua de forma similar a un capil·lar, com es mostra a la figura 4.

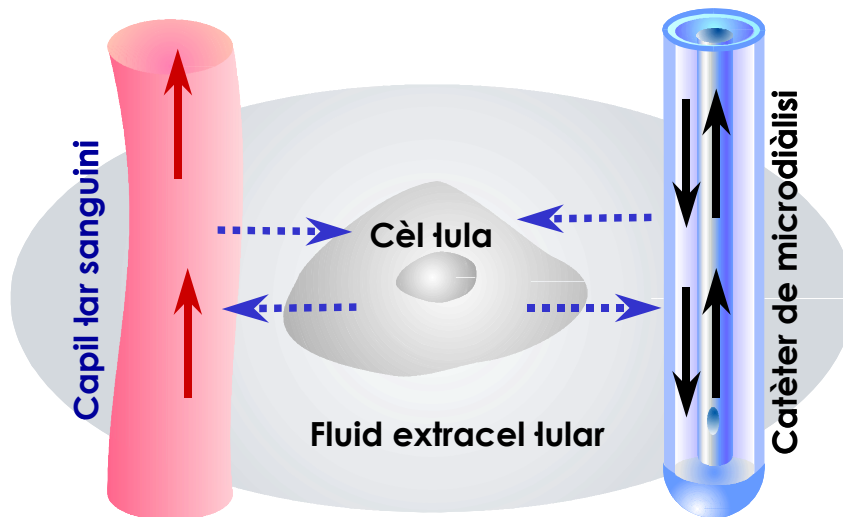


Figura 4. Esquema de la similitud d'un catèter de microdiàlisi amb un capil·lar sanguini.

La membrana de diàlisi permet la difusió lliure d'aigua i soluts entre l'espai intersticial cerebral i una solució de composició similar al LCR perfosa mitjançant una microbomba a una velocitat variable de 0,30µl/min, i que no conté les molècules que interessa estudiar. Quan la solució, que és equivalent en composició al LCR, és perfosa a través del catèter de microdiàlisi, s'equilibrarà amb el líquid de l'espai extracel·lular proper al catèter. L'intercanvi de molècules es realitza en ambdues direccions i serà la diferència de concentració a través de la membrana el que establirà la direcció de gradient (figura 5), així com el tamany dels porus de la membrana de diàlisi.

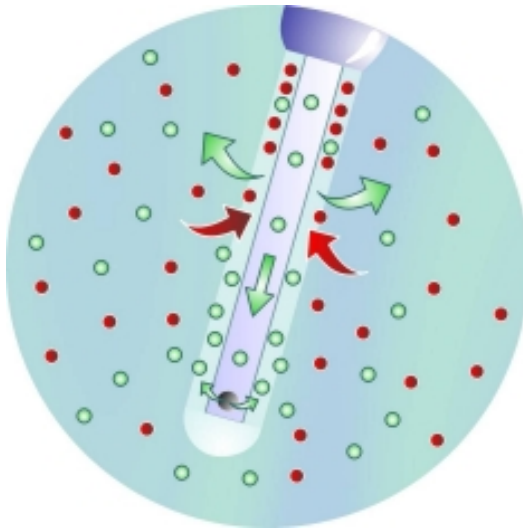


Figura 5. Imatge que mostra l'intercanvi de soluts a través de la membrana de microdiallisi. Imatge cedida per CMA Microdialysis AB, Solna, Suècia.

El líquid de perfusió contindrà una proporció representativa dels ions i mol·lècules que componen el líquid extracel·lular de l'encèfal. La solució infosa es recull periòdicament en microvials i el seu contingut és analitzat a la capçalera del pacient mitjançant mètodes enzimàtics, per l'analitzador CMA600 (CMA, Microdialysis, Solna, Sweden) o congelat pel seu anàlisi posterior al laboratori.

L'intercanvi de soluts que té lloc durant la microdiallisi està regit per processos de transport passiu, que regulen la difusió entre dues fases separades per una membrana. Aquest intercanvi s'expressa matemàticament amb la **lleï de Fick** (Atkins, 1994):

$$J = D \frac{\delta C}{\delta X}$$

J: fluxe net; **D**: coeficient de difusió; **δC**: diferència de concentracions als dos cantons de la membrana; **δX**: longitud a atravesar per la membrana (gruixària de la membrana dialitzant).

2.1.2. Aspectes tècnics: concepte de recuperació

L'objectiu principal de la microdiallisi és estudiar la composició del líquid intersticial per poder monitoritzar la disponibilitat tissular de diferents metabolits, les mol·lècules que són alliberades per les cèl·lules i les conseqüències cel·lulars de la hipòxia/isquèmia tissular.

Una de les limitacions de la microdiàlisi és que la concentració d'una substància al dialitzat no equival necessàriament a la concentració real extracel·lular i la seva recuperació és sempre relativa. El terme recuperació o recuperació relativa es defineix com el cocient entre la concentració d'una substància determinada al dialitzat i la concentració real de la mateixa al líquid intersticial, expressat en percentatge (Ungerstedt and Rostami, 2004). En canvi, la recuperació absoluta es defineix com la quantitat de substància obtinguda al dialitzat per unitat de temps (Benveniste, 1989).

La recuperació *in vitro* normalment es medeix performent el catèter continuament a un fluxe constant i insertant el catèter en una solució aquosa, que conté la mol·lècula d'interès a una concentració coneguda. El líquid de perfusió és idèntic al líquid en el que es submergeix el catèter, excepte per la mol·lècula d'interès. La recuperació de diverses mol·lècules també es pot realitzar simultàniament. Per calcular la recuperació, es recullen diferents mostres seqüencialment pel seu anàlisi posterior mitjançant mètodes de HPLC, microelectrodes o *arrays* de proteïnes, entre d'altres.

La recuperació relativa (RR) s'obté mitjançant l'aplicació de la següent fórmula (Benveniste, 1989):

$$\text{Recuperació } in vitro = C_{ext}/C_{int}$$

C_{ext}: concentració de la substància al dialitzat

C_{int}: concentració de la substància al medi

Per intentar entendre els processos que intervenen i alteren la difusió de proteïnes a través de la membrana de diàlisi, diversos autors han realitzat estudis, tant matemàtics com experimentals, amb l'objectiu d'obtenir equacions teòriques que ens permetin predir els resultats *in vivo* a partir dels resultats de recuperació *in vitro* (Amberg and Lindfors, 1989; Bungay et al., 1990; Bungay et al., 2001; Chen et al., 2002).

2.1.2.1. Factors que afecten la recuperació relativa

Existeixen diferents factors que provoquen que la recuperació a través dels catèters de microdiàlisi no reflecteixi la concentració real del líquid de l'espai extracel·lular. Entre aquests factors trobem principalment la velocitat de infusió del líquid de perfusió, la longitud de la membrana de diàlisi, les alteracions tissulars reactives que apareixen al voltant del catèter, els coeficients de difusió de les mol·lècules de interès, les propietats de la membrana de diàlisi, la composició del líquid de perfusió, el drenatge local i la pressió hidrostàtica. Aquests factors es defineixen a continuació.

Velocitat d'infusió del líquid de perfusió i longitud de la membrana

El fluxe del líquid de perfusió està inversament relacionat amb la RR. Conforme més elevada és la velocitat de perfusió més diluïda està la mostra, sent la RR menor. Una hipòtesi és que amb la utilització de fluxes ràpids es produeix una major força hidrostàtica de filtració que podria afectar el transport de les substàncies (Benveniste, 1989; Kehr, 1993). Una velocitat de perfusió baixa i una membrana de diàlisi llarga proporcionen una RR elevada. Si la membrana és suficientment llarga per permetre un intercanvi de mol·lècules major i la velocitat de perfusió és baixa, la concentració al dialitzat s'aproximarà a la concentració real en el líquid intersticial, sent la recuperació de quasi el 100% (Ungerstedt and Rostami, 2004). El problema radica en que les membranes llargues són difícils d'implantar i les velocitats de perfusió massa baixes redueixen el volum de dialitzat per l'anàlisi i també afecten la resolució temporal (Johnston and Gupta, 2002).

La raó principal per la qual els resultats quantitius entre els diferents centres siguin difícils de comparar és que s'utilitzen diferents longituds de membrana i diferents velocitats de perfusió. La creixent utilització d'equips, membranes i velocitats de perfusió estàndars i homogènies permeten obtenir resultats quantitius més rellevants i comparables. En el cas dels catèters cerebrals i les bombes de perfusió que s'utilitzen a la clínica, la longitud estàndar de la membrana cerebral és de 10mm i la velocitat de perfusió de

0,30µl/min (Bellander et al., 2004). En aquestes condicions s'estima que la recuperació és d'aproximadament el 70% (Hutchinson, 2000).

Alteracions tissulars induïdes per la implantació del catèter

La implantació d'un catèter de microdiàlisi produeix una disrupció del teixit on es troba insertat. El catèter provoca un descens en el FSC local, en la fosforilació de la glucosa i un desacoblament entre el fluxe i el metabolisme en les primeres 24 hores després de la implantació. Trenta minuts després de la inserció del catèter la BHE es manté intacta (Benveniste, 1989). La implantació del catèter també produeix petites lesions hemorràgiques en el seu trajecte, astrogliosis i infiltració de macròfags (Whittle et al., 1998). En alguns estudis *in vitro* s'ha observat que la recuperació relativa depèn del temps. Inicialment la recuperació és elevada però disminueix ràpidament fins arribar a un estat "semi-estacionari", a partir del qual va disminuint lentament. Els valors de RR no canvien significativament un cop s'ha arribat a l'estat "semi-estacionari" (Benveniste, 1989).

Coeficients de difusió

In vitro, la difusió d'un determinat metabolit només depèn del coeficient de difusió a la solució (D_s) i d'aquest coeficient a través de la membrana (D_m). La difusió al cervell i a altres teixits però, està limitada per les característiques del líquid extracel·lular i la tortuositat de l'espai intersticial. La matriu extracel·lular (MEC) té propietats algutinants degut a les glicoproteïnes i altres macromol·lècules que estan presents. Les mol·lècules poden ser ràpidament degradades al medi extracel·lular, transportades per processos actius o també poden difondre dins dels capil·lars. Tot això provoca que la recuperació *in vivo* sempre sigui menor que la *in vitro* (Benveniste, 1989; Kehr, 1993). Un altre factor que afecta al coeficient de difusió és la temperatura, que augmenta en un 1-2% el coeficient per cada grau centígrad (Benveniste, 1989).

Propietats de la membrana

Una membrana amb un tamany de porus petit purificarà la mostra excloent les mol·lècules grans del microdialitzat, mentre que una de tamany major recuperarà substàncies de major PM, com pèptids i proteïnes. El material del que es componen les membranes dialitzants també influeix en la recuperació, interaccionant amb diferents substàncies que són transportades per mecanismes desconeguts (Benveniste, 1989).

Composició química del líquid de perfusió i drenatge local

D'acord amb els principis de difusió, una substància ha d'estar absent del líquid de perfusió per obtenir una recuperació satisfactòria de l'analit de interès. D'altra banda, el drenatge continu d'una substància de l'espai extracel·lular pot augmentar el seu drenatge amb el temps de forma artificial, reduint-se la seva concentració a la regió propera al catèter. Així mateix, en estudis *in vitro* s'han observat gradients de concentració d'un metabolit de interès entre la superfície del catèter i la resta del medi, essent inferiors les concentracions del metabolit en les zones properes al catèter (Benveniste, 1989). La composició dels diferents líquids de perfusió també influeix en la recuperació. Així, si s'utilitza sèrum salí (NaCl al 0,9%) com a líquid de perfusió, sense calci (Ca^{2+}), en comptes de Ringer amb Ca^{2+} , això pot provocar la deplecció del Ca^{2+} extracel·lular. D'aquesta manera s'afectaria l'alliberació de neurotransmissors com el glutamat, i la concentració de substàncies dependents de la concentració de Ca^{2+} intra/extracel·lular (Hutchinson, 2000).

Pressió hidrostàtica i col·loïdosmòtica

La variació en la posició del microvial de microdialisi produeix canvis en la pressió hidrostàtica, recollint-se menys volum si el microvial es situa en una posició elevada en relació a la punta del catèter. També s'ha descrit que la concentració de lactat és significativament inferior quan el final del tub de sortida es situa en una posició elevada (Hamrin et al., 2002). Així mateix, la presència d'un col·loid al líquid de perfusió del catèter produeix que el volum

recollit sigui major. S'han descrit variacions significatives en la concentració de glucosa amb o sense col·loïd al líquid de perfusió.

2.1.3. Monitoratge bioquímic

Malgrat que els catèters de microdialisi cerebral permeten l'obtenció d'un gran nombre de mol·lècules i ions, a la pràctica clínica el monitoratge neuroquímic a la capçalera del pacient es limita a la quantificació seqüencial dels següents metabolits: glucosa, lactat, piruvat, glutamat, glicerol i urea. L'anàlisi es realitza amb l'analitzador CMA600 (CMA, Microdialysis, Solna, Sweden) per un màxim de quatre metabolits de forma simultània.

Els valors normals d'aquests metabolits al líquid intersticial cerebral es van obtenir de l'estudi de Reinstrup i col. (Reinstrup et al., 2000), a partir de catèters implantats al còrtex frontal de pacients sotmesos a cirurgia de la fosa posterior (Reinstrup et al., 2000). A la taula 2 es mostren aquests valors de normalitat, obtinguts amb catèters d'una longitud de membrana de 10mm i una velocitat de infusió d'1 µl/min durant l'anestèsia/cirurgia i de 0,3 µl/min a la fase posterior.

	Glucosa (mM)	Lactat (mM)	Piruvat (µM)	Índex lactat/ piruvat	Glicerol (µM)	Urea (mM)	Glutamat (µM)
Mitja	1,7	2,9	166	23	82	4,4	16
DS	0,9	0,9	47	4	44	1,7	16

Taula 2. Concentracions intersticials de glucosa, lactat, piruvat, glicerol, urea i glutamat al teixit normal del cervell humà. DS: Desviació estàndar.

2.1.3.1. Glucosa

La glucosa és un marcador important dels canvis en el metabolisme cerebral. Els nivells de glucosa al microdialitzat varien per diferents raons:

- **Isquèmia.** Si ocorre un descens en el FSC, existirà una reducció dels nivells tissulars de glucosa i per aquest motiu la concentració de glucosa al dialitzat disminuirà.
- **Hiperglucèmia.** En els casos en els que la glucosa sanguínia augmenta (estrés metabòlic, infusió intravenosa de glucosa, etc.), la proporció de glucosa alliberada a l'espai intersticial augmenta i com a conseqüència també al microdialitzat.
- **Hipermetabolisme o hipometabolisme.** Un augment o descens en la captació de glucosa per les cèl·lules, com el canvi del metabolisme aeròbic a l'anaeròbic, afectarà la concentració de glucosa intersticial. En aquesta situació, la quantitat de glucosa disponible a l'espai extracel·lular disminuirà o augmentarà respectivament.

Degut a que la concentració de glucosa canvia per diverses raons és necessari comparar els valors obtinguts amb els valors d'altres marcadors o inclús amb cocients que reflecteixin els canvis sistèmics (glucosa sistèmica/glucosa cerebral). La implantació d'un catèter subcutani a la regió peri-umbilical permet obtenir dades sistèmiques de glucosa, que ens serviran per determinar l'origen dels canvis en els nivells de glucosa (Ungerstedt and Rostami, 2004). El metabolisme de la glucosa a més és diferent segons el tipus de cèl·lules nervioses (Almeida et al., 2002).

2.1.3.2. Lactat

Després d'un TCE, la relació entre el FSC i el metabolisme es pot alterar per un increment en la demanda metabòlica, com a resultat de perturbacions en el gradient iònic cel·lular i per l'alliberació d'aminoàcids excitatoris (Katayama et al., 1990) en combinació amb la disfunció mitocondrial, i el descens en l'aport de substrats. A la taula 3 es troben esquematitzades les causes del desacoblament entre el FSC i el metabolisme cerebral.

Per restablir el gradient iònic transmembrana, les cèl·lules incrementen el consum de glucosa. El metabolisme cerebral oxidatiu normalment transcorre a la màxima capacitat, i com a conseqüència, l'augment en la demanda energètica a la fase aguda necessàriament requereix un augment de la glucòlisi, acumulant-se el lactat (Bergsneider et al., 1997; Glenn et al., 2003) i disminuint els nivells de glucosa. Tradicionalment, l'augment del lactat al teixit cerebral s'interpretava com un indicador de metabolisme anaeròbic en situacions de baix aport d'O₂. En aquesta situació de baix aport d'O₂ es manté certa producció d'ATP, tot i que mitjançant un mecanisme menys eficient que el de la ruta aeròbica de la glucosa a través del cicle de Krebs. D'aquesta forma, l'augment del lactat es considerava un indicador de isquèmia. D'altra banda, la hiperglucòlisi també genera un augment dels nivells de lactat, fins i tot en situacions d'aport normal d'O₂ al cervell (Bergsneider et al., 1997; Persson et al., 1984). Últimament, També s'han descrit altres causes d'augment del lactat com pot ser la disfunció mitocondrial (Verweij et al., 2000), la disfunció de l'enzim piruvat deshidrogenasa en pacients amb sepsi (Fink, 2001), l'increment de l'amoni (Kala and Hertz, 2005) i la hiperlactacidèmia en la disfunció hepàtica aguda (Tofteng and Larsen, 2002).

Causas del desacoblament entre el FSC i el metabolisme cerebral	
Descens de l'aport de substrats	<ul style="list-style-type: none"> • Hipòxia arterial • Hipotensió sistèmica • FSC reduït (isquèmia) • Edema cerebral
Increment en la demanda metabòlica	<ul style="list-style-type: none"> • Alteracions iòniques • Alliberació de neurotransmisors excitatoris • Crisis comicials • Hipermetabolisme
Disfunció mitocondrial	

Taula 3. Causes del desacoblament entre el FSC i el metabolisme cerebral.

2.1.3.3. Índex lactat/piruvat (L/P)

L'índex L/P és un marcador dels canvis energètics a les cèl·lules originats per la isquèmia. El piruvat es forma a partir de la glucosa a la part anaeròbica de la glucòlisi, generant 2 mol·lècules d'ATP per cada mol·lècula de glucosa. A continuació, el piruvat entra en el cicle de l'àcid cítric si existeix O_2 disponible. El cicle de l'àcid cítric (cicle de Krebs) és el productor majoritari d'ATP. Si el teixit està en situació de isquèmia es redueix la producció d'ATP pel cicle de l'àcid cítric produint-se un increment del lactat i una disminució del piruvat, raó per la qual l'índex L/P augmenta. A la figura 6 es troba esquematitzat el metabolisme de la glucosa al cervell, així com els processos que tenen lloc durant la isquèmia.

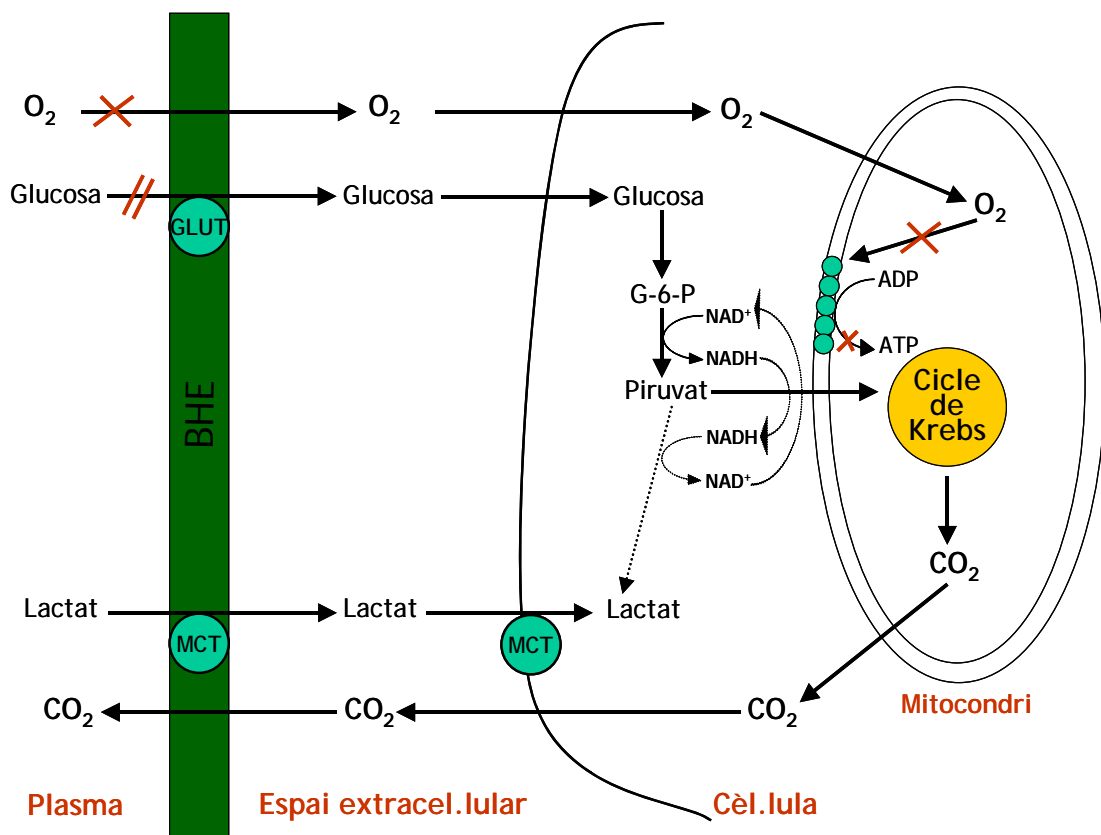


Figura 6. Esquema del metabolisme de la glucosa al cervell. Durant la isquèmia (X), la falta d' O_2 a nivell mitocondrial condueix a una alteració de l'estat redox de la cèl·lula, amb acumulació de NADH i l'activació de la lactat deshidrogenasa amb la conseqüent producció de lactat i l'increment del cocient L/P. La falta d'aport de glucosa produeix una concentració intersticial disminuïda d'aquest metabolit. GLUT: transportador de glucosa; MCT: transportador monocarboxílic. Modificat de Hillered i col. (Hillered et al., 2005)

La utilització de l'índex L/P té l'avantatge d'eliminar les fluctuacions en la recuperació del catèter. En els últims anys, la majoria d'estudis realitzats en el pacient amb TCE greu utilitzen l'índex L/P per detectar la hipòxia isquèmica (Enblad et al., 1996; Engstrom et al., 2005; Hutchinson et al., 2000; Magnoni et al., 2003). Recentment han aparegut publicats un parell d'estudis on es detecten valors elevats del cocient L/P que no es corresponen amb situacions de hipòxia tisular (Hlatky et al., 2004; Vespa et al., 2005). En l'estudi de Vespa i col. (Vespa et al., 2005) van utilitzar el PET i la microdiàlisi cerebral simultàniament, trobant una incidència de crisi metabòlica del 25% (cocient L/P>40) en la sèrie de 19 pacients estudiats, que només es corresponia en un 2,4% amb processos isquèmics diagnosticats per PET.

2.1.3.4. Glicerol

El glicerol és un component integral de la membrana cel·lular. Una pèrdua d'energia comporta una alliberació de glutamat, el qual estimula l'entrada de Ca^{2+} a l'interior cel·lular i la posterior activació de fosfolipases. Les fosfolipases degradaran els fosfolípids que formen la bicapa de les membranes cel·lulars, alliberant-se d'aquesta forma el glicerol a l'espai extracel·lular (Hillered et al., 1998).

2.1.3.5. Glutamat

Durant els episodis cerebrals isquèmics es produeix una alliberació massiva de glutamat, el qual activa l'obertura de canals de Ca^{2+} neuronals, provocant una entrada massiva de Ca^{2+} a l'interior cel·lular i el posterior dany cel·lular per una sèrie de cascades bioquímiques anòmales calci-dependents (Katayama et al., 1990). S'han trobat elevacions en els nivells de glutamat en pacients amb una isquèmia perllongada i en lesions focals després d'un TCE (Zauner et al., 1996). El glutamat és un marcador indirecte del dany cel·lular, de vegades difícil d'interpretar perquè el glutamat alliberat per les neurones es barreja amb un *pool* ampli de glutamat a la fenedura sinàptica.

Una altra acció del glutamat seria la d'activar la glucòlisi astrocítica, augmentant els nivells de lactat, el substrat preferit per les neurones (Alessandri et al., 1999).

2.1.3.6. Urea

L'urea pot utilitzar-se com a compost de referència endogen, ja que en passar de forma quasi instantània per la BHE la seva distribució és homogènia en tots els fluids corporals (Hillered, 1999), com es mostra a la figura 7. El cocient entre els nivells d'urea cerebral i sistèmic ens permet conèixer el correcte funcionament dels catèters de microdiàlisi cerebral. Així, si el cocient es manté constant, les fluctuacions en els metabolits analitzats per la microdiàlisi seran deguts a canvis biològics (Ronne-Engstrom et al., 2001).

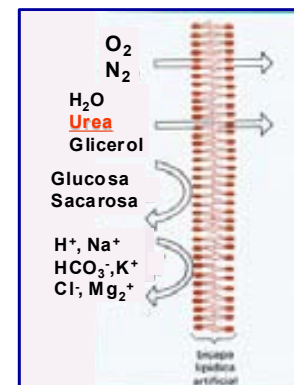


Figura 7. Difusió simple de l'urea a favor de gradient a través d'una bicapa lipídica (Alberts B et al., 1994).

2.1.4. Aplicació de la microdiàlisi al traumatisme cranial

L'aplicació de la tècnica de microdiàlisi es remunta a la dècada dels seixanta. Bito i col. (Bito et al., 1966) van ser els primers en aplicar-la al cervell de gos al 1966. Aquest mètode inicial consistia en un sac porós amb una solució de dextrà al 6% en sèrum salí i del que només s'obtenia una mostra. Posteriorment, al 1972, Rodríguez-Delgado i col. (Delgado et al., 1972) van dissenyar un sistema de recollida contínua de mostres mitjançant l'ús de dues cànules connectades a una petita bossa porosa. La tècnica s'ha anat perfeccionant fins arribar al model de catèters que s'utilitzen actualment, la composició dels quals és de poliamida i poliuretà.

El fet de conèixer la composició del líquid intersticial cerebral és important per entendre la funció cerebral i el metabolisme. Als pacients que es troben en una unitat de neurocrítics generalment se'ls monitoritza la pressió

arterial, la PIC, la temperatura i els nivells d'oxigenació sanguinis. El principal objectiu d'aquest polimonitoratge és detectar de forma precoç la isquèmia/hipòxia, així com els problemes metabòlics relacionats que succeeixen al cervell lesionat. Durant els últims anys s'han incorporat nous mètodes per mesurar els processos metabòlics, entre els que ha destacat la microdiàlisi cerebral (Ronne-Engstrom et al., 2001). La microdiàlisi cerebral és una eina potent d'investigació clínica en el camp de les neurociències, que proporciona informació de gran rellevància en els processos isquèmics (Hillered, 1999), en l'epilepsia, en el TCE (Bullock et al., 1998; Goodman et al., 1999; Robertson et al., 1998; Vespa et al., 2003) i en l'hemorràgia subaracnoidea (HSA) (Enblad et al., 1996; Persson et al., 1984; Persson and Hillered, 1976).

A part del monitoratge rutinari a la capçalera del pacient, comentat en apartats anteriors, existeixen també altres marcadors bioquímics útils pel monitoratge de l'espai intersticial cerebral, que es presenten a la taula 4. Un requisit per què la microdiàlisi sigui útil és que els marcadors analitzats reflecteixin de forma fiable les alteracions metabòliques que els processos patològics cerebrals indueixen. El 2002 un grup d'experts en microdiàlisi cerebral es va reunir a l'Institut Karolinska d'Estocolm, per establir una sèrie de recomanacions sobre l'aplicació clínica de la microdiàlisi en els pacients neurocrítics (Bellander et al., 2004).

Marcadors de lesió secundària cerebral al líquid intersticial cerebral (Hillered, 1999)	
Isquèmia	Glucosa, lactat, piruvat, cocient lactat/piruvat, cocient lactat/glucosa, pH, potassi, adenosina, inosina, hipoxantina
Excitotoxicitat	Glutamat, aspartat
Alliberació de transmissors	GABA, taurina, catecolamines
Radicals d'O₂	Hipoxantina, xantina, àcid úric, productes d'oxidació de l'àcid úric, ascorbat, glutatión
Degradació membrana	Glicerol

Taula 4. Llistat de diferents marcadors de lesió cerebral secundària al líquid intersticial cerebral.

2.1.4.1. Microdiàlisi “d’alta resolució”

La limitació més important de la microdiàlisi tradicional, és el no poder recuperar proteïnes amb un tamany superior al tamany del porus de la membrana dialitzant (20kDa). Així, pràcticament tots els estudis en humans que s’han realitzat han estudiat de forma quasi exclusiva els perfils metabòlics amb analits de baix PM (glucosa, lactat, piruvat, etc) i, en casos aïllats, la recuperació de proteïnes de baix PM. Tanmateix, la majoria de proteïnes que intervenen a la cascada inflamatòria queden excloses del seu estudi per les membranes de 20kDa. Alguns investigadors han intentat defugir aquesta limitació mitjançant sistemes que utilitzen membranes de fins a 3000kDa. Amb aquestes tècniques han recuperat IL-1 i IL-6 en concentracions suficients per ser quantificades (Winter et al., 2002). Fassbender, va observar un ràpid increment de IL-1 β (Fassbender et al., 2000) utilitzant catèters de microdiàlisi, en un model experimental de TCE en rates. El problema fonamental d’aquest tipus de catèters és que el seu disseny i fiabilitat no estan validats i no poden aplicar-se a la clínica.

Recentment, aquesta limitació ha desaparegut amb la disponibilitat de membranes de tamany de porus de 100kDa, amb característiques idèntiques als catèters de 20kDa i autoritzades per la seva utilització clínica per la Comunitat Europea. Les noves membranes de 100kDa han expandit el potencial per estudiar el proteoma de l’espai intersticial cerebral normal i el del pacient amb una lesió cerebral traumàtica. Aquest tipus de microdiàlisi “d’alta resolució” ha canviat les possibilitats de la investigació traslacional en neurociències, i permet ja actualment estudiar tots els mediadors implicats en la resposta inflamatòria dels pacients amb un TCE.

2.2. Monitoratge de la PtiO₂

2.2.1. Aspectes tècnics

La PtiO₂ és una mesura de la tensió d’O₂ disolt a l’espai extracel·lular, i reflecteix el balanç entre l’aport i la demanda tissular d’O₂. En un teixit

metabòlicament actiu existeix un gradient de concentració d'O₂ desde el capil·lar arterial al venós fins la cèl·lula, que és el resultat de l'extracció d'O₂ pel teixit. Encara que el registre continu de la PtiO₂ és una tècnica de monitoratge local, els valors obtinguts poden reflectir un estat d'oxigenació global si el catèter es localitza en una zona de cervell no lesionada. D'altra banda, existeixen controvèrsies sobre si el catèter s'hauria de situar a la zona de penombra del teixit lesionat o en teixit cerebral sa (Haitsma and Maas, 2002).

Per medir la PtiO₂ actualment només existeix un model al mercat, el sistema Licox® (Integra Neurocare, Plainsboro, New Jersey, USA). El sistema Licox® permet medir localment la PtiO₂ i la temperatura cerebral, indicant així l'estat d'oxigenació del teixit cerebral on està situat el sensor. La PtiO₂ es medeix a través del Revoxode, una microcèl·lula que registra el valor absolut de la PtiO₂ continuament. Les dades operacionals del Revoxode™ s'emmagatzemen en una targeta amb una banda magnètica que es subministra amb cada sensor. Quan s'introdueix aquesta targeta al monitor Licox®, el sistema es calibra automàticament.

El sistema Revoxode™ consta d'un electrode modificat de tipus Clark, amb un diàmetre de 0.6mm i un àrea de sensibilitat a la pressió d'O₂, localitzada a la punta, que medeix 4,5mm de longitud i té un àrea de mostreig de 13 mm² (Gelabert-Gonzalez and Villa, 2003; Valadka et al., 2003), com es pot observar a la figura 8. Com en qualsevol electrode polarogràfic del tipus Clark, l'O₂ difon desde el teixit a través de la paret de polietilè del tub del catèter fins la càmera interna del sensor, que conté una solució electrolítica amb un pH de 7,4, en la que estan immersos un càtode d'or i un ànode de plata. A la figura 8 es troba l'esquema del Revoxode™ amb tots els seus components.

En aquesta càmera electrolítica, l'O₂ es transforma al càtode en ions OH⁻, segons la reacció següent: $O_2 + 2H_2O + 4e^- \rightarrow 4OH^-$

La reducció de l'O₂ genera una corrent elèctrica que es transmet al monitor, que és proporcional a la pressió parcial d'O₂, i on el valor de PtiO₂ apareix digitalment i expressat en mmHg.

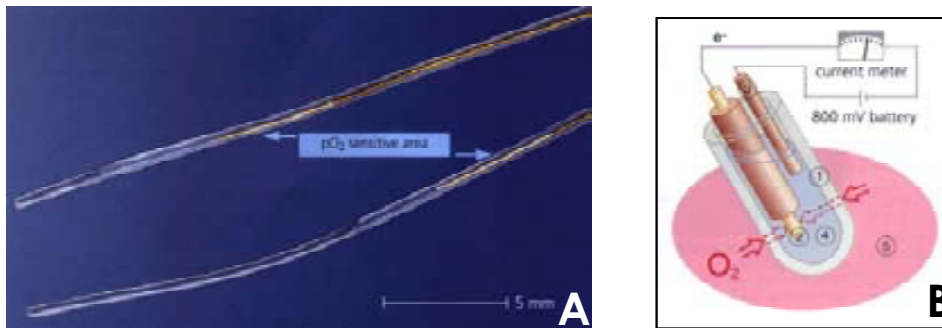


Figura 8. Àrea sensible del sensor de PtiO₂ i esquema del Revoxode. A: Àrea sensible del sensor de PtiO₂ (Licox CMP, 2004); B: Esquema del Revoxode: 1) membrana de polietilè; 2) càtode d'or; 3) ànode de plata; 4) solució electrolítica; 5) espai extracel·lular.

2.2.2. Fiabilitat, seguretat i estabilitat dels sensors de PtiO₂

La implantació local influeix en els valors mitjos de la PtiO₂. Es considera que el sensor triga aproximadament de 30 a 45 minuts en establir-se, moment a partir del qual les lectures són estables i representatives del teixit (Hoffman et al., 1996; Valadka et al., 2003; van Santbrink et al., 1996).

És recomanable que la localització del catèter es comprovi amb un TC cerebral per detectar possibles hemorràgies, que podrien interferir en els valors de PtiO₂. També es pot testar la resposta del sensor a increments de la FiO₂ (Haitsma and Maas, 2002), per comprovar el funcionament correcte del sensor. A més, també és recomanable calibrar el sensor quan es retira del pacient, per determinar possibles desviacions del mateix, si es tenen sospites de mal funcionament.

Quan es retira de forma progressiva un catèter de PtiO₂ i es realitzen determinacions de la PtiO₂ a diferents nivells anatòmics, s'observa habitualment un increment progressiu en les xifres de PtiO₂ desde la substància blanca fins al còrtex cerebral. Això és degut a que l'activitat metabòlica i el fluxe cerebral cortical són majors a la substància gris que a la blanca (Dings et al., 1998).

Les possibles complicacions del monitoratge de la PtiO₂ són la producció d'un hematoma intraparenquimatós derivat de la punció cerebral, la infecció i la ruptura del catèter, tot i que totes elles es presenten en un percentatge molt baix. La fiabilitat, seguretat i estabilitat del sensor de PtiO₂ tipus Licox s'ha estudiat extensament tant a la clínica com al laboratori. A l'any 2000, van den Brink i col. (van den Brink et al., 2000) van descriure en 101 pacients una desviació del zero de $0,42 \pm 0,85$ mmHg i un percentatge de desviació respecte als valors atmosfèrics de $0 \pm 6\%$. No es van observar complicacions clínicament rellevants. Dings i col. (Dings et al., 1998), en un estudi anterior realitzat al 1998 amb 101 pacients i 118 sensors de PtiO₂ tipus Licox, van descriure petits hematomes iatrogènics en dos pacients (1,7%), cap cas d'infecció, una desviació del zero de $0,4 \pm 1,3$ mmHg i un percentatge de desviació de $6,9 \pm 13,2\%$ respecte a la PO₂ atmosfèrica. Tanmateix, pels últims 34 sensors de l'estudi la mitja de desviació va ser de $1,1 \pm 0,9$ mmHg.

2.2.3. Valors de normalitat

Alguns estudis han determinat els valors normals de la PtiO₂, tot i que no es tenen estudis vàlids en humans sobre els valors de normalitat ni al còrtex ni a la substància blanca (Gelabert-Gonzalez and Villa, 2003). A la clínica s'accepten com a xifres normals de substància blanca els valors compresos entre 15 i 30 mmHg, tot i que alguns autors consideren que el límit superior hauria de ser més elevat. A la taula 5 es mostren els diferents treballs realitzats per obtenir els valors de normalitat, i els detectats en una situació patològica.

Leniger-Follert i col. (Leniger-Follert et al., 1975) van estudiar la pressió arterial d'oxigen (PaO₂) cerebral en gats variant les pressions d'O₂ i utilitzant diferents electrodes de superfície o de profunditat. En condicions de normoxia l'oxigenació cerebral tissular presentava uns valors de 30 a 45mmHg i existia una reducció uniforme en la PaO₂ cerebral en situacions de reducció d'aport d'O₂. D'altra banda, en situacions d'increment d'administració d'O₂ la PaO₂ cerebral es mantenia constant o fins i tot disminuïa lleugerament en algunes zones del cervell, mentre que en altres existia un increment proporcional a l'increment d'O₂. Maas i col. (Maas et al., 1993), amb el sistema Licox, van

obtenir valors de 28-29 mmHg en el lòbul frontal de gossos. Meixensberger i col. (Meixensberger et al., 1993), també amb el mateix sistema, en 26 cirurgies programades, la majoria d'elles per tumors cerebrals, van obtenir xifres mitjes de 47,9 mmHg al còrtex cerebral. Zauner i col. (Zauner et al., 1995) van estudiar els valors de la PtiO₂ cerebral en set gats normals i van obtenir xifres de 42±9 mmHg, mentre que en sis gats sotmesos a una oclusió de l'artèria cerebral mitja esquerra amb la finalitat de provocar una isquèmia cerebral focal, van obtenir valors de 19±6 mmHg. Hoffman i col. (Hoffman et al., 1996), amb el sistema Neurotrend™, obsolet actualment, van obtenir valors mitjos de 37 mmHg en pacients sense afectació de la circulació cerebral. Van Santbrink i col. (van Santbrink et al., 1996) van reportar els valors de PtiO₂ trobats en 22 pacients amb un TCE, utilitzant el sistema Licox. Aquests autors van trobar valors per sota de 20 mmHg en diverses situacions dins de les primeres 24 hores després del traumatisme. Així mateix, els pacients que presentaven valors de PtiO₂ inferiors a 5 mmHg presentaven un mal pronòstic. Zauner i col. (Zauner et al., 1997) van utilitzar el sistema Paratrend, també obsolet actualment, que permetia mesurar simultàniament la pressió del diòxid de carboni (PCO₂), el pH i la PtiO₂ cerebral, i van observar que els pacients amb PtiO₂ inferiors a 15 mmHg eren exitus en les següents 36 hores.

	Espècie animal	Tipus d'estudi	Valors normals (mmHg)	Situació patològica (mmHg)
Leniger-Follert i col. (Leniger-Follert et al., 1975)	Gats	Isquèmia focal	41 ± 14	17 ± 07
Maas i col. (Maas et al., 1993)	Gossos	Descens de PPC	28 ± 07	7 ± 2
Meixensberger i col. (Meixensberger et al., 1993)	Humans	Tumors cerebrals	48 ± 13	34 ± 20
Zauner i col. (Zauner et al., 1995)	Gats	Isquèmia focal	42 ± 09	19 ± 6
Hoffman i col. (Hoffman et al., 1996)	Humans	Isquèmia	37 ± 12	10 ± 5
Van Santbrink i col. (van Santbrink et al., 1996)	Humans	TCEG	30 ± 13	≤ 5
Zauner i col. (Zauner et al., 1997)	Humans	TCEG	36 ± 06	18 ± 8

Taula 5. Valors normals i patològics de la PtiO₂ en diferents estudis en models experimentals animals i en humans.

2.2.4. Factors que afecten els valors de PtiO₂

Existeixen diferents factors que influeixen en els valors de la PtiO₂:

- ❖ **Pressió de perfusió cerebral (PPC).** Després d'un TCE existeixen períodes de reducció de la PPC. Els descensos en la tensió arterial mitja i/o els augments de la PIC provoquen un descens en els valors de la PtiO₂. Aquest fet, s'ha observat en pacients amb un TCE greu amb increments de la PIC. Els límits de PPC que condicionen una caiguda de la PtiO₂ oscil·len entre 60 i 70 mmHg (Kety and Schmidt, 1948).
- ❖ **Hipòxia.** La hipòxia es defineix com una reducció del nivell de PtiO₂, que és insuficient per mantenir la funció i el metabolisme cel·lular. La causa més freqüent de la caiguda de la PtiO₂ és la hipòxia arterial (hipoxèmia). Diversos estudis han demostrat que els episodis de hipoxèmia contribueixen a reduccions en els valors de la PtiO₂ (Kiening et al., 1996; van Santbrink et al., 1996).
- ❖ **Hiperòxia.** La hiperòxia augmenta els valors mesurats de PtiO₂ en els pacients amb lesions cerebrals.
- ❖ **Hipocàpnia.** La hiperventilació intensa que s'utilitza en algunes situacions pel tractament de la hipertensió intracranial, en pacients amb un TCE greu, indueix la caiguda sistemàtica dels valors de PtiO₂. Gupta i col. (Gupta et al., 2002) van observar que la hipocàpnia provocava una reducció en la PtiO₂ en 16 dels 19 pacients. Aquestes troballes recolzen la idea que la hiperventilació indueix una reducció considerable de l'oxigenació cerebral i que pot ser nociva en els TCE (Zauner et al., 1997).
- ❖ **FSC.** Existeixen controvèrsies respecte a la relació entre el FSC i la PtiO₂. Menzel i col. (Menzel et al., 1999b) van estudiar la PtiO₂ en 40 pacients amb TCE greu en els que determinaven el FSC amb xenó estable i els mantenien amb una FiO₂ del 35%. El fluxe regional el determinaven en

una àrea de 20-30mm² al voltant de la punta del sensor. Les xifres de FSC per sota de 18ml/100g/min es correlacionaven bé amb els valors de PtiO₂ per sota de 26 mmHg. Contràriament, Gupta i col. (Gupta et al., 2002) no van trobar una correlació significativa entre el FSC i els valors de PtiO₂, possiblement degut al monitoratge d'un compartiment tissular diferent pel sensor de PtiO₂, que en aquest cas va ser del tipus Neurotrend.

- ❖ **Àrea de medicació.** Els factors que influeixen en la zona de captació del sensor inclouen la densitat local de la xarxa capil·lar, el seu diàmetre i la distribució espacial de la microcirculació local. L'oxigenació tissular és el resultat de la difusió de l'O₂ desde el capil·lar al mitocondri. En presència d'un *shunt* anatòmic o funcional cap a les vècules per diferents mecanismes (Ince and Sinaasappel, 1999), existeix una contribució addicional d'O₂ a partir de la difusió desde vècules. Així, els valors de PtiO₂ estan influïts pel diàmetre vascular i pel grau de *shunt* funcional o anatòmic existent. A més, els valors obtinguts poden estar influïts per la diferent contribució de la substància gris i la blanca en la zona de captació del sensor i per la proximitat de la zona del teixit lesionat (contundit o infartat), a més de la possibilitat de microhemorràgies al voltant de la punta del sensor (Dings et al., 1998; van den Brink et al., 2000).

2.2.5. Principis d'alliberació d'O₂ al teixit cerebral

El transport d'O₂ al teixit cerebral depèn del sistema circulatori, respiratori, i de factors vasculars locals. L'O₂ es transporta desde l'atmosfera al alvèol, de l'alvèol a la sang, de la sang als teixits perifèrics i finalment fins el mitocondri. L'O₂ es transporta majoritàriament associat a l'Hb, per la qual cosa la capacitat de transport de l'O₂ depèn en gran mesura de la concentració d'Hb, mentre que la quantitat d'O₂ dissolt és mínima i en condicions normals inferior al 0,3% (0.0031*PaO₂). En condicions normals es transporta 65 cops més O₂ associat a l'Hb que dissolt al plasma. L'O₂ s'allibera al teixit d'acord amb l'estat de l'Hb en la corva de dissociació. La forma d'aquesta corva és única

en el sentit que afavoreix la unió de l'O₂ a l'Hb als pulmons i l'alliberació del mateix a la perifèria (Alves et al., 2004). En la microcirculació, la difusió d'O₂ depèn fonamentalment del gradient de pressió existent entre els capil·lars, el teixit i el mitocondri. A més, la difusió és inversament proporcional a la distància de difusió (primera llei de Fick de la difusió). El mitocondri necessita una pressió d'O₂ intracel·lular de només 0,5-1,5mmHg pel seu metabolisme oxidatiu.

L'alliberació d'O₂ al teixit cerebral és també dependent de la regulació del FSC. Per mantenir una adequada oxigenació cerebral, el cervell regula el FSC a uns nivells relativament constants per un rang de pressions arterials bastant ampli (de 60 a 150mmHg), un procés conegut com autorregulació cerebral. De la mateixa forma, el cervell regula el FSC per mantenir la demanda metabòlica del teixit en el procés conegut com regulació metabòlica.

L'oxigenació tissular es pot potenciar augmentant el FSC o la capacitat de transport d'O₂ de la sang, que es pot aconseguir incrementant l'O₂ dissolt o augmentant l'alliberació d'O₂ desde l'Hb, com la taula 6 explica.

Modalitats per millorar l'oxigenació cerebral
<i>Increment del FSC</i>
<ul style="list-style-type: none">• Teràpia del control de la PPC• Vasodilatadors cerebrals• Reducció de la PIC
<i>Increment del transport i alliberació d'O₂</i>
<ul style="list-style-type: none">• O₂ hiperbàric (1- 3 atmosferes)• FiO₂ al 100% (hiperòxia normobàrica)• Increment de l'O₂ dissolt (perfluorocarbons)• Modificadors alostèrics de l'hemoglobina (SRS-13)

Taula 6. Estratègies per millorar l'oxigenació cerebral.

2.2.6. Aplicacions clíniques del monitoratge de la PtiO₂

La hipòxia tissular cerebral d'origen isquèmic o no isquèmic és una de les causes més importants de lesió secundària en pacients amb alteracions cerebrals agudes, com en el cas del TCE i de l'hemorràgia subaracnoidea (HSA). La hipòxia isquèmica és el resultat de mecanismes fisiopatològics cerebrals i de complicacions sistèmiques com l'hipotensió, la hipòxia i l'anèmia (Haitsma and Maas, 2002). La medicació de la PtiO₂ permet el monitoratge continu de l'oxigenació cerebral i la ràpida detecció de la hipòxia tissular isquèmica o no isquèmica. La isquèmia és una troballa quasi constant en els pacients que moren per un TCE (Graham and Adams, 1971). Per aquest motiu l'objectiu principal en el tractament d'aquests pacients consisteix en proporcionar al cervell una quantitat d'O₂ suficient i en consonància amb les demandes de les cèl·lules cerebrals (Sahuquillo et al., 2002a). És també una tècnica molt útil per monitoritzar el nivell d'oxigenació en cirurgies de malformacions arteriovenoses i aneurismes cerebrals (Arikan et al., 2008; Ibañez et al., 2003).

Existeixen numerosos estudis a la literatura que correlacionen els valors obtinguts de la PtiO₂ amb el resultat clínic dels pacients (Doppenberg et al., 1998; Menzel et al., 1999b; Valadka et al., 1998; van den Brink et al., 2000; van Santbrink et al., 1996; Zauner et al., 1997; Zauner et al., 1998), permetent determinar el llindar de isquèmia. El llindar de isquèmia també es pot determinar correlacionant els valors de PtiO₂ amb els valors llindars coneguts de FSC (Doppenberg et al., 1998; Menzel et al., 1999b), així com relacionant els valors de PtiO₂ amb els llindars de SjO₂ (Kiening et al., 1996).

Els llindars de hipòxia en funció dels valors de la PtiO₂ encara no s'han establert d'una forma consistent. En general, s'accepten tres situacions de hipòxia tissular cerebral en funció dels valors de PtiO₂ obtinguts. Van den Brink i col. (van den Brink et al., 2000) van classificar la hipòxia tissular cerebral com a severa (PtiO₂ menor de 5 mmHg), moderada (PtiO₂ de 5 a 10 mmHg) i lleu (PtiO₂ de 10 a 15 mmHg). També van trobar que una PtiO₂ inferior o igual a 5 mmHg dins de les primeres 24 hores després del TCE es correlacionava de

forma sistemàtica amb un mal pronòstic. Els mateixos autors, en un altre estudi, van trobar dos tipus de patrons de canvi de la PtiO₂ en funció del temps (van Santbrink et al., 1996). El primer patró es caracteritzava per uns valors estables i normals en les primeres 24 hores després del TCE, i el segon per uns valors lleugerament elevats durant el segon i el tercer dia.

2.2.6.1. PtiO₂ i SjO₂

Per la determinació de isquèmia en pacients amb un TCE greu es poden utilitzar dos tipus de monitoratge, l'oximetria jugular i la PtiO₂. Ambdues tècniques no sempre es troben correlacionades però aporten informació diferent i complementària, i per tant haurien d'utilitzar-se de forma simultània per detectar les complicacions secundàries i prevenir el dany cerebral afegit (Haitzma and Maas, 2002). Gupta i col. (Gupta et al., 1999) van trobar una bona correlació entre la SjO₂ i la PtiO₂ en zones sense una patologia focal, mentre que en àrees amb una patologia focal no trobaren aquesta correlació. D'altra banda, Kiening i col. (Kiening et al., 1996) van observar una bona correlació entre els valors de PtiO₂ i de SjO₂ en pacients que presentaven descensos pronunciats de la PPC.

L'oximetria del bulb de la jugular permet monitoritzar l'oxigenació cerebral global, mentre que la PtiO₂ monitoritza l'oxigenació en una zona concreta i limitada del cervell. Les complicacions multifocals o difuses són fàcilment detectables mitjançant mesures de tipus global, però els canvis a la penombra de les lesions focals poden passar desapercebutos. A més, si una zona significativa del cervell està infartada i no existeix drenatge sanguini desde la zona, la saturació d'O₂ al bulb de la jugular no disminuirà. Valors de saturació de SjO₂ baixos són indicatius d'una extracció d'O₂ major i per tant de isquèmia.

La interpretació dels valors relatius de la SjO₂ i de la PtiO₂ requereix una comprensió àmplia dels possibles mecanismes de hipòxia tissular (Haitzma and Maas, 2002). Siggaard-Andersen i col. (Siggaard-Andersen et al., 1995) van descriure 9 classes de hipòxia, que es troben a la taula 7, en funció de la seva

causa. Aquesta classificació pot ser útil per entendre els resultats contradictoris obtinguts a partir d'aquests dos sistemes de monitoratge. A la taula 7 es pot observar que amb el monitoratge exclusiu de la SjO_2 no es poden explicar tots els tipus de hipòxia, ja que els valors esperats en l'extracció arteriovenosa d' O_2 no sempre són els mateixos. Sahuquillo i col. (Sahuquillo et al., 2002a) van analitzar diferents episodis de hipòxia regional cerebral monitoritzant la $PtiO_2$, on la fracció d'extracció arteriovenosa d' O_2 suggeria un cervell correctament perfós o fins i tot hiperèmic. En aquest estudi es va utilitzar la classificació de hipòxia proposada per Siggaard-Andersen del 1995 (Siggaard-Andersen et al., 1995), per classificar els diferents episodis en un tipus concret de hipòxia.

TIPUS DE HIPÒXIA	CAUSA	CANVI ESPERAT EN L'EXTRACCIÓ D' O_2 ARTERIOVENÓS
Hipòxia isquèmica	Descens en el fluxe	Augment
Hipòxia per baixa extractivitat	- PaO_2 arterial baixa (<i>hipòxia hipoxèmica</i>) - Concentració d'hemoglobina (Hb) baixa (<i>hipòxia anèmica</i>) - $p50$ baixa (<i>hipòxia per elevada afinitat</i>)	Sense canvis
Hipòxia per "shunt"	"Shunt" arteriovenós	Descens
Hipòxia per disperfusió	Longitud mitja de difusió major desde els eritròcits al mitocondri, provocada per l'edema intersticial o cel·lular	Descens
Hipòxia histotòxica	Agents tòxics	Descens
Hipòxia per desacoblament	- Agents que interfereixen amb la síntesi d'ATP - Disfunció mitocondrial	Sense canvis
Hipòxia hipermetabòlica	Demanda metabòlica incrementada	Augment

Taula 7. Classificació de la hipòxia segons la causa, d'acord amb la classificació de Siggaard-Andersen (Siggaard-Andersen et al., 1995).

2.2.6.2. Hiperòxia normobàrica

Una altra aplicació del monitoratge de la $PtiO_2$ és avaluar els efectes de la hiperòxia normobàrica en l'oxigenació cerebral i el metabolisme en combinació amb la microdiàlisi cerebral.

Existeixen dos tipus de hiperòxia, la hiperbàrica i la normobàrica, que serà la que es descriurà més detalladament en ser l'utilitzada en un dels treballs de la tesi. La hiperòxia hiperbàrica consisteix en l'administració d'O₂ a una pressió major que la pressió atmosfèrica a nivell del mar (1atm), per aconseguir un increment en la PaO₂ en sang i als teixits (Rockswold et al., 1992; Rockswold et al., 2001; Sukoff, 2001).

Existeixen pocs estudis que mesurin els efectes de la hiperòxia normobàrica en el TCE. Les raons teòriques per les quals es podria aplicar aquesta maniobra es recolzen en el fet que després del TCE l'alliberació d'O₂ es troba disminuïda, així com el gradient de pressió d'O₂, la demanda metabòlica augmenta, existeixen àrees de perfusió isquèmiques o fins i tot amb fluxe zero, l'edema cerebral obstaculitza la difusió d'O₂ i la hipòxia tissular cerebral es correlaciona amb un mal resultat. Així, amb l'aplicació de la hiperòxia normobàrica podríem incrementar l'oxigenació cerebral i de forma secundària millorar el metabolisme cerebral aeròbic.

En el TCE, el fluxe d'O₂ desde els capil·lars a la cèl·lula i posteriorment al mitocondri pot veure's afectat per alteracions en la difusió, com l'augment de la distància de difusió per edema i per *shunts* funcionals o anatòmics arteriovenosos. La distància de difusió de les mol·lècules d'O₂ desde els capil·lars a les cèl·lules és d'aproximadament 60 µm, però aquesta distància és major després del TCE degut a l'edema cerebral intra i extracel·lular, causat per la lesió tissular. És per això, que en aquests casos pugui ser necessari obtenir unes pressions d'O₂ majors per, augmentant el gradient, proporcionar un correcte aport d'O₂ al cervell. Una hipòtesi introduïda en els darrers anys és que amb l'edema cerebral, si s'incrementen les tensions d'O₂ fins uns valors superiors als requerits per saturar l'Hb arterial, es podria obtenir un gradient de pressions òptim per millorar l'oxigenació mitocondrial (Alves et al., 2004). Un cop l'Hb està completament saturada, increments majors en la PaO₂ només augmenten l'O₂ dissolt en el plasma, però no el contingut total arterial d'O₂.

Diversos investigadors en l'àmbit clínic i experimental han detectat un increment en la PtiO₂ cerebral després de l'augment de la FiO₂ al 100% (Longhi

et al., 2002; Magnoni et al., 2003; Menzel et al., 1999b; Menzel et al., 1999a; Reinert et al., 2003; Rossi et al., 2001). Sembla raonable pensar que l'increment de P_{tiO_2} no és degut a la proximitat anatòmica del sensor a un capil·lar, on la P_{aO_2} és major, ja que l'increment de P_{tiO_2} s'observa en la majoria dels pacients sotmesos a una F_{iO_2} del 100%. De totes formes, existeix una elevada variabilitat interindividual en els valors obtinguts de P_{tiO_2} després de l'inducció de la hiperòxia, que s'explica pels canvis de patrons del FSC, pel tipus de lesió i per la magnitud de l'edema cerebral (Alves et al., 2004). Longhi i col. (Longhi et al., 2002) van trobar que els pacients amb nivells basals baixos de P_{tiO_2} ($19,7 \pm 13,1$ mmHg) presentaven un increment 10 cops inferior de P_{tiO_2} que el subgrup de pacients amb nivells de P_{tiO_2} basals superiors ($31,7 \pm 14,3$ mmHg). Per aquests autors, aquests resultats s'explicaven per un increment en la distància de difusió i en la reducció de la densitat capil·lar en les lesions focals. Menzel i col. (Menzel et al., 1999a) també van confirmar que el rang de la resposta de la P_{tiO_2} a la hiperòxia no era uniforme. Curiosament, els pacients que presentaven una reactivitat de P_{tiO_2} major (percentatge de canvi en la P_{tiO_2} dividit pel canvi en la P_{aO_2}) presentaven un pitjor resultat. Rossi i col. (Rossi et al., 2001) van investigar els efectes de la hiperòxia en nivells de FSC normals o reduïts en porcs, utilitzant un model de infusió salina intraventricular per augmentar la PIC, que no replica necessàriament la fisiopatologia del TCE en humans. L'increment en la P_{tiO_2} era menor quan la hiperòxia s'aplicava durant la isquèmia progressiva, el que podria indicar que els efectes beneficiosos de la hiperòxia són depenents del FSC.

Alguns autors proposen que la hiperòxia protegeix dels efectes deleteris de la hiperventilació. Thiagarajan i col. (Thiagarajan et al., 1998) van trobar que la hiperòxia provocava un increment en els valors de $AVDO_2$ de pacients sotmesos a hiperventilació. L'increment de la O_2 per sobre dels valors normals compensava, aparentment, els efectes deleteris de la hiperventilació reflectits en la SjO_2 i la $AVDO_2$.

Menzel i col. (Menzel et al., 1999b; Menzel et al., 1999a) van reportar que la hiperòxia arterial induïda disminuïa el lactat cerebral en un 40%, considerant que aquest descens indicava una millora en el metabolisme aeròbic. La crítica a aquest descens seria que el lactat per si mateix no és un indicador suficient

per valorar el metabolisme oxidatiu, ja que pot ser també utilitzat per les neurones en determinades situacions per produir energia aeròbicament (Chih and Roberts Jr, 2003; Pellerin and Magistretti, 2003; Schurr et al., 1997b; Schurr and Rigor, 1998; Tsacopoulos and Magistretti, 1996). Magnoni i col. (Magnoni et al., 2003) també van confirmar la reducció extracel·lular del lactat cerebral però en una proporció menor (10% respecte el basal) després de la hiperòxia. Aquests últims autors van observar una disminució en els nivells de piruvat, amb la qual cosa el cocient L/P roman constant. Malgrat això, aquesta tendència no era uniforme. En 3 dels 18 tests el cocient L/P va disminuir i en els altres 4 tests, el percentatge de descens del lactat era superior que el percentatge de descens del piruvat. També van detectar que la $AVDO_2$ es reduïa un 4% durant el procés hiperòxic, però no de forma estadísticament significativa. L'explicació que van donar els autors per aquesta observació va ser que existia un descens significatiu del $CMRO_2$, donat que la hiperòxia s'associa amb un descens del FSC ($AVDO_2 = CMRO_2/FSC$). A partir d'aquestes troballes van concloure que la hiperòxia no millorava el metabolisme oxidatiu. Reinert i col. (Reinert et al., 2003) van trobar també que el lactat cerebral disminuïa després del tractament hiperòxic. Reinert i col. (Reinert et al., 2004) en un estudi recent en rates sotmeses a un TCE van trobar que els nivells de glucosa augmentaven significativament i el lactat cerebral disminuïa, després de la hiperòxia normobàrica.

Resposta cerebral a la hiperòxia

Diversos autors han estudiat els efectes cerebrovasculars de la hiperòxia observant una disminució en el FSC. Johnston i col. (Johnston et al., 2003) van detectar una reducció del FSC del 9% al 27%. Menzel i col. (Menzel et al., 1999b) van estudiar la vasoreactivitat cerebral d' O_2 en 6 pacients amb un TCE greu, utilitzant el TC amb xenó estable. Aquests autors van observar una reducció mitja del FSC del 19% en regions de interès corresponents a teixit aparentment normal. El grau de la resposta va ser proporcional al valor regional basal del FSC. Aquesta reducció del 19% del FSC és major que la detectada en condicions fisiològiques normals i per tant es podria suggerir que el TCE per si mateix amplifica l'efecte vasoconstrictor de la hiperòxia (Alves et

al., 2004). A més, van demostrar també que el percentatge de descens del FSC amb una FiO_2 del 60% es correlacionava significativament i inversament amb els nivells basals de FSC. Tot i que la hiperòxia i la hipoxèmia s'associen amb un descens i un augment del FSC respectivament, el $CMRO_2$ es manté constant.

La hiperòxia s'acompanya d'un augment en els valors de la SjO_2 (McLeod et al., 2003) i d'un descens en les $AVDO_2$ (Magnoni et al., 2003), suggerint que el cocient entre la demanda d' O_2 i l'aport es decanten cap a un consum metabòlic d' O_2 menor o una millor alliberació d' O_2 . De totes formes, en un model experimental animal de isquèmia cerebral global en porcs, quan el FSC es reduïa el 30%, el valor de $AVDO_2$ no canviava per la hiperòxia. D'aquests resultats es podia deduir que l'increment de PaO_2 no sempre influeix en l'aport d' O_2 al cervell (Rossi et al., 2001).

En pacients amb lesions cerebrals s'ha trobat que la $PtiO_2$ té una relació lineal amb la PaO_2 i després de la hiperòxia augmenten els seus valors. Els nivells basals de $PtiO_2$ i la resposta a la hiperòxia són majors quan el sensor de $PtiO_2$ es col·loca en un teixit aparentment sa visualitzat en el TC que quan es col·loca al voltant d'una contusió cerebral. Aquests descobriments suggereixen que la difusió d' O_2 desde els vasos al teixit es redueix, com a resultat de certs canvis patològics com l'edema cerebral o *shunts* arteriovenosos (Longhi et al., 2002).

Els riscos potencials de la hiperòxia en el TCE comprenen la toxicitat pulmonar i l'augment en la producció de radicals lliures. Els pulmons, la retina, la còrnia i el sistema nerviós central són els òrgans més perjudicats per les exposicions perllongades de hiperòxia. Els canvis funcionals deguts a la toxicitat de l' O_2 en el pulmó comprenen el desacoblament entre la difusió i la flexibilitat pulmonar i petites alteracions als bronquiols. La toxicitat pulmonar en l'home es caracteritza inicialment per l'aparició d'edema pulmonar, seguit de fibrosi i hipertensió pulmonar. La quantitat requerida de hiperòxia per produir dany cel·lular i el temps d'aparició dels canvis varia d'unes espècies a unes altres, i entre diferents individus de la mateixa (Alves et al., 2004).

3. Neuroinflamació en el traumatisme cranioencefàlic

Les dades obtingudes d'estudis en models experimentals i clínics han demostrat de forma inequívoca que la resposta inflamatòria cerebral juga un paper predominant en la lesió secundària postraumàtica, facilitant l'alteració de la permeabilitat de la BHE, l'edema cerebral i secundàriament la tumefacció cerebral i l'augment de la PIC. L'alteració de la BHE permet el pas de substàncies neurotòxiques al SNC, el reclutament de polimorfonuclears i el pas de proteases que degraden la matriu extracel·lular, perpetuant el cicle inflamatori i incrementant la lesió cerebral (Morganti-Kossmann et al., 2001).

El SNC ha estat considerat tradicionalment un òrgan immunològicament privilegiat degut a l'estrict control que la BHE exerceix entre la sang perifèrica i el parènquima cerebral, protegint-lo per tant d'interaccions externes i de l'activitat de citocines proinflamatòries que tenen, en general, un elevat pes molecular. No obstant això, alguns estudis experimentals recents refuten aquest concepte demostrant que el SNC conté els mateixos mediadors de resposta inflamatòria innata que altres òrgans. Els astròcits, les cèl·lules microgials i les mateixes neurones són capaces d'expressar tots els mediadors tradicionalment involucrats en la resposta inflamatòria sistèmica: proteïnes activadores del complement, citocines i quimiocines (Morganti-Kossmann et al., 2002). Aquests mediadors alteren la permeabilitat de la BHE permetent un reclutament massiu de mediadors perifèrics i l'expressió dels receptors d'aquests mediadors (Barnum, 2002; Ransohoff, 2002).

Actualment s'accepta que existeix una resposta fisiològica immune al SNC i que es pot induir una resposta inflamatòria potent en el teixit lesionat. El concepte controvertit sobre el "rol dual" de la neuroinflamació s'ha anat utilitzant recentment. Segons estudis experimentals s'ha demostrat que els mediadors inflamatoris poden ser neurotòxics i neuroprotectors, depenent de la cinètica de la regulació i de l'expressió temporal després del traumatisme (Asensio and Campbell, 1999; Lenzlinger et al., 2001; Merrill and Benveniste, 1996).

3.1. Neuroinflamació en el TCE

En el TCE greu es desencadenen una sèrie de fenòmens neuroquímics inicials no inflamatoris entre els que destaquen l'alliberació massiva d'aminoàcids excitatoris. A més, la lesió mecànica i les complicacions intra o extracranials (hipoxia, hipotensió, anèmia, etc) provoquen una activació de la resposta inflamatòria sistèmica i de la pròpia del SNC. Les lesions primàries més freqüents (lesió axonal difusa i contusions cerebrals) generen una resposta inflamatòria enèrgica intrínseca que està condicionada per mediadors endògens. Aquesta cascada inflamatòria té com a principal diana la BHE, alterant-se la seva permeabilitat i facilitant així el reclutament de leucòcits de la sang perifèrica al teixit cerebral danyat. El reclutament de leucòcits procedents de la sang perifèrica i de mediadors plasmàtics proinflamatoris potencia i facilita el desenvolupament de lesions cerebrals secundàries i més específicament de l'edema cerebral. L'edema cerebral a la vegada, exacerba i perpetua la resposta inflamatòria cerebral mediada per substàncies neurotòxiques i proteases alliberades pels neutròfils.

En la resposta neuroinflamatòria postraumàtica poden distingir-se tres vies:

- 1) Activació del complement a través de les vies clàssiques o alternatives.
- 2) Activació de quimocitocines.
- 3) Activació de citocines proinflamatòries (Schmidt et al., 2005).

L'activació del sistema del complement és la primera resposta intrínseca induïda al SNC lesionat. Totes les cèl·lules del SNC, incloses les neurones, són capaces d'expressar els components primordials del complement (Schmidt et al., 2005). L'activació del complement altera la permeabilitat de la BHE i permet el reclutament precoç de neutròfils, monòcits i macròfags, que potencien els mecanismes neuroinflamatoris mitjançant l'alliberació de radicals lliures d'O₂, proteases i per l'inducció de citocines proinflamatòries com el factor de necrosi tumoral alfa (TNF- α), la interleucina (IL) IL-1 β i la IL-6 (Schmidt et al., 2005).

Les quimiocines són els majors inductors de reclutament leucocitari en l'àrea cerebral lesionada mecànicament. El pas de leucòcits a través de la BHE potencia l'alliberació de proteases que alteren encara més la seva permeabilitat perpetrant i magnificant la cascada inflamatòria induïda pel traumatisme. Tant les neurones com la glia són productores de quimiocines. No obstant, igual que en la resposta inflamatòria sistèmica, el paper més important en la neuroinflamació el tenen les citocines proinflamatòries. Els estudis experimentals i clínics més recents apunten com a candidats més rellevants al TNF- α i les interleucines IL-1, IL-6 i IL-18.

Tant el TNF- α com l'IL-1 β són capaces d'induir una potent resposta inflamatòria en el SNC, alterant la permeabilitat de la BHE i reclutant leucòcits de la sang circulant (Ramilo et al., 1990; Schmidt et al., 2005). El TNF- α es sobreexpressa ràpidament després del traumatisme tant en models experimentals com en el sèrum i en el LCR de pacients amb un TCE, on ja es troba elevat dins les primeres 24 hores, existint una relació directa entre els nivells de TNF- α i el resultat neurològic final (Ross et al., 1994). Les cèl·lules microgials s'activen ràpidament en la lesió axonal difusa alliberant predominantment IL-1 (Basu et al., 2004). Les cèl·lules microgials, a més, expressen caspasa-1, un enzim responsable d'activar al precursor de l'IL-1, sent aquestes cèl·lules la font més important d'IL-1 en el SNC (Basu et al., 2004).

Dins de la família de les IL-1 existeixen tres formes ben definides que han demostrat la seva potència proinflamatòria: IL-1 α , IL-1 β i la IL-18 (Patel et al., 2003). Tots els lligands i receptors de la família de les IL-1 estan presents a nivells molt baixos en l'encèfal normal. En models experimentals de lesió traumàtica del SNC, totes les variants d'IL-1 s'eleven durant les primeres hores després del traumatisme i actuen de forma sinèrgica amb el TNF- α , potenciant el seu efecte proinflamatori i afavorint l'expressió de metal·loproteïnases de matricu (MMPs) (Schmidt et al., 2005). Un altre membre de la família de l'IL-1, l'IL-18, ha demostrat ser un potent agent proinflamatori en models experimentals de lesió axonal traumàtica, ja que la proteïna mielínica bàsica (PMB) és un potent inductor d'aquesta citocina (Menge et al., 2001; Yatsiv et al., 2002). L'IL-18 es

troba elevada al LCR de pacients amb un TCE greu. L'IL-1 estimula a la vegada la producció microglial d'altres mediadors inflamatoris com el TNF- α , l'IL-6, la Cox-2, quimiocines, prostaglandines, radicals lliures i proteases (Basu et al., 2004). L'IL-1 però, no té *per se* propietats neurotòxiques, per tant la lesió cel·lular del SNC s'indueix per altres mol·lècules.

L'IL-6 juga un paper dual (proinflamatori i neuroprotector) en l'home, i és la citocina més estudiada en la resposta inflamatoria sistèmica desencadenada al xoc, la sepsi i el politraumatisme (Vila and Salaices, 2005). Quan es sobreexpressa al cervell, l'IL-6 passa al torrent sanguini gràcies a l'alteració en la permeabilitat de la BHE causada per la resposta neuroinflamatòria (Kossmann et al., 1995). Els nivells d'IL-6 es troben elevats en pacients amb un TCE greu, existint una bona correlació entre els nivells d'IL-6 i l'evolució clínica (Minambres et al., 2003).

Les metal·loproteïnases de matriu (MMPs) són enzims proteolítics responsables de remodelar la matriu extracel·lular. La presència de nivells elevats de MMPs s'associa a una destrucció del teixit neural. En estudis experimentals de TCE s'ha demostrat una molt bona relació entre el desenvolupament de lesions cerebrals secundàries i la sobreexpressió d'una subfamília de MMPs, les denominades gelatinases (MMP-2 i MMP-9), unes proteases que degraden tots els components de la membrana basal de l'endoteli cerebral i que s'explicaran detalladament en els següents apartats.

3.2. La matriu extracel·lular

Els teixits no estan formats únicament per cèl·lules, una part important del seu volum el constitueix l'espai extracel·lular, que està ocupat per una xarxa densa de macromol·lècules denominada matriu extracel·lular (MEC). En els teixits, la MEC presenta un important desenvolupament, envoltant completament les cèl·lules, i determinant les seves propietats físiques. La participació relativa de les diferents macromol·lècules de la matriu, així com els seus models d'organització a la MEC, donen lloc a una sorprenent diversitat de formes, altament adaptades als requeriments funcionals de cada tipus de teixit en particular.

La idea d'una MEC dinàmica és relativament nova. Un quart de segle abans es pensava que era inanimada, no reactiva i purament estructural, la funció principal de la qual era l'estabilització física dels teixits. Una sèrie de descobriments varen canviar aquesta visió (Piez, 1997), recalcant el fet que la MEC té un paper complex i actiu en la regulació del comportament de les cèl·lules que es troben en contacte directe amb ella, afectant el seu desenvolupament, la seva migració, la seva proliferació, la seva forma i les seves funcions metabòliques.

La MEC, que es troba esquematitzada a la figura 9, està formada per diferents tipus de mol·lècules, entre les que destaquen:

- **Polisacàrids** del tipus glucosaminglicans (principalment àcid hialurònic (Lo et al., 2002)), que normalment es troben units a proteïnes, formant els proteoglicans. Els proteoglicans són macromol·lècules d'elevat PM, molt abundants en determinats teixits esquelètics del nostre organisme i que es localitzen fonamentalment al cartílag de tipus hialí.
- **Proteïnes fibroses** que pertanyen a dos tipus funcionals:
 - ❖ Proteïnes amb funció estructural. En aquest grup trobem l'elastina i el col·làgen.
 - ❖ Proteïnes amb funció adhesiva. En aquest grup trobem la fibronectina i la laminina.

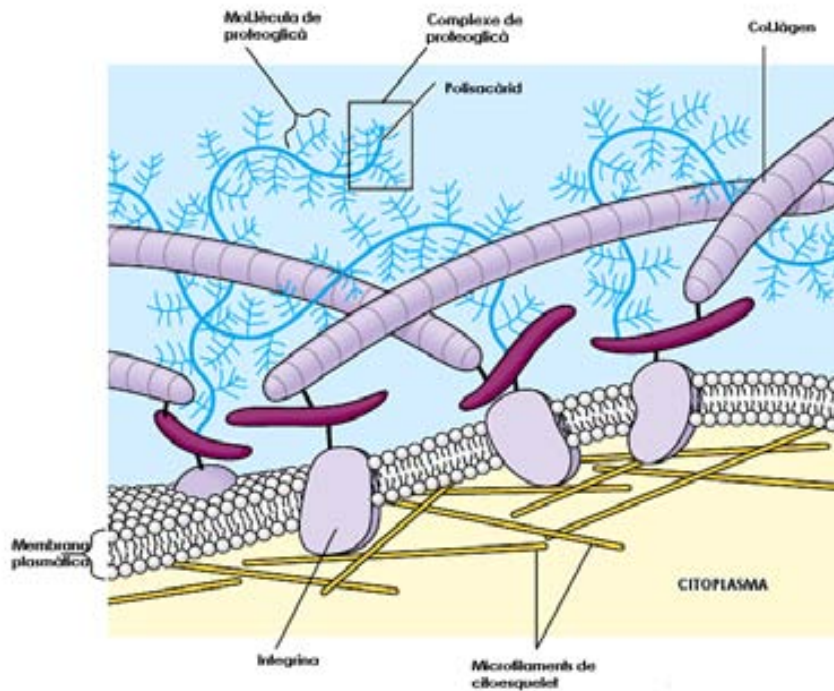


Figura 9. Esquema de la matriu extracel·lular amb els seus components.

Els glucosaminglicans i els proteoglicans formen el que es denomina "la substància fonamental" de la MEC, un component molt hidratat amb propietats de gel i en el que s'integren les proteïnes fibroses. La fase aquosa del gel permet la difusió de nutrients, metabolits i hormones entre la sang i les cèl·lules que formen els teixits (Alberts B et al., 1994). A part de la seva estructura funcional, la MEC també serveix com a reservori de factors que promouen la proliferació, la diferenciació i la migració cel·lular. Entre aquests factors els més versàtils són els activadors del plasminògen i les metal·loproteïnases de matriu, ja que degraden tots els components de la MEC, incloent els proteoglicans, la laminina i la fibronectina (Lo et al., 2002).

3.2.1. La matriu extracel·lular al sistema nerviós central

Fins fa poc temps, es considerava que la MEC era pràcticament inexistent en el SNC i poc abundant en el sistema nerviós perifèric. Per la seva localització, la MEC es relaciona directament amb els elements que constitueixen el sistema nerviós (neurones i cèl·lules gials) i estableix amb elles interaccions específiques, servint a més, de vehicle a nombroses mol·lècules

que difonen pels seus intersticis (Crespo, 2004). La MEC del SNC, a excepció dels contactes sinàptics, és molt semblant a la MEC de la resta de teixits del cos humà. No obstant això, l'encèfal disposa d'una estructura que l'aïlla i el protegeix de les influències sistèmiques, la BHE, en la que la MEC presenta unes característiques específiques.

3.3. La barrera hematoencefàlica (BHE)

A l'encèfal, la BHE exerceix un control estricte en l'intercanvi de substàncies entre el teixit nerviós i la sang. Una de les funcions principals d'aquesta estructura és la de protegir el SNC d'agents invasius com poden ser les cèl·lules inflamatòries sistèmiques, bacteris i agents químics (Romanic et al., 1998). La BHE està formada per les cèl·lules endotelials dels capil·lars sanguinis que arriben a l'encèfal, els peus dels astròcits, que envolten els capil·lars, i la MEC que uneix ambdós tipus de cèl·lules (Rubin and Staddon, 1999).

Les cèl·lules endotelials dels capil·lars cerebrals s'uneixen entre elles per unions de tipus estret: *tight junctions* (Romanic et al., 1998). Com a conseqüència d'aquestes unions, les membranes plasmàtiques de les cèl·lules endotelials estan molt poc fenestrades, a diferència d'altres endotelis com el pulmó i el fetge, i formen una barrera contínua que separa el compartiment hemàtic de l'interstici cerebral (Pardridge and Oldendorf, 1977), evitant d'aquesta manera l'entrada de quasi totes les mol·lècules provinents de la sang a excepció de les que són de petit tamany i altament lipofíliques. A la figura 10 es mostra l'estructura de la BHE.

(Jung et al., 2006; Mendes et al., 2005), l'ictus isquèmic (Montaner et al., 2003; Romanic et al., 1998) i la transformació hemorràgica cerebral (Abilleira et al., 2003; Montaner et al., 2003), entre d'altres.

En el moment actual, la família de les MMPs es considera formada per 18 membres que es divideixen en 4 subfamílies, segons la seva estructura i els substrats que degraden, com es mostra a la taula 8 (Yong et al., 1998).

GRUP	NOM	NOM MMP	SUBSTRAT PRINCIPAL
Col·lagenases	Col·lagenasa intersticial	MMP-1	Col·làgens fibril·lars
	Col·lagenasa del neutròfil	MMP-8	Col·làgens fibril·lars
	Col·lagenasa-3	MMP-13	Col·làgens fibril·lars
	Col·lagenasa-4	MMP-?	Desconegut
Gelatinases	Gelatinasa A	MMP-2	Gelatina, col·làgen tipus IV i V, fibronectina, laminina
	Gelatinasa B	MMP-9	Gelatina, col·làgen tipus IV y V, fibronectina, laminina
Estromelisines	Estromelisina-1	MMP-3	Laminina, col·làgens no fibril·lars, fibronectina
	Estromelisina-2	MMP-10	Laminina, col·làgens no fibril·lars, fibronectina
	Matrilisina	MMP-7	Laminina, col·làgens no fibril·lars, fibronectina
	Estromelisina-3	MMP-11	Inhibidor proteasa $\alpha 1$
MT-MMPs	MT1-MMP	MMP-14	Pro-MMP-2, col·làgens, gelatina
	MT2-MMP	MMP-15	Pro-MMP-2, col·làgens, gelatina
	MT3-MMP	MMP-16	Pro-MMP-2, col·làgens, gelatina
	MT4-MMP	MMP-17	Pro-MMP-2, col·làgens, gelatina
Altres	Metaloelastasa	MMP-12	Elastina
	Enamelina	MMP-20	Proteïnes de l'esmalt dental (?)
	Xenopus MMP	MMP-21 (?)	Desconegut
		MMP-19	Agrecà

Taula 8. Membres de la família de les MMPs (Yong et al., 1998).

Degut a la seva importància en el manteniment de la MEC, l'expressió de les MMPs es troba estrictament regulada a tres nivells: a nivell transcripcional, mitjançant l'activació de la proforma i a partir d'inhibidors tissulars (TIMPs) (Cunningham et al., 2005; Jaworski, 2000).

Malgrat aquest sistema regulador tant complex, la regulació de les MMPs es pot alterar, produint una sobreexpressió d'aquests enzims proteolítics, arribant inclús a alterar l'estructura tissular i provocant de vegades una destrucció del teixit, com s'ha observat en patologies neurològiques tals com l'esclerosi múltiple, la formació d'aneurismes i la isquèmia cerebral (Montaner et al., 2003; Romanic et al., 1998).

3.4.2. Les gelatinases

Dins del grup de les MMPs trobem el grup de les gelatinases, proteïnes que són capaces de degradar quasi tots els components de la làmina basal de l'endoteli cerebral. La subfamília de les gelatinases està formada per dos enzims:

- ❖ **Gelatinasa A** o **MMP-2**. Gelatinasa amb un PM de 72 kDa en la forma inactiva o proforma i, un PM de 66 kDa en la forma activa. Els seus substrats són els col·làgens tipus I, IV V, VII, X, XI, fibronectina, tenascina, fibrilina, osteonectina, laminina, etc. (Chakraborti et al., 2003; Rosenberg, 2002). A la figura 11 es pot observar l'estructura cristal·litzada de la MMP-2.

- ❖ **Gelatinasa B** o **MMP-9**. Gelatinasa amb un PM de 92 kDa en la forma inactiva o proforma i de 83 kDa en la forma activa. Aquesta proteasa degrada específicament el col·làgen de tipus IV, la fibronectina, la laminina (components principals de la làmina basal dels capil·lars encefàlics) i la PMB. La MMP-9 és en el moment actual la MMP millor estudiada i de la que es disposa de més informació. A la figura 11 es pot observar l'estructura cristal·litzada de la MMP-9.

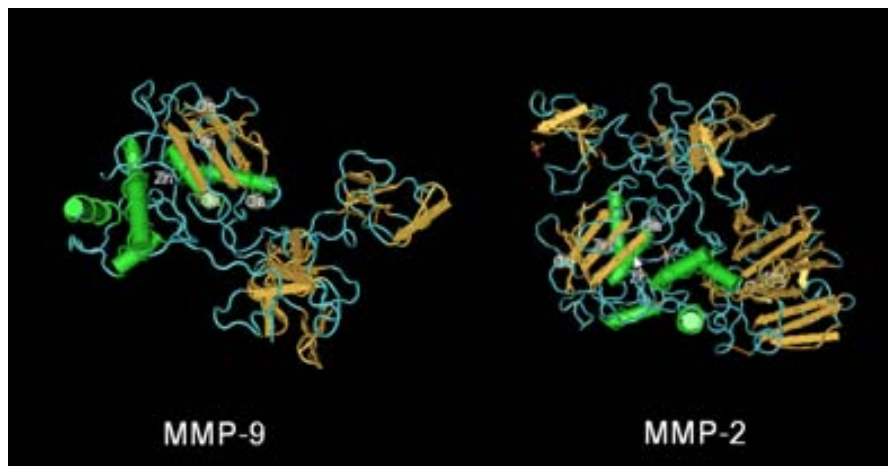


Figura 11. Estructura cristal·litzada de les gelatinases MMP-2 i MMP-9.

3.4.2.1. Estructura de les gelatinases

Totes les MMPs comparteixen tres dominis en la seva estructura:

- Un propèptid N-terminal amb un pèptid senyal (80 aminoàcids; (Nagase and Woessner, Jr., 1999)).
- Un domini catalític (100 aminoàcids).
- Un domini hemopexina C-terminal (excepte la matrilisina MMP-7).

A aquesta estructura bàsica, cada família de MMPs afegeix altres dominis, com per exemple el domini transmembrana només present a les MMPs d'unió a membrana (MT-MMPs). Les gelatinases i les MT-MMPs, a part d'aquestes estructures comuns, contenen llocs d'unió a la fibronectina.

El domini catalític conté tota la maquinària catalítica responsable de l'activitat enzimàtica i proteolítica sobre els substrats diana, una mol·lècula de zinc (Zn), una metionina i ions Ca^{2+} , responsables de l'estructura tridimensional de la mol·lècula (Chakraborti et al., 2003). Al mig del domini catalític, les gelatinases disposen de tres dominis addicionals d'unió a la fibronectina. Aquests elements són imprescindibles en la interacció de l'enzim amb els diferents tipus de col·làgens i amb la gelatina (Nagase and Woessner, Jr., 1999). A la regió C-terminal de les gelatinases es troba un domini d'unió a l'hemopexina d'uns 210 aminoàcids (Nagase and Woessner, Jr., 1999), amb el

que la mol·lècula adquireix la capacitat d'activar altres proteases (Rosenberg, 2002);(Chakraborti et al., 2003). També presenten una regió rica en prolina, de funció desconeguda fins el moment actual, que connecta el domini catalític amb el domini d'unió a l'hemopexina, que és la regió frontissa. A la figura 12 es troba esquematitzada l'estructura bàsica de les gelatinases.

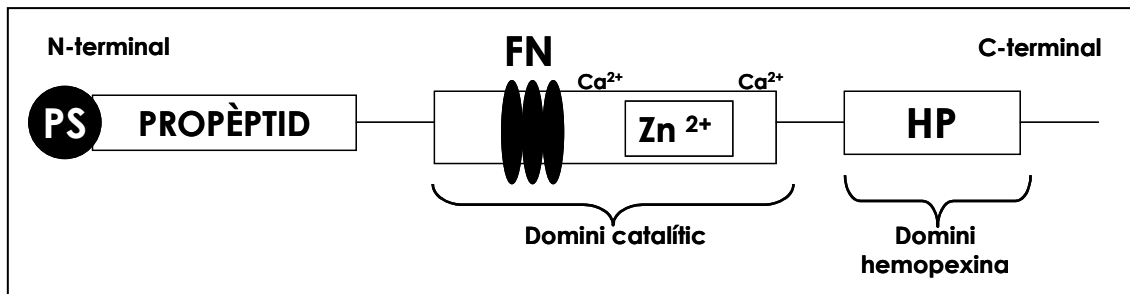


Figura 12. Estructura bàsica de les gelatinases. PS: pèptid senyal; FN: domini d'unió a la fibronectina; HP: hemopexina; Zn: zinc.

D'altra banda, en la regió del propèptid existeix una seqüència molt ben conservada i formada per una seqüència específica d'aminoàcids: (PRCG[V/N]PD). La cisteïna d'aquesta regió s'uneix al Zn del domini catalític i és la responsable de mantenir l'estat de latència de l'enzim (Nagase and Woessner, Jr., 1999). La MMP-9, a més, té entre els domini catalític i el de l'hemopexina, un domini addicional d'unió al col·làgen tipus V (Chakraborti et al., 2003).

3.4.2.2. Regulació i activació de les gelatinases

En condicions normals la degradació de la MEC és un procés molt controlat. La plasmina (una serin proteasa), l'activador del plasminògen tipus urocinasa (uPA) i l'activador del plasminògen tissular (tPA) són alguns dels activadors fisiològics de les MMPs. Les gelatinases (com la resta de MMPs) són secretades a l'espai extracel·lular com a zimògens o proenzims. Per activar-les és necessari que el centre actiu amb l'àtom de Zn, el qual està preservat dins l'estructura quaternària en les formes no actives, quedi lliure i exposat al medi. Aquest procés es pot produir per la proteòlisi del domini propèptid (*Cysteine Switch Mechanism*) (Chakraborti et al., 2003; Rosenberg, 2002) o bé per una modificació de l'estructura, per un procés químic, com és el cas de la S-

Els inhibidors tissulars de les metal·loproteïnases (TIMPs)

Els TIMPs són una família de 4 proteïnes (TIMP-1, -2,-3,-4) de baix PM (20-29kDa), secretades per diferents tipus cel·lulars i que presenten una elevada afinitat per les MMPs. S'uneixen en una relació 1:1, bloquejant la capacitat proteolítica de les MMPs (Chakraborti et al., 2003; Cunningham et al., 2005; Dzwonek et al., 2004). Tot i que en general poden bloquejar diferents MMPs presenten certa especificitat selectiva. Així, el TIMP-1 bloquejaria preferentment la MMP-9 i el TIMP-2 i el TIMP-3 la MMP-2.

A part de la seva acció directa bloquejant les diferents MMPs, els TIMPs també sembla que estarien implicats de forma directa en processos apoptòtics post-isquèmics (Dzwonek et al., 2004; Wallace et al., 2002) i en molts d'altres com la diferenciació i proliferació cel·lular, la inhibició del creixement tumoral, les metàstasis i l'angiogènesi (Cunningham et al., 2005; Mannello and Gazzanelli, 2001).

3.5. Les MMPs en els processos de isquèmia cerebral

Existeix evidència de que les MMPs estan implicades en els canvis patològics associats amb la isquèmia cerebral, concretament en les alteracions que es produeixen als vasos sanguinis cerebrals. En un accident isquèmic s'activa la transcripció de gens de resposta immediata com el c-jun, c-fos, p53, p38, etc. Els productes d'aquests gens promouen l'alliberació de citocines, quimocines i radicals lliures, que a la vegada promouen la migració dels leucòcits desde la sang al parènquima cerebral. La producció de MMPs per aquests leucòcits produeix alteracions estructurals a la BHE (edema i/o hemorràgia) i mort cel·lular (Muir et al., 2002), com es troba esquematitzat a la figura 14.

A l'encèfal, durant l'estrés cel·lular produït per la isquèmia tissular, les macromol·ècules de la làmina basal es degraden, degut a l'acció de les MMPs secretades per les mateixes cèl·lules cerebrals i per limfòcits que arriben

a través de la sang. Aquesta pèrdua de material de la MEC incrementa la possibilitat d'aparició d'hemorràgies tissulars.

D'altra banda, la proteòlisi de la MEC pot contribuir també a la lesió del teixit cerebral a través d'altres mecanismes lesius:

- Lesionant directament els vasos sanguinis i incrementant la seva permeabilitat.
- Provocant una pèrdua de connexions intercel·lulars, degut a la interrupció dels canals de comunicació utilitzats per la senyalització del pas de mol·lècules i nutrients.
- Provocant la mort cel·lular.

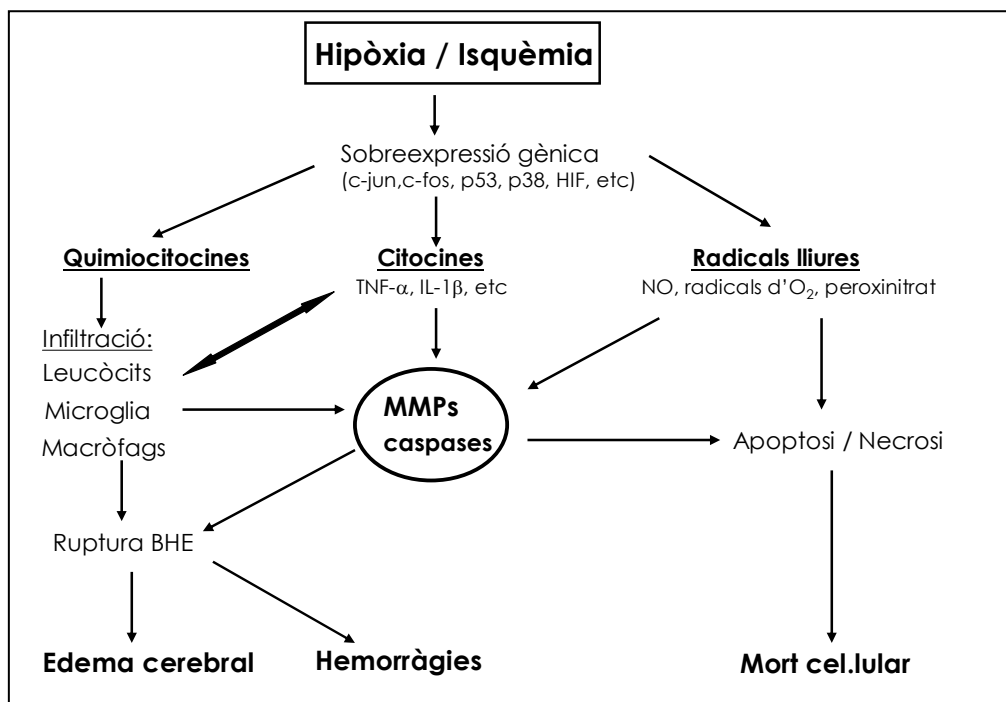


Figura 14. Representació esquemàtica de les múltiples vies activades per la hipòxia/isquèmia, que desenvoquen en l'edema cerebral. Adaptat de Rosenberg GA i col. (Rosenberg, 2002).

Diversos estudis realitzats en pacients amb ictus greus han objectivat nivells elevats de MMP-9. Aquestes alteracions apareixen a l'inici dels símptomes i durant les 48 hores posteriors. També s'han observat troballes

similars quan ocorre una transformació hemorràgica en una zona de l'infart o en pacients que han presentat hematomes cerebrals espontanis (Montaner et al., 2001b; Montaner et al., 2001c; Montaner et al., 2001a; Montaner et al., 2003).

3.6. Les metal·loproteïnases de matriu a la lesió neurotraumàtica

El paper que les MMPs tenen a la fisiopatologia de les lesions neurotraumàtiques és encara poc conegut. Existeixen alguns estudis experimentals que relacionen les alteracions encefàliques produïdes després d'una lesió traumàtica amb increments en les concentracions de diverses MMPs, especialment la MMP-9 (Kawai et al., 2003; Mori et al., 2002; Morita-Fujimura et al., 2000; Shibayama et al., 1997; Vecil et al., 2000; von Gertten et al., 2003; Wang et al., 2000; Wang et al., 2002). La informació que tenim en el moment actual sobre el paper de les MMPs a les lesions neurotraumàtiques procedeix fonamentalment d'estudis experimentals *in vitro*, d'estudis *in vivo* i de només tres articles en humans (Suehiro et al., 2004; Vilalta et al., 2008a; Vilalta et al., 2008b). En els següents apartats s'explicaran de forma resumida els diferents estudis *in vitro*, *in vivo* i en humans centrats en les gelatinases, les proteases que s'estudien a la present tesi.

3.6.1. Estudis *in vitro*

A diferència del que passa en cultius de neurones de rata, s'ha demostrat que en cultius de cèl·lules astrocitàries de rata, humanes o en cultius mixtes d'astròcits i neurones de rata es poden detectar nivells basals de MMP-9 (Vecil et al., 2000; Wang et al., 2002).

En cultius d'astròcits de rata, l'administració de lipopolisacàrid (LPS), IL-1 β , TNF- α (Gottschall and Yu, 1995) o del fragment amiloide A β estimulen la secreció de proMMP-9 (Rosenberg, 2002). La citocina TGF- β , en canvi, indueix una disminució dels nivells de MMP-9 en el medi cel·lular (Vecil et al., 2000).

Aquestes troballes suggereixen que les mol·lècules que originen la resposta inflammatòria tenen un paper important en la regulació de la MMP-9, i que mol·lècules com les citocines IL-1 β (Gottschall and Yu, 1995; Muir et al., 2002; Vecil et al., 2000; Wang et al., 2002), TNF- α (Gottschall and Yu, 1995; Muir et al., 2002; Vecil et al., 2000; Wang et al., 2002), IL-1 α (Gottschall and Yu, 1995) i LPS (Gottschall and Yu, 1995; Rosenberg, 2002) són capaces d'activar l'expressió de la MMP-9 (Muir et al., 2002; Vecil et al., 2000). D'altra banda, altres estudis han demostrat que si es produeix una lesió mecànica en un cultiu de cèl·lules corticals de rata s'observa un augment de l'expressió de la MMP-9, que és dependent de la gravetat de la lesió (Wang et al., 2002).

Diversos estudis experimentals han demostrat que els astròcits i les neurones de cultius cel·lulars de rata i humans secreten MMP-2 de forma basal (Gottschall and Yu, 1995; Muir et al., 2002; Vecil et al., 2000; Wang et al., 2002). També s'ha demostrat que a les 24 hores d'una lesió mecànica en cultiu cel·lular, els nivells de MMP-2 al medi de cultiu augmenten significativament (Wang et al., 2002). Altres estudis observen que l'estimulació cel·lular amb IL-1 β (Gottschall and Yu, 1995; Muir et al., 2002), TNF- α (Gottschall and Yu, 1995) i LPS incrementa la secreció de MMP-2 en cultius d'astròcits de rata (Gottschall and Yu, 1995). En canvi, s'ha demostrat que les vies inflamatories com les MAP cinases no afecten a la secreció de MMP-2 (Wang et al., 2002). Només algunes citocines com la IL-1 β regulen els nivells de MMP-2. El TIMP-2 no és capaç d'inactivar la MMP-2 *in vitro* (Muir et al., 2002).

3.6.2. Estudis *in vivo*

Els estudis experimentals *in vivo* s'han realitzat exclusivament en el model de rata i ratolí. Aquests treballs han demostrat que la utilització d'inhibidors de les MMPs disminueix l'àrea de lesió i el contigut d'aigua al cervell a les 24 hores de produir-se la lesió crioinduïda (Jaworski, 2000). En models animals s'ha objectivat que després d'un traumatisme cranial es produeix un augment de la concentració de MMP-9 a l'hemisferi lesionat, però també, tot i que en menor mesura, a l'hemisferi contralateral. Investigacions recents amb ratolins *knock out* pel gen de la MMP-9 han demostrat que després d'un TCE el dany cerebral

és menor en ratolins *knock out* que en ratolins salvatges, tant en tamany de la lesió cerebral com en les seqüeles funcionals (Wang et al., 2000). Altres estudis han detectat nivells de mRNA de la MMP-9 al parènquima cerebral, de forma constitutiva, i un augment a partir de les 12 hores de produir la lesió traumàtica (Jaworski, 2000).

En cervells normals de rates s'ha localitzat MMP-2 en astròcits propers a la paret ventricular, a la superfície pial, i als vasos sanguinis. La localització de la MMP-2 als peus dels astròcits, aprop de les superfícies controladores de l'intercanvi de fluids al cervell, suggereix que la MMP-2 intervé en el balanç normal de fluids o en la regulació de la BHE (Rosenberg, 2002). No obstant això, tot i que *in vivo* s'han detectat nivells basals de MMP-2 al parènquima cerebral, no s'ha demostrat que existeixi un augment en la concentració d'aquesta proteasa després d'un TCE (Vecil et al., 2000), a excepció d'un estudi en rates en el que es va detectar un augment discret de la MMP-2 entre les 6 i les 12 hores després del TCE (Morita-Fujimura et al., 2000).

3.6.2. Estudis en pacients amb TCE

Només existeixen fins l'actualitat tres treballs realitzats en pacients amb un TCE, dos dels quals són del nostre grup i formen part de la present tesi. En l'estudi de Suehiro i col. (Suehiro et al., 2004) es va observar un augment de MMP-9 a la fase aguda del TCE, amb una posterior disminució dels nivells, que ells van atribuir a l'efecte neuroprotector de la hipotèrmia moderada, la qual va ser aplicada a tots els pacients de l'estudi. També van analitzar els nivells d'IL-6 i van trobar una correlació significativa entre els nivells d'IL-6 i MMP-9 a la sang venosa provinent del bulb de la jugular.

Una hipotèsi seria doncs que existiria una resposta combinada, tant cerebral com sistèmica, que actuaria de forma simultània en el malalt que ha sofert un TCE, tal i com es representa a la figura 15.

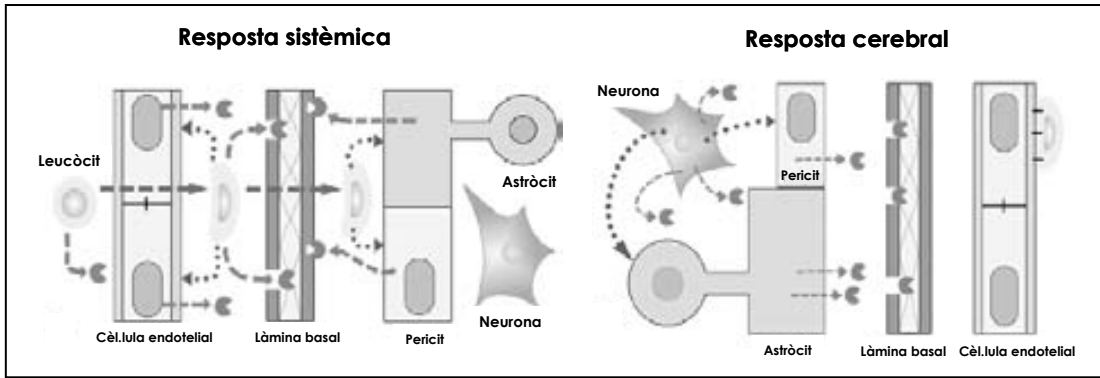


Figura 15. Esquema adaptat de Rosenberg GA i col.(Rosenberg, 2002) on es pot observar la resposta inflamatòria sistèmica (esquerra de l'imatge) i la resposta inflamatòria cerebral (dreta de l'imatge) que actuarien simultàniament al TCE. Per una banda l'alliberació de MMPs per part de leucòcits (principalment neutròfils) permetria el seu pas a través del capil·lar i un cop al teixit cerebral estimularia altres MMPs que amplificarien el dany tissular. En situacions de hipòxia/isquèmia les mateixes cèl·lules cerebrals també produirien MMPs i citocines que alterarien la permeabilitat de la BHE i alliberarien MMPs al torrent sanguini, facilitant el reclutament de leucòcits desde el component hemàtic.

HIPÒTESI DE TREBALL

L'estudi *in vivo* del metabolisme cerebral mitjançant tècniques de microdiàlisi permet detectar precoçment situacions de hipòxia tissular, validar una sèrie de mètodes rutinaris utilitzats a la pràctica clínica diària y conèixer la resposta metabòlica a certs procediments terapèutics. Aquesta tècnica permet a més, estudiar la resposta inflamatòria desencadenada pel TCE. Aquesta resposta és probablement precoç i influeix de forma decisiva en les cascades neuroquímiques anòmales desencadenades per la lesió cerebral traumàtica.

OBJECTIUS

Els objectius principals d'aquesta tesi són:

1. Determinar la sensibilitat, especificitat i el valor predictiu de les AVDLs i el LOI com indicadors de l'increment de la producció de lactat cerebral en pacients amb un TCE moderat i greu, mitjançant l'ús comparatiu del valor del lactat cerebral obtingut per microdiàlisi cerebral.
2. Analitzar els efectes de la hiperòxia normobàrica en l'oxigenació cerebral i el metabolisme energètic a la fase aguda del TCE moderat i greu.
3. Analitzar el perfil temporal dels nivells plasmàtics de gelatinases (MMP-2 i MMP-9) a la fase aguda del TCE moderat i greu, així com el seu perfil temporal a l'espai extracel·lular cerebral.
4. Estudiar els nivells de gelatinases (MMP-2 i MMP-9) a les contusions cerebrals.

PACIENTS I MÈTODES

1. Pacients

1.1. Tractament mèdic general

Tots els pacients inclosos en els diferents estudis van ser monitoritzats i tractats d'acord amb les guies de pràctica clínica pel tractament del pacient amb TCE greu, publicades per la Brain Trauma Foundation i adaptades al nostre medi (2000; Bullock et al., 2000; Sahuquillo et al., 2002b).

L'objectiu principal en el tractament dels pacients amb un TCE és mantenir la PPC per sobre de 60 mmHg i la PIC inferior a 20 mmHg. Els pacients normalment s'incorporen amb el cap elevat 20°. Per assolir una TAM d'almenys 90 mmHg, s'utilitzen fàrmacs vasoactius quan el volum de reposició és suficient per mantenir una situació de normovolemia. En tots els pacients s'indueix la sedació i analgèsia, que es manté amb la infusió contínua de midazolam i mòrfics. El tractament complementari pel control de la PIC inclou la paràlisi muscular mitjançant vecuroni, una hiperventilació optimitzada (mitjançant el monitoratge descontínu de la SjO_2) i bolus intermitents de manitol i/o sèrum salí hipertònic al 7.2%. La concentració d'Hb s'intenta mantenir a 11g/dl o a nivells superiors. Les complicacions sistèmiques extracranials com l'anèmia, la hipotensió arterial i la hipòxia són ràpidament tractades.

Els pacients amb PICs elevades (per sobre de 20 mmHg) són tractats inicialment amb manitol i hiperventilació moderada (3,5-4,5Kpa). Quan la PIC és refractària a aquestes mesures de primer nivell s'utilitzen els barbitúrics, la hipotèrmia moderada i/o la craniectomia descompressiva com a teràpies de segon nivell, depenent de la situació clínica del malalt i del tipus de lesió visualitzada a la TC.

1.2. Protocols de recollida i processament de mostres biològiques

1.2.1. Mostres sanguínies

Les mostres plasmàtiques utilitzades per valorar els nivells de MMPs es van obtenir de sang perifèrica, i es van recollir en tubs que contenien EDTA com anticoagulant. El plasma va ser obtingut després de centrifugar la sang a 3500rpm durant 15 minuts a 4°C. Aquest fou emmagatzemat a -80°C fins el moment de l'anàlisi. Les mostres sanguínies utilitzades per realitzar les gasometries van ser obtingudes de sang arterial perifèrica per l'estudi de la hiperòxia normobàrica. Per l'estudi de les AVDLs es va obtenir sang venosa provinent del catèter situat al bulb de la jugular dominant.

1.2.2. Mostres de teixit cerebral

Les mostres de teixit cerebral control es van obtenir de lobectomies realitzades per accedir i extreure tumors extra-axials, que no van presentar cap abnormalitat a la resonància magnètica en seqüències potenciades en T1 i T2. Les mostres de teixit procedent de contusions es van obtenir en contusectomies realitzades en diferents moments de l'evolució després del TCE.

Els teixits cerebrals es van processar de dues maneres diferents. Una porció del teixit es va sotmetre a congelació ràpida en nitrògen líquid i va ésser emmagatzemada fins el seu ús a -80°C, i l'altra porció de teixit es va fixar per immersió en paraformaldehid al 4% seguint posteriorment un protocol específic (Asahi et al., 2000). Les mostres de teixit a partir de les quals es van realitzar les zimografies in situ i en gel de gelatina van ser les congelades en nitrògen líquid.

Les mostres de teixit congelades van ser homogenitzades prèviament a la realització de la zimografia en gel de gelatina. El teixit cerebral (0,2g) es va barrejar amb 0,7ml de tampó de lisi (50mmol/l Tris-HCL, pH=7,6, 150mM NaCl, 5mmol/l CaCl₂, 0,05% Brij-35, 0,02% NaN₃ i 1% Tritó X-100), que contenia inhibidors de proteases (PMSF i aprotinina). Posteriorment l'homogenitzat del

teixit cerebral es va centrifugar a 4°C i a 12000g durant 10 minuts. El sobrenadant es va al·liquotar i emmagatzemar a -80°C fins al moment de la realització de la zimografia en gel de gelatina.

1.2.3. Mostres de microdialitzat cerebral i subcutani

Les mostres obtingudes de microdialitzat cerebral i subcutani són recollides horàriament en microvials específics. Després de l'anàlisi rutinari de quatre metabolits (glucosa, lactat, piruvat, glicerol/glutamat/urea) amb l'analitzador CMA600 (CMA microdialysis, Stockholm, Sweden), els microvials es col·loquen en gradetes específiques amb capacitat per 12 microvials i posteriorment s'emmagatzemen a -80°C fins la realització de futurs anàlisis. A la figura 17 es pot observar un detall de l'analitzador CMA600 i les gradetes amb els microvials.

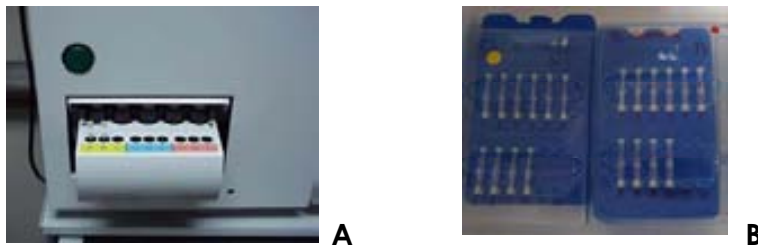


Figura 16. A: detall de l'analitzador CMA600; B: gradetes amb microvials.

1.3. Selecció de pacients: criteris d'inclusió i d'exclusió

Els pacients inclosos als diferents estudis foren traumatismes cranioencefàlics greus o moderats, amb una puntuació en el GCS (annexe 2.1) entre 3 i 13. Els criteris de inclusió i d'exclusió per cada estudi es troben especificats a les publicacions corresponents.

1.4. Variables clíniques i radiològiques

Les variables clíniques i radiològiques registrades per cada estudi estàn especificades a cada publicació i les diferents escales utilitzades en els estudis es troben als annexes. El resultat funcional dels pacients el va avaluar una neuropsicòloga, mitjançant el GOSE als 6 mesos desde el traumatisme cranial (annexe 4) .

2. Neuromonitoratge avançat: PtiO₂ i microdiàlisi cerebral

2.1. Monitoratge de la PtiO₂

Els sensors que es van implantar als pacients per mesurar la PtiO₂ van ser del tipus CC1.SB (Integra, Plainsboro, NJ, USA). El sistema de monitoratge utilitzat fou el Licox® CMP, que permet registrar les dades obtingudes pel sensor de forma contínua. Les dades registrades durant tot el període de monitoratge es van registrar en un ordinador portàtil (IBM, ThinkPad) i es van emmagatzemar al disc dur fins el seu anàlisi posterior. Cada sensor té assignada una targeta amb un microxip, que conté totes les dades de calibració i per tant no és necessari calibrar-lo abans de la inserció. El monitor també disposa, a part del canal d'oxigen, d'un altre canal per la temperatura cerebral. En el cas que no es vulgui monitoritzar la temperatura cerebral, el monitor disposa d'un panell on es pot introduir la temperatura del pacient, i d'aquesta manera, el monitor corregeix els valors de PtiO₂ en funció de la temperatura del pacient. El detall ampliat del panell es troba a la figura 17.

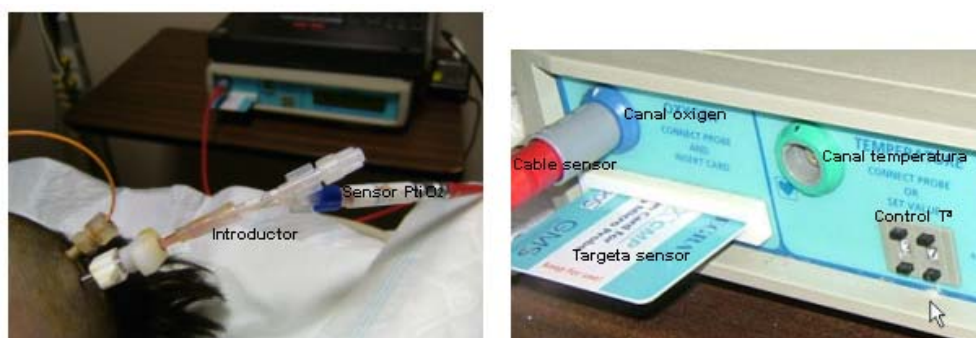


Figura 17. Imatge on s'observa l'introductor i el cable del sensor de PtiO₂, així com un detall ampliat del monitor LicoxCMP amb els diferents components (dreta de l'imatge).

2.1.1. Implantació del sensor de PtiO₂

Els sensors de PtiO₂ es van implantar a la substància blanca del lòbul frontal, a uns 25 mm per sota de la duramàter, al territori frontera entre l'artèria cerebral mitja i l'artèria cerebral anterior. La col·locació del sensor és similar a la col·locació d'un sensor de PIC intraparenquimatós. A través d'una petita craniostomia (a uns 10.5 cm del nasion i a uns 2,5 cm de la línia mitja) es fixa un cargol amb rosca a la cal·lota cranial i es perfora la duramàter. El cargol subjecta l'introduïdor del sensor, el qual té la finalitat de realitzar un pre-trajecte al parènquima encefàlic, de manera que facilita el pas del catèter d'oximetria i permet mantenir-lo en una posició correcta.

2.2. Microdiàlisi cerebral

2.2.1. Catèters cerebrals i subcutanis

El catèter de microdiàlisi cerebral utilitzat va ser el model CMA 70 per l'estudi de les AVDLs i per alguns pacients del de la hiperòxia normobàrica i el CMA 71 per alguns pacients de l'estudi de la hiperòxia normobàrica i el de les MMPs a l'espai extracel·lular cerebral. El catèter de microdiàlisi subcutani utilitzat va ser el CMA 60. L'única diferència entre els catèters és el tamany del porus. Els models CMA 70 i CMA 60 permeten el pas de mol·lècules fins a 20kDa, mentre que en el CMA71 es permet el pas de mol·lècules fins a 100kDa.

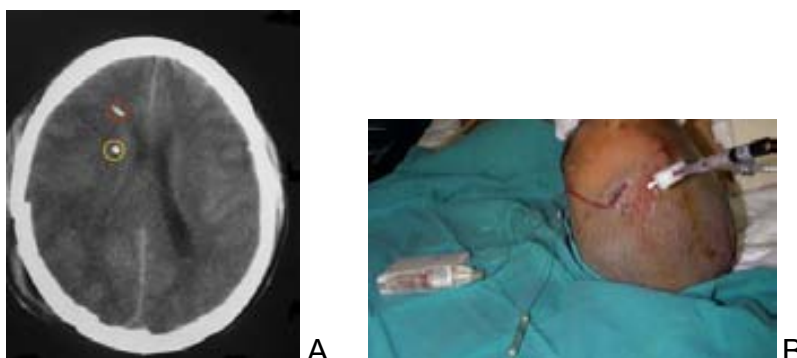


Figura 18. TC cerebral i pacient polimonitoritzat. A: TC cerebral on es mostra la punta del catèter de microdiàlisi (groc) i el sensor de PtiO₂ (vermell). B: pacient monitoritzat on s'observa un catèter de microdiàlisi i un sensor de PtiO₂.

Els primers catèters utilitzats a l'estudi de les AVDL eren radiotransparents. Per confirmar la correcta posició del catèter s'infonia aire durant una hora mitjançant la microbomba i es realitzava un TC cerebral. Els següents catèters cerebrals CMA 70 i CMA 71, disposen d'una peça d'or a l'extrem distal, que és visualitzada als controls radiològics, com es pot comprovar a la figura 18.

La longitud de les membranes utilitzades va ser diferent en funció del catèter, éssent de 30 mm la del catèter subcutani i de 10mm la dels diferents catèters cerebrals. A la figura 19 es mostra un catèter cerebral i el material necessari per la inserció.

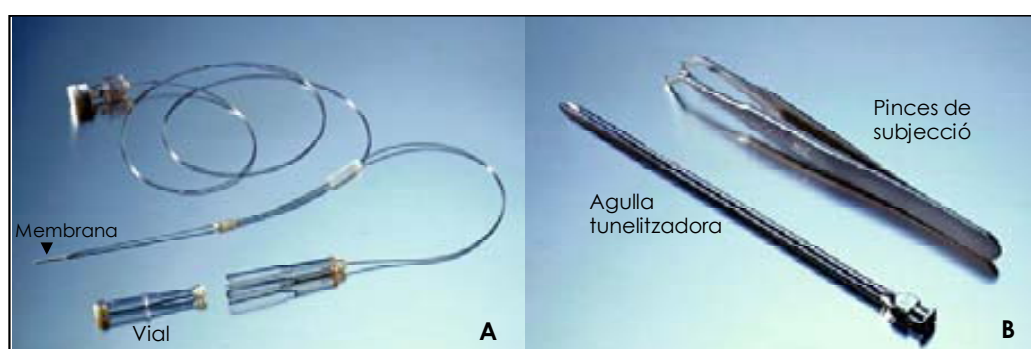


Figura 19. Catèter CMA 70 i material de implantació. A: Catèter CMA 70 (cerebral). B: material necessari per la col·locació del catèter cerebral: agulla tunelitzadora utilitzada per la tunelització del catèter sota la pell, i pinces de subjecció que serviran per introduir el catèter per la petita craniostomia.

2.2.2. Líquid de perfusió

La solució isotònica i estèril perfosa a través de la membrana de diàlisi consta de diferent composició química, depenent de si el catèter és cerebral o subcutani.

Catèter cerebral: NaCl 147 mM, KCl 2,7 mM, CaCl₂ 1.2 mM, MgCl₂, 0,85 mM.

Catèter subcutani: Na⁺ 147 mM, K⁺ 4 mM, Ca²⁺ 2,3 mM, Cl⁻ 156 mM.

Les microbombes de perfusió utilitzades per ambdós tipus de catèters (cerebral, subcutani) van ser del model CMA106, amb una velocitat de perfusió de 0,30 µl/min (figura 20).

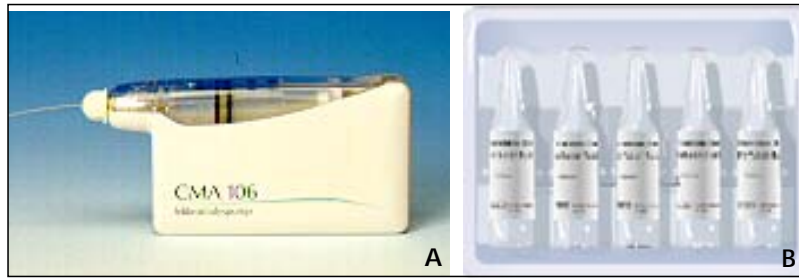


Figura 20. Bomba de perfusió CMA 106 i ampolles de perfusió. A: bomba de perfusió CMA106. B: caixa amb ampolles de líquid de perfusió.

Les mostres dialitzades contingudes als microvials es van analitzar mitjançant l'analitzador CMA600 per tècniques enzimàtiques i posteriorment es van emmagatzemar a -80°C .

2.2.3. Implantació dels catèters de microdialisi

El catèter cerebral es va tunelitzar per sota de la pell del crani mitjançant una agulla especialment dissenyada per aquesta funció. Posteriorment, el catèter es va implantar al parènquima cerebral a través d'una craniostomia d'un diàmetre de 3mm (Poca et al., 2006). Els catèters implantats pels diferents estudis es van localitzar a la part del cervell menys lesionada, d'acord amb les troballes de la TC cerebral. El catèter subcutani es va implantar en el teixit adipós de la meitat inferior de l'abdòmen, com es veu a la figura 21. La inserció del catèter es va realitzar amb l'ajuda d'una guia incorporada al catèter, que permet la retirada de la guia i el correcte posicionament del catèter al teixit cel·lular subcutani de l'abdòmen.

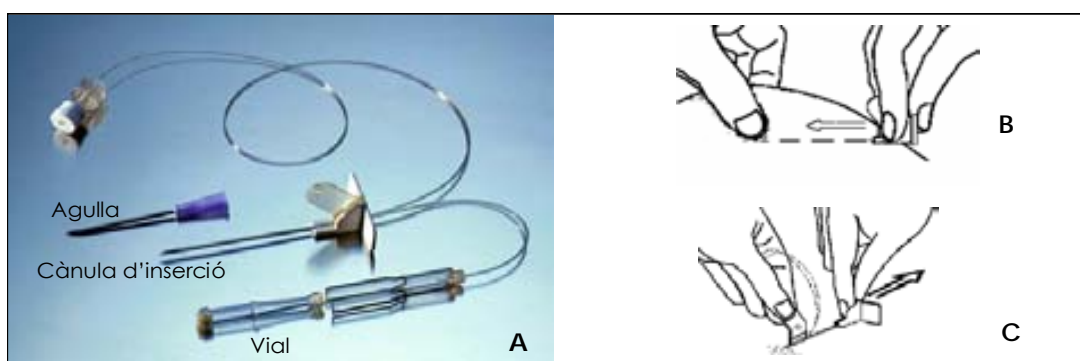
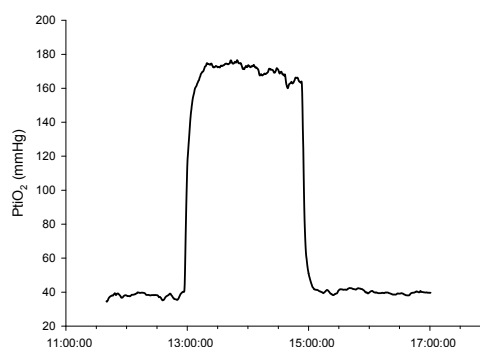


Figura 21. Catèter subcutani i implantació. A: catèter subcutani CMA60 amb els seus components. A la dreta de l'imatge un esquema de la inserció del catèter subcutani. B: col·locació de la cànula al teixit subcutani. C: retirada de la cànula; el catèter queda a l'interior del teixit.

2.3. Protocol de hiperòxia normobàrica

El protocol de hiperòxia normobàrica va ser aprovat pel comitè d'ètica de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron (PR-TR-137/98), el qual va considerar que no era necessari obtenir el consentiment informat per realitzar aquest estudi, en ser aquesta maniobra inoqua i rutinària en qualsevol unitat de cures intensives. El test de hiperòxia es va realitzar a la fase aguda del TCE, un cop els valors de microdiàlisi i de P_{tiO_2} van ser estables. El principal objectiu era realitzar el test en les condicions més estables possibles, per evitar al mínim les fluctuacions en les variables que es volien analitzar. Els pacients que reunien els requisits per entrar a l'estudi (veure criteris de inclusió/exclusió a l'article corresponent) van ser monitoritzats amb microdiàlisi cerebral i un sensor de P_{tiO_2} . En començar el test de hiperòxia es van extreure mostres basals de sang arterial. Si la PaO_2 basal estava per sota de 170mmHg es començava el test i es registraven les diferents constants, així com els valors obtinguts del catèter de microdiàlisi cerebral i subcutani. Si la PaO_2 basal era superior a 170mmHg, es disminuïa la FiO_2 i es començava el test una hora més tard després de reduir els valors de PaO_2 en sang arterial dins del rang de 100-170 mmHg. La FiO_2 es va incrementar al 100% durant dues hores. Un cop transcorregudes les dues hores es disminuïa de nou la FiO_2 al seu valor basal. A part de les variables basals registrades abans d'augmentar la FiO_2 , de forma horaria es van registrar les constants i els valors obtinguts dels catèters de microdiàlisis fins dues hores després de la finalització de la hiperòxia. Les mostres sanguinies arterials es van extreure en tres temps: basal, a les dos hores de hiperòxia i a les dues hores de la finalització del tractament hiperòxic. A la figura 22 veiem un exemple de test.

Figura 22. Exemple d'un test de hiperòxia on s'observa l'increment significatiu dels valors de P_{tiO_2} i la posterior disminució dels valors a nivell basal un cop ha finalitzat el test.



3. Tècniques de laboratori

3.1. Zimografia en gelatina

La zimografia en gelatina es tracta d'una tècnica específica per detectar les MMPs amb capacitat gelatinolítica (MMP-2 i MMP-9). Gràcies a la digestió enzimàtica de la gelatina, continguda en el gel d'acrilàmida, per part de les MMPs, s'observen unes bandes que seràn proporcionals en intensitat i grandària a la quantitat de gelatinases contingudes a la mostra.

En el cas concret dels treballs realitzats per la present tesi, la zimografia en gel de gelatina es va utilitzar per determinar els nivells plasmàtics i cerebrals de MMP-2 i MMP-9. Prèviament es va determinar mitjançant el test BCA (Pierce, Rockford, IL) el contingut de proteïna total per cada mostra. Les mostres plasmàtiques es van ajustar al mateix contingut de proteïna total (20µg) en un volum final de 10µl. Cada mostra es va barrejar 1:1 amb el tampó de mostra Tris-Glicina SDS (2x) de Novex® (LC2676). Les proteïnes es van separar mitjançant l'electroforesi en gels prefabricats per zimografia de Novex® (EC6175BOX) a 100V, durant dues hores i mitja a temperatura ambient. A cada carril de cada gel es va carregar proteïna recombinant MMP2-9 (Chemicon International, Inc) com a control positiu. Un cop transcorreguda l'electroforesi, els gels van ser rentats per eliminar l'SDS amb un tampó renaturalitzant 1x (Tritó x-100 al 2,5%) de Novex® (LC2670) durant 45 minuts dues vegades. Els gels es van incubar a 37°C durante 18 hores en el cas de les mostres plasmàtiques i 47 hores en el cas de les mostres de microdialitzat cerebral, en un tampó d'incubació 1x de Novex® (LC2671). Les bandes d'activitat enzimàtica es van visualitzar després de la tinció dels gels en Amido Black al 0.1% (amb acètic i metanol), en un total d'una hora, i de la destinció mitjançant una solució de metanol al 30% (v/v) i d'àcid acètic glacial al 10% (v/v). Les bandes d'intensitat dels zimogrames es van llegir amb el sistema d'imatge Kodak gel logistic 440 i l'anàlisi es va realitzar amb el programa Kodak 1D. Les intensitats de les bandes es van expressar com cocients i cada mostra es va comparar amb el control positiu.

3.1. Zimografia *in situ*

La zimografia *in situ* permet la detecció d'activitat gelatinolítica en una secció de teixit. És una tècnica molt útil per valorar el grau d'activitat en un teixit i és complementària a altres tècniques com el Western Blot (WB), la zimografia en gelatina i la immunohistoquímica.

Per realitzar aquesta tècnica vam utilitzar els teixits cerebrals congelats en nitrògen líquid i conservats a -80°C , ja que és important no haver realitzat cap tipus de fixació prèvia. Es van tallar en un criostat seccions de $14\mu\text{m}$ de gruix, que es van muntar sobre un porta-objectes i es van cobrir amb una solució que contenia gelatina unida a un fluorocrom FITC (Molecular Probes, USA). Seguidament es van incubar tota la nit en una cambra humida i protegida de la llum. Posteriorment es van cobrir les mostres en un medi aquós que les protegia de la pèrdua de fluorescència i que contenia DAPI (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA 94010, USA), el qual tenyeix els nuclis cel·lulars (marcatge de l'ADN). L'anàlisi de la reactivitat es va realitzar mitjançant un microscopi de fluorescència (Olympus IX71, Center Valley, Pennsylvania, USA). A la figura 23 es pot observar un exemple de zimografia en gelatina i *in situ*.

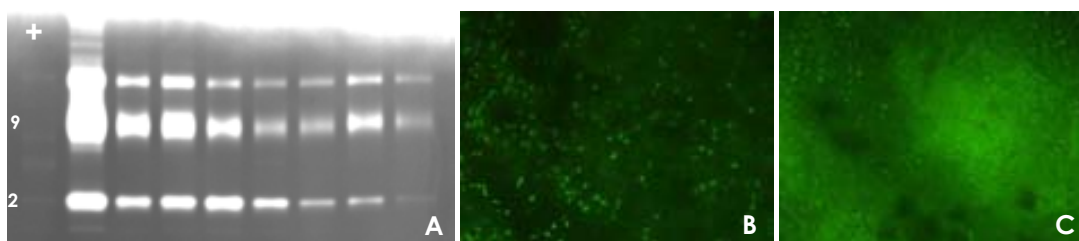


Figura 23. Zimografia en gel de gelatina i *in situ*. A: exemple de zimografia en gel de gelatina. Al carril de l'esquerra (+) està carregat el control positiu. 9: bandes corresponents a la proforma de la MMP-9; 2: bandes corresponents a la proforma de la MMP-2. B: zimografia *in situ* d'un teixit control. C: zimografia *in situ* d'un teixit de contusió, on s'observa major intensitat de senyal que en el teixit control.

4. Anàlisi estadístic

L'anàlisi estadístic de les dades obtingudes en els diferents estudis es va realitzar amb els programes SigmaStat versió 3.1 de Windows i l'SPSS 12.0 (SPSS, Chicago, IL; USA). A cadascun dels treballs s'especifica a la secció de metodologia, els tests estadístics realitzats per l'anàlisi de les dades.

RESULTATS

Llistat d'articles que formen part de la tesi doctoral:

- 1) *Microdiálisis cerebral: fundamentos e indicaciones en el paciente neurocrítico*. Capítulo 5. El paciente neurocrítico. Directores: Àlvar Net Castel, Luis Marruecos-Sant. Capítol de llibre. 2006.
- 2) *Lack of utility of arteriojugular venous difference of lactate as a reliable indicator of increased brain anaerobic metabolism in traumatic brain injury*. J Neurosurg 106:530-537;2007. Revista. Abril 2008.
- 3) *Effects of normobaric hyperoxia on brain metabolism in the injured brain*. Article en preparació.
- 4) *Moderate and severe traumatic brain injury induce early overexpression of systemic and brain gelatinases*. Intensive Care Medicine 2008;34(8):1384-92. Revista. Març 2008.
- 5) *Brain contusions induce a strong local overexpression of MMP-9. Results of a pilot study*. Acta Neurochir Suppl 2008 (En premsa). Revista. 2008

❖ **Microdiálisis cerebral: fundamentos e indicaciones en el paciente neurocrítico.** Capítulo 5. El paciente neurocrítico. Directores: Àlvar Net Castel, Luis Marruecos-Sant. Capítol de llibre. 2006.

Capítulo 5

Microdiálisis cerebral: fundamentos e indicaciones en el paciente neurocrítico

M. A. POCA, J. SANQUILLO Y A. VILAITA

La presión intracraneal, la presión de perfusión cerebral, el flujo sanguíneo cerebral e incluso la presión tisular de oxígeno, son sólo parámetros que nos ofrecen una información indirecta sobre características físicas o sobre la disponibilidad de ciertos elementos en el tejido cerebral. En cambio, la microdiálisis cerebral nos muestra la repercusión de todos estos factores sobre el metabolismo celular. Podríamos decir que la microdiálisis cerebral es para el clínico lo que el microscopio para el patólogo, probablemente un instrumento del que no podremos prescindir en el futuro en el manejo del paciente neurocrítico.

INTRODUCCIÓN

La isquemia cerebral es la lesión secundaria de mayor prevalencia y trascendencia en los traumatismos craneoencefálicos graves. También es frecuente en otras patologías, como la hemorragia subaracnoidea, y constituye el sustrato fundamental de los accidentes vasculares cerebrales de origen isquémico. Además de sus mecanismos lesivos intrínsecos, la isquemia cerebral origina o potencia la aparición de importantes cascadas metabólicas anómalas (liberación incontrolada de neurotransmisores excitatorios, entrada masiva de calcio al interior de la célula, formación de radicales libres, etc.), que son la causa más importante de las alteraciones celulares y lesiones estructurales irreversibles que presentan los pacientes neurocríticos.

En el origen de las lesiones isquémicas podemos encontrar, entre otras causas, alteraciones metabólicas y disfunciones en los mecanismos de control del flujo sanguíneo cerebral (FSC). La importancia de la isquemia cerebral y la elevada prevalencia de alteraciones de los mecanismos de control del FSC en los pacientes con un traumatismo craneoencefálico grave explican la necesidad de que los protocolos terapéuticos actuales incluyan la monitorización de diversos sistemas de medición, directos o indirectos, del

flujo sanguíneo, y o del metabolismo cerebral. Las técnicas de microdiálisis cerebral constituyen el sistema de neuromonitorización más específico y que aporta una información más directa sobre los procesos metabólicos que se producen en el tejido cerebral. En este capítulo pretendemos recordar los fundamentos de las técnicas de microdiálisis, resumir las indicaciones actuales y recordar las limitaciones de esta sofisticada técnica de monitorización cerebral.

FUNDAMENTOS Y OBJETIVOS DE LA TÉCNICA DE MICRODIÁLISIS APLICADA AL ENCÉFALO

Las técnicas de microdiálisis ofrecen información directa sobre la disponibilidad de sustratos energéticos (glucosa) en los tejidos y sobre la producción de diversos metabolitos celulares. La aplicación de estas técnicas al estudio del encéfalo se inició en la década de 1970, utilizándose exclusivamente en animales de experimentación (1, 2). Delgado y Defradas en 1972 y posteriormente Ungerstedt refinaron y adaptaron la microdiálisis al estudio del encéfalo humano (3-5). El primer estudio clínico corresponde a Meyerson y cols. (6). Estos autores analizaron el comportamiento metabólico de una región cerebral que posteriormente sería lesionada para tratar un temblor de origen parkinsoniano (6). En el momento actual, la microdiálisis cerebral se está introduciendo de forma progresiva en la monitorización de los pacientes neurocríticos, ya que ofrece una importante información neuro-metabólica complementaria a las variables que se monitorizan en estos pacientes de forma rutinaria (7).

Desde un punto de vista conceptual, la microdiálisis es una técnica basada en el principio del intercambio de solutos a través de una membrana semipermeable, que emula el funcionamiento de un capilar y cuyos objetivos básicos son: *a)* monitorizar la disponibilidad tisular de diferentes metabolitos; *b)* monitorizar los elementos liberados por las células, y *c)* monitorizar las consecuencias celulares de la hipoxia/isquemia tisular. La membrana semipermeable (membrana dializante) se encuentra en el extremo distal del catéter de microdiálisis y permite el intercambio de solutos entre una solución de composición conocida y neutra y el líquido contenido en el espacio extracelular del tejido estudiado. El análisis del microdializado obtenido permite cuantificar diversos metabolitos derivados de rutas metabólicas fisiológicas o productos que se producen como resultado de una lesión tisular.

Desde un punto de vista técnico, la aplicación de la microdiálisis al encéfalo implica la inserción de un catéter de calibre fino (0,62 mm de diámetro externo) y de doble luz en el espacio extracelular del parénquima encefálico. Una de las luces del catéter se conecta a una pequeña bomba de precisión que infunde suero salino o Ringer sin lactato a una velocidad extremadamente baja (0,1-5 μ l/min). En función del diámetro de los poros de la membrana semipermeable se produce el paso de moléculas contenidas en el espacio extracelular hacia el interior del catéter, debido a que existe un gradiente de concentración entre ambos espacios. A través de la segunda luz del catéter de microdiálisis, la solución cargada con los metabolitos tisulares se recoge en un microvial que se sustituye cada 10-60 minutos. Los microviales obtenidos se analizan a cabecera del paciente, lo que permite cuantificar de forma secuencial cuatro analitos mediante técni-

cas enzimàtics. Sin embargo, para que esta información cerebral sea válida y útil, debe contrastarse con la información proporcionada por un catéter adicional colocado en el tejido subcutáneo. Este último aporta información sobre el metabolismo sistémico (extracerebral).

Uno de los objetivos fundamentales del tratamiento de los pacientes con un traumatismo craneoencefálico grave es la prevención de lesiones cerebrales secundarias, de ahí la importancia de realizar una detección precoz de la isquemia isular cerebral. Este concepto puede extenderse al contexto de otros pacientes neurocránicos. En el encéfalo, la colocación de un catéter de microdiálisis permite el análisis y la cuantificación de los cambios que se producen en diversos metabolitos «energéticos», como lactato, piruvato, adenosina, inosina o hipoxantina. También permite estudiar la liberación de neurotransmisores y neuromoduladores (glutamato, aspartato, ácido gammaaminobutírico [GABA], tauina, etc.) o la liberación de productos de origen inflamatorio o resultado de la degradación isular (glicerol, potasio).

APLICACIONES DE LA MICRODIÁLISIS CEREBRAL EN INVESTIGACIÓN

La aplicación de las técnicas de microdiálisis en modelos experimentales ha permitido incrementar de forma muy significativa el conocimiento de la fisiopatología de diversas lesiones cerebrales. El comportamiento dinámico de las contusiones cerebrales postraumáticas, las alteraciones metabólicas en casos de inflamación cerebral unilateral o bilateral o el proceso evolutivo que pueden seguir los accidentes vasculares de origen isquémico (8-10) son sólo ejemplos de la información que puede proporcionar la microdiálisis cerebral y que, partiendo de un ámbito experimental, puede trasladarse de forma directa al paciente neurocránico.

Otra de las aplicaciones experimentales de la microdiálisis de gran valor es el estudio de la farmacocinética cerebral de fármacos neuroprotectores. Los diversos autores que han analizado las causas del fracaso de los numerosos fármacos neuroprotectores en diversos tipos de pacientes neurocránicos (ensayos clínicos en fase III) reconocen la importancia de disponer de información más directa sobre el comportamiento cerebral del fármaco en estudio (11, 12). Conocer la velocidad de acceso del fármaco al encéfalo, así como la concentración que se alcanza en el espacio extracelular del parénquima encefálico y su influencia en el metabolismo celular, a partir de la implantación de un catéter de microdiálisis cerebral, probablemente va a ser requisito indispensable para el diseño de futuros ensayos clínicos de nuevos fármacos neuroprotectores.

AVANCES EN LA APLICACIÓN CLÍNICA DE LA MICRODIÁLISIS CEREBRAL

Una vez reconocidas las importantes aportaciones de la microdiálisis cerebral en el ámbito de la investigación, el paso siguiente consistía en conseguir su aplicación en la

práctica clínica. La incorporación rutinaria de esta técnica en los pacientes neurocríticos supone un incremento importante de los costes derivados de la neuromonitorización multimodal que aplicamos a este tipo de pacientes. Sin embargo, el inconveniente económico quedaba superado inicialmente por una serie de dudas y controversias metodológicas que debían resolverse: resolver las dificultades en la colocación de los catéteres en regiones cerebrales específicas, conocer la situación exacta del catéter en el cerebro, seleccionar adecuadamente la solución que se debía infundir, conocer la velocidad óptima de infusión y las dimensiones idóneas de la membrana de diálisis, y disponer de valores de referencia de los diversos parámetros medidos y de información específica sobre la sensibilidad y fiabilidad de la técnica. Por otra parte, a estos aspectos metodológicos también se añadían dificultades iniciales sobre la correcta interpretación de los resultados obtenidos.

En el momento actual, la mayor parte de estos inconvenientes o dificultades iniciales ya se ha resuelto. Los catéteres de microdiálisis pueden implantarse en la unidad de cuidados intensivos, utilizando una técnica percutánea casi idéntica a la que se emplea para colocar un sensor de presión intracraneal (PIC) intraparenquimatoso. El catéter de microdiálisis puede adaptarse a un tornillo roscado de dos o tres lúmenes o colocarse de forma individual a través de una pequeña craneotomía, tunelizando unos centímetros el catéter para asegurar su posición y reducir el riesgo de infecciones (fig. 5-1). Las dificultades iniciales para conocer la posición exacta de la membrana dializante se debían a que los catéteres eran radiotransparentes. Esto suponía que debía intuirse la posición del catéter en una determinada región cerebral. Por otra parte, dado el pequeño diámetro del catéter y su falta de rigidez, en ocasiones el catéter cerebral podía doblarse y quedar si-

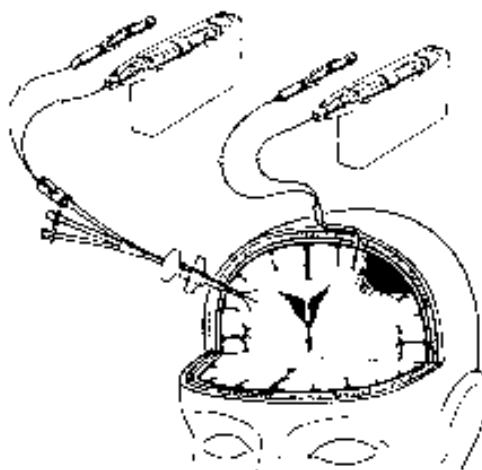


Figura 5-1. Esquema de dos catéteres de microdiálisis implantados en un paciente con una lesión cerebral traumática. El catéter puede introducirse a través de un tornillo roscado (*izquierda*) o a cielo abierto (*derecha*). En este segundo caso, el catéter se tuneliza para fijar su situación y reducir el riesgo de infecciones.

tuado en el espacio subaracnoideo o incluso en el cuero cabelludo. En el momento actual, los catéteres cerebrales incluyen una pequeña pieza de oro en su extremo distal que permite conocer su posición exacta mediante control radiológico.

Las repercusiones de diferentes variantes metodológicas han quedado clarificadas gracias a los estudios de Hutchinson y cols. (13), quienes demostraron que utilizando Rinjer sin lactato o suero salino isotónico como solución mesita para infundir, a un ritmo de 0,3 μ l/min, intercambiando los microviales cada hora y utilizando una membrana dializante de 10 nm, las concentraciones de los analitos obtenidos representaban aproximadamente el 70 % de las concentraciones reales de los metabolitos contenidos en el espacio extracelular (13, 14). Estos autores también observaron, entre otros aspectos, que la obtención de muestras a partir de catéteres situados en posiciones cercanas y en tejido macroscópicamente no lesionado proporcionaban valores que diferían menos del 5 % (13). La congelación de los microviales para ulteriores determinaciones tampoco afectaba al resultado de manera significativa (13). Por último, las determinaciones por métodos enzimáticos que ofrece el analizador situado a la cabecera del paciente proporcionan resultados prácticamente análogos a los que se obtienen al utilizar columnas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (13).

Los valores de referencia de los diferentes elementos o metabolitos estudiados que utilizamos en el momento actual se han obtenido a partir de pacientes neurológicos y

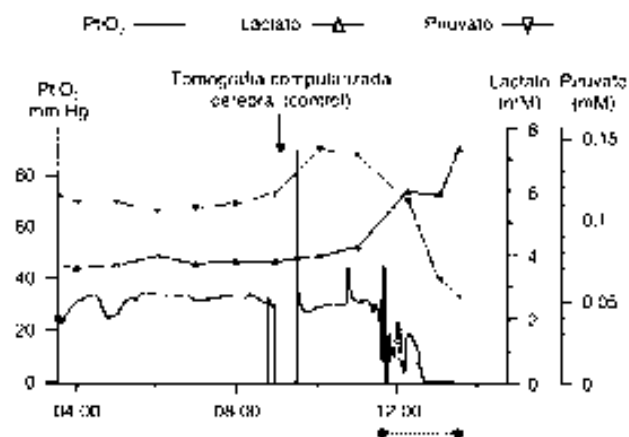


Figura 5-2. Repercusión metabólica en el cerebro de una parada cardíaca que, a pesar de las medidas de reanimación, acaba siendo irreversible. La imagen muestra la efectividad parcial de las maniobras de reanimación cardíaca sobre la presión tisular de oxígeno (PtO_2), ya que de forma inmediata al masaje cardíaco la PtO_2 se eleva de forma transitoria. Finalmente, la reanimación no es efectiva y la PtO_2 cae definitivamente hasta 0 mm Hg. La información obtenida a partir del catéter de microdialisis muestra cómo, ya desde el inicio de estas maniobras, el lactato cerebral aumenta de forma importante y el piruvato disminuye, mostrando un patrón de isquemia cerebral irreversible.

neuroquirúrgicos, en situación de vigilia y anestesiados, insertando el catéter cerebral en tejido no lesionado (15). En la mayor parte de los casos, estos pacientes presentaban tumores benignos de fosa posterior y el catéter se implantaba en una región frontal no lesionada y sin edema cerebral (15). La práctica clínica ha demostrado que la microdiálisis cerebral constituye un sistema de monitorización muy sensible, cuya información metabólica puede anticiparse a la información clínica y radiológica (fig. 5-2) (16, 17). Por último, la macrodiálisis es una técnica fiable, tal y como ha quedado objetivado al incluir entre las variables a analizar un analito como la urea, que permite constatar el correcto funcionamiento de los catéteres (18, 19).

El mayor conocimiento en la interpretación de la información que aportan los catéteres de microdiálisis en el ámbito clínico, así como su posible aplicación directa en el paciente neurocrítico, se hace patente en los siguientes apartados.

APLICACIONES CLÍNICAS ACTUALES

Las aplicaciones clínicas de la microdiálisis cerebral en el momento actual se centran fundamentalmente en la monitorización de pacientes con una lesión cerebral de origen isquémico, en la hemorragia subaracnoidea y en los traumatismos craneoencefálicos, aunque también se ha utilizado en la monitorización de pacientes con epilepsia, con tumores cerebrales y tras diferentes tipos de intervenciones neuroquirúrgicas.

Los accidentes cerebrales vasculares de origen isquémico constituyen el paradigma de la lesión isquémica que podemos monitorizar con un catéter de microdiálisis cerebral. Estas lesiones pueden ser reproducidas en animales con modelos experimentales muy controlados y homogéneos, que permiten estudiar fenómenos patogénicos secundarios al desarrollo de isquemia y a la posterior perfusión tisular. Estos modelos reflejan en gran medida los acontecimientos isquémicos que tienen lugar en el ámbito clínico, incluyendo una potencial perfusión espontánea o terapéutica (fibrinólisis) y, en algunos casos, una evolución fatal con inflamación hemisférica, herniación cerebral y muerte del enfermo.

La aplicación de la microdiálisis cerebral en modelos experimentales y en pacientes isquémicos ha permitido objetivar el comportamiento metabólico del tejido dañado (parte de la lesión), de las áreas de penumbra (regiones colindantes al core) y del tejido cerebral no lesionado (hemisferio contralateral) (20-22), antes y después de la aplicación de medidas neuroprotectoras como la hipotermia moderada (3). La microdiálisis cerebral, combinada en algunos casos con estudios de tomografía por emisión de positrones (PET), ha mostrado una secuencia de acontecimientos metabólicos en la evolución de la isquemia tisular (20, 22-24). Las repercusiones metabólicas de la isquemia en el cerebro dependen, entre otros factores, de la magnitud de la lesión, de su duración y de si se produce o no perfusión tisular.

En los pacientes con un infarto maligno de la arteria cerebral media se ha observado que en el núcleo de la lesión isquémica se produce un aumento masivo del glutamato, del lactato y del índice lactato-piruvato, junto con una reducción del piruvato (21, 22, 25). Cuando estos cambios se acompañan de una caída en los niveles de glucosa y el glicérol persiste elevado, probablemente nos enfrentamos a una situación de infarto establecido (22) (fig. 5-3). En las áreas de penumbra también se ha objetivado

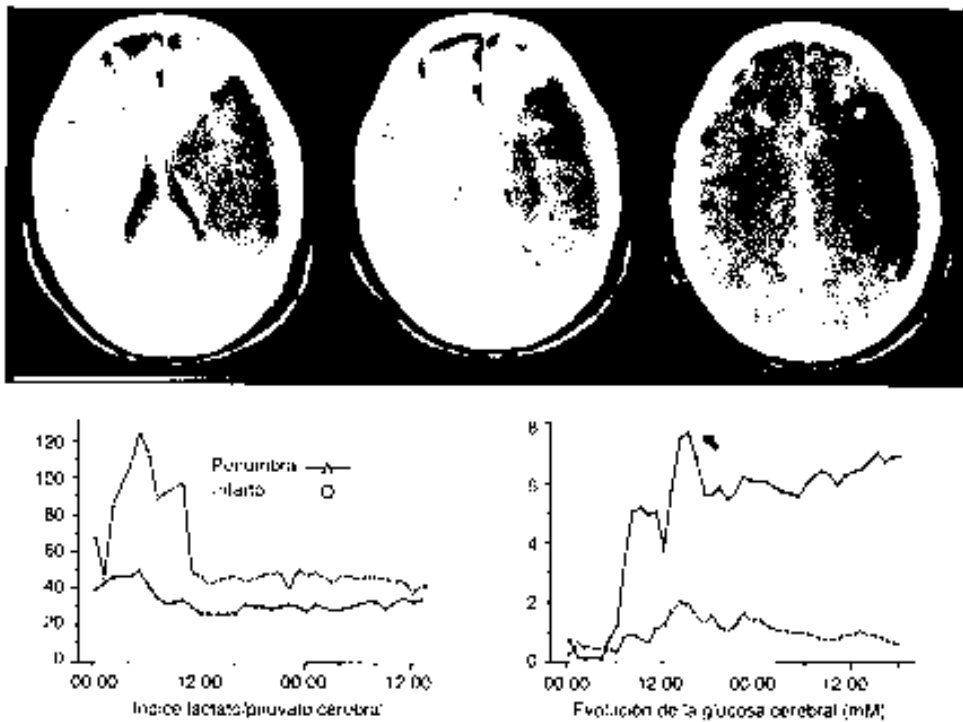


Figura 5-3. Evolució metabòlica en el core (I) i en el territori de penumbra isquèmica (P) de un infart malin (de la artèria cerebral mitjana esquerra). La imatge mostra com el índex lactato/piruvato de ambos territoris cerebrals se encuentra elevado, aunque en el núcleo o core del infarto la glucosa desciende de forma muy importante. Este hallazgo es congruente con una caída del flujo sanguíneo cerebral en este territorio vascular.

un augment del glutamato, del lactato, del índex lactato-piruvato i del glicerol (21, 22). Sin embargo, si la evolució isular es correcta, totes aquestes alteracions (incluïdo el augment de glicerol) poden retornar els nivells normals (22). Si la regió de infart se expande, «reclutando» las áreas de penumbra, estas alteraciones pueden adquirir valores extremos, semejantes a los del core de la lesión.

Las alteraciones metabólicas de los pacientes con un infarto maligno de la artèria cerebral mitjana pueden modificarse con la aplicaci3n de ciertas medidas terapéuticas. Berger y cols. observaron que la hipotermia moderada prácticamente no influy6 en los niveles de los diferentes metabolitos monitorizados en el área de infarto (21). En cambio, en las áreas de penumbra y en el tejido no lesionado, la hipotermia moderada produci3 una reducci3n significativa de los niveles de glutamato, lactato y piruvato, mientras que el índice lactato-piruvato no se modificaba de manera significativa (21). En relaci3n con el glicerol, la hipotermia s3lo reduci3 significativamente los niveles en el área

de penumbra (21). Estos hallazgos confirman el efecto neuroprotector de la hipotermia en este tipo de pacientes.

Además del seguimiento de la evolución metabólica del tejido, la microdialísis cerebral puede ayudarnos a determinar marcadores bioquímicos que permitan predecir una mala evolución de las lesiones isquémicas (infartos malignos) (23, 24-26). Esta detección precoz facilitaría la decisión de aplicar de forma rápida medidas terapéuticas intensivas como las técnicas descompresivas craneales o la hipotermia, que a pesar de su «agresividad» pueden mejorar de forma muy significativa el pronóstico de estos pacientes. El uso de membranas dializantes con poros de 100.000 D, que permiten el paso de proteínas de diferente peso molecular, sin duda será determinante para conseguir este objetivo.

En los pacientes que han presentado una hemorragia subaracnoidea la microdialísis cerebral pretende identificar precozmente la aparición de isquemia tisular e intentar evitar su evolución hacia un infarto establecido. Además de una posible lesión neurológica derivada directamente de la rotura mural del aneurisma o de un hematoma secundario al sangrado, alrededor del 20-30% de los pacientes con una hemorragia subaracnoidea aneurismática desarrollarán vasospasmo durante su curso evolutivo (27). El vasospasmo es causa de déficit neurológicos diferidos de origen isquémico, déficit agudos que también pueden derivarse de complicaciones posquirúrgicas asociadas al pinzado del aneurisma, a fenómenos tromboembólicos o al desarrollo de inflamación cerebral (16). En los pacientes en coma o sedados y sometidos a analgesia se hace necesaria la identificación de marcadores titulares capaces de detectar de forma precoz la aparición de isquemia cerebral. Con este objetivo, en los últimos años se han implantado catéteres de microdialísis y sensores de oximetría tisular en el parénquima cerebral, técnicas que si bien sólo ofrecen información sobre una determinada región cerebral, permiten disponer de una monitorización continua durante un período relativamente prolongado.

Los catéteres de microdialísis cerebral se implantan en el momento del ingreso del paciente o después de proceder al pinzado del aneurisma. La principal consideración metodológica que debe realizarse en este contexto es que el catéter debe ubicarse en el territorio cerebral irrigado por la arteria que contiene el aneurisma, y que debe evitarse su implantación en una zona «macroscópicamente» lesionada o en el seno de un hematoma (16, 28). Cuando el estudio angiográfico no demuestra la presencia de un claro aneurisma, algunos autores recomiendan que el catéter de microdialísis se coloque en relación con la zona en la que se aprecia un mayor acúmulo hemático (17).

Los resultados de los diversos estudios efectuados en pacientes con una hemorragia subaracnoidea que han detectado la aparición de isquemia cerebral secundaria muestran que los marcadores metabólicos más comunes son: a) disminución en el aporte de sustratos (glucosa y oxígeno); b) depleción de otros sustratos energéticos como el piruvato, y c) incremento del lactato, del glutamato, del índice lactato-piruvato y del glicerol (16, 28-30). Los incrementos en los niveles de lactato y glutamato se han mostrado como los cambios metabólicos más precoces y sensibles a la aparición de isquemia cerebral en los pacientes con hemorragia subaracnoidea. Estos cambios se siguen de un aumento en el índice lactato-piruvato y, en último término, de un aumento en la concentración de glicerol (16). Sin embargo, Sarrazadeh y cols. han observado que el índice lactato-piruvato es el marcador más sensible y específico (sensibilidad, 0,82; espe-

cularidad, 1,0) en la detección de isquemia tisular al realizar estudios de microdialísis combinados con PET cerebral en pacientes con hemorragia subaracnoidea (28).

Algunos autores consideran que el perfil dinámico de los diferentes metabolitos aporta una información más útil que el simple valor absoluto de cada uno de ellos. Skjold-Rasmussen y cols. observaron que cuando se produce un incremento del índice lactato: glucosa y del índice lactato: piruvato superior al 20 %, seguido de un incremento superior al 20 % en los niveles de glicerol, este patrón metabólico es capaz de predecir la aparición de un déficit neurológico o diferido con una sensibilidad del 94 %, y que estos cambios metabólicos pueden anticiparse hasta 11 horas a la aparición de los síntomas (17). Otros autores han demostrado períodos de hasta 20 horas entre la aparición de los cambios metabólicos referidos y el establecimiento de un déficit neurológico (16), lo que confirma la utilidad de la microdialísis cerebral en este tipo de pacientes.

En el ámbito clínico, los traumatismos craneoencefálicos constituyen la patología sobre la que se dispone de mayor experiencia en el uso de la microdialísis cerebral. En estos pacientes la inserción de uno o varios catéteres cerebrales ha permitido profundizar en diversos aspectos fisiopatológicos. Sabemos que un elevado porcentaje de pacientes neurotraumáticos presentan importantes incrementos en la concentración de lactato cerebral de forma precoz tras el traumatismo. En un estudio reciente practicado en nuestro centro (pendiente de publicación), el 81 % de las muestras del líquido extracelular del cerebro presentaban valores de lactato superiores a 2 mmol/l (31). Sin embargo, en el momento actual todavía no está bien establecido el porcentaje de ocasiones en que esta situación de hiperlactacidemia cerebral corresponde a una situación de incremento del metabolismo anaeróbico o de hipermetabolismo cerebral, secundario a la exacerbación del metabolismo de la glucosa por la vía aerobia. Estas dos posibilidades, metabólicamente antagónicas, pueden diferenciarse si se obtienen de forma simultánea los valores de piruvato y del índice lactato:piruvato.

El uso clínico de catéteres de microdialísis cerebral también ha permitido conocer la repercusión de las situaciones de hipoxia tisular, reconocidas por descensos de la presión tisular de oxígeno (P_{tiO_2}) por debajo de los umbrales críticos, sobre el metabolismo celular. Incluso antes del descenso de la P_{tiO_2} , Sarrafzadeh y cols. (32) detectaron de forma sistemática descensos significativos de la glucosa e incrementos del glutamato. A partir de estos resultados, estos autores sugieren que la identificación de estos fenómenos permite modificar algunas pautas terapéuticas, como reducir o retirar la hiperventilación del paciente (32). Del mismo modo, la aplicación de catéteres de microdialísis en el cerebro de pacientes con un traumatismo craneoencefálico ha permitido objetivar la repercusión metabólica de las situaciones de hiperglucemia (33). Cuando las cifras de glucemia superan los 15 mmol/l se produce un incremento del lactato intersticial (33).

La colocación de catéteres de microdialísis en regiones cerebrales de riesgo especial, como pueden ser las áreas colindantes a las contusiones cerebrales o las regiones adyacentes a hematomas subdurales evacuados, ha permitido confirmar la situación de vulnerabilidad que caracteriza a estas regiones tisulares del cerebro, que en ocasiones pueden ser muy extensas. Habitualmente, el parénquima cerebral adyacente a un hematoma subdural evacuado presenta importantes alteraciones en el metabolismo energético celular, así como incrementos patológicos del glicerol (34). Sin embargo, el hallazgo más importante es que el metabolismo tisular de estas regiones cerebrales se altera especialmente cuando aparecen fenómenos adversos, como descensos en la con-

centraci3n de hemoglobina, hiperventilaci3n y caídas en la presi3n arterial o en la presi3n de pefusi3n cerebral (34-36).

Otra aportaci3n de la microdiálisis cerebral en el contexto de los pacientes neurotraumáticos es el estudio de la repercusi3n de ciertas medidas terapéuticas como la evacuaci3n de lesiones (fig. 5-4), la hiperventilaci3n, la administraci3n de soluciones hiperosmolares, el coma barbitúrico o la hipotermia en el metabolismo cerebral de los pacientes con hipertensi3n intracraneal. La hiperventilaci3n intensa puede repercutir de forma muy negativa en el metabolismo tisular cerebral, especialmente en las regiones pericontusionales o adyacentes a un hematoma subdural evacuado. Hutchinson y cols. han observado que cuando el catéter cerebral se ubica en una regi3n aparentemente no lesionada, la hiperventilaci3n grave condiciona un incremento significativo en la fracci3n de extracci3n de oxígeno (estudios de PET), fenómeno que se asocia a una reducci3n de la glucosa tisular, sin que se produzca un incremento significativo del índice lactato/piruvato o del glutamato (37). En cambio, en regiones tisulares de riesgo especial, episodios breves de hiperventilaci3n pueden condicionar importantes repercusiones negativas en el metabolismo celular, en especial durante las primeras 24-36 horas tras el traumatismo (35).

Un aspecto que ha suscitado cierta polémica en la literatura médica ha sido el beneficio que podía ofrecer el aumento de la fracci3n inspirada de oxígeno sobre la P_{tO_2} y sobre el metabolismo celular del encéfalo. Diversos estudios han demostrado que el aumento en la fracci3n inspirada de oxígeno produce un incremento paralelo de la P_{tO_2} (38-40). El incremento en la disponibilidad tisular de oxígeno disuelto se ha acompañado de una reducci3n en los niveles de lactato tisular (38-40), por lo que algunos autores han sugerido que el aumento de oxígeno condiciona una desviaci3n hacia el

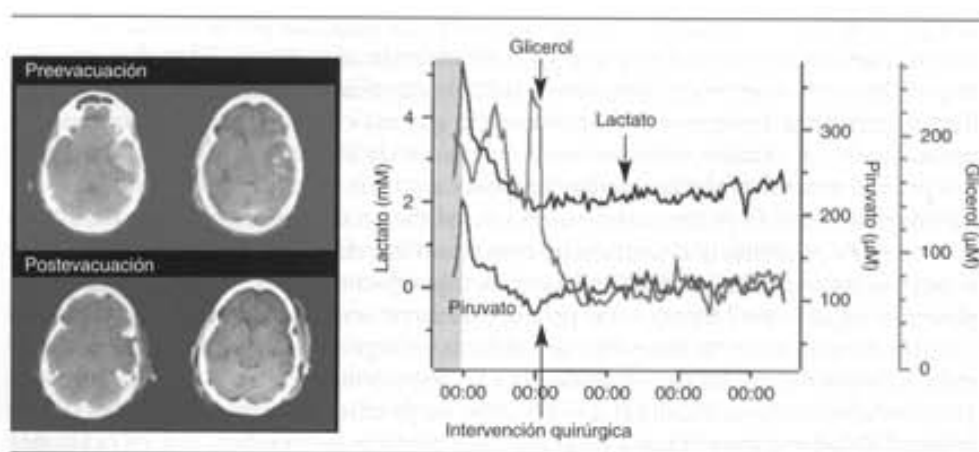


Figura 5-4. Repercusi3n de la evacuaci3n de una contusi3n cerebral sobre el metabolismo cerebral de un paciente con un traumatismo craneoencefálico grave. Después de la evacuaci3n de la lesi3n el glicerol desciende de forma importante, sugiriendo un menor «sufrimiento tisular» después de la cirugía y del descenso de la presi3n intracraneal.

metabolismo aerobio de la glucosa (39). Sin embargo, cuando se han realizado determinaciones simultáneas de lactato y piruvato se ha observado que el índice lactato/piruvato permanece constante, por lo que esta maniobra no parece mejorar el metabolismo oxidativo de la glucosa (38).

Por último, el uso de la microdialisis cerebral indica que debemos descartar algunas variables como las diferencias arterioyugulares de lactato (AVDL), que hasta hace poco tiempo incluíamos dentro del arsenal de neuromonitorización que aplicábamos a los pacientes neurocríticos. En el momento actual, la microdialisis cerebral constituye el estándar de referencia para conocer las concentraciones de lactato en el cerebro. La determinación simultánea del lactato cerebral a partir de un catéter de microdialisis y el cálculo de las AVDL nos ha permitido objetivar que no existe ningún tipo de correlación entre ambas variables (resultados pendientes de publicación) (31).

INDICACIONES Y PAUTAS RECOMENDADAS A PARTIR DE LA CONFERENCIA DE CONSENSO DE ESTOCOLMO (NOVIEMBRE DE 2002)

Después de un periodo inicial en el uso de la microdialisis cerebral en el ámbito clínico, se hacía necesario revisar las indicaciones recomendadas para los pacientes neurocríticos. Con el objetivo de intentar ayudar al clínico en este aspecto y establecer una serie de recomendaciones prácticas, en noviembre de 2002 se reunieron en el Instituto Karolinska de Estocolmo un grupo de expertos en la aplicación de microdialisis cerebral en el paciente neurocrítico. Es importante recordar que el peso que los instrumentos utilizados por la medicina basada en la evidencia otorgan a las conferencias de consenso es la de «opinión de expertos», por lo que estas recomendaciones deben catalogarse como recomendaciones de nivel III (41). Sin embargo, hasta que no dispongamos de unas mejores, estas recomendaciones pueden ser de gran utilidad para aquellos que decidan incorporar la microdialisis en la neuromonitorización de los pacientes neurocríticos. Los resultados de esta Conferencia de Consenso se encuentran pendientes de publicación, aunque fueron presentados por el Dr. U. Ungerstedt en Barcelona en noviembre de 2003 (42). Estas recomendaciones se detallan a continuación y aparecen resumidas en la figura 5-5.

De acuerdo con las sugerencias de esta Reunión de Consenso, los pacientes que más se beneficiarían de la incorporación de la microdialisis cerebral serían los que han presentado un traumatismo craneoencefálico o una hemorragia subaracnoidea. En ambos casos el objetivo de la monitorización con esta técnica sería el mismo: realizar una detección precoz de los cambios metabólicos que sugieran la aparición de isquemia tisular y monitorizar el efecto de las maniobras terapéuticas aplicadas. Las indicaciones específicas para ambas patologías también coinciden, recomendándose incluir la microdialisis cerebral en todos los pacientes graves (por tanto, con una puntuación igual o inferior a 8 en la Escala de Coma de Glasgow) que requieran la colocación de un sensor de PIC y una monitorización de la presión de perfusión cerebral (PPC). Los aspectos comunes para todos estos enfermos terminan con la recomendación de que nunca debe utilizarse la información obtenida durante la primera hora de monitorización (43).

Panel de expertos		Hemorragia subaracnoidea	Traumatismo craneoencefálico
M. B. Bejerling F. Carlais P. Erblang P. Hutchinson C. H. Nordstrom C. Robertson J. Saluquillo M. Smith N. Stockhoff U. Ungerstedt A. Umerberg N. Videndal-Olsen	Indicaciones	Pacientes graves + PIC + PPC	
	Cateteres	Territorio vascular de riesgo	Lesión difusa: 1 catéter frontal derecho Lesión focal: 2 cateteres, uno en tejido no lesionado y otro en zona de penumbra
	Valores	Despreciar los valores de la primera hora de monitorización	
	Metabolitos	Glutamato Índice lactato/piruvato	Índice lactato/piruvato glucosa/glicerol-glutamato

Figura 5-5. Resumen de las indicaciones y pautas recomendadas a partir de la Conferencia de Consenso de Estocolmo (noviembre de 2002) sobre la aplicación clínica de la microdialísis en los pacientes neurocríticos. PIC, presión intracraneal; PPC, presión de perfusión cerebral.

Los aspectos diferenciales en el uso de microdialísis cerebral en los pacientes que han presentado un traumatismo craneoencefálico o una hemorragia subaracnoidea se centran en la ubicación de los catéteres cerebrales y en la relación de analitos recomendados en cada patología. En los traumatismos craneoencefálicos deberían colocarse uno o dos catéteres cerebrales en función del tipo de lesión. En las lesiones difusas se recomienda la implantación de un único catéter cerebral en la región frontal derecha. En las lesiones focales se recomienda la colocación de dos catéteres, uno en una región cerebral macroscópicamente no lesionada y el segundo en una zona de penumbra. Consideramos «zona de penumbra» el territorio cerebral que rodea a una lesión focal y que se encuentra en una situación de alto riesgo (43-45). El grupo de expertos de esta reunión consideró que la información que puede obtenerse de la implantación de un catéter adicional en el seno de una lesión establecida no es relevante para el manejo terapéutico del enfermo. En los pacientes con una hemorragia subaracnoidea se recomienda la colocación de un único catéter cerebral, aunque debe implantarse en el territorio vascular de mayor riesgo. Los analitos recomendados y la importancia relativa de cada uno de ellos en ambas patologías es la siguiente: a) hemorragia subaracnoidea: glutamato e índice lactato/piruvato, y b) traumatismo craneoencefálico: índice lactato/piruvato, glucosa, glicerol y glutamato (42).

LIMITACIONES Y COMPLICACIONES DE LA MICRODIALÍISIS CEREBRAL

Entre las limitaciones de la microdialísis cerebral debe citarse el hecho ya conocido de que se trata de un sistema de monitorización local, que puede no detectar estados metabólicos que tengan lugar en puntos alejados a la localización del catéter. Además, en

funció de la duració de la monitorització se han descrit fenòmens de inflamació local que poden dificultar el pas de molècules desde el espació intersticial al catèter de microdiàlisis (46). No obstant, se ha confirmat que este fenomen carece de relevància clínica durante la primera semana de monitorització (46, 47).

El índex de complicacions atribuïdo a este sistema de monitorització en las diferentes series publicadas ha sido muy inferior al que se asocia a la colocació de un sensor de PIC. Los catèteres de microdiàlisis cerebral son extremadamente finos (0,62 mm de diámetro externo), lo que reduce al mínimo la posibilidad de lesión cerebral. No se han descrito complicaciones hemorrágicas significativas ni infecciones atribuibles a la microdiàlisis cerebral (17, 48, 49), probablemente porque se trata de un circuito cerrado que no se manipula durante el tiempo que dura la monitorització. Las fracturas del catèter o de la membrana de microdiàlisis se deben casi siempre a una mala manipulación del sistema y disminuyen al finalizar la curva de aprendizaje de cada centro.

CONCLUSIONES

La microdiàlisis cerebral es una técnica extremadamente sensible que puede aportar una información metabólica precoz sobre el establecimiento de una lesión tisular. Esta técnica aporta una información muy superior a la de cualquier otro sistema de monitorització. A pesar de su innegable posición en el ámbito de la investigación hasta hace poco tiempo, con toda probabilidad su uso va a generalizarse en los próximos años, aportando nuevos conocimientos que permitan profundizar en la fisiopatología de los pacientes neurocrítics, así como actuar de manera más efectiva en su tratamiento. Los interesados en adquirir información adicional sobre los últimos avances de este nuevo sistema de monitorització pueden consultar, entre otras fuentes, la página web del Dr. Ungerstedt y cols. (www.microdialysis.com).

Agradecimientos

Agradecemos a todo el personal de enfermería de la Unidad de Cuidados Intensivos de neurotraumatología del Hospital Universitario de Vall d'Hebron su inestimable colaboración en la aplicación de la microdiàlisis cerebral en los pacientes neurocrítics tratados en esta unidad. Este trabajo ha sido parcialmente financiado por la beca del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social ES 00-05827, por la Red Temática de Investigación Cooperativa de Enfermedades Neurológicas (Red CIEN, C3-06) y por el proyecto europeo Rapid Stroke Marker Detection via nanosensors utilizing labelless electrochemical and resonant mass detection (SMILE), Q1K6-CT-2002-05833.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bito L, Davson H, Levin E, Murray M, Studer N. The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain, and blood plasma of the dog. *J Neurochem* 1966; 13: 1057-1067.

2. Gaddum JH. Push-pull cannulae. *J Physiol* 1967; 155: 1-2.
3. Delgado JM, Delgado-FV, Roth RH, Ryugo DK, Marota BM. Dialyde for long term intra cerebral perfusion in awake monkeys. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1972; 198: 9-21.
4. Ungerstedt U. Microdialysis: principles and applications for studies in animals and man. *J Intern Med* 1991; 230: 365-373.
5. Ungerstedt U, Pycock C. Functional correlates of dopamine neurotransmission. *Bell Schweiz Akad Med Wiss* 1974; 30: 44-55.
6. Meyerson BA, Linderoth B, Karlsson H, Ungerstedt U. Microdialysis in the human brain: extracellular measurements in the thalamus of parkinsonian patients. *Life Sci* 1990; 46: 301-308.
7. Hutchinson PJ, O'Connell MT, Kirkpatrick PJ, Pickard JD. How can we measure substrate, metabolite and neurotransmitter concentrations in the human brain? *Physiol Meas* 2003; 23: R75-109.
8. Bullock R, Zanner A, Woodward JJ y cols. Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. *J Neurosurg* 1998; 89: 507-518.
9. Coles JP. Regional ischemia after head injury. *Curr Opin Crit Care* 2004; 10: 120-125.
10. Katayama Y, Kawamata T, Maeda T, Tsubokawa T. Free latic acid liberation and cellular swelling during cerebral ischemia: The role of excitatory amino acids. *Acta Neurochir (Suppl)* 1994; 60: 242-245.
11. Bullock MR, Lyeth BG, Muzelaa JP. Current status of neuroprotection trials for traumatic brain injury: lessons from animal models and clinical studies. *Neurosurgery* 1999; 45: 207-217.
12. Maas AI, Steyerberg FW, Murray GD y cols. Why have recent trials of neuroprotective agents in head injury failed to show convincing efficacy? A pragmatic analysis and theoretical considerations. *Neurosurgery* 1999; 44: 1286-1298.
13. Hutchinson PJ, O'Connell MT, Al Rawi PG y cols. Clinical cerebral microdialysis: a methodological study. *J Neurosurg* 2000; 93: 37-43.
14. Hutchinson PJ, O'Connell MT, Al Rawi PG y cols. Clinical cerebral microdialysis: determining the true extracellular concentration. *Acta Neurochir Suppl* 2002; 81: 359-362.
15. Remstrup P, Stahl N, Møllergaard P, Uski T, Ungerstedt U, Nordström CM. Intra-cerebral microdialysis in clinical practice: baseline values for chemical markers during wakefulness, anesthesia, and neurosurgery. *Neurosurgery* 2000; 47: 701-709.
16. Sarrafzadeh A, Haue D, Sakowitz O y cols. Acute focal neurological deficits in aneurysmal subarachnoid hemorrhage: relation of clinical course, CT findings, and metabolite abnormalities monitored with bedside microdialysis. *Stroke* 2003; 34: 1382-1388.
17. Skjold-Basmetten J, Schulz M, Kristensen SR, Bjerre P. Delayed neurological deficits determined by an ischemic pattern in the extracellular cerebral metabolites in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 2004; 100: 8-15.
18. Bonne-Lingstrom E, Cesarini EG, Enblad P y cols. Intracerebral microdialysis in neuro-intensive care: the use of inositol as an endogenous reference compound. *J Neurosurg* 2001; 94: 397-402.
19. Strandberg J, Tommroth P. Validation of an endogenous reference technique for the calibration of microdialysis catheters. *Scand J Clin Lab Invest* 2000; 60: 205-211.
20. Berger C, Amcke A, Aschoff A, Spranger M, Schwab S. Neurochemical monitoring of fatal middle cerebral artery infarction. *Stroke* 1999; 30: 460-463.
21. Berger C, Schätzl WR, Georgiadis D, Semler T, Aschoff A, Schwab S. Effects of hypothermia on excitatory amino acids and metabolism in stroke patients: a microdialysis study. *Stroke* 2002; 33: 519-524.
22. Enblad P, Ezykholer P, Valtysson J y cols. Multiple cerebral artery occlusion and reperfusion in primates monitored by microdialysis and sequential positron emission tomography. *Stroke* 2001; 32: 1574-1580.
23. Bosche B, Dohmen C, Graf B y cols. Extracellular concentrations of mono-transmitter amino

- acids in perinatal tissue of patients predict malignant middle cerebral artery infarction. *Stroke* 2003; 34: 2908-2913.
24. Dolmisi C, Boscato B, Graf R y cols. Prediction of malignant course in MCA infarction by PET and microdialysis. *Stroke* 2003; 34: 2152-2158.
 25. Toyota S, Graf R, Valentini M, Yoshimine T, Hesse WD. Malignant infarction in cats after prolonged middle cerebral artery occlusion: glutamate elevation related to decrease of cerebral perfusion pressure. *Stroke* 2002; 33: 1383-1391.
 26. Schweser S, Grand M, Stahl E y cols. Predictive value of neurochemical monitoring in large middle cerebral artery infarction. *Stroke* 2001; 32: 1863-1867.
 27. Kassell NF, Sasaki T, Colohan AR, Nazar G. Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 1985; 16: 562-572.
 28. Serratizadeh AS, Hauck D, Ludeemann L y cols. Cerebral ischemia in aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a correlative microdialysis-PET study. *Stroke* 2004; 35: 638-643.
 29. Johnston AJ, Gupta AK. Advanced monitoring in the neurology intensive care unit: microdialysis. *Curr Opin Crit Care* 2002; 8: 171-177.
 30. Kerr White R, Hutchinson PJ, Al Rawi PG, Gupta AK, Pickard JD, Kirkpatrick PJ. Adverse cerebral events detected after subarachnoid hemorrhage using brain oxygen and microdialysis probes. *Neurosurgery* 2002; 50: 1213-1221.
 31. Boca MA, Salasquillo J, Mena MP, Vilalta A, Ibañez J, Garrachó A. Arterio-venular differences of lactate (AVDL) and the lactate: oxygen index are not reliable indicators of increased brain anaerobic metabolism in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* (En prensa).
 32. Serratizadeh AS, Sakowitz GW, Calsen TA, Lanksch WR, Unterberg AW. Detection of secondary insults by brain tissue pCO₂ and bedside microdialysis in severe head injury. *Acta Neurochir Suppl* 2002; 81: 319-321.
 33. Diaz Parejo P, Stahl N, Xu W, Reinstrup P, Ungerstedt U, Nordström CH. Cerebral energy metabolism during transient hyperglycemia in patients with severe brain trauma. *Intens Care Med* 2003; 19: 544-550.
 34. Stahl N, Schalen W, Ungerstedt U, Nordström CH. Bedside biochemical monitoring of the penumbra zone surrounding an evacuated acute subdural haematoma. *Acta Neurol Scand* 2003; 108: 211-215.
 35. Marion DW, Puccio A, Wisniewski SR y cols. Effect of hyperventilation on extracellular concentrations of glutamate, lactate, pyruvate, and local cerebral blood flow in patients with severe traumatic brain injury. *Crit Care Med* 2002; 30: 2619-2625.
 36. Nordström CH, Reinstrup P, Xu W, Gardentors A, Ungerstedt U. Assessment of the lower limit for cerebral perfusion pressure in severe head injuries by bedside monitoring of regional energy metabolism. *Anesthesiology* 2003; 98: 809-814.
 37. Hutchinson PJ, Gupta AK, Fryer DJ y cols. Correlation between cerebral blood flow, substrate delivery, and metabolism in head injury: a combined microdialysis and triple oxygen position emission tomography study. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 735-745.
 38. Magnus S, Ghisani E, Loatelli M y cols. Lack of improvement in cerebral metabolism after hyperoxia in severe head injury: a microdialysis study. *J Neurosurg* 2003; 98: 952-958.
 39. Menzel M, Dopppenberg EM, Zacher A, Sankup J, Benner MM, Bullock R. Increased inspired oxygen concentration as a factor in improved brain tissue oxygenation and tissue lactate levels after severe human head injury. *J Neurosurg* 1999; 91: 1-10.
 40. Romer M, Barth A, Rothén HU, Schaller B, Takala J, Seiler RW. Effects of cerebral perfusion pressure and increased fraction of inspired oxygen on brain tissue oxygen, lactate and glucose in patients with severe head injury. *Acta Neurochir (Wien)* 2003; 145: 341-349.
 41. Bullock R, Chesnut RM, Clifton GL y cols. Guidelines for the management of severe head injury. Brain Trauma Foundation, American Association of Neurological Surgeons, Joint Section on Neurotrauma and Critical Care. *J Neurotrauma* 1996; 13: 631-734.
 42. Ungerstedt H. Microdialysis in neurointensive care. Results of a consensus conference on

- how and when to use it. X Simposium de monitorizació de la pressió intracraneal y de la hemodinàmica cerebral. Barcelona, noviembre de 2003.
43. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999; 22: 391-397.
 44. Gemetzli TA. The pathobiology of traumatic brain injury. *Neuroscientist* 1997; 3: 73-81.
 45. Salinasillo J, Peka MA, Amorós S. Current aspects of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury. *Curr Pharm Des* 2001; 7: 1475-1503.
 46. Benveniste H, Diemer NH. Cellular reactions to implantation of a microdialysis tube in the rat hippocampus. *Acta Neuropathol (Berl)* 1987; 74: 234-238.
 47. Wattle IB, Glasby M, Lammie A, Bell H, Ungerstedt U. Neuropathological findings after intracerebral implantation of microdialysis catheters. *Neuroreport* 1998; 9: 2821-2825.
 48. Meiswenger J, Katze E, Baresay F, Vaeth A, Roosen K. Clinical cerebral microdialysis, brain metabolism and brain tissue oxygenation after acute brain injury. *Neuro Res* 2001; 23: 801-806.
 49. Sarrafzadeh AS, Keenan KL, Callen TA, Unterberg AW. Metabolic changes during impending and manifest cerebral hypoxia in traumatic brain injury. *Br J Neurosurg* 2003; 17: 340-346.

- ❖ **Lack of utility of arteriojugular venous difference of lactate as a reliable indicator of increased brain anaerobic metabolism in traumatic brain injury. J Neurosurg 106:530-537;2007. Revista. Abril 2008.**

Lack of utility of arteriojugular venous differences of lactate as a reliable indicator of increased brain anaerobic metabolism in traumatic brain injury

MARIA A. POCA, M.D., PH.D.,^{1,2} JUAN SAHUQUILLO, M.D., PH.D.,^{1,2} ANNA VILALTA,²
AND ANGEL GARNACHO, M.D.^{2,3}

¹Department of Neurosurgery, ²Neurotraumatology Research Unit, and ³Neurotraumatology Intensive Care Unit, Vall d'Hebron University Hospital and Vall d'Hebron Research Institute, Autonomous University of Barcelona, Spain

Object. Ischemic lesions are highly prevalent in patients with traumatic brain injuries (TBIs) and are the single most important cause of secondary brain damage. The prevention and early treatment of these lesions is the primary aim in the modern treatment of these patients. One of the most widely used monitoring techniques at the bedside is quantification of brain extracellular level of lactate by using arteriojugular venous differences of lactate (AVDL). The purpose of this study was to determine the sensitivity, specificity, and predictive value of AVDL as an indicator of increases in brain lactate production in patients with TBIs.

Methods. Arteriojugular venous differences of lactate were calculated every 6 hours using samples obtained through a catheter placed in the jugular bulb in 45 patients with diffuse head injuries (57.8%) or evacuated brain lesions (42.2%). Cerebral lactate concentration obtained with a 20-kD microdialysis catheter implanted in undamaged tissue was used as the de facto gold standard.

Six hundred seventy-three AVDL determinations and cerebral microdialysis samples were obtained simultaneously; 543 microdialysis samples (81%) showed lactate values greater than 2 mmol/L, but only 21 AVDL determinations (3.1%) showed an increase in brain lactate. No correlation was found between AVDL and cerebral lactate concentration ($\rho = 0.014$, $p = 0.719$). Arteriojugular venous differences of lactate had a sensitivity and specificity of 3.3 and 97.7%, respectively, with a false-negative rate of 96.7% and a false-positive rate of 2.3%.

Conclusions. Arteriojugular venous differences of lactate do not reliably reflect increased cerebral lactate production and consequently are not reliable in ruling out brain ischemia in patients with TBIs. The clinical use of this monitoring method in neurocritical care should be reconsidered.

KEY WORDS • traumatic brain injury • ischemia • brain metabolism • lactate • microdialysis

THE optimal treatment of patients with a TBI requires continuous monitoring of ICP combined with collection of additional information on CBF and metabolism.^{17,18} According to the Fick principle, CBF can be estimated at the bedside by using AVDO₂.^{10,43} Brain metabolism can be monitored by using cerebral microdialysis techniques to measure cerebral lactate and pyruvate production, glucose levels, and brain tissue PO₂ levels to determine O₂ availability.^{13,41,52,59} Brain lactate production has also been measured in clinical practice by using AVDL, which can easily be determined by placing the tip of a retrograde jugular catheter in the jugular bulb.

Abbreviations used in this paper: AVDL = arteriojugular venous differences of lactate; AVDO₂ = AVD of O₂; BBB = blood–brain barrier; CBF = cerebral blood flow; CI = confidence interval; CT = computed tomography; GCS = Glasgow Coma Scale; ICP = intracranial pressure; ICU = intensive care unit; LOI = lactate-O₂ index; SaO₂ = arterial O₂ saturation; SjO₂ = jugular O₂ saturation; TBI = traumatic brain injury.

In the normoxic mammalian brain, more than 95% of adenosine 5'-triphosphate is derived from aerobic glucose oxidation, and lactate production accounts for less than 4% of metabolized glucose.²¹ According to traditional thinking, excessive production of lactate in the brain has been considered to indicate failing energy metabolism and consequently ischemic or nonischemic brain tissue hypoxia. Subsequently, in the presence of anaerobic brain metabolism, lactate and the lactate/pyruvate ratio are among the first metabolic markers to increase. Increases in cerebral lactate levels have also been related to neurological outcomes both in experimental models of brain injury and in clinical studies.

In classic thinking it has also been accepted that cerebral anaerobic metabolism can be studied at the bedside using AVDL and LOI.^{40,42,43} The LOI is obtained from the ratio between AVDL and AVDO₂ (both measured in $\mu\text{mol/ml}$) according to the equation: $\text{LOI} = -[\text{AVDL}] / \text{AVDO}_2$. Robertson and colleagues⁴³ have considered LOI values of at least 0.08 as indicative of an ischemia/infarction pattern. In

Monitoring cerebral lactate production in TBI using AVDL

a retrospective analysis of AVDL and LOI in 43 patients with a TBI or spontaneous subarachnoid hemorrhage, Artru and associates³ have found that AVDL above the threshold of 0.300 mmol/L was correlated with areas of hypodense lesions seen on the CT scan.

However, because lactate is transported across the BBB and across the neuron and astrocytic membranes by a monocarboxylate transporter,³⁸ the reliability of using AVDL and LOI to monitor brain anaerobic metabolism is highly questionable. There are theoretical reasons as well as experimental and clinical evidence to suggest that the quantities of lactate reaching the jugular blood are probably not representative of levels in the brain and are therefore unreliable for use in the diagnosis of brain tissue hypoxia and, consequently, as a guide to patient treatment at the bedside.¹

The purpose of this study was to determine the sensitivity, specificity, and predictive values of AVDL and LOI in detecting increases in brain lactate production, by correlating AVDL values with extracellular lactate concentrations obtained by microdialysis, considered the de facto gold standard. This method was chosen because currently it provides the most accurate and reliable information on cerebral production of lactate. Our main hypothesis was that because of the kinetics of lactate transport through the BBB and brain membranes, the reliability of AVDL and LOI values in monitoring anaerobic metabolism should be very low.

Clinical Material and Methods

The protocol of the study was approved by the Institutional Ethical Committee on Human Research of Vall d'Hebron University Hospitals (PR [HG] 25/98). Consent was obtained from the patient's next of kin after the nature of the procedure had been fully explained.

Patient Population

Between September 1999 and January 2002, a prospective study was conducted involving 45 patients, 31 with a severe head injury (postresuscitation GCS score \leq 8) and 14 with a moderate head injury. Moderate head injury was defined as a postresuscitation GCS score between 9 and 13. All patients were admitted to a 10-bed neurotrauma ICU.

General Medical Treatment and Monitoring Protocol

The general treatment of head-injured patients followed a collaborative multicenter protocol⁴⁴ and was based on the guidelines for the management of severe head injuries proposed by the Brain Trauma Foundation.² This protocol emphasizes prompt evacuation of intracranial mass lesions and prevention of secondary ischemic events. In all patients, continuous sedation and analgesia were induced and maintained by continuous infusion of midazolam and morphine. Further treatment to control high ICP included muscular paralysis using vecuronium, optimized hyperventilation (with continuous monitoring of S_jO_2), and intermittent boluses of mannitol and/or 7.2% hypertonic saline.²⁶ Barbiturates, decompressive craniotomy, and/or hypothermia (32–33°C) were used only if all previous therapeutic maneuvers failed to control high ICP.

In addition to routine systemic monitoring, an intrapar-

enchymal ICP sensor (Model 110-4B, Camino Laboratories) was implanted in the most severely damaged hemisphere in all patients.⁴⁵ A probe for continuous monitoring of brain tissue PO_2 (GMS) and a microdialysis catheter to measure extracellular lactate concentrations (CMA-70, CMA Microdialysis) were inserted in the less damaged hemisphere without contact with any hemorrhagic or hypodense lesions (confirmed by the control CT scans). In all patients, a 30-mm control microdialysis catheter (CMA-60, CMA Microdialysis) was inserted in the periumbilical subcutaneous adipose tissue to help in interpretation of intracerebral microdialysis data.¹⁵ Cerebral microdialysis and brain tissue PO_2 monitoring were started on admission to the ICU and, when possible, were continued for at least 5 days.

Arteriojugular venous differences of O_2 , AVDL, and LOI were calculated every 6 hours using the values measured through a retrograde jugular catheter inserted in the predominant jugular vein, which was identified by compressing both jugular veins and observing the induced increase in ICP. This maneuver was performed with the patient relaxed and sedated, and compression was applied for a short time. The correct position of the catheter tip in the jugular bulb was verified daily by using imaging.

Microdialysis Procedure

The cerebral microdialysis catheter was inserted in the frontal subcortical white matter using a percutaneous technique (catheter inserted 10 cm from the nasion and 3 cm from the midline) with the catheter tunneled subcutaneously.³⁵ In patients who underwent surgery, the catheter was inserted by the surgeon under direct vision. The CMA-70 probe has a 10-cm flexible shaft and a 10-mm membrane length with a 20,000-D cutoff. For microdialysis in the central nervous system, isotonic and sterile perfusion fluid containing 147 mmol/L Na^+ , 1.2 mmol/L $CaCl_2$, 2.7 mmol/L KCl , and 0.85 mmol/L $MgCl_2$ was perfused at a flow rate of 0.30 μ l/minute by using a microdialysis pump (CMA-106, CMA Microdialysis). The subcutaneous CMA-60 abdominal catheter was perfused at the same rate and with sterile perfusion fluid containing 147 mmol/L Na^+ , 2.3 mmol/L Ca^{++} , 4 mmol/L K^+ , and 156 mmol/L Cl^- . Microdialysis samples from both the brain and subcutaneous tissue were analyzed hourly at the bedside by the nurse in charge of the patient by using a microdialysis analyzer (CMA-600, CMA Microdialysis). A research fellow was in charge of collecting data from the microdialysis analyzer by using commercially available software (ICUpilot, CMA Microdialysis) and was also responsible for quality control for the microdialysates that were obtained. Microdialysates from the first 2 hours of monitoring were discarded and were not used for analysis because the first 2 hours of monitoring were used for stabilization of the monitoring system.

The position of the microdialysis catheter was checked using a control CT scan. In most patients we used first-generation radiotransparent catheters. To check the position of the cerebral catheter, air was infused for 1 hour with the micropump before catheter removal, and a CT scan was obtained shortly after finishing infusion (Fig. 1). In the most recently enrolled patients and when catheters with gold tips became commercially available, we checked their position

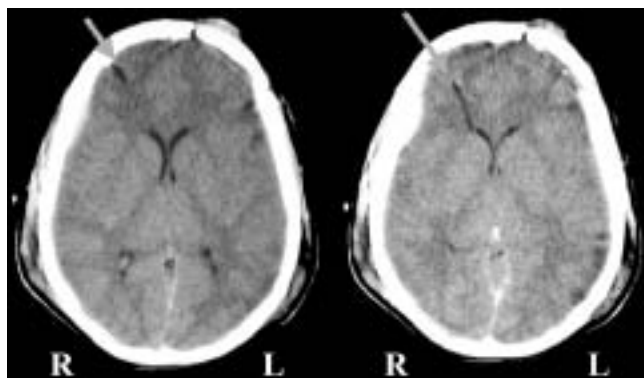


FIG. 1. Computed tomography scans obtained in a patient with an evacuated left frontal contusion. An intraparenchymatous ICP sensor was inserted into the left hemisphere; brain tissue PO₂ and microdialysis catheters were inserted in the right hemisphere. The arrows show the location of the microdialysis catheter, into which a small quantity of air was injected before removal.

by using a standard CT scan before catheter removal. Because the recovery rate of these catheters perfused at 0.30 $\mu\text{l}/\text{minute}$ is approximately 70%,¹⁴ cerebral lactate values higher than 2 mmol/L were considered indicative of increased lactate production.^{19,39,53}

Monitoring of AVDO₂, AVDL, and LOI

Arteriojugular venous differences of O₂ were calculated by using the following equation: $\text{AVDO}_2 = 1.34 \times \text{Hb} [(\text{SaO}_2 - \text{SjO}_2)/100]$, where Hb is arterial hemoglobin and SaO₂ and SjO₂ are the percentages of saturated oxyhemoglobin in the arterial and jugular bulb blood, respectively. Saturated oxyhemoglobin in the arterial blood and SjO₂ were measured by using a CO oximeter (Model 865, Chiron Diagnostics Corp.). In the first seven patients enrolled in this study, hemoglobin concentration was determined daily in the laboratory using flow cytometry. In the remaining patients, total hemoglobin concentration was simultaneously determined with the SaO₂ in the arterial sample using a CO oximeter module (800 series, Chiron Diagnostics Corp.). Arteriojugular venous differences of O₂ were expressed in micromoles per milliliter uncorrected for the patient's arterial PaCO₂.

Arteriojugular venous differences of lactate were calculated by subtracting the venous content from the arterial content of lactate. The arterial and jugular concentrations of lactate were obtained with the same analyzer, using a complementary biosensor that incorporates amperometric technology to measure lactate concentrations in very small samples. These differences were also expressed in micromoles per milliliter.

The normal range for AVDL was calculated by using data from the pivotal study by Gibbs and associates¹⁰ and was converted to micromoles per milliliter (Fig. 2).⁵⁰ The range of normality was defined as the 2.5 and 97.5 percentiles. According to this definition, the normal range of AVDL was considered to be between -0.42 and -0.03 $\mu\text{mol}/\text{ml}$. An AVDL of less than -0.420 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ was considered indicative of increased brain anaerobic metabolism. Lactate-O₂ index was calculated as the $-[\text{AVDL}]/\text{AVDO}_2$ ratio. According to the method described by Robertson et

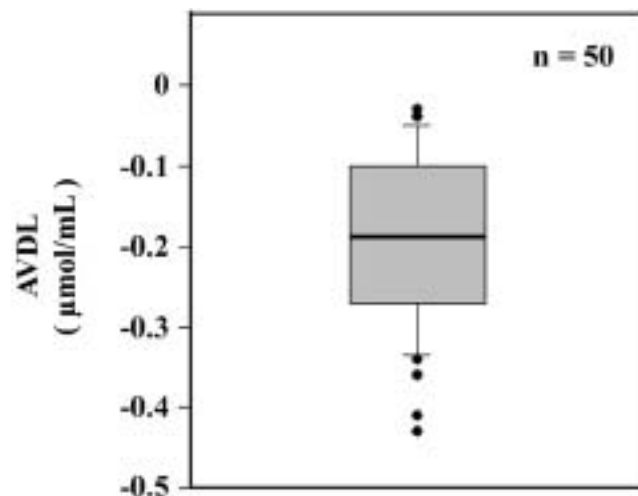


FIG. 2. Box-and-whisker plot showing the distribution of normal values of AVDL (values obtained from Gibbs et al.).

al.,^{42,43} values of LOI greater than or equal to 0.08 are indicative of increased anaerobic metabolism (Robertson's ischemia/infarction pattern), and values less than 0.08 are considered nonischemic. Arteriojugular venous differences of lactate and LOI values were calculated every 6 hours using arterial and jugular blood samples; these samples were then matched with the microdialysate obtained for the same hour, which contained the lactate recovered from the brain parenchyma for the previous hour. Consequently for each day of monitoring there was a maximum of four matched samples per patient.

Statistical Analysis

Unless stated otherwise, data are expressed as means \pm standard deviations. Normal and nonnormal distribution of the quantitative variables was determined by the Kolmogorov-Smirnov test, using commercially available statistical software (SigmaStat version 3.0 for Windows, SPSS Inc.). To determine whether a linear relationship existed between quantitative variables, the Pearson product-moment correlation coefficient was used with normally distributed variables and the Spearman rank coefficient (ρ) was used with nonnormally distributed variables. Probability values less than or equal to 0.05 indicated statistical significance.

The validity of AVDL and LOI in determining an increase in lactate in the extracellular compartment of the brain was analyzed by comparing this diagnostic method with extracellular lactate concentrations obtained by microdialysis, considered the de facto gold standard, and by establishing the sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of AVDL and LOI, with their respective 95% CIs. Sensitivity, specificity, and predictive values were calculated by using commercially available statistical software (StatsDirect version 2.3.3, StatsDirect Ltd.).

Results

Of the 45 patients, there were nine female and 36 male patients. The mean age of the entire group was 33 ± 15

Monitoring cerebral lactate production in TBI using AVDL

years (range 16–67 years). According to the classification of the Traumatic Coma Data Bank,²⁴ 58% of the patients had a diffuse brain injury Type II (31%), III (20%), or IV (7%), and 42% had an evacuated intracranial mass lesion. Table 1 shows additional clinical information.

Sensitivity and Specificity of AVDL and LOI

Six hundred seventy-three matched AVDL determinations and cerebral microdialysis samples were obtained in the 45 patients. Of the 673 brain microdialysis samples, 543 (81%) showed an extracellular lactate concentration higher than 2 mmol/L, whereas only 21 of the 673 AVDL determinations (3%) showed an increase in brain lactate (Table 2). When the cerebral lactate threshold was increased to 3 mmol/L, 328 of the 673 samples (49%) had an extracellular brain lactate level above this threshold. No correlation was found between AVDL measurements and extracellular lactate concentrations measured by cerebral microdialysis ($\rho = 0.014$, $p = 0.719$; Fig. 3). Of the 543 readings in which an increase in extracellular lactate was found by microdialysis (> 2 mmol/L), only 18 (3.3%) showed an increase in AVDL in the jugular bulb. Consequently AVDL readings were not useful in detecting increases in extracellular lactate in 96.7% of the readings (false negatives). The sensitivity (true-positive rate) of AVDL was only 3.3% (95% CI 1.98–5.19%), and the specificity (true-negative ratio) was 97.7% (95% CI 93.4–99.52%), with a false-negative rate of 96.7% and a false-positive rate of 2.3% (Table 2).

Six hundred seventy-three simultaneous LOI determinations and cerebral microdialysis samples were also ana-

TABLE 1
Clinical characteristics of 45 patients with TBI in whom the relationship between AVDL and brain lactate production was studied

Characteristic	No. of Patients (%)
initial GCS score	
3–8	31 (69)
9–12	14 (31)
cause of injury	
car accident	13 (29)
motorcycle accident	17 (38)
fall	13 (29)
suicide attempt	1 (2)
unknown	1 (2)
associated systemic lesions	
yes	21 (47)
no	24 (53)
preadmission insults	
hypoxia	14 (31)
hypotension	16 (36)
aspiration	6 (13)
cardiopulmonary arrest	0 (0)
extended Glasgow Outcome Scale category	
dead	15 (33)
vegetative state	0 (0)
lower severe disability	9 (20)
upper severe disability	2 (4)
lower moderate disability	5 (11)
upper moderate disability	6 (13)
lower good recovery	1 (2)
upper good recovery	7 (16)

TABLE 2
*Determinations of AVDL and cerebral lactate concentrations obtained by cerebral microdialysis in 673 samples from 45 patients with TBIs**

AVDL	No. of Samples		Total
	Cerebral Microdialysis Lactate > 2 mmol/L	Cerebral Microdialysis Lactate ≤ 2 mmol/L	
< -0.420 $\mu\text{mol/ml}$	18	3	21
≥ -0.420 $\mu\text{mol/ml}$	525	127	652
total	543	130	673

* The sensitivity of AVDL was 3.3% (95% CI 1.98–5.19%) and the specificity was 97.7% (95% CI 93.4–99.52%), with a false-negative rate of 96.7% and a false-positive rate of 2.3%.

lyzed. Of the 673 intracerebral microdialysis samples, 543 (81%) showed a lactate value of greater than 2 mmol/L, whereas 329 of the 673 LOI determinations (49%) corresponded to an ischemic pattern (Table 3). No correlation was found between LOI values and lactate values determined by cerebral microdialysis ($\rho = -0.009$, $p = 0.806$, Fig. 4). The sensitivity of LOI was 50.6% (95% CI 46.4–55.0%), and the specificity was 58.5% (95% CI 49.5–67.0%), with a false-negative rate of 49.4% and a false-positive rate of 41.5% (Table 3).

Predictive Value of AVDL and LOI

The positive predictive value of AVDL was 85.7% (95% CI 63.7–96.9%), and the negative predictive value was 19.5% (95% CI 16.5–22.7%). Consequently 85.7% of the readings that showed increased AVDL (≤ -0.420 $\mu\text{mol/ml}$) had increased extracellular levels of lactate in the microdialysates, while 19.5% of the AVDL readings within the normal range did not have increased lactate levels determined by microdialysis. Most (80.5%) of the AVDL readings within the normal range had increased extracellular levels of lactate detected by microdialysis. The positive predictive value of LOI was 83.6% (95% CI 79.0–87.3%), and its negative predictive value was 22.1% (95% CI 17.9–26.9%).

Discussion

Ischemic or nonischemic brain tissue hypoxia is highly prevalent in patients with severe head injuries and is the single most important cause of secondary brain damage.^{11,25} The prevention and early treatment of this condition is the primary aim in the modern management of these patients.⁴⁶ In the last few years, several bedside techniques for estimating CBF and brain metabolism have been developed. The most widely used monitoring techniques are jugular venous oximetry, near-infrared spectroscopy, transcranial Doppler ultrasonography, AVDL, monitoring of brain tissue PO_2 , and, more recently, the clinical application of cerebral microdialysis.^{17,18} Currently, measuring extracellular levels of lactate by microdialysis is considered the de facto gold standard for determining brain lactate. Experimental and clinical studies using cerebral microdialysis have demonstrated that ischemia is associated with a metabolic profile characterized by increased anaerobic glycolysis with decreased glucose and elevated lactate concentrations, as

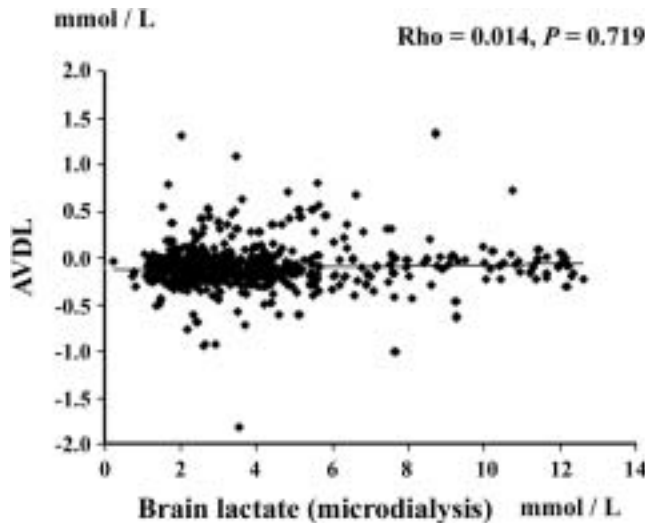


FIG. 3. Scatterplot demonstrating a nonsignificant correlation between AVDL values and brain lactate values obtained by cerebral microdialysis.

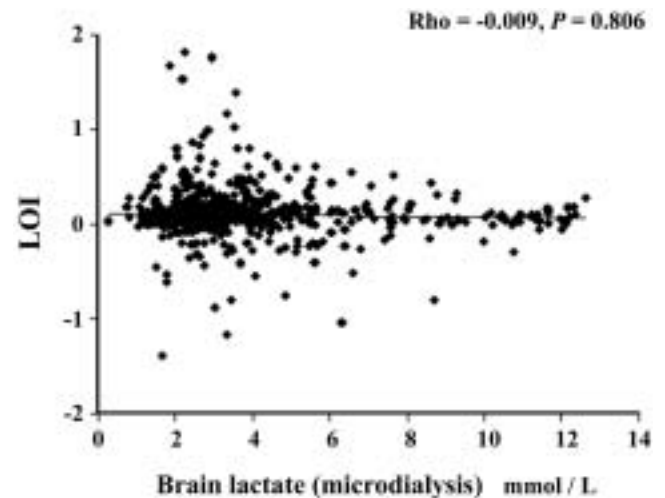


FIG. 4. Scatterplot showing a nonsignificant correlation between LOI values and brain lactate values obtained by cerebral microdialysis.

well as by an elevated lactate/pyruvate ratio in the extracellular fluid.^{13,41,48,59}

In both experimental and clinical studies, lactate has also been found to be increased in the jugular bulb and CSF after head injury.^{7,27,37,58} In a study of 21 patients with severe head trauma, different AVDL profiles were found in patients with high ICP; a correlation between AVDL and outcome was also found.²⁷ However, a close look at the data reveals that these authors did not define a normal AVDL threshold. In both the high ICP and low ICP groups, most AVDL readings were below 0.300, a normal range according to the range of normality reported by Gibbs et al.¹⁰ In addition, AVDL has been reported as failing to detect even large cerebral infarctions,⁸ which raises serious doubts about the ability of AVDL to detect excess lactate production in the brain.

The results of our study show that AVDL, and consequently AVDL-derived indices such as LOI, are not reliable indicators of increased extracellular lactate and therefore should be disregarded as monitoring tools at the bedside in the neurocritical patient. Our results are in agreement with those in the study performed by Vespa and associates.⁵⁶

These authors have found no correlation between levels of extracellular brain lactate measured by a CMA-70 probe in the white matter and levels of jugular lactate ($r = 0.02$ in 181 matched samples). In a study performed by our group, LOI was used to detect an apparent increase in anaerobic metabolism within the acute phase after TBI in half of the 28 patients studied.⁴⁶ In view of the results of the present study, our previous results should be considered unreliable and should be disregarded.

An interesting finding of the present study is that brain lactate is almost systematically increased within the first 72 hours of head injury. When a cerebral microdialysis catheter was inserted in the macroscopically noninjured hemisphere, lactate levels were higher than the normal limits established for the brain (2 mmol/L) in 81% of the samples. This was true even when we increased the lactate threshold to 3 mmol/L. However, simultaneous AVDL determinations revealed increased brain lactate concentrations in only 3% of the samples. The most plausible explanation for these discrepancies is that AVDL does not fulfill the main requirements for the Fick principle to be applied. There are several additional reasons to explain the exceptionally wide discrepancies between the two methods, including the intrinsic characteristics of each of the two methods (regional versus global monitoring systems), the possibility that the lactate produced in some cells is consumed in other cells rather than being eluted in the venous blood,¹ and the fact that patients with high arterial lactate levels can present a potential secondary transfer of lactates into the brain.^{5,6,51}

TABLE 3
Determinations of LOI and cerebral lactate concentrations obtained by cerebral microdialysis in 673 samples from 45 patients with TBIs*

LOI	No. of Samples		Total
	Cerebral Microdialysis Lactate > 2 mmol/L	Cerebral Microdialysis Lactate ≤ 2 mmol/L	
≥ -0.08	275	54	329
< -0.08	268	76	344
total	543	130	673

* The sensitivity of LOI was 50.6% (95% CI 46.4–55.0%) and the specificity was 58.5% (95% CI 49.5–67.0%), with a false-negative rate of 49.4% and a false-positive rate of 41.5%.

Metabolic Role of Lactate in the Brain

There are several classic and new metabolic concepts that could be useful for interpreting the results of our study. Glucose is the principal metabolic substrate of the mammalian brain. Aerobic glucose oxidation produces only a small quantity of lactate that can be detected in the extracellular space. Under physiological redox conditions, lactate can be converted to pyruvate in the cytoplasm through the action of lactate dehydrogenase; in the presence of active mito-

Monitoring cerebral lactate production in TBI using AVDL

chondrial oxidative phosphorylation, pyruvate is then fully oxidized to CO_2 and H_2O , a process yielding 36 adenosine 5'-triphosphate molecules per molecule of glucose.²³ However, the brain can use lactate as a substrate, as demonstrated by studies that have shown that the brain uses lactate during hypoglycemia or periods of elevated blood lactate.^{16,28} Other authors have introduced the hypothesis that under specific conditions a substantial part of the brain's energy comes from lactate oxidation. According to this hypothesis, lactate is produced by astrocytes and is then transferred to and used by active neurons.³⁴

An increasing amount of experimental and clinical data suggest that the metabolism of some glial cells is primarily glycolytic and that the lactate generated by these cells is transferred to the adjacent neurons as a substrate for their oxidative metabolism by what has been called the astrocyte-neuron lactate shuttle.^{22,33} Experimental and clinical evidence indicates that lactate may be a useful substrate for neurons. Moreover, *in vitro* studies have demonstrated that lactate can adequately maintain synaptic activity in the absence of glucose and sufficient O_2 supply.⁴⁹ *In vivo*, or when applied to *in vitro* preparations, lactate may be preferentially consumed aerobically, compared to glucose, particularly during periods of intense activity.^{20,23}

Microdialysis studies in rats⁹ and magnetic resonance imaging studies in humans⁴⁷ have indicated that physiological stimulation markedly increases lactate concentration, suggesting transient glycolytic processing of glucose during activation.²³ Consequently, lactate may play an additional metabolic role in the normally oxygenated brain, and increased brain extracellular lactate is not always indicative of brain tissue hypoxia. For an optimal diagnosis of an increase in anaerobic metabolism and of the redox state of the cell, ideally simultaneous information on pyruvate levels would be obtained and the lactate/pyruvate ratio calculated. Hillered and Persson¹² have already proposed that the lactate/pyruvate ratio might be a more reliable indicator of ischemia than lactate alone. However, the lactate/pyruvate ratio cannot be calculated from AVDL.

More recent findings from Vespa and colleagues⁵⁵ have introduced new data that can be used to further elucidate the significance of an increased lactate/pyruvate ratio. By simultaneously using cerebral microdialysis and positron emission tomography to study glucose and O_2 metabolism, these authors have found frequent episodes of an abnormally high lactate/pyruvate ratio (> 40) that did not correspond to ischemia shown on the positron emission tomography scan. These authors have also found a low incidence of posttraumatic regional and global ischemia. However, they have suggested that even in the absence of true ischemia, the brain is in metabolic crisis.⁵⁵ These findings complicate the significance of increased cerebral lactate production and lend support to the view that use of lactate alone, without pyruvate being taken into account, may be misleading in the diagnosis of anaerobic cerebral metabolism.

The Fick Principle and Transport of Lactate Across the BBB

For the Fick principle to be applied to any substance, the transfer of the substance across the BBB must be instantaneous, constant, and homogeneous.⁵⁷ When applied to the

brain, calculation of ADVO_2 is a reliable method for estimating CBF. The Fick principle can still be applied to CO_2 or to any other diffusible substance that acts as a tracer when added to the inflowing blood.⁵⁷ This principle requires that this tracer cross the barrier by simple diffusion. This is not the case with lactate, which needs the help of a transport system and consequently crosses the BBB not by simple diffusion but by facilitated diffusion. Consequently, the Fick principle cannot be applied to lactate as it is applied to O_2 or to CO_2 .^{29-32,36}

Since the 1950s lactate has been assumed to cross cell membranes via free diffusion of the unionized acid.³² Indeed, lactate and pyruvate can move across phospholipid membranes by free diffusion of the undissociated acid, but only if they are present at high concentrations or if the pH of the medium is low.⁴ However, at physiological concentrations, rates of lactate transfer are very slow.³⁶ This is because lactate uses a specific carrier-mediated mechanism for lactate/ H^+ cotransport.³⁶

Studies performed in the BBB have confirmed the presence of a specific transport mechanism for lactate, pyruvate, and β -hydroxybutyrate with mutual competition between different monocarboxylates.³⁰ The use of a saturable transporter explains why measurements of lactate released into jugular blood are not a reliable estimate of the quantity of lactate produced by the brain.

Controversies Surrounding Normal Values

Normal values of AVDL can be obtained from the classic study of Gibbs and associates,¹⁰ which included 50 healthy awake young male medical students aged 18 to 29 years. However, the definition of normal values of specific substances from the extracellular fluid is more controversial. Normal values for human extracellular brain lactate have been extrapolated from animal models, studies of patients with epilepsy or subarachnoid hemorrhage, and studies of patients who were undergoing neurosurgical interventions. In the latter, a microdialysis catheter was inserted in normal or minimally disturbed brain tissue.^{19,39} Although further studies are required, according to the research performed to date, the estimated normal levels of lactate in anesthetized human brain are 2 mmol/L or less, when using a 10-mm dialysis membrane and 0.30- $\mu\text{l}/\text{min}$ flow.^{19,39,53} However, as previously mentioned, values obtained by the microdialysis catheter may underestimate the true interstitial concentrations.³⁹

Controversies Surrounding Comparison of Global and Regional Monitoring Methods

One of the most important possible criticisms of our results is that catheters placed in the jugular bulb differ fundamentally from cerebral microdialysis catheters in the type of data provided. Arteriojugular venous differences of lactate—a global monitoring technique—may not reveal regions of increased lactate production if the increase in brain lactates generated by such areas is diluted and masked by the lactate concentrations coming from other relatively normal areas of the brain. In addition, with the use of a microdialysis catheter as a regional monitoring technique, it is possible to analyze the extracellular fluid of only a small amount of tissue. Thus, considerable, and possibly undetected, disturbances could occur far from the

catheter position. Equally, if the catheter is inserted near a contused area, the data provided may reflect the metabolic status of the abnormal area only, which may be very different from that found in most of the brain. However, in patients with diffuse brain injuries, without relevant contusions or other sizeable lesions, the metabolic information obtained by regional monitoring systems can be interpreted as indicative of the status of global metabolism if the method is correctly used and the catheter is placed in a macroscopically normal region.⁵⁴ In the present study, because all the patients had a diffuse brain injury or evacuated mass lesion, and the brain microdialysis catheter was inserted into macroscopically noninjured tissue, the discrepancies in the results observed between AVDL and microdialysis cannot be attributed to methodological problems, but instead reflect the inability of AVDL to indicate increased brain lactate production.

Conclusions

Arteriojugular venous differences of lactate values do not reliably reflect increased cerebral lactate production in brain-injured patients, and consequently LOI cannot be considered a reliable method for ruling out brain ischemia. In our study, AVDL values were evaluated by matching readings against microdialysates obtained hourly in a population of head-injured patients representative of those who are monitored in a neurotrauma center. Therefore, a microdialysis catheter should be inserted in the brain when lactate measurements are needed at the bedside for the management of these patients or for clinical research.

Acknowledgments

We thank Gail Craigie for correcting the manuscript and the nursing staff of the Neurotraumatology ICU for their assistance.

References

- Ames A III: CNS energy metabolism as related to function. **Brain Res Rev** **34**:42–68, 2000
- Anonymous: The Brain Trauma Foundation. The American Association of Neurological Surgeons. The Joint Section on Neurotrauma Critical Care. Management and prognosis of severe traumatic brain injury. Part I: guidelines for the management of severe traumatic brain injury. **J Neurotrauma** **17**:457–627, 2000
- Artru F, Dailler F, Burel E, Bodonian C, Grousson S, Convert J, et al: Assessment of jugular blood oxygen and lactate indices for detection of cerebral ischemia and prognosis. **J Neurosurg Anesthesiol** **16**:226–231, 2004
- Bakker EP, van Dam K: The movement of monocarboxylic acids across phospholipid membranes: evidence for an exchange diffusion between pyruvate and other monocarboxylate ions. **Biochim Biophys Acta** **339**:285–289, 1974
- Chen T, Qian YZ, Di X, Rice A, Zhu JP, Bullock R: Lactate/glucose dynamics after rat fluid percussion brain injury. **J Neurotrauma** **17**:135–142, 2000
- Chen T, Qian YZ, Di X, Zhu JP, Bullock R: Evidence for lactate uptake after rat fluid percussion brain injury. **Acta Neurochir Suppl** **76**:359–364, 2000
- Crockard HA, Taylor AR: Serial CSF lactate-pyruvate values as a guide to prognosis in head injury coma. **Eur Neurol** **8**:151–157, 1972
- Cruz J, Zager EL, Schnee CL, Gennarelli TA, Hoffstad OJ: Failure of jugular lactate determinations to disclose cerebral ischemia in posttraumatic cerebral infarction: case report. **J Trauma** **35**:805–807, 1993
- Fellows LK, Boutelle MG, Fillenz M: Physiological stimulation increases nonoxidative glucose metabolism in the brain of the freely moving rat. **J Neurochem** **60**:1258–1263, 1993
- Gibbs EL, Lennox WG, Nims LF, Gibbs FA: Arterial and cerebral venous blood arterial-venous differences in man. **J Biol Chem** **144**:325–332, 1942
- Graham DI, Ford DI, Adams JH, Doyle D, Teasdale GM, Lawrence AE, et al: Ischaemic brain damage is still common in fatal non-missile head injury. **J Neurol Neurosurg Psychiatry** **52**:346–350, 1989
- Hillered L, Persson L: Microdialysis for neurochemical monitoring in the human brain injury, in Tsubokawa T, Marmarou A, Robertson C, Teasdale G (eds): **Neurochemical Monitoring in the Intensive Care Unit. Microdialysis, Jugular Venous Oximetry, and Near-Infrared Spectroscopy**. Tokyo: Springer-Verlag, 1995, pp 59–63
- Hillered L, Persson L, Ponten U, Ungerstedt U: Neurometabolic monitoring of the ischaemic human brain using microdialysis. **Acta Neurochir (Wien)** **102**:91–97, 1990
- Hutchinson PJ, O'Connell MT, Al-Rawi PG, Maskell LB, Kett-White R, Gupta AK, et al: Clinical cerebral microdialysis: a methodological study. **J Neurosurg** **93**:37–43, 2000
- Hutchinson PJ, O'Connell MT, Maskell LB, Pickard JD: Monitoring by subcutaneous microdialysis in neurosurgical intensive care. **Acta Neurochir Suppl** **75**:57–59, 1999
- Ide K, Schmalbruch IK, Quistorff B, Horn A, Secher NH: Lactate, glucose and O₂ uptake in human brain during recovery from maximal exercise. **J Physiol** **522**:159–164, 2000
- Johnston AJ, Gupta AK: Advanced monitoring in the neurology intensive care unit: microdialysis. **Curr Opin Crit Care** **8**:121–127, 2002
- Kett-White R, Hutchinson PJ, Czosnyka M, Boniface S, Pickard JD, Kirkpatrick PJ: Multi-modal monitoring of acute brain injury. **Adv Tech Stand Neurosurg** **27**:87–134, 2002
- Langemann H, Alessandri B, Mendelowitsch A, Feuerstein T, Landolt H, Gratzl O: Extracellular levels of glucose and lactate measured by quantitative microdialysis in the human brain. **Neurol Res** **23**:531–536, 2001
- Larrabee MG: Lactate metabolism and its effects on glucose metabolism in an excised neural tissue. **J Neurochem** **64**:1734–1741, 1995
- Lutz PL, Nilsson GE: **The Brain Without Oxygen**. Austin, Texas: Landes Bioscience, 1997, pp 1–207
- Magistretti PJ, Pellerin L: Astrocytes couple synaptic activity to glucose utilization in the brain. **News Physiol Sci** **14**:177–182, 1999
- Magistretti PJ, Pellerin L: The cellular bases of functional brain imaging: evidence for astrocyte-neuron metabolic coupling. **The Neuroscientist** **3**:361–365, 1997
- Marshall LF, Marshall SB, Klauber MR, Van Berkum Clark M, Eisenberg HM, Jane JA, et al: A new classification of head injury based on computerized tomography. **J Neurosurg** **75** (Suppl): S14–S20, 1991
- Miller JD: Head injury and brain ischaemia—implications for therapy. **Br J Anaesth** **57**:120–130, 1985
- Munar F, Ferrer AM, de Nadal M, Poca MA, Pedraza S, Sahuquillo J, et al: Cerebral hemodynamic effects of 7.2% hypertonic saline in patients with head injury and raised intracranial pressure. **J Neurotrauma** **17**:41–51, 2000
- Murr R, Stummer W, Schurer L, Polasek J: Cerebral lactate production in relation to intracranial pressure, cranial computed tomography findings, and outcome in patients with severe head injury. **Acta Neurochir (Wien)** **138**:928–937, 1996
- Nemoto EM, Hoff JT, Severinghaus JW: Lactate uptake and metabolism by brain during hyperlactatemia and hypoglycemia. **Stroke** **5**:48–53, 1974
- Oldendorf WH: Brain uptake of metabolites and drugs following

Monitoring cerebral lactate production in TBI using AVDL

- carotid arterial injections. **Trans Am Neurol Assoc** **96**:46–50, 1971
30. Oldendorf WH: Carrier-mediated blood-brain barrier transport of short-chain monocarboxylic organic acids. **Am J Physiol** **224**: 1450–1453, 1973
 31. Pardridge WM, Connor JD, Crawford IL: Permeability changes in the blood-brain barrier: causes and consequences. **CRC Crit Rev Toxicol** **3**:159–199, 1975
 32. Pardridge WM, Oldendorf WH: Transport of metabolic substrates through the blood-brain barrier. **J Neurochem** **28**:5–12, 1977
 33. Pellerin L: Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation. **Neurochem Int** **43**:331–338, 2003
 34. Pellerin L, Pellegrini G, Bittar PG, Charnay Y, Bouras C, Martin JL, et al: Evidence supporting the existence of an activity-dependent astrocyte-neuron lactate shuttle. **Dev Neurosci** **20**:291–299, 1998
 35. Poca MA, Sahuquillo J, Vilalta A, De los Rios J, Robles A, Exposito L: Percutaneous implantation of cerebral microdialysis catheters by twist-drill craniostomy in neurocritical patients: description of the technique and results of a feasibility study in 97 patients. **J Neurotrauma** **23**:1510–1517, 2006
 36. Poole RC, Halestrap AP: Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. **Am J Physiol** **264**: C761–C782, 1993
 37. Prasad MR, Ramaiah C, McIntosh TK, Dempsey RJ, Hipkens S, Yurek D: Regional levels of lactate and norepinephrine after experimental brain injury. **J Neurochem** **63**:1086–1094, 1994
 38. Price NT, Jackson VN, Halestrap AP: Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. **Biochem J** **329**:321–328, 1998
 39. Reinstrup P, Stahl N, Mellergard P, Uski T, Ungerstedt U, Nordstrom CH: Intracerebral microdialysis in clinical practice: baseline values for chemical markers during wakefulness, anesthesia, and neurosurgery. **Neurosurgery** **47**:701–710, 2000
 40. Robertson CS: Anaerobic metabolism within the brain: its relationship to brain failure in head-injured patients, in Bihari D, Holaday JW (eds): **Update in Intensive Care and Emergency Medicine 9. Brain Failure**. Berlin: Springer-Verlag, 1989, pp 85–102
 41. Robertson CS, Gopinath SP, Uzura M, Valadka AB, Goodman JC: Metabolic changes in the brain during transient ischemia measured with microdialysis. **Neurol Res** **20** (1 Suppl):S91–S94, 1998
 42. Robertson CS, Grossman RG, Goodman JC, Narayan RK: The predictive value of cerebral anaerobic metabolism with cerebral infarction after head injury. **J Neurosurg** **67**:361–368, 1987
 43. Robertson CS, Narayan RK, Gokaslan ZL, Pahwa R, Grossman RG, Caram P Jr, et al: Cerebral arteriovenous oxygen difference as an estimate of cerebral blood flow in comatose patients. **J Neurosurg** **70**:222–230, 1989
 44. Sahuquillo J, Biestro A, Mena MP, Amoros S, Lung M, Poca MA, et al: [First tier measures in the treatment of intracranial hypertension in the patient with severe craniocerebral trauma. Proposal and justification of a protocol.] **Neurocirugia** **13**:78–100, 2002 (Spanish)
 45. Sahuquillo J, Poca MA, Arribas M, Garnacho A, Rubio E: Interhemispheric supratentorial intracranial pressure gradients in head-injured patients: are they clinically important? **J Neurosurg** **90**:16–26, 1999
 46. Sahuquillo J, Poca MA, Garnacho A, Robles A, Coello F, Godet C, et al: Early ischaemia after severe head injury. Preliminary results in patients with diffuse brain injuries. **Acta Neurochir (Wien)** **122**:204–214, 1993
 47. Sappey-Mariniere D, Calabrese G, Fein G, Hugg JW, Biggins C, Weiner MW: Effect of photic stimulation on human visual cortex lactate and phosphates using ¹H and ³¹P magnetic resonance spectroscopy. **J Cereb Blood Flow Metab** **12**:584–592, 1992
 48. Sarrafzadeh AS, Sakowitz OW, Lanksch WR, Unterberg AW: Time course of various interstitial metabolites following subarachnoid hemorrhage studied by on-line microdialysis. **Acta Neurochir Suppl** **77**:145–147, 2001
 49. Schurr A, West CA, Rigor BM: Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. **Science** **240**: 1326–1328, 1988
 50. Sood SC, Gulati SC, Kumar M, Kak VK: Cerebral metabolism following brain injury. II. Lactic acid changes. **Acta Neurochir (Wien)** **53**:47–51, 1980
 51. Tofteng F, Larsen FS: Monitoring extracellular concentrations of lactate, glutamate, and glycerol by in vivo microdialysis in the brain during liver transplantation in acute liver failure. **Liver Transpl** **8**:302–305, 2002
 52. Ungerstedt U: Microdialysis—principles and applications for studies in animals and man. **J Intern Med** **230**:365–373, 1991
 53. Ungerstedt U, Bellander BM, Nordstrom C: **Microdialysis in Neuromonitoring: Principles, Procedures and Interpretations**, 2000. (<http://www.microdialysis.se/pdf/ffiler/mdbook.pdf>) [Accessed 10 January 2007]
 54. Valadka AB, Furuya Y, Hlatky R, Robertson CS: Global and regional techniques for monitoring cerebral oxidative metabolism after severe traumatic brain injury. **Neurosurg Focus** **9**:E3, 2000
 55. Vespa P, Bergsneider M, Hattori T, Wu HM, Huang SC, Martin NA, et al: Metabolic crisis without brain ischemia is common after traumatic brain injury: a combined microdialysis and positron emission tomography study. **J Cereb Blood Flow Metab** **25**: 763–774, 2005
 56. Vespa PM, McArthur D, O'Phelan K, Glenn T, Etchepare M, Kelly D, et al: Persistently low extracellular glucose correlates with poor outcome 6 months after human traumatic brain injury despite a lack of increased lactate: a microdialysis study. **J Cereb Blood Flow Metab** **23**:865–877, 2003
 57. Weibel ER: **The Pathway for Oxygen. Structure and Function in the Mammalian Respiratory System**. Cambridge, MA: Harvard University Press, 1984
 58. Yang MS, DeWitt DS, Becker DP, Hayes RL: Regional brain metabolite levels following mild experimental head injury in the cat. **J Neurosurg** **63**:617–621, 1985
 59. Zauner A, Doppenberg EM, Woodward JJ, Choi SC, Young HF, Bullock R: Continuous monitoring of cerebral substrate delivery and clearance: initial experience in 24 patients with severe acute brain injuries. **Neurosurgery** **41**:1082–1093, 1997

Manuscript submitted February 14, 2006.

Accepted September 29, 2006.

This study was supported by Grant No. 00/0827 to Dr. Sahuquillo from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS) and Grant No. C3/06, nodo 11, to Hospital Universitario Vall d'Hebron from the Red Temática de Investigación Cooperativa de Enfermedades Neurológicas (RED CIEN) of the Fondo de Investigaciones Sanitarias.

Part of this study was presented at the 7th Congress of the Euro-academia Multidisciplinaria Neurotraumatologica, Newcastle, England, June 26–29, 2002.

Address reprint requests to: Juan Sahuquillo, M.D., Ph.D., Department of Neurosurgery, Vall d'Hebron University Hospital, Paseo Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. email: sahuquillo@neurotrauma.net.

❖ **Effects of normobaric hyperoxia on brain metabolism in the injured brain.** Article en preparació.

Effects of normobaric hyperoxia on brain metabolism in the injured brain

Anna Vilalta PhD¹; Juan Sahuquillo MD, PhD²;

Mari-Angels Merino, PhD¹; Maria-Antonia Poca MD, PhD².

1: Neurotraumatology and Neurosurgery Research Unit (UNINN); 2: Department of Neurosurgery, 3: Neurotraumatology Intensive Care Unit. Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Key words: hyperoxia, head injury, microdialysis, brain tissue oxygen pressure, brain metabolism.

Objective: to investigate the effects of 2 hours of normobaric hyperoxia on brain oxygenation and glucose metabolism in the early phase of severe and moderate traumatic brain injury (GCS < 14).

Design: Prospective study.

Setting: Neurotraumatology intensive care unit of a tertiary university hospital.

Patients: 31 severe or moderate traumatic brain injury (TBI) patients were monitored with a brain microdialysis catheter and a brain tissue oxygen sensor in non-injured brain tissue.

Interventions: Increase in fraction of inspired oxygen to 100% for two hours. 32 hyperoxia tests were performed. Blood samples were extracted prior to hyperoxia treatment and at the end of the hyperoxia.

Measurements and Main Results: The effects on several variables, which were obtained after two hours of normobaric hyperoxia, were later analyzed: glucose, lactate, Lactate/Pyruvate (L/P) ratio, brain tissue oxygen pressure (PtiO₂), arterial oxygen pressure (PaO₂), intracranial pressure, mean arterial blood pressure, cerebral perfusion pressure and pCO₂, each compared with those of baseline levels.

After hyperoxia treatment a significant increase in PtiO₂ and PaO₂ was found but it was not accompanied by a decrease in brain lactate or L/P ratio. We observed different patterns of lactate and L/P ratio response to hyperoxia with different frequencies. Only 4 patients were hypoxic at baseline and presented a decrease in lactate levels after hyperoxic challenge, although it was not significant. However in this subgroup of patients L/P ratio did not decrease after hyperoxia treatment.

Conclusion: Our results suggest that normobaric hyperoxia effects are not equal in all TBI patients and perhaps it might be only effective improving brain metabolism in a subgroup of patients, which should be better depicted in future studies.

INTRODUCTION

The management of severe severe traumatic brain injury (TBI) is based on the basic assumption that in patients who arrive to the hospital alive, most damage is delayed in time (secondary injuries) and that interventions directed to preventing and early treating secondary injuries can make a difference in survival and functional outcome¹. However, despite the many clinical trials that have targeted patients with a moderate or severe TBI, at present, there is no effective therapy in the treatment of these patients. The heterogeneity of TBI population has been proposed as one of the most important causes of the systematic failure of phase III clinical trials to show the effectiveness of many drugs with neuroprotective properties when tested in preclinical studies².

In the last decade, significant insight has been acquired in the underlying pathophysiology of TBI, the secondary lesions and the neurochemical cascades that acute injury puts in motion. Ischemic and non-ischemic tissue hypoxia are highly prevalent after severe TBI³. Direct assessment of brain tissue oxygen oxygen partial pressure (PtiO₂) with the use of polarographic Clark-type electrodes directly placed within the brain tissue is a widely used method of neuromonitoring. At the bedside, these devices allow the clinician to closely monitor PtiO₂, a good indicator of the balance between oxygen supply and consumption and therefore are useful to monitor the integrity of brain tissue metabolism.

In TBI, the oxygen flux from capillaries to the cell and later to the mitochondria can be altered by diffusion alterations an many different stages

of the oxygen delivery to the mitochondria⁴. The diffusion distance of the oxygen molecules from the capillaries to the cell is about 60 μm , but this distance is greater after TBI as a result of the intra- and extracellular edema induced by the tissular lesion⁵. Therefore theoretically, it may be beneficial for some patients to obtain greater oxygen pressures to increase the pressure drive and to provide a correct supply of oxygen to the brain.

Some authors have introduced the hypothesis whereby following brain edema, if the oxygen pressures are increased to levels higher than necessary to saturate arterial hemoglobin, an optimal gradient could be obtained, ameliorating mitochondrial oxygenation. Recent studies suggest that normobaric hyperoxia, which is easily achieved in mechanically ventilated patients, could be used as a potential treatment to improve brain oxygenation and consequently the metabolic disorders that follow TBI. Nevertheless, much controversy has been raised due to contradictory results obtained by different studies⁶⁻¹⁰. This variability in the results might be due to methodological differences in evaluating the response to the oxygen challenge. It is obvious that an increase in PtiO_2 does not necessarily imply a better brain oxygenation and that hyperoxic tissue improves the redox state of the cell. Moreover, improvement is not always demonstrated by using robust metabolic parameters such as the lactate-pyruvate ratio (LP ratio) after the hyperoxic challenge^{6,10}.

Another issue to clarify is whether it could exist a subgroup of patients, identified by metabolic parameters, in whom normobaric hyperoxia can be a therapeutic option. The aim of this study was to study the metabolic response of the injured brain to normobaric hyperoxia. Our goal was to show whether oxygen challenge could improve brain oxidative metabolism by analysing the data obtained from brain microdialysis and brain tissue oxygen pressure (PtiO_2) monitoring techniques. A second aim was to try to identify whether a subgroup of patients could benefit for being treated with normobaric hyperoxia.

MATERIAL AND METHODS

Patients

A prospective study was conducted on patients aged 18 to 65 years, with a moderate or severe TBI as defined by an admission Glasgow Coma Scale (GCS)¹¹ score below or equal to 13 and an abnormal CT scan. The Traumatic Coma Databank (TCDB) classification¹² was used to describe brain lesions in the TBI patients. All patients required ICP monitoring and were

monitored and treated following the Brain Trauma Foundation guidelines for the TBI patient, which were adapted to our protocols^{13,14}. These guidelines give priority to ICP control, CPP control as well as the prevention of avoidable factors that could promote the appearance of secondary brain lesions.

This study received institutional approval (protocol number, PR-TR-137/98). The Institutional Review Board waived the need for informed consent, as hyperoxic challenge was considered harmless and routinely performed in any Intensive Care Unit. Outcome was evaluated by an independent evaluator at six months of injury by the Extended Glasgow Outcome Scale (GOSE). Scores obtained were dichotomized in bad outcome (GOSE:1-4) and good outcome (GOSE:5-8).

Brain microdialysis monitoring

A cerebral microdialysis catheter CMA-70 (CMA Microdialysis Stockholm, Sweden), with a 20 kDa cut-off membrane was used in 15 patients and a CMA-71 catheter (CMA Microdialysis Stockholm, Sweden) with a 100 kDa cut-off membrane in 16 patients. Brain microdialysis catheters were inserted in non-injured brain tissue following a method previously described elsewhere¹⁵. The position of the catheter was checked using a control CT scan in which the catheter is seen because it has a gold-tip. In addition, all patients were monitored with a subcutaneous microdialysis catheter (CMA-60, CMA Microdialysis Stockholm, Sweden) as a systemic reference, which was inserted in the subcutaneous adipose tissue of the abdominal region. Sterile isotonic fluid containing 147 mmol/L Na^+ , 1.2 mmol/L CaCl_2 , 2.7 mmol/L KCl , and 0.85 mmol/L MgCl_2 was perfused at a flow rate of 0.30 $\mu\text{l}/\text{minute}$ using a CMA-106 pump (CMA Microdialysis Stockholm, Sweden). The first microdialysate sample was discarded and microvials were collected hourly by the nurse in charge of the patient. Bedside analysis for glucose, lactate, pyruvate and either glutamate, urea or glycerol was routinely performed using the CMA600 microdialysis analyser (CMA microdialysis, Stockholm, Sweden).

Brain tissue oxygen monitoring and hyperoxic test

Patients were monitored by the Licox[®] CMP system using licox CC1.SB sensors (Integra, Plainsboro, NJ, USA). The brain tissue oxygen sensor for PtiO_2 measurement was implanted near the brain microdialysis catheter also in the non-injured brain tissue. Data obtained during

the entire monitoring period was exported to a laptop and stored in the hard disk until analysis.

Hyperoxia test

The hyperoxic challenge was performed within the first hours post-TBI when patients already had both the microdialysis catheter and the brain tissue oxygen sensor implanted. Patients had to be hemodynamically stable and correctly sedated at the beginning of the hyperoxia test. As a first step, we extracted arterial baseline blood samples. If PaO₂ was above 170, ventilator and/or FiO₂ settings were modified to obtain a PaO₂ between 100-170 mmHg and at least one hour was allowed before conducting the test. Before hyperoxic challenge, different vital signs as well as microdialysis and brain PtiO₂ values were recorded and blood samples withdrawn. After stable readings FiO₂ was increased to 100% and maintained at this level for two hours. At the end of the two hours hyperoxic challenge arterial blood samples were extracted and the same baseline variables recorded again. Immediately after the test, FiO₂ was reverted to maintain a PaO₂ of at least 100 mmHg. Hyperoxia test was performed twice in one patient, with an interval period of one day between the first and the second test. Patients that did not present a minimum PtiO₂ increase of 10 mmHg after hyperoxia test were considered as non-responders and excluded from the metabolic analysis.

Data analysis

Our preliminary findings showed that brain lactate and L/P ratio levels after hyperoxic challenge varied differently. Each parameter could increase, decrease or not change after O₂ stimulus, finding 9 possible combinations of the two parameters (lactate and L/P ratio).

A change in lactate of $\pm 5.7\%$ and for pyruvate of $\pm 3.4\%$ from baseline was considered non-significant. These are the standard deviations provided by the manufacturer for the CMA 600 microdialysis analyser¹⁶. Therefore, if lactate changed within this range, it was considered that no variation existed. Pyruvate change was prior calculated to obtain L/P ratio changes in relation to hyperoxia.

Statistical Analysis

Descriptive statistics were obtained for each variable. Whether or not data followed a normal distribution was checked using the Shapiro-Wilks test. A paired t-test was used to compare baseline and hyperoxia samples for each variable when normal distribution was found. The Wilcoxon test was used for two related

samples to determine significant differences between pairs of variables that did not follow a normal distribution (baseline and post-hyperoxia samples). The Spearman correlation coefficient was used to correlate two scale variables when they did not follow a normal distribution and the Pearson linear correlation test was used for samples that followed a normal distribution. Comparisons were made using SigmaStat version 3.1 for Windows and SPSS 12.0 (SPSS, Chicago, IL; USA). In all of the abovementioned tests a difference of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Thirty one patients (9 women and 22 men) with a median initial GCS of 6 (range: 3-12) were included in the study. Median age of the group was 30 (range: 17-64 years). Among the patients included in the study, we included 19 patients with a diffuse injury type II, 6 patients with a diffuse injury type III, 3 patients with a diffuse injury type IV and 3 patients with an evacuated mass lesion. The median time from TBI until test was 46 hours (range: 15-126). Thirty two hyperoxia tests were performed in thirty one patients. Mortality rate at 6 months was 23% (7 patients). Sixteen patients presented a good outcome and 13 patients presented bad outcome. In 2 patients who survive it was not possible to assess the GOSE.

Systemic and intracranial parameters

Median baseline ICP was 8 mmHg and after hyperoxia treatment a non significant increase to 9.5 mmHg was observed. Mean arterial blood pressure (MABP) at baseline was 86.8 ± 14.4 mmHg which increased significantly after hyperoxia treatment to 129.4 ± 16.7 mmHg ($P < 0.001$; paired t-test). Baseline cerebral perfusion pressure (CPP) calculated as the difference between MABP and ICP was 77.3 ± 15.1 mmHg and also increased to 118.6 ± 16.1 mmHg ($P < 0.001$, paired t-test).

PaO₂ increased from 121 ± 24.1 mmHg at baseline to 456.1 ± 105 mmHg at the end of the hyperoxic challenge ($P < 0.001$; paired t-test). PtiO₂ at baseline was 26.9 ± 9.7 mmHg and increased after hyperoxia to 95.5 ± 43.2 mmHg ($P < 0.001$; paired t-test). Only four patients were hypoxic at baseline (PtiO₂ < 15 mmHg).

Microdialysis data

One patient was considered as non-responder and excluded from the metabolic analysis. Baseline and hyperoxia values for each metabolite, as well as statistical significance, are shown in **Table 1**. To analyse whether systemic and brain metabolites were related we tested if

Brain and subcutaneous microdialysis data

Microdialysis metabolites	Baseline	Hyperoxia	p value
Brain catheter			
Glucose (mmol/L)	1.2 (0.02-9.16)	1.5 (0.03-10.74)	p = 0.005*
Lactate (mmol/L)	2.2 (0.03-10.80)	2.8 (1.25-10.8)	p = 0.964
Pyruvate (mmol/L)	0.1 (0.00-0.36)	0.1 (0.06-0.38)	p = 0.136
Lactate/Pyruvate	22.7 (4.78-115.73)	23.4 (11.31-99.89)	p = 0.264
Subcutaneous catheter			
Glucose (mmol/L)	5.7 (1.71-11.52)	5.8 (1.77-10.77)	p = 0.173
Lactate (mmol/L)	1.6 (0.42-6.20)	1.3 (0.34-3.57)	p < 0.001*
Pyruvate (mmol/L)	0.12 (0.00-0.29)	0.1 (0.00-0.23)	p = 0.186
Lactate/Pyruvate	13.3 (9.00-63.94)	13.4 (5.76-91.00)	p = 0.699

Table 1. Brain and subcutaneous microdialysis data from TBI patients included in the study. *: statistically significant. Data is presented as median and maximum and minimum (in brackets).

there existed a correlation between metabolite concentrations from subcutaneous and cerebral catheter at baseline and we did not find any relationship between them (**Figure 1**).

Lactate and L/P ratio did not change after the hyperoxia challenge (**Figure 2**).

The subgroup of hypoxic patients presented a decrease in lactate levels although the small sample size precludes any definite conclusion. Moreover L/P ratio increased in hypoxic patients after hyperoxic challenge (**Figure 3**).

We found 8 types of Lactate and L/P ratio combinations in our patients, which are shown in **Table 2**, with the different frequencies and percentages. Fourteen patients presented a decrease in lactate (45.16%) as well as in L/P ratio (45.16%) after hyperoxia challenge, but only 10 patients (32.3%) presented both a decrease in lactate and L/P ratio. On the other hand, fifteen patients showed an increase in L/P ratio (48.39%) and seven patients presented an increase in lactate (22.58%) after hyperoxia treatment. An example of different pattern responses depending on lactate and L/P ratio parameters for some patients is shown in **Figure 4**.

Combination groups	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
L/P	L ↓	L/P ↓	L/P ↓	L/P ↓	L/P ↓	L/P ↓	L/P ↓	L/P ↓	L/P ↓
L	L ↓	L ↓	L ↓	L ↓	L ↓	L ↓	L ↓	L ↓	L ↓
Frequency	10	0	6	3	2	1	1	4	4
Percentage	32.3%	0%	19.4%	9.7%	6.5%	3.2%	3.2%	12.9%	12.9%

Table 2. Combination groups found in patients included in the study. L:lactate; L/P: L/P ratio. Arrows show an increase or decrease after hyperoxia treatment. Equal symbol means no change after hyperoxia challenge.

DISCUSSION

Mammalian brain is a highly aerobic organ that requires sufficient supply of oxygen (O₂) to the mitochondria to maintain an adequate ATP production. The supply of O₂ to the brain is multifactorial and depends on cerebral blood flow (CBF), the ability of blood to transport O₂, hemoglobin (Hb) oxygen affinity, Hb characteristics, diffusion conductivity from arterial capillaries to cells and arterial oxygen pressure (PaO₂) between arterial blood and intracellular compartment¹⁷.

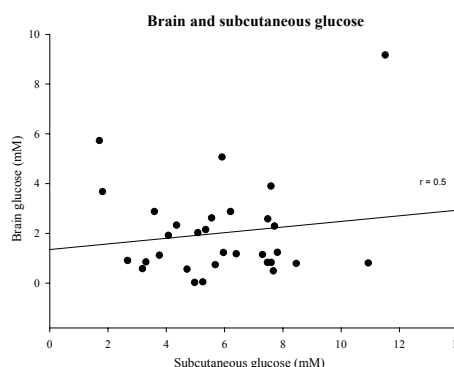


Figure 1. Scatterplot showing the relationship between brain and subcutaneous microdialysis at baseline (r=0.5; p=0.165).

Neurocritical care in moderate and severe TBI patients is addressed to restore and maintain normal physiology which enables the anatomic and functional recovering of nervous cells after injury, as well as to avoid the occurrence of intracranial and extracranial secondary complications. Therefore, it is pivotal in the treatment of these patients to correctly supply

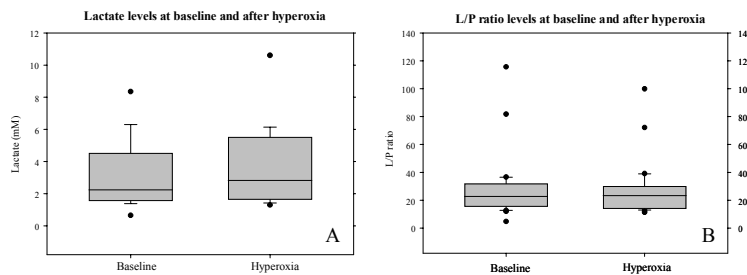


Figure 2. Boxplots showing lactate and L/P response to hyperoxia. A: boxplots for lactate at baseline and at the end of hyperoxia treatment. B: boxplots for L/P ratio at baseline and at the end of hyperoxia treatment.

metabolic substrates, ascertain monitoring reliable markers to control this supply and monitoring early alterations in brain metabolism, thus allowing to modify therapeutic management when necessary.

Despite the progress in brain monitoring techniques and treatment, the outcome of patients suffering a TBI has not significantly improved. The heterogeneity of TBI has been the main cause because several clinical trials have failed to demonstrate neuroprotective effectiveness to blockade secondary brain injury^{2,18-21}. In this context, normobaric hyperoxia is presented as an easy procedure that can be performed in all critical care settings, which is relatively safe and potentially beneficial in improving brain oxygenation and consequently brain metabolism. However, several studies have analysed the effects of normobaric hyperoxia on brain metabolism from TBI patients with contradictory results and controversial interpretations^{6,8-10}. In addition, methodological differences among studies make it difficult to compare series and results.

In the present study our purpose was to analyse the effects of two hours of normobaric hyperoxia in the normal-appearing brain tissue from 31 patients. Our data confirm as other studies do^{6,8-10} that after normobaric hyperoxia both arterial and brain tissue oxygen tension significantly increase although their increase is not linear. Despite few available data in humans, several experimental studies have demonstrated that O₂ is tightly regulated in the mammalian brain. In the last decade evidence has been accumulated to show that PtiO₂ is maintained constant in mammals independently of marked changes in PaO₂²². These studies have shown that increases in inspired fraction of O₂ and secondary in PaO₂ promote a moderate increase in PtiO₂ quickly followed by a *plateau*. This strategy has been called *the low blood PaO₂ strategy* and it has been considered a phylogenetic evolutive mechanism directed to protect organs from potential O₂ toxicity¹⁷. However, even if this increase in PtiO₂ was an abnormal response it would be beneficial if it was followed by an increase in O₂ consumption and by an

improvement in brain metabolism.

Nevertheless, brain lactate as well as L/P ratio did not change after hyperoxia in our study. Interestingly lactate from subcutaneous adipose tissue decreased significantly which suggests that the two compartments are independent and that at least in subcutaneous tissue the supplementary oxygen could be the cause for lactate reduction. However, L/P ratio in adipose tissue was not changed.

Several clinical and experimental studies have shown that severe TBI is associated with important brain metabolism alterations²³⁻²⁶. Brain lactate was identified several years ago as one of the markers of these metabolism alterations, specifically in the acute phase of TBI²⁷⁻³⁰. However, a raised lactate does not necessarily indicate an increased anaerobic metabolism. An increase in lactate levels could denote anaerobic metabolism or hyperglycolysis, independently of aerobic brain tissue condition³¹. It has been demonstrated that lactate can be produced by astrocytes during hypoxia and later aerobically consumed by neurons as the main energy fuel, once O₂ deprivation is restored³²⁻³⁷. Although lactate is not reliable for detecting tissue hypoxia both lactate and L/P ratio, in combination, have a crucial role in detecting significant anaerobic metabolism.

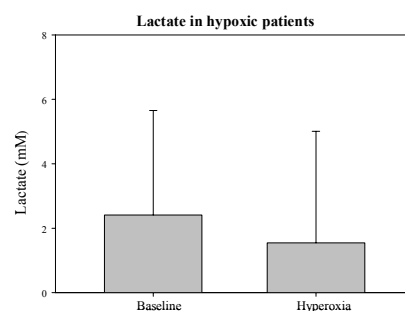


Figure 3. Error bars showing lactate levels at baseline and at hyperoxia phase in the subgroup of hypoxic patients.

Because our hypothesis was that not all the patients react in the same way to hyperoxia we analysed data in depth finding different types of patterns regarding lactate and L/P ratio levels. We observed that pyruvate changed very

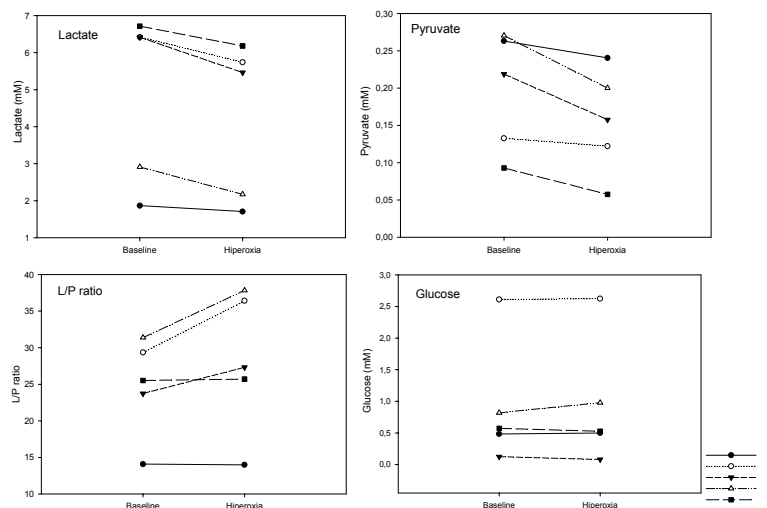


Figure 4. Figure showing patients that presented a decrease in lactate after hyperoxia, with different L/P ratio responses. Glucose and pyruvate are also shown.

differently even though with L/P ratios that decreased or increased. In figure 4 we can observe that patients 2 to 4 presented a decrease in lactate as well as a reduction in pyruvate showing an elevated L/P ratio after hyperoxia, showing no compatible results between the two parameters. Although lactate accumulation origin can be diverse as mentioned before, elevated levels of brain lactate might be deleterious in the injured brain. Marked cerebral acidosis may exacerbate calcium-mediated damage to intracellular enzyme systems and may also interfere with ion-channel function³⁸. Furthermore, high tissue lactate levels could promote a decline in brain pH, as has been shown in several posttraumatic animal and clinical studies³⁹.

We found eight different combinations of lactate and L/P ratio within all the patients included in the study. The combination most frequently found was a decrease in lactate as well as L/P ratio after hyperoxia treatment. Therefore, a possible hypothesis is that patients presenting a major metabolic alteration could present a selective benefit with hyperoxia. The responses to hyperoxia are influenced by the interpatient heterogeneity but at least in some patients mitochondria could be sufficiently intact to increase their function in response to the O₂ stimulus. Patients that did not experience any change in lactate or L/P ratio after O₂ stimulus, maybe it was because they were physiologically more normal and no need of extra oxygen was necessary or mitochondrial dysfunction was enough to prevent any metabolic change. Finally, in other patients a metabolic worsening is a possible explanation, as lactate increased as well as L/P ratio after the hyperoxic challenge. In these patients, perhaps mitochondria were dysfunctional but with

sufficient O₂ preventing the transformation of lactate to pyruvate.

These findings could explain why different results are obtained among publications, maybe because series were composed by patients with different responses to hyperoxia challenge.

It has been investigated that mitochondrial function is impaired in head injured patients^{40;41}. One experimental study showed that there are mitochondrial populations that are different in terms of sensitivity to injury and Ca²⁺ loading⁴². Mitochondria should be adequately intact to be able to increase their function in response to hyperoxic treatment. Aerobic metabolism depends on the correct supply of substrates and on the existence of mitochondria with appropriate function. If mitochondrial dysfunction occurs, aerobic metabolism will also shift toward anaerobic metabolism even with normal oxygenation⁴¹.

Patients included in the study were not in a hypoxia/ischemia condition as mean baseline PtiO₂ levels were above 20 mmHg, as well as in other studies^{6;8-10}, and only four patients presented baseline PtiO₂ levels below 15 mmHg. This subgroup of hyperoxic patients presented a decrease in lactate levels after hyperoxia challenge, although the sample size precluded to perform any conclusion. Moreover, L/P ratio in this subgroup of patients increased after O₂ stimulus. It has been determined that if brain oxygen tension levels fall below approximately 20 mmHg aerobic metabolism ceases⁴³. However, it should be pointed that the minimum PtiO₂ required to provide sufficient intracellular oxygen is unknown³⁹ and that ischemia definition is not fully validated. In addition, it has been suggested that the diffusion distance for oxygen from the microvasculature may increase after TBI due to swelling and tissue damage. In these situations the brain might

require higher tissue oxygen tensions to maintain sufficient tissue oxygenation⁴⁴. Nonhemoglobin O₂ transport may be more important than previously believed. Under normal oxygen tensions the dissolved oxygen in plasma is negligible, but normobaric hyperoxia may increase the amount of dissolved oxygen by approximately 0.5-1 vol%⁴⁵.

Our main goal was to analyse whether hyperoxia could diminish lactate as well as L/P ratio regardless the metabolic or oxygenation condition at baseline. For this purpose, and because our general protocol is like this, probes were situated in regions that did not show anatomic injury on CT scan. We observed that even normal tissue presented metabolic alterations. Furthermore, it has been ascertained that TBI leads to a state of persistent metabolic impairment which is not primarily a result on persistent brain ischemia⁴⁶. In this latter study authors found a low incidence of brain ischemia although the PET start time was after 24 hours from TBI, which differs from previous studies that detected an elevated persistence of brain ischemia in the early stage of TBI^{47;48}. In another study sustained increases in L/P ratio occurred more frequently in pericontusional tissue compared with normal tissue but L/P ratio was not related to cerebral perfusion pressure⁴⁹. In future studies it will be interesting to analyse the effects of hyperoxia only on ischemic patients to find out whether it could be more beneficial than in patients better oxygenated.

Unlike the lung, the rest of organs are largely protected from elevated arterial oxygenation. The harmful effects of hyperoxia have been attributed mainly to free radical formation which could then lead to lipid peroxidation⁵⁰. Additionally to toxicity from reactive oxygen species, it has been detected that pure O₂ can cause cerebral vasoconstriction thus reducing perfusion^{51;52}. It has been suggested that cerebral vasoreactivity is a mechanism whereby brain attempts to protect itself against high partial pressures of oxygen, maybe to limit the production of oxygen free radicals⁵³.

In our study we found that MABP significantly increased after normobaric hyperoxia and thus calculated CPP also significantly increased, although this finding is not clinically relevant.

One of the limitations of the present study is that we have not been able to measure directly the cerebral metabolic rate for oxygen (CMRO₂) with PET or brain high-energy phosphates with MRI, as recent studies have done^{54;55}. In the first study CMRO₂ did not change when inspired oxygen concentration was raised from 40% to 100%⁵⁴, whereas in the second one authors found that CMRO₂ was increased in at-risk tissue in the absence of significant changes on

other parameters, implying a preferential metabolic benefit with hyperoxia⁵⁵.

CONCLUSIONS

Moderate and severe TBI induce brain metabolic alterations even in normal-appearing brain tissue. Normobaric hyperoxia increases significantly PaO₂ and PtiO₂ and when brain metabolism is analysed several response patterns are found, suggesting that patient heterogeneity should be taken into account when applying hyperoxia treatment. Further studies are needed in order to better define whether a subgroup of patients could be in clear benefit with normobaric hyperoxia treatment, as well as to define possible hyperoxia protocols. Future phase III, randomized, clinical trials are also needed in order to demonstrate whether a clear clinical benefit exists.

Acknowledgements

This study was supported by *Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social* (FIS) grant number 05/1092. A. Vilalta is the recipient of a pre-doctoral grant from the *Institut Fundació de Recerca*, Hospital Vall d'Hebron.

REFERENCE LIST

1. Park E, Bell JD, Baker AJ: Traumatic brain injury: can the consequences be stopped? *CMAJ*. 178:1163-1170, 2008
2. Saatman KE, Duhaime AC, Bullock R, et al: Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *J Neurotrauma* 25:719-738, 2008
3. Sahuquillo J, Poca MA, Amorós S: Current aspects of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury. *Curr Pharm Des* 7:1475-1503, 2001
4. Menon DK, Coles JP, Gupta AK, et al: Diffusion limited oxygen delivery following head injury. *Crit Care Med* 32:1384-1390, 2004
5. Alves OL, Daugherty WP, Rios M: Arterial Hyperoxia in Severe Head Injury: A Useful or Harmful Option? *Curr Pharm Design* 10:2163-2176, 2004
6. Magnoni S, Ghisoni L, Locatelli M, et al: Lack of improvement in cerebral

- metabolism after hyperoxia in severe head injury: a microdialysis study. *J Neurosurg* 98:952-958, 2003
7. Menzel M, Doppenberg EM, Zauner A, et al: Cerebral oxygenation in patients after severe head injury: monitoring and effects of arterial hyperoxia on cerebral blood flow, metabolism and intracranial pressure. *J Neurosurg Anesthesiol* 11:240-251, 1999
 8. Menzel M, Doppenberg EM, Zauner A, et al: Increased inspired oxygen concentration as a factor in improved brain tissue oxygenation and tissue lactate levels after severe human head injury [see comments]. *J. Neurosurg.* 91:1-10, 1999
 9. Reinert M, Barth A, Rothen HU, et al: Effects of cerebral perfusion pressure and increased fraction of inspired oxygen on brain tissue oxygen, lactate and glucose in patients with severe head injury. *Acta Neurochir* 145:341-350, 2003
 10. Tolias CM, Reinert M, Seiler R, et al: Normobaric hyperoxia--induced improvement in cerebral metabolism and reduction in intracranial pressure in patients with severe head injury: a prospective historical cohort-matched study. *J Neurosurg* 101:435-444, 2004
 11. Teasdale G: ANalyzing outcome of treatment of severe head injury: a review and update on advancing the use of the glasgow outcome scale. *Journal of neurotrauma* 15:587-597, 1998
 12. Marshall L.F., Eisenberg H.M., Jane J.A., et al: A new classification of head injury based on computerized tomography. *J Neurosurg* 75:S14-S20, 1991
 13. Bullock MR, Randall M, Clifton GL, et al: Guidelines for the management of severe traumatic brain injury, *Journal of neurotrauma.* Mary Ann Liebert, Inc., 2000, pp 450-553
 14. Sahuquillo J, Biestro A, Mena MP, et al: [First tier measures in the treatment of intracranial hypertension in the patient with severe craniocerebral trauma. Proposal and justification of a protocol]. *Neurocirugia (Astur.)* 13:78-100, 2002
 15. Poca MA, Sahuquillo J, Vilalta A, et al: Percutaneous implantation of cerebral microdialysis catheters by twist-drill craniostomy in neurocritical patients: description of the technique and results of a feasibility study in 97 patients. *J. Neurotrauma* 23:1510-1517, 2006
 16. Carlsson, A. CMA 600 Microdialysis Analyser. 2008. Ref Type: Catalog.
 17. Massabuau JC: From low arterial- to low tissue-oxygenation strategy. An evolutionary theory. *Respir Physiol* 15:249-261, 2001
 18. Longhi L, Stocchetti N: Hyperoxia in head injury: therapeutic tool? *Curr Opin Crit Care* 10:105-109, 2004
 19. Maas AI, Steyerberg EW, Murray GD, et al: Why have recent trials of neuroprotective agents in head injury failed to show convincing efficacy? A pragmatic analysis and theoretical considerations. *Neurosurgery* 44:1286-1298, 1999
 20. Narayan RK, Michel ME, Ansell B, et al: Clinical trials in head injury. *J Neurotrauma* 19:503-557, 2002
 21. Tolias CM, Bullock MR: Critical Appraisal of neuroprotection trials in head injury: what have we learned? *NeuroRx* 1:71-79, 2004
 22. Massabuau JC: Primitive, and protective, our cellular oxygenation status? *Mech Ageing Dev* 124:857-863, 2003
 23. Goodman JC, Valadka AB, Gopinath SP, et al: Extracellular lactate and glucose alterations in the brain after head injury measured by microdialysis. *Crit Care Med* 27:1965-1973, 1999
 24. Robertson CS, Gopinath SP, Uzura M, et al: Metabolic changes in the brain during transient ischemia measured with microdialysis. *Neurol Res* 20:S91-S94, 1998

25. Ungerstedt U, Rostami E: Microdialysis in neurointensive care. *Curr.Pharm.Des* 10:2145-2152, 2004
26. Vespa PM, McArthur D, O'Phelan K, et al: Persistently low extracellular glucose correlates with poor outcome 6 months after human traumatic brain injury despite a lack of increased lactate: a microdialysis study. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:865-877, 2003
27. Sahuquillo J, Poca MA, Garnacho A, et al: Early ischaemia after severe head injury. Preliminary results in patients with diffuse brain injuries. *Acta Neurochir.(Wien.)* 122:204-214, 1993
28. Hillered L, Persson L, Ponten U, et al: Neurometabolic monitoring of the ischaemic human brain using microdialysis. *Acta Neurochir (Wien)* 102:91-97, 1990
29. Robertson CS, Gopinath SP, Uzura M, et al: Metabolic changes in the brain during transient ischemia measured with microdialysis. *Neurol Res* 20:S91-S94, 1998
30. Sarrafzadeh AS, Sakowitz OW, Callsen T.A., et al: Bedside microdialysis for early detection of cerebral hypoxia in traumatic brain injury. *Neurosurg Focus* 9 5:1-6, 2000
31. Cesarini KG, Enblad P, Ronne-Engstrom E, et al: Early cerebral hyperglycolysis after subarachnoid haemorrhage correlates with favourable outcome. *Acta Neurochir (Wien)* 144:1121-1131, 2002
32. Chen Y, Swanson RA: Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:137-149, 2003
33. Chih CP, Roberts Jr EL: Energy substrates for neurons during neural activity: a critical review of the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1263-1281, 2003
34. Dringen R, Gebhardt R, Hamprecht B: Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res* 623:208-214, 1993
35. Pellerin L, Magistretti PJ: Food for thought: challenging the dogmas. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1282-1286, 2003
36. Schurr A, Payne RS, Miller JJ, et al: Brain lactate, not glucose, fuels the recovery of synaptic function from hypoxia upon reoxygenation: an in vitro study. *Brain Res.* 1997:105-111, 1997
37. Tsacopoulos M, Magistretti PJ: Metabolic coupling between glia and neurons. *Journal of neuroscience* 16:877-885, 1996
38. Siesjo BK: Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 77:169-184, 1992
39. Verweij BH, Amelink GJ, Muizelaar JP: Current concepts of cerebral oxygen transport and energy metabolism after severe traumatic brain injury. *Prog.Brain Res* 161:111-124, 2007
40. Signoretti S, Marmarou A, Aygok GA, et al: Assessment of mitochondrial impairment in traumatic brain injury using high-resolution proton magnetic resonance spectroscopy. *J Neurosurg* 108:42-52, 2008
41. Verweij BH, Muizelaar JP, Vinas FC, et al: Impaired cerebral mitochondrial function after traumatic brain injury in humans. *J.Neurosurg.* 93:815-820, 2000
42. Lifshitz J, Friberg H, Neumar RW, et al: Structural and functional damage sustained by mitochondria after traumatic brain injury in the rat: evidence for differentially sensitive populations in the cortex and hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:219-231, 2003
43. Zauner A, Doppenberg EM, Woodward JJ, et al: Continuous monitoring of cerebral substrate delivery and clearance: initial experience in 24 patients with severe acute brain injuries. *Neurosurgery* 41:1082-1091, 1997

44. Zauner A, Daugherty WP, Bullock MR, et al: Brain oxygenation and energy metabolism: part I-biological function and pathophysiology. *Neurosurgery* 51:289-301, 2002
45. Diringner MN: Hyperoxia: good or bad for the injured brain? *Curr Opin Crit Care* 14:167-171, 2008
46. Vespa P, Bergsneider M, Hattori N, et al: Metabolic crisis without brain ischemia is common after traumatic brain injury: a combined microdialysis and positron emission tomography study. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:763-774, 2005
47. Bouma GJ, Muizelaar JP, Choi SC, et al: Cerebral circulation and metabolism after severe traumatic brain injury: the elusive role of ischemia. *J Neurosurg* 75:685-693, 1991
48. Graham DI, Adams JH: Ischaemic brain damage in fatal head injuries. *Lancet* 1:265-266, 1971
49. Vespa PM, O'Phelan K, McArthur D, et al: Pericontusional brain tissue exhibits persistent elevation of lactate/pyruvate ratio independent of cerebral perfusion pressure. *Crit Care Med* 35:1153-1160, 2007
50. Raha S, Robinson BH: Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am.J.Med.Genet.* 106:62-70, 2001
51. Bulte DP, Chiarelli PA, Wise RG, et al: Cerebral perfusion response to hyperoxia. *J Cereb.Blood Flow Metab* 27:69-75, 2007
52. Rossi S, Stocchetti N, Longhi L, et al: Brain oxygen tension, oxygen supply, and oxygen consumption during arterial hyperoxia in a model of progressive cerebral ischemia. *J Neurotrauma* 18:163-174, 2001
53. Johnston AJ, Steiner LA, Gupta AK, et al: Cerebral oxygen vasoreactivity and cerebral tissue oxygen reactivity. *Br J Anaesth* 90:774-786, 2003
54. Diringner MN, Aiyagari V, Zazulia AR, et al: Effect of hyperoxia on cerebral metabolic rate for oxygen measured using positron emission tomography in patients with acute severe head injury. *J.Neurosurg.* 106:526-529, 2007
55. Nortje J, Coles JP, Timofeev I, et al: Effect of hyperoxia on regional oxygenation and metabolism after severe traumatic brain injury: preliminary findings. *Crit Care Med.* 36:273-281, 2008

Address correspondence and reprint requests to:

Dr.Juan Sahuquillo
 Department of Neurosurgery
 Vall d'Hebron University Hospital
 Paseo Vall d'Hebron 119-129
 08035 Barcelona
 Spain
 Fax :+34-93-3931930
 Phone:+34-93-2746213
 E-mail: sahuquillo@neurotrauma.net

❖ **Moderate and severe traumatic brain injury induce early overexpression of systemic and brain gelatinases.** Intensive Care Medicine 2008 Mar 19 Aug;34(8):1384-92. Revista.

Anna Vilalta
Juan Sahuquillo
Anna Rosell
Maria A. Poca
Marilyn Riveiro
Joan Montaner

Moderate and severe traumatic brain injury induce early overexpression of systemic and brain gelatinases

Received: 14 September 2007
Accepted: 20 February 2008

© Springer-Verlag 2008

This work was presented, in part, at the 8th International Neurotrauma Symposium, Rotterdam, The Netherlands, 21–25 May 2006.

Electronic supplementary material

The online version of this article (doi:10.1007/s00134-008-1056-1) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. Vilalta
Universitat Autònoma de Barcelona (UAB),
Neurotraumatology and Neurosurgery
Research Unit (UNINN), Vall d'Hebron
University Hospital,
Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035
Barcelona, Spain

J. Sahuquillo (✉) · M. A. Poca
Universitat Autònoma de Barcelona (UAB),
Department of Neurosurgery, Vall d'Hebron
University Hospital,
Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035
Barcelona, Spain
e-mail: sahuquillo@neurotrauma.net
Tel.: +34-93-2746213
Fax: +34-93-3931930

A. Rosell · J. Montaner
Universitat Autònoma de Barcelona (UAB),
Neurovascular Research Laboratory and
Neurovascular Unit, Vall d'Hebron
University Hospital,
Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035
Barcelona, Spain

M. Riveiro
Universitat Autònoma de Barcelona (UAB),
Neurotraumatology Intensive Care Unit,
Vall d'Hebron University Hospital,
Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035
Barcelona, Spain

Abstract Objective: Recent experimental evidence suggests that matrix metalloproteinases (MMPs) are implicated in the pathophysiology of traumatic brain injury (TBI) by increasing blood-brain barrier permeability and exacerbating posttraumatic edema. We examined the acute profile of MMP-2 and MMP-9 in the plasma of patients with moderate or severe TBI and in the brain extracellular fluid (ECF). **Design:** Prospective observational study. **Setting:** Neurotraumatology intensive care unit of a tertiary university hospital. **Patients:** Twenty patients with moderate or severe TBI were included and three groups were used as controls: 20 patients with a mild head injury and normal CT scan, 15 moderate polytrauma patients without TBI, and 20 healthy volunteers. **Interventions:** Plasma samples were collected within the first 12 h and at 24 h post-injury. Simultaneous brain microdialysate and plasma samples were obtained in four moderate-severe TBI patients

at additional timepoints: 48, 72, and 96 h post-TBI. **Measurements and main results:** Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) were measured by gelatin zymography. A significant increase in plasma gelatinases was observed at baseline when compared with healthy volunteers in the study group. This early increase was followed by a significant decrease at 24 h post-injury. Brain microdialysis samples presented a similar time profile as plasma samples for both gelatinases. **Conclusions:** High levels of gelatinases were found in plasma and brain ECF in the early phase of TBI, indicating that both local and systemic trauma-induced upregulation of gelatinases in the acute phase might play an important role in the pathophysiology of TBI and could be a future therapeutic target.

Keywords Blood-brain barrier · Brain extracellular fluid · Matrix metalloproteinases · Gelatinases · Microdialysis · Neuroinflammation · Traumatic brain injury

Introduction

Traumatic brain injury (TBI) is the leading cause of death and disability worldwide among the population under the age of 45 years. Severe TBI is an extremely heterogeneous and dynamic process where mechanical injury triggers vascular, metabolic, cellular, and molecular processes known as secondary injuries [1]. Two of the less understood processes activated by TBI are the neuroinflammatory response and the increase in vascular permeability of the blood-brain barrier (BBB). Alteration in BBB permeability, and consequently brain edema, are an integral part of the secondary injury process, although the timing of this dysfunction and the exact mechanisms involved are still highly speculative.

Matrix metalloproteinases (MMPs), also called matrixins, are a family of more than 20 neutral proteases that are able to degrade or modify almost all extracellular matrix (ECM) components, including collagen, laminin, and proteoglycans [2]. The MMPs and their potential deleterious effects are tightly regulated at transcriptional and post-transcriptional levels through proform activation and by MMP tissue inhibitors (TIMPs) [3]. Two members of this family have a very specific and marked activity against gelatin and are termed gelatinases. One enzyme of 72 kDa has been called MMP-2 (gelatinase A), and the other, a 92-kDa protein, is MMP-9 (gelatinase B). Both gelatinases specifically degrade type-IV collagen, laminin, and fibronectin, which are the major components of the basal membrane of the cerebral blood vessels [4]. The MMPs are secreted as a proenzyme (proMMPs) or latent inactive form by endothelial cells, astrocytes, and neurons. These proforms could be activated by a variety of molecules and its activation plays an important role in several physiological processes, such as embryonic development, tissue resorption, and remodeling [2, 5].

Recent evidence shows that MMPs are overexpressed in several pathological states affecting the brain [6] and also are involved in the pathophysiology of severe TBI [7–12]. *In vitro* studies have demonstrated that the secretion of gelatinases is significantly increased in cortical cultures in which mechanical injury has been simulated [12]. There is also evidence showing that several inflammatory cytokines, such as interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α), induce MMP overexpression following brain injury, both in astrocytes and microglial cells [13]. Animal models have shown that levels of MMP-9 messenger RNA are increased following TBI, and that in the MMP-9 knockout mice there is a significant reduction of brain damage after induced TBI when compared with wild animals [14, 15]. It is currently accepted that the balance between MMP and TIMP activity determines the net degrading potential of the ECM. Preliminary clinical studies have shown increased MMP-9 in the blood of TBI patients [16], and Horstmann et al. have defined its temporal profile in

severe stroke [6]; however, in human TBI, data about the presence of gelatinases in the brain extracellular fluid (ECF) and their temporal profile, both in plasma and ECF, are still lacking.

This work focuses primarily on studying the plasma levels of gelatinases (MMP-2 and MMP-9) in the acute phase of moderate or severe TBI, and on determining their temporal pattern in the early phase after injury. A secondary aim was to study the levels of both enzymes in the ECF of the injured brain in a selected group of patients monitored with microdialysis and a 100-kDa cut-off membrane. To clarify whether the systemic levels found are a consequence of either the release of gelatinases from the injured brain or a systemic brain-induced inflammatory response, or the result of both mechanisms combined, we used three different control groups. For establishing the baseline levels, healthy volunteers, mild TBI patients without significant polytrauma, and a normal CT scan and moderate polytrauma patients without TBI were used. To compare the temporal profile, a cohort of moderate polytrauma patients without an associated TBI and a normal CT scan were also used as controls.

Materials and methods

A prospective study was conducted in patients with moderate or severe TBI (Glasgow Coma Scale score ≤ 13), who required ICP monitoring and had an Injury Severity Score (ISS) of < 25 [17, 18]. Exclusion criteria included the presence of severe polytrauma (ISS ≥ 25), any inflammatory or malignant disease, an age of < 18 or over 65 years, patients with bilateral unreactive pupils, and patients admitted to hospital more than 12 h after injury. Traumatic brain lesions were classified according to the Marshall classification [19]. The general management of patients with severe or moderate TBI followed a protocol adapted from the guidelines for the management of severe TBI proposed by the Brain Trauma Foundation [20, 21]. Corticosteroids were not used in the treatment of these patients.

Twenty consecutive patients, 5 with a moderate TBI (GCS 9–13) and 15 with a severe TBI (GCS ≤ 8), were included in the study. Three groups were used as controls: mild polytrauma patients (ISS < 25) without associated TBI and a normal CT scan (15 patients); mild TBI patients with a GCS of 14 or 15 and a normal CT scan (20 patients); and 20 healthy volunteers.

The study received institutional approval. The Ethics Committee of Vall d'Hebron University Hospital waived the requirement for informed consent because blood samples were collected at the same time as routine extraction of blood samples were performed in the ICU, and because of the observational nature of the study. Informed consent was obtained from all volunteers and patients included in control groups.

Microdialysis technique

Brain microdialysis is used routinely in our Neurotraumatology Intensive Care Unit in most severe or moderate TBI patients who require ICP monitoring. The protocol used for implanting probes and the analytes routinely monitored at the bedside has been published elsewhere [22]. In four patients, three of them included in the study group (moderate or severe TBI patients), a high-cut-off (100 kDa) cerebral microdialysis catheter (CMA-71, CMA Microdialysis, Stockholm, Sweden) was inserted in the less damaged hemisphere in a structurally normal area identified by CT scan. The exact situation of the probe was confirmed by a control CT scan. For more detailed information the reader is referred to the electronic supplementary material (ESM).

Extraction and processing of blood samples and brain microdialysates

In the study group, plasma samples from peripheral arterial blood were collected in EDTA-coated plastic tubes at baseline (within the first 12 h from injury) and at 24 h from injury. The tubes were kept at room temperature and centrifuged immediately after extraction (3500 rpm for 15 min at 4°C) and the supernatants stored at -80°C until analysis. In patients monitored by brain microdialysis as well as plasma and microdialysate samples were obtained with the following temporal profile: ≤ 12, 24, 48, 72, and 96 h from injury.

In polytrauma control group, samples were collected using the same time points as in the study group. In mild TBI and healthy volunteers control groups, only a single plasma sample was collected for each patient at one time point per individual and within the first 12 h after injury in mild TBI patients. In all control groups, plasma was obtained from peripheral venous blood.

Zymographic measurement of gelatinase activity

In both plasma and microdialysate samples, MMP-2 and MMP-9 were measured by gelatin-substrate zymography as previously described [23]. In each gel we included a positive control both for MMP-2 and MMP-9 as an internal control that permits the comparison of results among all zymograms. The gelatinolytic zones were quantified using the Kodak 440 imaging system and analyzed using Kodak 1D image analysis software (Kodak, New Haven, CT, USA). The intensity of the bands (measured in arbitrary units) was normalized to that of recombinant human MMP-9 proform control to allow comparisons between gels. This assay is able to detect all gelatinase MMP isoforms. For more detailed information the reader is referred to the ESM.

Statistical analysis

All variables were introduced into a database created using Microsoft Excel 2000 (Microsoft, Redmond, WA, USA) and data was imported to the software package SPSS 12.0 for statistical analysis (SPSS, Chicago, IL, USA). Normal distribution was tested using the Kolmogorov–Smirnov test. For testing differences in means among groups the parametric one-way repeated-measures ANOVA was used with the Bonferroni post-hoc test. In not normally distributed data, a repeated measures ANOVA on ranks was used with the Dunn's post-hoc test. A paired *t*-test was used to compare the differences between baseline time points and 24-h sample time points when data was normally distributed, whereas a Mann–Whitney rank-sum test was used in not normally distributed data. Statistical significance was established at $p \leq 0.05$.

Results

Descriptive data from the TBI study group and the three control groups are shown in Table 1. Only values for each gelatinase (MMP-2 and MMP-9) proforms were statistically analyzed and reported in the text.

MMP-2 and MMP-9 baseline plasma levels

The median MMP-2 baseline plasma levels in the study group was 2.37 units (range 1.45–3.56), 1.26 for polytrauma group (range 0.62–3.2), 1.31 for mild TBI group (range 0.68–2.48), and 1.78 for healthy volunteers (range 0.73–2.7; Fig. 1). The median values of MMP-2 in the study group were significantly higher than median baseline levels in all control groups ($p \leq 0.05$). No statistically significant differences were detected in the MMP-2 baseline levels among the three control groups.

The median for baseline MMP-9 levels in the study group was 1.68 units (range 0.96–3.54), 1.02 in healthy controls (range 0.58–1.48), 1.25 in patients with mild TBI (range 0.51–2.66), and 1.42 in polytrauma patients (range 0.62–4.24; Fig. 2). The median levels of MMP-9 in the study group were significantly higher than those in the mild TBI group and in healthy volunteers ($p \leq 0.05$). Although baseline MMP-9 values in the study group were higher than in polytrauma group, these differences were not statistically significant. Moreover, a statistically significant increase in baseline MMP-9 levels was found in polytrauma patients when compared with healthy volunteers (one-way ANOVA, $p = 0.017$).

Table 1 Descriptive data from the TBI study group (moderate-severe) and control groups. *TCDB*, Traumatic Coma Databank classification; *EMLesion*, evacuated mass lesion; *ISS*, Injury Severity Score. Baseline sample: time in hours from injury to the time

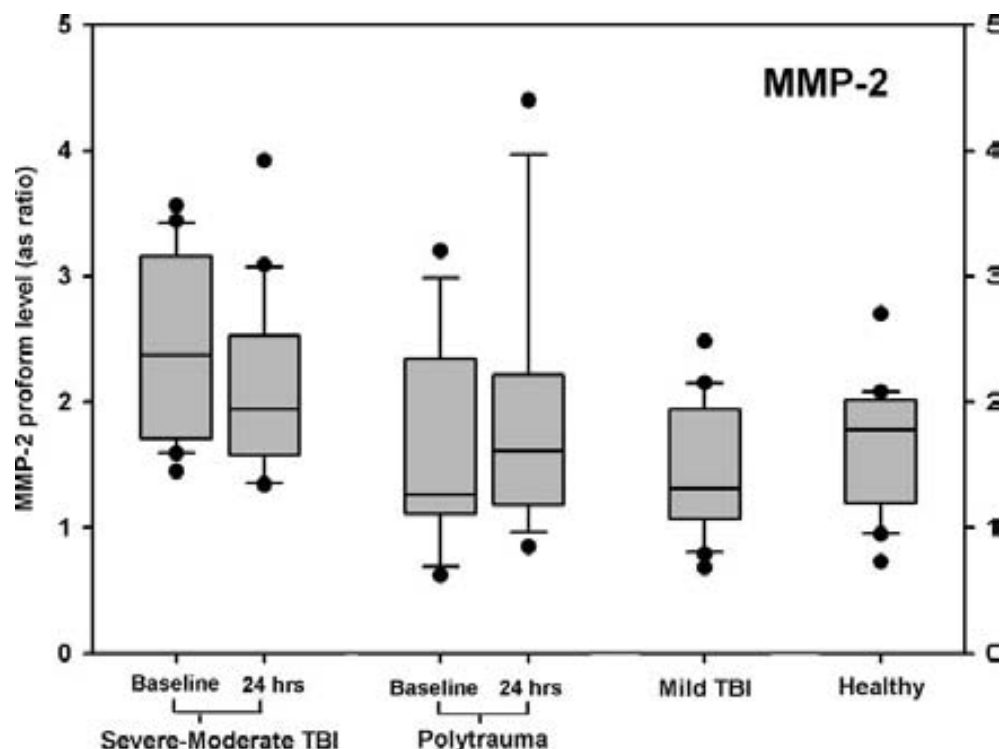
of sample extraction in the first 12 h after injury. Twenty-four-hour sample: time from injury to blood extraction in samples obtained at 24 h from TBI (in hours). *GCS*, Glasgow Coma Score

	TBI patients (study group; n = 20)	Microdialysis patients (n = 4) ^b	Polytrauma patients (n = 15)	Mild TBI patients (n = 20)	Healthy volunteers (n = 20)
Age (years)	33 ± 15 ^a	39 ± 18 ^a	38 ± 14 ^a	33 ± 18 ^a	39 ± 13 ^a
Gender					
Males	16 (80%)	3 (75%)	11 (73.3%)	8 (40%)	12 (60%)
Females	4 (20%)	1 (25%)	4 (26.7%)	12 (60%)	8 (40%)
ISS	14.45 ± 4.41 ^a	18 ± 5 ^a	7.6 ± 6 ^a	–	–
TCDB	DI type II: 15 DI type III: 2 DI type IV: 1 EMLesion: 2	Patient 1: DI type II Patient 2: DI type II Patient 3: DI type III Patient 4: DI type II	–	DI type I	–
GCS	7 ± 3 ^a	Patient 1: 9 Patient 2: 10 Patient 3: 4 Patient 4: 4	15	15	15
Baseline sample	6 ± 3 ^a	Plasma: 7 ± 1 ^a Microdialysis: 9.5 ± 4.9 ^a	7.6 ± 3.2 ^a	5.07 ± 3.68 ^a	–
24-h sample	24 ± 1.4 ^a	Plasma: 24 Microdialysis: 24.9 ± 1 ^a	25 ± 1.6 ^a	–	–

^a Data is presented as the mean ± SD

^b Patients 1, 3, and 4 also belong to the TBI study group

Fig. 1 Box-and-whisker plots for plasma MMP-2 proform levels at baseline and at 24 h post-injury in the TBI study group and in the polytrauma without TBI control group. Baseline plasma levels in the mild TBI and in the healthy-volunteers control groups are also shown. MMP-2 levels are expressed as ratios that were calculated by dividing the intensity of each band by the MMP-9 proform control in the same zymogram



Temporal profile of plasma MMP-2 and MMP-9

MMP-2 plasma levels showed a mild but statistically significant decrease in the study group at 24 h after injury compared with baseline levels ($p \leq 0.05$); however, the levels at 24 h after injury remained higher than the levels in all the control groups (Fig. 1). The differences found in the levels of MMP-2 at 24 h and the median of the baseline levels in polytrauma patients (1.61) were not statistically significant ($p = 0.59$).

MMP-9 plasma levels in the study group significantly decreased at 24 h after injury from a median of 1.68 to 1.41 (paired t -test, $p < 0.001$; Fig. 2); however, these levels still remained elevated at 24 h from injury when compared with healthy volunteers. In the polytrauma group, baseline levels also tended to decrease at 24 h (range 0.56–1.13), but this trend was mild and not statistically significant. Cleaved forms, when detected in plasma samples, showed a similar pattern and time profile to those of proforms for both gelatinases.

Brain extracellular levels of gelatinases

Table 1 summarizes clinical and demographic data of the four patients monitored with brain microdialysis. Microdialysis samples were matched with plasma samples.

Gelatinase levels in ECF samples presented a time profile similar to that of plasma samples both for MMP-2

and MMP-9, with higher values at the first evaluation and a spontaneous decrease over time, except for patient 2 (Figs. 3, 4). In this patient, brain ECF MMP-2 levels at 96 h were close to those of baseline. Moreover, an increase in plasma MMP-9 levels was observed at 48 h post-TBI. Due to the small sample size, no definite conclusions can be extracted from these data.

Discussion

Emerging evidence suggests that neuroinflammation, traditionally considered a secondary factor, actually plays a major role in the pathophysiology of TBI, and when up-regulated it might be a secondary insult that occurs at the very early stages after injury. There is robust evidence that protease systems become dysregulated after stroke and TBI. In the introduction to their seminal work on MMPs, Parks and Meacham stated that “...aberrant regulation of MMP production is thought to be a primary mechanism contributing to disease progression and injury” [24]. Gelatinases target mainly the BBB, damaging its structural integrity, and altering its permeability, allowing leukocytes to migrate from the blood to the brain tissue and facilitating the formation of brain edema [25–27].

MMP-9 is increased in the plasma of acute stroke patients and its levels have shown a good correlation with neurological outcome [28, 29]; however, the role of gelatinases in TBI is still relatively unexplored. We observed

Fig. 2 Box-and-whisker plots for plasma MMP-9 proform levels at baseline and at 24 h post-injury in the TBI study group and in the polytrauma without TBI control group. Baseline plasma levels in the mild TBI and in the healthy-volunteers control groups are also shown. MMP-9 levels are expressed as ratios that were calculated by dividing the intensity of each band by the MMP-9 proform control in the same zymogram

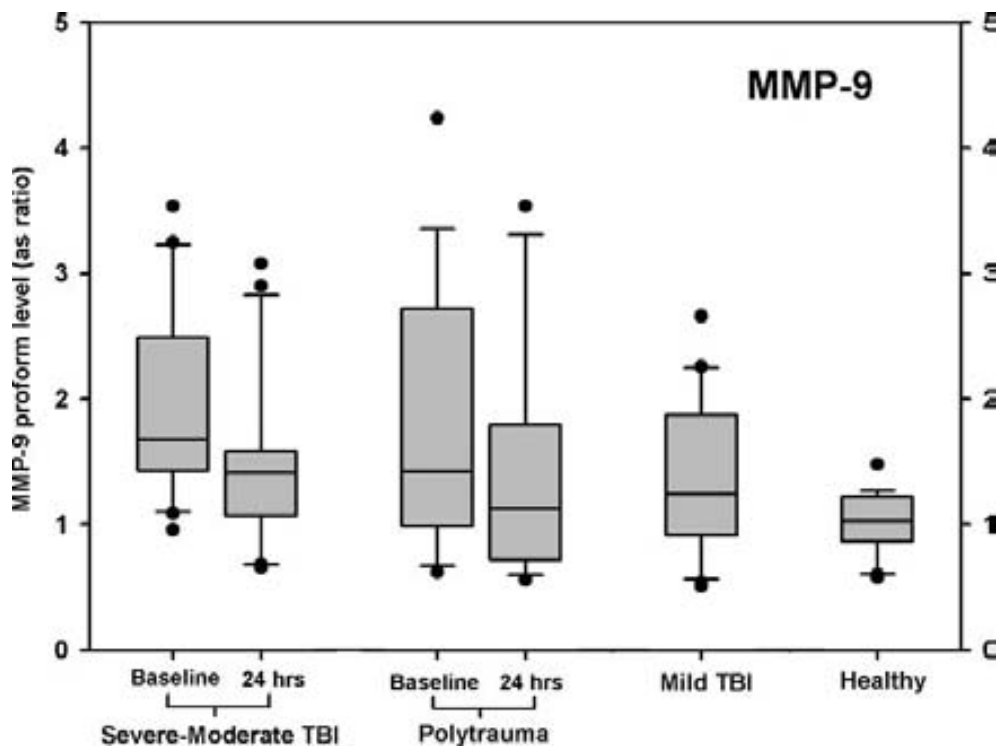
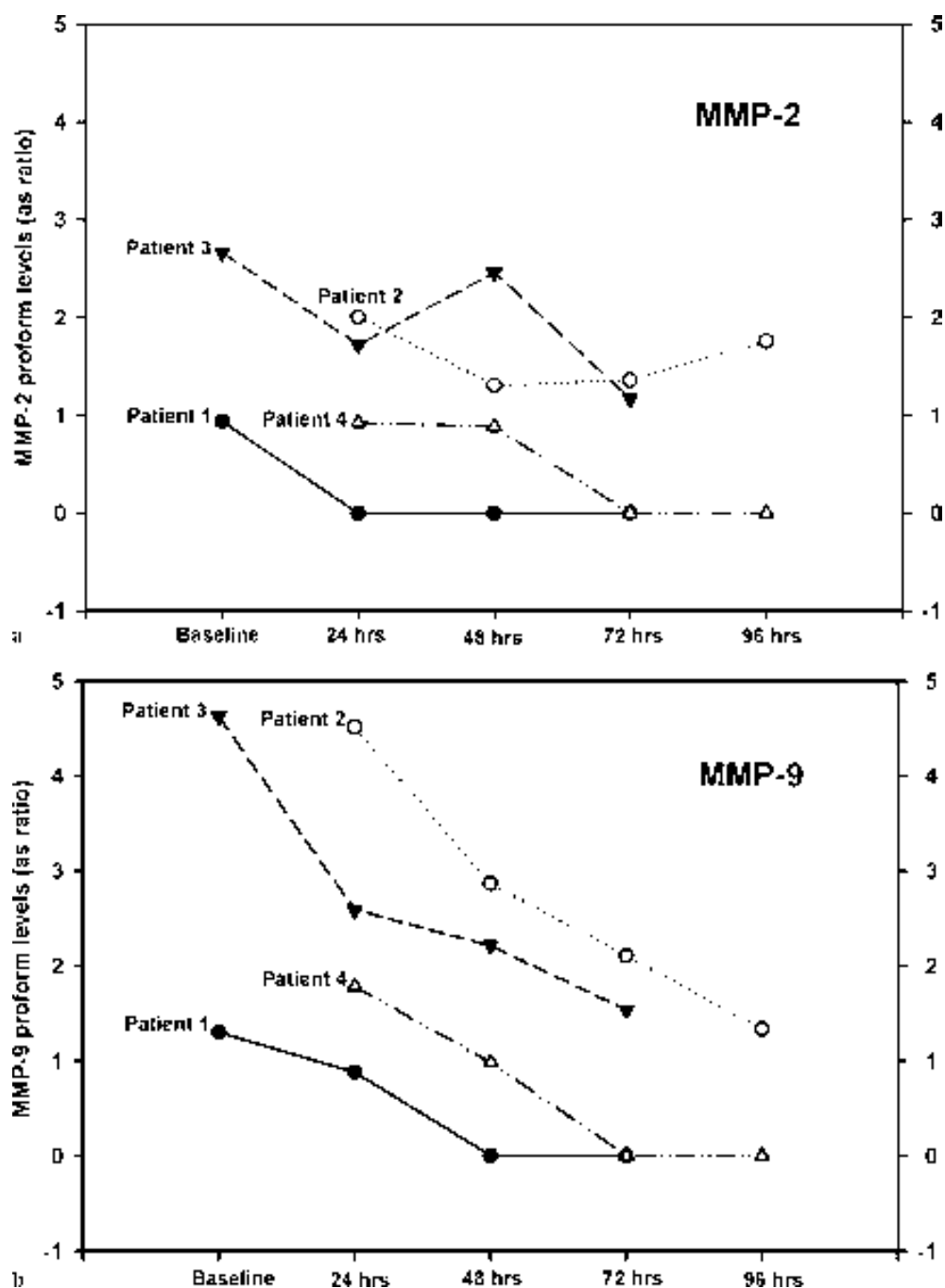


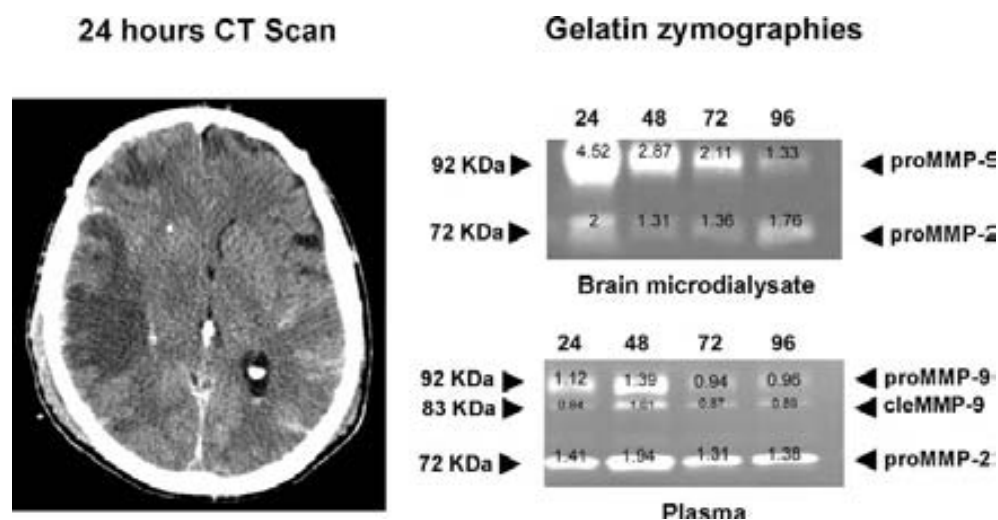
Fig. 3 Temporal profile of MMP-2 (a) and MMP-9 (b) levels in brain microdialysates in the four patients who underwent high-resolution microdialysis. Each line represents a single patient. The hours from injury to sample extraction are shown on the x-axis



a significant increase in plasma levels in both gelatinase proforms (MMP-2 and MMP-9) in the very acute phase of moderate and severe TBI. Gelatinase levels decreased during the first 24 h after injury, suggesting a burst of early systemic inflammatory response induced by the traumatic event. MMP-9 levels remained elevated at 24 h post-TBI when compared with healthy controls, although a clear trend towards normalization was observed. Moderate polytrauma also induced an early systemic overexpression

of gelatinases, but not so marked as in moderate and severe TBI. A similar pattern was found in the MMP-2 proform, but our data also suggest that MMP-2 plays a more selective role than MMP-9 in the acute phase of TBI. MMP-9 levels decreased at 24 h from injury, both in polytrauma patients without brain injury and in TBI patients; however, MMP-2 levels remained elevated only in the study group. Whether or not this overexpression could follow a biphasic pattern, with later increases after

Fig. 4 The CT scan 24 h after injury and the MMP-2 and MMP-9 time profiles in both brain microdialysates and plasma in patient 2. Values are shown superimposed on bands. Molecular weights are shown on the left side of the zymogram. Plasma and microdialysate extraction hours from injury are shown at the top of the zymograms. *proMMP-9*, MMP-9 proform form; *proMMP-2*, MMP-2 proform form; *cleMMP-9*, MMP-9 cleaved form



the early decrease, is not known yet and will require further studies; however, in patients in whom the plasma levels were monitored for 96 h, this was not the general tendency (Figs. 3, 4).

The initial increase of both gelatinase levels and the spontaneous reduction found in our study is an intriguing phenomenon. Suehiro et al. observed a similar pattern and attributed it to the use of moderate hypothermia in their patients [16]. We did not induce hypothermia in any of our patients, but the observed temporal MMP decline was similar to that shown by Suehiro's group [16].

The most relevant information provided by our study is that both gelatinases could be detected by high-cut-off microdialysis membranes in the brain ECF, showing that gelatinase release occurs not only systemically but also locally in the brain. The present study also shows, for the first time to our knowledge, an increased level of MMP-2 and MMP-9 in brain ECF following human TBI. The time profile of the brain ECF followed a similar pattern to that of plasma; thus, an increase of gelatinase levels in the early phase of TBI was found with a spontaneous decrease 24 h after injury. However, MMP-9 appeared to be more overexpressed than MMP-2. This information is important because in our study we targeted structurally normal brain tissue. Consequently, it can be expected that probes placed close to damaged brain (contusions, ischemic lesions, etc.) can have a higher overexpression of both gelatinases. This information cannot be neglected because it shows that even macroscopically normal areas of the brain have an inflammatory response to injury that can contribute to the pathophysiology of both focal and diffuse brain lesions.

We know that both intra- and extracellular edema coexist in different phases of TBI, but the nature of the alterations in the BBB permeability after injury and the timing of such a disorder is still a mystery. Several experimental studies have shown a close relationship between

high MMP levels in brain parenchyma and increased BBB permeability in brain ischemia [30–34]. Furthermore, this association has been found recently in experimental TBI models. Shigemori et al. showed a strong association among MMP-9 levels, the BBB opening, and brain edema formation after cortical contusion in rats [35].

An additional question to answer is which cells produce gelatinases in the injured brain. Endothelial cells, microglial cells, astrocytes, and even neurons can secrete gelatinases after simulated mechanical injury in vitro [12]. Another potential source for MMPs are leukocytes entering the brain across the BBB [36]. In tissue samples obtained from patients who died from ischemic stroke, Rosell et al. found that MMP-9 was mainly located around blood vessels together with the presence of perivascular immunoreactive neutrophils [23].

From a therapeutic perspective, emerging preliminary results in experimental models have shown that pharmacological blockage of the extracellular regulated protein kinase can reduce MMP-9 levels and attenuate brain edema and tissue damage in mice [9]. Moreover, in a rat model of TBI it has been shown that hyperbaric oxygen reduces the expression of MMP-9 in the acute phase of TBI [37]. If these data were confirmed in humans, the opportunity for pharmacological blocking of this pathway involved in protease upregulation would exist.

Limitations of the study

There are two main limitations to our study: (a) its sample size, and the reduced number of samples obtained by high-resolution microdialysis; and (b) the pure observational nature of the study that prevented any correlation analysis from being conducted between the levels of plasma gelatinases and patient outcome. The goal of the study was not to predict outcome, and therefore it was underpowered in

establishing this type of correlation. A further limitation is that our study was focused on understanding the early dysregulation of gelatinases after TBI. It is generally accepted that gelatinases also have an important role in repairing brain damage; in fact, upregulation late after injury can be a necessary response and has a beneficial effect on the natural healing process of the injured brain [38]. In addition, TIMPs were not evaluated. In future studies it would be necessary to study the balance between MMPs and their inhibitors to establish whether the increased levels of gelatinases depend on gelatinase production alone or are also influenced by the modulation of their activity by TIMPs.

Conclusion

In conclusion, high levels of MMP-2 and MMP-9 in plasma and in brain ECF were detected in the very early phase of TBI in the non-damaged brain. This suggests an

early upregulation of both systemic and brain gelatinases after mechanical brain injury. Gelatinase overexpression seems to be an unspecific reaction to injury and might be implicated in the disruption of the BBB and in the production of brain swelling after human TBI. If our preliminary findings are confirmed in larger studies, these results may open a whole new avenue for TBI patients for whom modulation of both local and systemic trauma-induced early upregulation of gelatinases could be a future therapeutic target.

Acknowledgements. This study was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FIS) grant number 05/1092, by the Commission of the European Communities, specific RTD programme 'Quality of Life and Management of Living Resources' project QLK6-CT-2002-02583, and by Fundació Mapfre Medicina grant 2004-2005. A Vilalta is the recipient of a predoctoral grant from the Institut Fundació de Recerca, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. We are grateful to M. Quintana for statistical advice and to S. Voss for her assistance in translating the manuscript into English.

References

- Sahuquillo J, Poca MA, Amoros S (2001) Current aspects of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury. *Curr Pharm Des* 7:1475–1503
- Nagase H, Woessner JF (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274:21491–21494
- Cunningham LA, Wetzel M, Rosenberg GA (2005) Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia* 50:329–339
- Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T (2003) Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253:269–285
- Fatar M, Stroick M, Griebel M, Hennerici M (2005) Matrix metalloproteinases in cerebrovascular diseases. *Cerebrovasc Dis* 20:141–151
- Horstmann S, Kalb P, Koziol J, Gardner H, Wagner S (2003) Profiles of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and laminin in stroke patients: influence of different therapies. *Stroke* 34:2165–2170
- Vilalta A, Rosell A, Poca MA, Sahuquillo J, Montaner J, de los Rios J, Riveiro M (2006) Increased levels of matrix metalloproteinase-9 in plasma and brain extracellular fluid in the early phase of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 23:772–773 (Abstract)
- Jaworski DM (2000) Differential regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase mRNA expression in response to intracranial injury. *Glia* 30:199–208
- Mori T, Wang X, Aoki T, Lo EH (2002) Downregulation of matrix metalloproteinase-9 and attenuation of edema via inhibition of ERK mitogen activated protein kinase in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 19:1411–1419
- Morita-Fujimura Y, Fujimura M, Gasche Y, Copin JC, Chan PH (2000) Overexpression of copper and zinc superoxide dismutase in transgenic mice prevents the induction and activation of matrix metalloproteinases after cold injury-induced brain trauma. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:130–138
- Rosenberg GA (1995) Matrix metalloproteinases in brain injury. *J Neurotrauma* 12:833–842
- Wang X, Mori T, Jung JC, Fini ME, Lo EH (2002) Secretion of matrix metalloproteinase-2 and -9 after mechanical trauma injury in rat cortical cultures and involvement of MAP kinase. *J Neurotrauma* 19:615–625
- Vecil GG, Larsen PH, Corley SM, Herx LM, Besson A, Goodyer CG, Yong VW (2000) Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo. *J Neurosci Res* 61:212–224
- von Gertten C, Holmin S, Mathiesen T, Nordqvist AC (2003) Increases in matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 mRNA after cerebral contusion and depolarisation. *J Neurosci Res* 73:803–810
- Wang X, Jung J, Asahi M, Chwang W, Russo L, Moskowitz MA, Dixon CE, Fini ME, Lo EH (2000) Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on morphological and motor outcomes after traumatic brain injury. *J Neurosci* 20:7037–7042
- Suehiro E, Fujisawa H, Akimura T, Ishihara H, Kajiwara K, Kato S, Fujii M, Yamashita S, Maekawa T, Suzuki M (2004) Increased matrix metalloproteinase-9 in blood in association with activation of interleukin-6 after traumatic brain injury: influence of hypothermic therapy. *J Neurotrauma* 2004 21:1706–1711
- Teasdale G, Jennett B (1974) Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* 2:81–84
- Baker SP, O'Neill B, Haddon W Jr, Long WB (1974) The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *J Trauma* 14:187–196
- Marshall SB, Klauber MR, Van Berkum Clark M, Eisenberg HM, Jane J, Luerssen TG, Marmarou A, Foulkes MA (1991) A new classification of head injury based on computerized tomography. *J Neurosurg* 75:S14–S20

20. Sahuquillo J, Biestro A, Mena MP, Amoros S, Lung M, Poca MA, De Nadal M, Baguena M, Panzardo H, Mira JM, Garnacho A, Lobato RD (2002) First tier therapeutic measures in the management of high intracranial pressure after severe head injury. Rationale and proposal for a protocol. *Neurocirugia* 13:78–100
21. Bullock RM, Chesnut RM, Clifton GL, Ghajar J, Marion DW, Narayan RK, Newell DW, Pitts LH, Rosner MJ, Walters BC, Wilberger JE, Chesnut RM, Maas AIR, Servadei F, Teasdale G, Untenberg A, von Holst H, Walters BC, Contant C, Florin R, Kelly JP, Marmarou A, Queen PC, Rosenberg J, Valadka AB, Dearden M, Miller JD, Stocchetti N (2000) Management and prognosis of severe traumatic brain injury. Intracranial pressure treatment threshold. *J Neurotrauma* 17:493–495
22. Poca MA, Sahuquillo J, Vilalta A, de los Rios J, Robles A, Exposito L (2006) Percutaneous implantation of cerebral microdialysis catheters by twist-drill craniostomy in neurocritical patients: description of the technique and results of a feasibility study in 97 patients. *J Neurotrauma* 23:1510–1517
23. Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabin J, Fernandez-Cadenas I, Ribo M, Molina CA, Lo EH, Montaner J (2006) Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke* 2006 37:1399–1406
24. Parks WC, Mecham RP (1998) *Matrix metalloproteinases*. Academic Press, San Diego
25. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T (2002) Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care* 8:101–105
26. Schmidt OI, Heyde CE, Ertel W, Stahel PF (2005) Closed head injury: An inflammatory disease? *Brain Res Rev* 48:388–399
27. Stamatovic SM, Dimitrijevic OB, Keep RF, Andjelkovic AV (2006) Inflammation and brain edema: new insights into the role of chemokines and their receptors. *Acta Neurochir Suppl* 96:444–450
28. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribo M, Quintana M, Alvarez-Sabin J (2003) Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* 107:598–603
29. Ning M, Furie KL, Koroshetz WJ, Lee H, Barron M, Lederer M, Wang X, Zhu M, Sorensen AG, Lo EH, Kelly PJ (2006) Association between tPA therapy and raised early matrix metalloproteinase-9 in acute stroke. *Neurology* 66:1550–1555
30. Gasche Y, Soccac PM, Kanemitsu M, Copin JC (2006) Matrix metalloproteinases and diseases of the central nervous system with a special emphasis on ischemic brain. *Front Biosci* 11:1289–1301
31. Mun-Bryce S, Rosenberg GA (1998) Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. *Am J Physiol* 274:R1203–R1211
32. Pfefferkorn T, Rosenberg GA (2003) Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rtPA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke* 34:2025–2030
33. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE (1998) Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 29:2189–2195
34. Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA (2007) Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:697–709
35. Shigemori Y, Katayama Y, Mori T, Maeda T, Kawamata T (2006) Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats. *Acta Neurochir Suppl* 96:130–133
36. Sellebjerg F, Sorensen TL (2003) Chemokines and matrix metalloproteinase-9 in leukocyte recruitment to the central nervous system. *Brain Res Bull* 61:347–355
37. Vlodaysky E, Palzur E, Soustiel JF (2006) Hyperbaric oxygen therapy reduces neuroinflammation and expression of matrix metalloproteinase-9 in the rat model of traumatic brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 32:40–50
38. Agrawal SM, Lau L, Yong VW (2008) MMPs in the central nervous system: where the good guys go bad. *Semin Cell Dev Biol* 19:42–51

- ❖ **Brain contusions induce a strong local overexpression of MMP-9. Results of a pilot study.**
Acta Neurochir Suppl 2008 (En premsa). Revista.
2008

Brain contusions induce a strong local overexpression of MMP-9. Results of a pilot study

A. Vilalta · J. Sahuquillo · M. A. Poca · J. De Los Rios ·
E. Cuadrado · A. Ortega-Aznar · M. Riveiro ·
J. Montaner

© Springer-Verlag 2008

Summary

Background Brain contusions are inflammatory evolutive lesions that induce intracranial pressure increase and edema, contributing to neurological outcome. Matrix metalloproteinases (MMPs) 2 and 9 can degrade the majority of the extracellular matrix components, and are implicated in blood-brain barrier disruption and edema formation. The aim of this study was to investigate MMP-2 and MMP-9 profiles in human brain contusions using zymography.

Methods A prospective study was conducted in 20 traumatic brain injury patients where contusion brain tissue was resected. Brain tissues from lobectomies were used as controls. Brain homogenates were analysed by gelatin zymography and in situ zymography was performed to confirm results, on one control and one brain contusion tissue sample.

Findings MMP-2 and MMP-9 levels were higher in brain contusions when compared to controls. MMP-9 was high during the first 24 hours and at 48 to 96 hours, whereas MMP-2 was slightly high at 24 to 96 hours. In situ zymography confirmed gelatin zymography results. A relation between outcome and MMP-9 levels was found; MMP-9 levels were higher in patients with worst outcome. **Conclusions** Our results indicate strong time-dependent gelatinase expression primarily from MMP-9, suggesting that the inflammatory response induced by focal lesions should be considered as a new therapeutic target.

A. Vilalta · J. De Los Rios
Neurosurgery and Neurotraumatology Research Unit (UNINN),
Vall d'Hebron University Hospital,
Passeig Vall d'Hebron 119-129,
08035 Barcelona, Spain

J. Sahuquillo (✉) · M. A. Poca
Department of Neurosurgery, Vall d'Hebron University Hospital,
Passeig Vall d'Hebron 119-129,
08035 Barcelona, Spain
e-mail: sahuquillo@neurotrauma.net

E. Cuadrado · J. Montaner
Neurovascular Research Laboratory and Neurovascular Unit,
Vall d'Hebron University Hospital,
Passeig Vall d'Hebron 119-129,
08035 Barcelona, Spain

A. Ortega-Aznar
Department of Pathology (Neuropathology),
Vall d'Hebron University Hospital,
Passeig Vall d'Hebron 119-129,
08035 Barcelona, Spain

M. Riveiro
Neurotraumatology Intensive Care Unit,
Vall d'Hebron University Hospital,
Universitat Autònoma de Barcelona,
Passeig Vall d'Hebron 119-129,
08035 Barcelona, Spain

Keywords Neuroinflammation ·
Matrix metalloproteinases · Traumatic brain injury ·
Brain contusion · Zymography

Introduction

Brain contusions are highly dynamic and evolutive lesions that induce cytotoxic and vasogenic edema, mass effect, neurological deterioration and early or delayed increase in intracranial pressure (ICP). They often increase in size over hours to days after injury due to the evolving events related to the interplay of hemorrhage, vasogenic edema and ischemic necrosis [3]. An increasing body of evidence implicates the inflammatory processes in the evolution and maturation of contusions, in vasogenic

53	edema development, and points to their influence on the		
54	neurological outcome [15]. Vasogenic brain edema results		
55	from blood-brain barrier (BBB) disruption and massive		
56	infiltration of the damaged tissue by leukocytes and		
57	extravasation of plasma proteins [17]. Several studies		
58	have reported the role of MMPs, a family of neutral		
59	proteases that degrade or modify almost all extracellular		
60	matrix (ECM) components, in increasing the BBB		
61	permeability [4, 9, 12, 13] and in the pathophysiology of		
62	traumatic brain injury (TBI). Brain inflammatory cascades		
63	are triggered by the production of proinflammatory		
64	cytokines, both by intrinsic (microglia, astrocytes and		
65	neurons) and extrinsic pathways (infiltrating macrophages,		
66	lymphocytes and leukocytes) [18]. Thus, by opening the		
67	structurally intact BBB, plasma molecules and inflammatory		
68	cells enter the brain neuropil. Because gelatinases (MMP-2		
69	and MMP-9) are the main enzymes that degrade type IV		
70	collagen, their role as mediators in BBB opening is very		
71	intriguing. Experimental models of TBI suggest a role for		
72	MMPs in the pathophysiology of severe TBI [5, 10, 11, 14].		
73	To date, two studies have assessed the changes of MMP		
74	levels in the peripheral blood of TBI patients [16, 19] but		
75	information regarding MMP levels in human brain contusion		
76	tissue is still lacking.		
77	The main goal of our study was to investigate the MMP-2		
78	and MMP-9 profiles in surgically resected human brain		
79	contusions, measuring their levels by using both gelatin		
80	zymography and <i>in situ</i> zymography techniques.		
81	Materials and methods		
82	Prospective study of TBI patients who underwent surgical		
83	treatment of brain contusions. Brain samples were obtained		
84	from surgically resected areas of contusions. Brain tissue		
85	samples obtained from lobectomies performed for extra-		
86	axial tumors, that did not present MRI abnormalities in T1		
87	and T2 weighted images, were used as controls. Depending		
88	on time from injury to brain resection, four groups were		
89	arbitrarily formed: A) <24 hrs, B) 24–48 hrs, C) 48–96 hrs,		
90	D) >96 hrs. Clinical outcome was assessed at 6 months by		
91	using the Extended Glasgow Outcome Scale (GOSE).		
92	Scores obtained were pooled in two groups: Bad outcome:		
93	1–4; Good outcome: 5–8.		
94	Brain homogenates		
95	Resected brain tissue was snap-frozen in liquid nitrogen		
96	and stored at –80°C. Brain homogenates were obtained		
97	from these tissues by adding lysis buffer and protease		
98	inhibitors as described previously [2]. Total protein content		
99	of supernatants was determined by bicinchoninic acid		
100	(BCA) assay (Pierce, Rockford, IL, USA).		
	Gelatin zymography		101
	Samples were adjusted to equal protein content (20 µg) and	102	
	were mixed 1:1 with a Tris-Glycine SDS sample buffer (2x)	103	
	from Novex®. Proteins were separated by electrophoresis in	104	
	pre-cast zymogram gels from Novex® at 100 V for two and	105	
	a half hours at room temperature. A MMP2-9 recombinant	106	
	protein (Chemicon International, Inc) was loaded in one	107	
	lane of each gel as a positive control. Following	108	
	electrophoresis, gels were washed to remove SDS with a	109	
	zymogram renaturing buffer from Novex® for 45 minutes	110	
	two times. Zymograms were incubated at 37°C for 18	111	
	hours in Novex® developing buffer. Enzymatic activity	112	
	bands were visualized after staining of the gels in Amido	113	
	Black 1% for one hour and destaining for a total of 100	114	
	minutes, in alternating periods of 20 minutes, in a solution	115	
	of 30% (v/v) methanol and 10% (v/v) glacial acetic acid.	116	
	Band intensities were read with a Kodak Gel Logistic 440	117	
	imaging system and analysis was performed with a Kodak	118	
	1D image analysis software. Band's intensities were	119	
	compared with the positive control and expressed as	120	
	ratios.	121	
	<i>In situ</i> zymography		122
	Frozen cryostat brain sections (14 µm thick) from one	123	
	sample from a brain contused specimen and a control	124	
	patient were used to perform <i>in situ</i> zymography as	125	
	described elsewhere [6]. Nuclei were stained with 4'-	126	
	diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories,	127	
	Inc. Burlingame, CA 94010, USA). Reactivity was ana-	128	
	lysed with a fluorescence microscope (Olympus IX71,	129	
	Center Valley, Pennsylvania, USA).	130	
	Statistical analysis		131
	The Mann-Whitney Rank Sum Test was used to compare	132	
	contusion levels for each target protein with controls.	133	
	Summary variables are expressed as the median and range	134	
	or mean±SD. Depending on the distribution of the variables	135	
	either One-way ANOVA (with Bonferroni post-hoc test) or	136	
	Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks were used to compare	137	
	differences between several groups or phases. Statistical	138	
	significance was assumed when P<0.05.	139	
	Results		140
	We studied twenty specimens obtained from resected	141	
	contusions in TBI patients with a mean age of 44±17 and	142	
	a mean GCS of 10±4. Median time from TBI to brain	143	
	contusion extraction was 42 hrs (range:5–205) (Table 1).	144	
	Six specimens, as described above, were used as controls.	145	

t1.1 **Table 1** Descriptive data from patients and brain specimens

t1.2	Brain Specimens	GCS	Sex	Age	Hrs from TBI	Contusion phase (n)	GOSE
t1.3	Brain contusions	10±4	M: 17	44±17	42 hrs (range:5–205)	A: 6; B: 6; C:6; D:2	4±2
t1.4	n=20		F: 3				
t1.5	Brain controls	-	M: 1	49±20	-	-	-
t1.6	n=6		F: 5				

t1.7 Descriptive data from brain control specimens and from contused brain resected at different times from injury. GCS: Glasgow Coma Score; Hrs: hours; Contusion phase: A: ≤24 hrs, B: >24–48 hrs, C: >48–96 hrs; D: >96 hrs (sample size is shown); GOSE: Extended Glasgow Outcome Scale. M: male; F: female

146 Gelatinase expression

147 An increase of MMP-2 (P=0.026) and MMP-9 (P=0.012)
 148 was found in brain contusion homogenates when compared
 149 with brain control homogenates. A significant increase in
 150 MMP-9 levels was found in the first 24 hours (P<0.05) and
 151 at 48 to 96 hours (P<0.05) after injury (Fig. 1), with a
 152 decrease towards normality after 96 hours from TBI. MMP-2
 153 levels were slightly increased from 24 to 96 hours after

injury (24–48 hrs: P=0.065, 48–96 hrs: P=0.066) but this
 increase was remarkably less pronounced than in MMP-9
 (Fig. 1). Patients with bad outcome at six months had
 significantly higher levels of MMP-9 (P<0.05) than
 patients with good outcome when compared to controls
 (Fig. 2). The differences in MMP-2 levels in both groups
 did not reach statistical significance.

Mean intensities, expressed as ratios from arbitrary units,
 for the tissues assayed with *in situ* zymography were as
 follows: brain contusion proMMP-9 tissue level was 2.11
 and brain control proMMP-9 tissue level was 1.05; brain
 contusion proMMP-2 tissue level was 1.27 and brain
 control proMMP-2 tissue level was 0.8 (Fig. 3).

167 *In situ* gelatinase activity

In situ zymography performed on a single specimen of brain
 contusion showed a strong gelatinase activity (green fluo-
 rescence; grey in the figure) when compared with a control.
 In this control, the signal obtained was significantly weaker
 (Fig. 3). High magnification images revealed that in the
 control tissue, a weak gelatinase signal was detected within
 the cytoplasm of cells whereas in the contusion tissue a
 strong reactivity was found primarily in the cell boundaries.

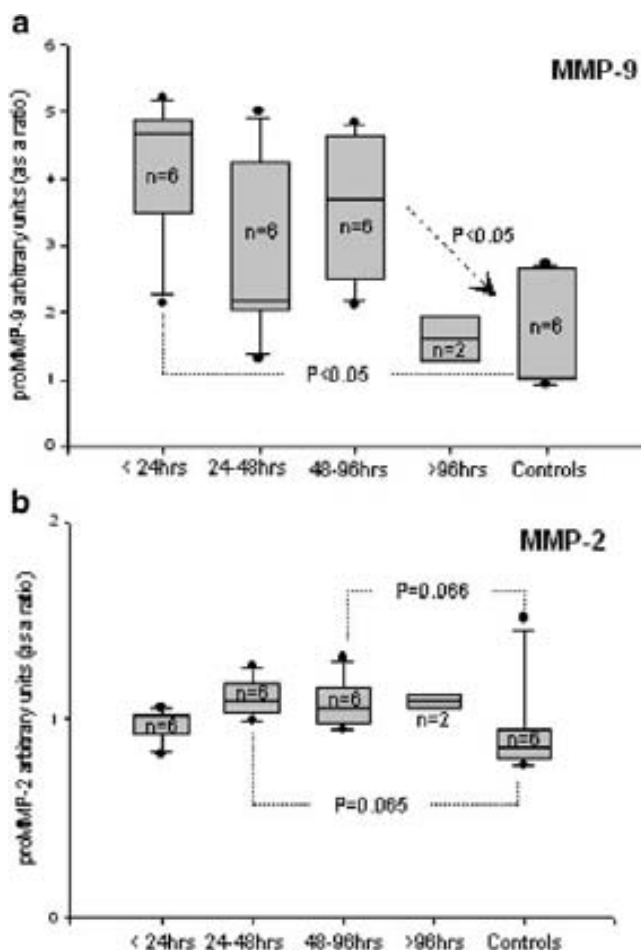


Fig. 1 Box-plot graph summarizing proMMP-9 (a) and proMMP-2 (b) levels in brain contusion specimens and controls at different times from injury. Only statistically significant differences are shown

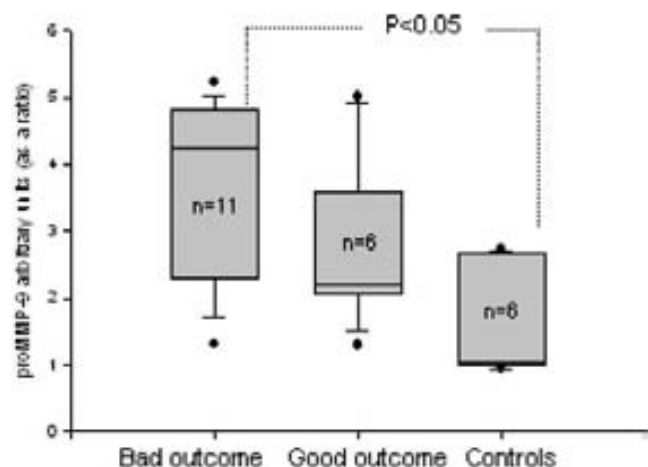


Fig. 2 Box-plot graph showing proMMP-9 levels in patients with bad and good outcome compared with controls. Only statistically significant differences are shown

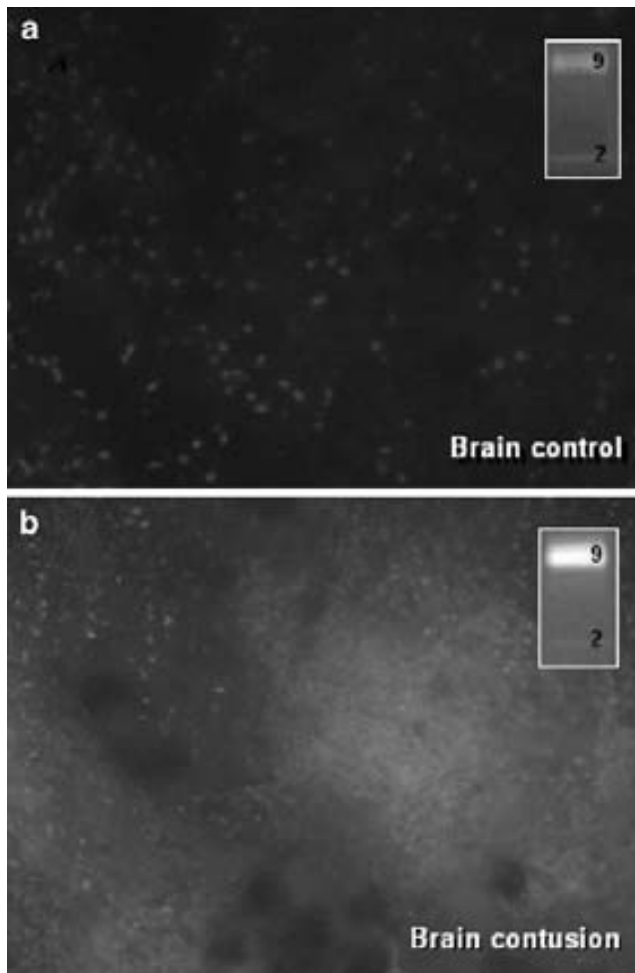


Fig. 3 *In situ* zymography images from a control specimen (a) and surgically removed brain contusion tissue (b). High gelatinase activity (green fluorescence, grey in the figure) is observed in the brain contusion tissue. In the right-upper side of each image (inset) the gelatin zymograms are shown for each specimen. In zymogram a higher degradation intensity is also observed in tissue from contusion. 9: Band corresponding to proMMP-9 and 2: Band corresponding to proMMP-2

176 **Discussion**

177 The progression of brain damage after trauma involves a
 178 complex and multifactorial cascade of secondary events,
 179 including excitotoxicity, oxidative stress, inflammation and
 180 apoptosis [20]. Emerging evidence suggests that neuro-
 181 inflammation plays an important role in the pathophysiol-
 182 ogy of TBI and MMPs might be implicated in this process.
 183 MMPs can degrade several substrates, including the
 184 components of the basal lamina of cerebral blood vessels
 185 and thus, they could increase BBB permeability [14]. At the
 186 macroscopic level, brain edema, whether intra- or extracel-
 187 lular, is still the most important cause of increased ICP after
 188 TBI [8]. Several studies suggest that a large amount of

189 edema occurs in the core of brain contusions and that this
 190 could contribute to the development of early massive
 191 edema [7]. According to the pivotal studies of Katayama's
 192 group, the edema found in the core of contusions is not
 193 strictly cytotoxic nor vasogenic but passive attraction of
 194 water due to the high osmolality that necrosis of neurons,
 195 glial cells and vessels exhibit in the contusion core [7].
 196 However, vasogenic edema from the disrupted BBB also
 197 facilitates an increase in brain water content.

198 In our study we found high levels of MMP-9 in brain
 199 contusions compared with controls. This was also con-
 200 firmed by *in situ* zymography, which showed higher
 201 gelatinase activity in brain contusion tissue compared with
 202 control brain tissue. These findings were in consonance
 203 with gelatin zymography results (Fig. 3). MMPs also
 204 presented a different temporal profile in brain contusions,
 205 MMP-9 was highest over the whole of the period with 2
 206 peaks at the first 24 hours and at 48–96 hours from TBI.
 207 Although MMP-2 levels were higher in brain contusions at
 208 24–96 hours from TBI, the small differences between
 209 groups and the wide range of MMP-2 detected in controls,
 210 preclude the extraction of any conclusion regarding MMP-2
 211 levels, although perhaps with an increased sample size the
 212 differences would be greater. Additionally, in a recent study
 213 we found high levels of gelatinases in plasma and brain
 214 extracellular fluid from patients with TBI [19]. Our
 215 findings, if replicated in a larger series, would suggest an
 216 early overexpression of MMP-9, creating new targets for a
 217 novel approach to the pharmacological treatment of brain
 218 contusions. Recent experimental studies have shown that
 219 pharmacological blocking of the extracellular regulated
 220 kinase can reduce MMP-9 levels attenuating brain edema
 221 and tissue damage in mice [10], opening a new whole
 222 avenue for pharmacological intervention in TBI patients.

223 Several studies have also demonstrated a close relation-
 224 ship between different cytokines and the early increase in
 225 MMPs. In these studies [1, 16] there was a significant
 226 correlation between levels of blood MMP-9 and IL-6,
 227 suggesting that in an incompletely understood way IL-6 is
 228 associated with the observed increases in MMP-9. In a
 229 preliminary study we found an increase in IL-6 and IL-1 β
 230 levels at 24 to 48 hours from TBI, followed by an increase
 231 in MMP-9 levels at 48 to 96 hours from injury in brain
 232 contusion homogenates (unpublished results).

233 Our study was not designed to investigate the outcome
 234 in relation to MMP levels. However, we found that
 235 patients with a bad outcome had higher MMP-9 levels
 236 than patients with a good outcome. Although this should
 237 not be disregarded as a spurious finding: adequately
 238 powered studies are necessary to verify or refute these
 239 results.

240 MMPs are pathologically overexpressed in TBI but
 241 they can also have an important role in repairing brain

242 damage [21]. Further research is needed in order to determine
 243 whether an increase of any gelatinase implicated in the
 244 neuroinflammation cascade should be blocked or partially
 245 blocked, depending on its repairing nature or pathological
 246 condition and especially depending on the expression time
 247 from TBI.

248 In conclusion, our preliminary results showed a signifi-
 249 cant increase in MMP-9 levels in the acute phase of TBI
 250 patients with brain contusions. This suggests that these
 251 lesions induce a strong local and early inflammatory response
 252 that may play a very important role in their pathophysiology,
 253 in their evolving mass effect and in clinical deterioration of
 254 some patients. If this is confirmed in additional studies, the
 255 modulation of the inflammatory response induced by focal
 256 lesions should be considered a new therapeutic target for
 257 improving outcome in these patients.

258 **Acknowledgements** This study was supported by Fondo de Inves-
 259 tigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (FIS) grant number
 260 PI051092 to J. Sahuquillo. A Vilalta is the recipient of a pre-doctoral
 261 grant from the Institut Fundació de Recerca, Vall d'Hebron University
 262 Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.
 263

264 References

- 265 1. Aibiki M, Maekawa S, Ogura S, Kinoshita Y, Kawai N, Yokono S
 266 (1999) Effect of moderate hypothermia on systemic and internal
 267 jugular plasma IL-6 levels after traumatic brain injury in humans.
 268 *J Neurotrauma* 16:225–232
- 269 2. Asahi M, Asahi K, Jung JC, Zoppo del GJ, Fini ME, Lo EH
 270 (2000) Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral
 271 ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with
 272 BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1681–1689
- 273 3. Bullock R, Maxwell WL, Graham DI, Teasdale GM, Adams JH
 274 (1991) Glial swelling following human cerebral contusion: an
 275 ultrastructural study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54:427–434
- 276 4. Gasche Y, Soccac PM, Kanemitsu M, Copin JC (2006) Matrix
 277 metalloproteinases and diseases of the central nervous system with
 278 a special emphasis on ischemic brain. *Front Biosci* 11:1289–1301
- 279 5. Jaworski DM (2000) Differential regulation of tissue inhibitor of
 280 metalloproteinase mRNA expression in response to intracranial
 281 injury. *Glia* 30:199–208
- 282 6. Justicia C, Panes J, Sole S, Cervera A, Deulofeu R, Chamorro A,
 283 Planas AM (2003) Neutrophil infiltration increases matrix metal-
 284 loproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of
 285 the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*
 286 23:1430–1440
7. Katayama Y, Kawamata T (2003) Edema fluid accumulation 287
 within necrotic brain tissue as a cause of the mass effect of 288
 cerebral contusion in head trauma patients. *Acta Neurochir Suppl* 289
 86:323–327 290
8. Marmarou A, Signoretti S, Fatouros PP, Portella G, Aygok GA, 291
 Bullock MR (2006) Predominance of cellular edema in traumatic 292
 brain swelling in patients with severe head injuries. *J Neurosurg* 293
 104:720–730 294
9. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T 295
 (2002) Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a 296
 double-edged sword. *Curr Opin Crit Care* 8:101–105 297
10. Mori T, Wang X, Aoki T, Lo EH (2002) Downregulation of matrix 298
 metalloproteinase-9 and attenuation of edema via inhibition of 299
 ERK mitogen activated protein kinase in traumatic brain injury. *J* 300
Neurotrauma 19:1411–1419 301
11. Morita-Fujimura Y, Fujimura M, Gasche Y, Copin JC, Chan PH 302
 (2000) Overexpression of copper and zinc superoxide dismutase 303
 in transgenic mice prevents the induction and activation of matrix 304
 metalloproteinases after cold injury-induced brain trauma. *J Cereb* 305
Blood Flow Metab 20:130–138 306
12. Mun-Bryce S, Rosenberg GA (1998) Gelatinase B modulates 307
 selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. 308
Am J Physiol 274:1203–1211 309
13. Mun-Bryce S, Rosenberg GA (1998) Matrix metalloproteinases in 310
 cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:1163–1172 311
14. Rosenberg GA (1995) Matrix metalloproteinases in brain injury. *J* 312
Neurotrauma 12:833–842 313
15. Schmidt OI, Heyde CE, Ertel W, Stahel PF (2005) Closed 314
 head injury—an inflammatory disease? *Brain Res Rev* 48:388– 315
 399 316
16. Suehiro E, Fujisawa H, Akimura T, Ishihara H, Kajiwara K, Kato S, 317
 Fujii M, Yamashita S, Maekawa T, Suzuki M (2004) Increased 318
 matrix metalloproteinase-9 in blood in association with activation 319
 of interleukin-6 after traumatic brain injury: influence of hypother- 320
 mic therapy. *J Neurotrauma* 21:1706–1711 321
17. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL (2004) Edema and 322
 brain trauma. *Neuroscience* 129:1021–1029 323
18. Vecil GG, Larsen PH, Corley SM, Herx LM, Besson A, Goodyer CG, 324
 Yong VW (2000) Interleukin-1 is a key regulator of matrix metal- 325
 loproteinase-9 expression in human neurons in culture and following 326
 mouse brain trauma in vivo. *J Neurosci Res* 61:212–224 327
19. Vilalta A, Sahuquillo J, Rosell A, Poca MA, Riveiro M, Montaner J 328
 (2008) Moderate and severe traumatic brain injury induce early 329
 overexpression of systemic and brain gelatinases. *Intensive Care* 330
Med Mar 19 Epub ahead of print 331
20. Wang X, Jung J, Asahi M, Chwang W, Russo L, Moskowitz 332
 MA, Dixon CE, Fini ME, Lo EH (2000) Effects of matrix 333
 metalloproteinase-9 gene knock-out on morphological and 334
 motor outcomes after traumatic brain injury. *J Neurosci* 335
 20:7037–7042 336
21. Zhao BQ, Tejima E, Lo EH (2007) Neurovascular proteases in 337
 brain injury, hemorrhage and remodeling after stroke. *Stroke* 338
 38:748–752 339

DISCUSSIÓ

1. La microdiàlisi cerebral com a eina diagnòstica i guia terapèutica

La PIC, la PPC, el FSC i fins i tot la P_{tiO_2} , són només paràmetres que ens ofereixen una informació indirecta sobre les característiques físiques o sobre la disponibilitat de certs elements al teixit cerebral. En canvi, la microdiàlisi cerebral ens mostra la repercussió de tots aquests factors sobre el metabolisme cel·lular. Desde un punt de vista conceptual, la microdiàlisi cerebral és una tècnica basada en el principi d'intercanvi de soluts a través d'una membrana semipermeable, que simula el funcionament d'un capil·lar. Els objectius bàsics de la microdiàlisi són: a) monitoritzar la disponibilitat tissular de diferents metabolits; b) monitoritzar els elements alliberats per les cèl·lules i c) monitoritzar les conseqüències cel·lulars de la hipòxia tissular.

L'aplicació clínica de la microdiàlisi cerebral fins l'actualitat es centra fonamentalment en el monitoratge de pacients amb lesions cerebrals isquèmiques (Coles, 2004; Robertson et al., 1998), en l'HSA (Kett-White et al., 2002; Persson et al., 1984; Sarrafzadeh et al., 2002b) i en els pacients amb TCE greu (Alessandri et al., 2000; Reinert et al., 2000; Salci et al., 2006). Els TCEs constitueixen la patologia sobre la que es disposa de major experiència en l'ús d'aquesta tècnica. En aquests pacients la inserció d'un o varis catèters cerebrals ha permès profunditzar en diversos aspectes fisiopatològics. Per exemple, coneixem que un elevat percentatge de pacients neurotraumàtics presenten importants increments en la concentració de lactat cerebral de forma precoç després del traumatisme (Goodman et al., 1999; Hillered et al., 2005).

L'ús clínic de catèters de microdiàlisi cerebral també ha permès conèixer la repercussió de les situacions de hipòxia tissular sobre el metabolisme cel·lular (Hlatky et al., 2004). Una altra aportació de la microdiàlisi cerebral en el context dels pacients neurotraumàtics és l'estudi de la repercussió metabòlica de certes mesures terapèutiques tals com l'evacuació de lesions focals (Stahl et al., 2001), la hiperventilació (Sarrafzadeh et al., 2002a), l'administració de certs fàrmacs, la hipotèrmia moderada (Zauner et

al., 1998) o la hiperòxia normobàrica (Bullock, 2003; Diringer et al., 2007; Diringer, 2008; Fehlings and Baker, 2007; Magnoni et al., 2003; Menzel et al., 1999a; Nortje et al., 2008; Reinert et al., 2003; Rockswold and Rockswold, 2007). A més, la recent aparició al mercat de noves membranes de microdiàlisi, amb porus de filtratge majors, ha obert la possibilitat d'estudiar proteïnes de major tamany implicades en els processos neuroinflamatoris desencadenats després d'un TCE (Maurer et al., 2003).

2. El lactat com indicador de metabolisme anaeròbic

Les cures intensives dels pacients amb un TCE moderat o greu estan dirigides al restabliment i manteniment de les condicions fisiològiques normals que permetin la recuperació anatòmica i funcional de les cèl·lules nervioses després de l'impacte, així com evitar l'aparició de lesions secundàries d'origen intra o extracranial. El correcte aport de substrats metabòlics al teixit és un aspecte primordial en el tractament terapèutic d'aquests pacients, motiu pel qual és necessari trobar indicadors fiables que ens permetin monitoritzar de forma contínua aquest aport i les seves alteracions de forma precoç.

Nombrosos estudis clínics i experimentals indiquen que els TCE greus s'associen a alteracions importants en el metabolisme cerebral. El lactat cerebral es va identificar fa anys com un dels marcadors d'aquestes alteracions, especialment durant la fase aguda del TCE (Hillered et al., 1990; Robertson et al., 1998; Sahuquillo et al., 1993; Sarrafzadeh et al., 2000). No obstant això, l'increment de lactat després d'un TCE no implica necessàriament un metabolisme anaeròbic incrementat, i probablement en el seu augment intervenen múltiples factors etiopatogènics. Un increment de lactat podria ser un índex de metabolisme anaeròbic o de hiperglucòlisi, independentment de les condicions aeròbiques del teixit cerebral (Cesarini et al., 2002). A més, s'ha demostrat que el lactat és produït pels astròcits en situació de hipòxia i utilitzat aeròbicament com a font principal d'energia per les neurones, un cop restablerta la deprivació d'O₂ (Chen and Swanson, 2003; Chih and Roberts Jr, 2003; Dringen et al., 1993; Pellerin and Magistretti, 2003; Schurr et al., 1997a; Schurr and Rigor, 1998; Tsacopoulos and Magistretti, 1996).

Existeixen estudis *in vitro* que han demostrat que el lactat pot mantenir l'activitat sinàptica en absència de glucosa i amb un aport suficient d'O₂ (Schurr et al., 1988). Altres estudis de microdialisi en rates (Fellows et al., 1993) i de resonància magnètica en humans (Sappey-Marinier et al., 1992), han indicat que l'estimulació fisiològica incrementa de forma important la concentració de lactat, suggerint un procés glucolític transitori de la glucosa durant l'activació cerebral (Magistretti and Pellerin, 1997). A més, en el període perinatal, el lactat és el substrat principal pel desenvolupament del cervell i s'utilitza com a font d'energia. Les neurones, els astròcits i els oligodendròcits utilitzen el lactat preferentment com a substrat energètic i com a precursor de lípids (Medina and Tabernero, 2005). Recentment s'ha suggerit que el lactat podria ser el producte final de la glucòlisi aeròbica i que seria el substrat principal del cicle de Krebs en condicions aeròbiques (Schurr, 2006a). Una de les raons és que s'ha descobert una isoforma de la lactat deshidrogenasa al mitocondri (Schurr, 2006b).

Tot i que l'acumulació de lactat pot tenir orígens diversos, els increments de lactat poden ser deleteris. L'acidosi cerebral pot exacerbar el dany mediat pel Ca²⁺ en els sistemes enzimàtics intracel·lulars, i pot interferir en la funció dels canals iònics (Siesjo, 1992). A més, nivells elevats del lactat tissular poden promoure una disminució en el pH cerebral, com s'ha detectat en diversos estudis clínics i en models experimentals (Verweij et al., 2007).

Donat que el lactat per si mateix no és sempre indicatiu de hipòxia tissular cerebral, és indispensable la determinació dels nivells de piruvat, així com el càlcul de l'índex L/P, per realitzar un diagnòstic etiològic d'un increment del metabolisme anaeròbic.

3. Utilitat del lactat en el càlcul de les AVDL i el LOI en la detecció de la isquèmia cerebral

El principi de Fick només es pot aplicar correctament sempre i quan s'apliqui a una substància que atravesi la BHE instantàniament, de forma constant i homogènia (Weibel E.R., 1984). Quan s'utilitza aquest principi al cervell pel càlcul de les AVDO₂, és un mètode fiable per estimar el FSC. El principi de Fick també es pot aplicar al CO₂ o a qualsevol altra substància difonible, que atravesi la BHE per difusió simple. Aquest no és el cas del lactat, que necessita transportadors específics per atravesar la BHE i per tant la seva difusió és facilitada. Com a conseqüència d'aquest fet, el principi de Fick no es pot aplicar al lactat de la mateixa manera que amb l'O₂ o el CO₂ (Oldendorf, 1973; Pardridge et al., 1975; Pardridge and Oldendorf, 1977; Poole and Halestrap, 1993). Els estudis realitzats a la BHE han confirmat la presència d'un mecanisme de transport específic competitiu pel lactat, piruvat i pel β -hidroxibutirat (Oldendorf, 1973). La utilització d'un transportador saturable explica el perquè els valors del lactat mesurat al bulb de la jugular no reflecteixen de forma correcta els nivells de lactat a nivell cerebral.

En els últims anys s'han desenvolupat diverses tècniques a la capçalera del pacient per estimar el FSC i el metabolisme cerebral. Les tècniques més exteses han estat l'oximetria del bulb de la jugular, el NIRS, el DTC, les AVDL, el monitoratge de la PtiO₂ i més recentment la microdiàlisi cerebral (Johnston and Gupta, 2002; Kett-White et al., 2002). Actualment, la mesura del lactat a nivell extracel·lular mitjançant la microdiàlisi s'ha de considerar el *patró or* per determinar el lactat cerebral.

Diversos estudis experimentals i clínics que han utilitzat la microdiàlisi cerebral han demostrat que la isquèmia està associada amb un perfil caracteritzat per l'augment de la glucòlisis anaeròbica, amb el descens de la glucosa i amb nivells elevats de la concentració del lactat i del cocient L/P elevat a l'espai extracel·lular (Hillered et al., 1990; Robertson et al., 1998; Sarrafzadeh et al., 2001; Zauner et al., 1997). El lactat també s'ha detectat elevat al bulb de la jugular i al LCR després del TCE (Crockard and Taylor, 1972;

Murr et al., 1996; Prasad et al., 1994; Yang et al., 1985). No obstant això, les AVDL han demostrat la seva baixa fiabilitat per detectar importants infarts cerebrals (Murr et al., 1996). Això, conjuntament amb les nostres troballes, ha posat de manifest la baixa especificitat per detectar la producció excessiva de lactat cerebral.

En el nostre estudi (Poca et al., 2007), els valors de les AVDL es van correlacionar amb els valors de lactat horaris obtinguts amb la microdialísi cerebral, en una població representativa de la que rutinàriament és monitoritzada a un centre de Neurotraumatologia. No vam observar cap correlació significativa entre les AVDL i el lactat cerebral del microdialitzat cerebral ($\rho = 0,014$; $p = 0,719$). Aquests resultats indiquen que tant les AVDL, com els índexs derivats d'elles (LOI), no són bons indicadors per determinar increments de lactat extracel·lular cerebral. Els nostres resultats es corresponen també amb els de Vespa i col. (Vespa et al., 2003). Aquests autors no van trobar una correlació entre els nivells del lactat cerebral mesurats amb el catèter CMA-70 a la substància blanca i els nivells de lactat al bulb de la jugular ($r = 0,02$ en 181 mostres aparellades).

Una troballa interessant en el nostre estudi de les AVDL és que el lactat cerebral es troba sistemàticament elevat en les primeres 72 hores després del traumatisme cranial. Els valors de lactat cerebral es van obtenir d'un catèter situat en un teixit macroscòpicament no lesionat, i van ser més alts que els límits establerts com a normals (2mM), en el 81% de les mostres. No obstant això, les determinacions simultànies amb les AVDL van determinar que només existia un increment de la concentració de lactat cerebral en el 3% de les mostres. L'explicació més factible per aquestes discrepàncies és que les AVDL no compleixen els principals requeriments de la llei de Fick, com s'ha comentat anteriorment. Altres raons addicionals poden ser les diferències en les característiques intrínseques dels dos mètodes (monitoratge regional enfront la global), la possibilitat que el lactat produït en algunes cèl·lules es consumeixi en altres cèl·lules i no sigui transportat a la sang venosa, i el fet que els pacients amb lactat arterial elevat poden presentar una transferència secundària del lactat al cervell (Chen et al., 2000; Toffeng and Larsen, 2002).

4. Efectes de la hiperòxia normobàrica en els nivells extracel·lulars del lactat i de l'índex L/P cerebral

L'objectiu principal del nostre estudi va ser analitzar si la hiperòxia podia disminuir el lactat o l'índex L/P, independentment de l'oxigenació i de la situació metabòlica basal. Els catèters es van implantar en una zona del teixit no lesionada. Per tant, es pot suggerir que fins i tot en zones de teixit aparentment normal existeixen alteracions metabòliques.

Al contrari que en altres publicacions (Magnoni et al., 2003; Menzel et al., 1999b; Menzel et al., 1999a; Reinert et al., 2003; Reinert et al., 2004), en l'estudi de la hiperòxia normobàrica (Vilalta et al., 2009a) no vam trobar modificacions estadísticament significatives entre els nivells de lactat cerebral basal i després del tractament, amb una hiperòxia mantinguda de dues hores. Els nivells mitjos de lactat al microdialitzat cerebral no van disminuir en els nostres pacients. Curiosament, els nivells de lactat subcutani sí que van disminuir de forma significativa, suggerint que els dos compartiments són independents i que almenys en el teixit subcutani l'O₂ suplementari podria ser la causa de la reducció del lactat. De totes maneres, l'índex L/P, el veritable indicador de la situació redox del teixit, no es va modificar. Aquestes dades es contradiuen amb les del treball de Menzel i col. (Menzel et al., 1999a) realitzat en 12 pacients amb un TCE greu. Aquesta diferència en els resultats podria explicar-se, tot i que només en part, per l'existència de diferències metodològiques respecte el nostre estudi. El sistema utilitzat per Menzel i col. per la recollida de microdialitzats va ser diferent (CMA170), així com el sistema d'anàlisi (YSI 2700). Altres diferències respecte al nostre estudi van ser: 1) el líquid perfós (salí al 0.9%), que pot afectar la recuperació dels analits d'interès; 2) la velocitat de perfusió utilitzada (2µl/min) i 3) l'interval de recollida de microdialitzat (cada 30 minuts). A més, el disseny del test hiperòxic va ser diferent al realitzat en el nostre estudi. La duració total del test va ser de sis hores. Durant les primeres tres hores es va utilitzar una FiO₂ del 60% i en les últimes tres hores es va utilitzar una FiO₂ del 100%. Sorprenentment els valors basals de lactat per l'estudi de Menzel i col. (Menzel et al., 1999a) eren baixos (1,3±0,9 mM). Després del tractament hiperòxic van presentar una disminució

del 40% en els seus valors ($0,7 \pm 0,5$ mM). En aquest estudi no es va analitzar el piruvat ni l'índex L/P, amb la qual cosa es fa difícil comparar els resultats obtinguts per aquests autors amb els nostres resultats, a més d'existir moltes diferències metodològiques entre ambdós treballs.

Magnoni i col. (Magnoni et al., 2003) van realitzar 18 tests de hiperòxia normobàrica en 8 pacients amb TCE greu, repetint en alguns casos els mateixos tests en més d'un pacient, i per tant podria existir certa influència intraindividual en els valors obtinguts. Una altra diferència entre el nostre estudi i el de Magnoni i col. és el moment de la realització del test, que en el nostre estudi es va realitzar més precoçment. Aquest fet podria afectar els valors obtinguts en el seu estudi, en trobar-se els pacients en diferent situació metabòlica respecte el traumatisme, ja que el marge de diferència de la realització del test va ser superior que en el nostre, sent els valors de lactat basal al nostre estudi més baixos (2,2 de mediana) que els de Magnoni i col. ($3,2 \pm 2,7$ mM). Entre ambdós estudis no existeixen més diferències metodològiques.

Les diferències metodològiques en els treballs esmentats podria justificar les diferències entre els resultats del nostre estudi i els demés respecte a la disminució del lactat després de la hiperòxia normobàrica. A més, per comparar correctament els resultats entre els diferents estudis és necessari disposar dels valors de piruvat i sobretot de l'índex L/P i d'aquesta forma identificar si existeix una millora real en el metabolisme cerebral d'aquests pacients. Cal tenir en compte també, que les diferents velocitats de reacció dels enzims implicats en la glucòlisi, com la lactat deshidrogenasa o la piruvat deshidrogenasa, també seràn un factor limitant en els balanços obtinguts tant de lactat com de piruvat.

Tot i que el lactat no és un indicador per ell mateix fiable de hipòxia tissular, la combinació dels valors del lactat, del piruvat i de l'índex L/P si que té un paper rellevant en la detecció del metabolisme anaeròbic (Magnoni et al., 2003). El piruvat és el producte final de la glucòlisi, i si existeix O_2 suficient entra al cicle de l'àcid cítric en forma d'acetil conenzima A i és posteriorment oxidat

a CO₂ i H₂O mitjançant la cadena respiratòria mitocondrial (Magnoni et al., 2003).

Al nostre estudi l'índex L/P no es va modificar de forma significativa després de la hiperòxia. La mediana per l'índex L/P basal va ser de 22,7 éssent de 23,4 després de les dues hores de tractament hiperòxic. Els nivells de lactat van augmentar discretament de 2,2mM a 2,8mM, però en canvi els valors de piruvat no es van modificar després de la hiperòxia. Al treball de Magnoni i col. (Magnoni et al., 2003) els valors de lactat i de piruvat van disminuir en la mateixa mesura i com a conseqüència l'índex L/P es va mantenir invariable després del test. Els nivells basals de l'índex L/P van ser de 19±12 i de 18±11 després del tractament hiperòxic.

Donat que una de les nostres hipòtesis era que no tots els pacients reaccionen de la mateixa manera al tractament hiperòxic, vam analitzar les dades metabòliques dels pacients en funció de la seva resposta al tractament, trobant a la nostra sèrie 8 patrons diferents de lactat i d'índex L/P dels nou possibles. Vam observar que el piruvat canviava molt independentment de l'augment o disminució del lactat i de l'índex L/P després de la hiperòxia. També vam observar que els canvis de lactat i d'índex L/P en quant a augment o disminució posthiperòxia no sempre van en paral·lel.

La combinació més freqüent en la nostra sèrie va ser la d'una disminució tant en el lactat com en l'índex L/P cerebral (32,3%). Les respostes a la hiperòxia estan influenciades per l'heterogeneïtat dels pacients, però almenys en alguns pacients els mitocondris es trobaven suficientment intactes per incrementar la seva funció en resposta a l'estímul d'O₂. La segona combinació en freqüència és la de l'increment de lactat i del cocient L/P després de la hiperòxia (19,4%). En aquests pacients es podria considerar que el metabolisme ha empitjorat després del tractament, potser com a conseqüència d'una disfunció mitocondrial important. Això podria explicar el perquè existeixen diferències en quant a resultats en els diferents estudis que s'ha publicat sobre el tema. És possible que les diferents sèries estiguessin formades per diferent proporció de pacients amb diferent resposta a la hiperòxia.

5. Efectes de la hiperòxia normobàrica en la PtiO₂ i la PaO₂

El cervell dels mamífers és un òrgan que requereix un aport d'O₂ suficient al mitocondri per mantenir una producció d'ATP adequada. L'aport d'O₂ al cervell és multifactorial i depèn del FSC, de la capacitat de transport d'O₂ per la sang, de l'afinitat de l'O₂ per l'Hb, de les característiques de l'Hb, de la conductància en la difusió des dels capil·lars arterials a les cèl·lules i dels gradients de PaO₂ entre la sang arterial i el compartiment intracel·lular (Massabuau, 2001).

La hiperòxia normobàrica es considera una maniobra terapèutica simple i relativament segura en pacients ventilats amb un TCE quan aquesta es manté durant un període limitat de temps. En els últims anys, diversos estudis han observat que incrementar la FiO₂ en pacients amb lesions cerebrals greus incrementa substancialment els valors de la PtiO₂. Aquesta resposta, que no es considera fisiològica, ha estat suggerida per alguns autors com una forma senzilla de determinar la fiabilitat del sensor de PtiO₂ quan existeixen dubtes sobre els seu funcionament correcte. A més, alguns autors han proposat que incrementar la FiO₂ fins a nivells supranormals podria ser una maniobra efectiva per millorar l'oxigenació cerebral quan la PtiO₂ es troba reduïda, així com un mètode de profilaxis contra la hipòxia (Menzel et al., 1999a).

En el nostre estudi els valors de PtiO₂ i PaO₂ van augmentar de forma significativa respecte als basals després de dues hores de hiperòxia normobàrica. Aquestes troballes estan en consonància amb els resultats obtinguts en nombrosos treballs (Longhi et al., 2002; Magnoni et al., 2003; Menzel et al., 1999b; Menzel et al., 1999a; Reinert et al., 2003; Rossi et al., 2001). Alguns investigadors han suggerit que és l'increment de la PtiO₂ i no l'increment en el contingut arterial d'O₂ el que afectaria els processos que transcorren a nivell cel·lular o mitocondrial, incrementant d'alguna forma la fosforilació i/o activitat de certs enzims del cicle de Krebs. Respecte la correlació entre la PtiO₂ i la PaO₂, no vam trobar una correlació estadísticament significativa entre ambdós variables (Rho=0,5, P= 0,165). Alguns estudis si que han observat que la

PtiO₂ cerebral i la PaO₂ presenten una relació lineal en les lesions cerebrals (Menzel et al., 1999b; van Santbrink et al., 1996).

Els pacients inclosos a l'estudi de hiperòxia van presentar una mitja de PtiO₂ basal superior a 20mmHg, com en altres estudis (Magnoni et al., 2003; Menzel et al., 1999a; Reinert et al., 2003; Toliaş et al., 2004). Només 4 pacients es van considerar hipòxics (PtiO₂ < 15mmHg) de forma basal. Aquest subgrup de pacients va presentar una disminució en els nivells de lactat cerebral després de la hiperòxia, tot i que el tamany mostral no permet extreure cap tipus de conclusió ni realitzar un anàlisi estadístic adient. En aquest subgrup de pacients l'índex L/P va augmentar després del tractament hiperòxic.

En un estudi de Zauner i col. (Zauner et al., 1997) es va determinar que si la tensió d'O₂ disminuïa per sota de 20mmHg aleshores el metabolisme aeròbic s'interrompia. De totes maneres, s'ha de puntualitzar que la PtiO₂ mínima requerida per proporcionar O₂ intracel·lularment és del tot desconeguda (Verweij et al., 2007) i que la definició de isquèmia no està plenament validada. A més, s'ha suggerit que la distància de difusió d'O₂ desde la microcirculació cerebral és major després d'un TCE, degut a l'edema i al dany tissular. En aquestes situacions el cervell requeriria tensions d'O₂ superiors per mantenir una oxigenació cerebral suficient (Zauner et al., 2002). A més, el transport d'O₂ sense l'Hb podria ser més important del que es pensa. Amb tensions d'O₂ normals, l'O₂ dissolt al plasma és negligible, però la hiperòxia normobàrica incrementa la quantitat d'O₂ dissolt aproximadament de 0.5 - 1vol% (Diringer, 2008).

Cal destacar que tant el catèter de microdiàlisi com el sensor de PtiO₂ en aquest estudi es van implantar en teixit macroscòpicament no lesionat. Idealment, seria recomanable implantar dos sensors de PtiO₂ i dos de microdiàlisi cerebral, a la zona de penombra i a la zona no lesionada, però per raons òbvies no és possible monitoritzar amb tants sensors un pacient.

6. Metabolisme aeròbic en el pacient amb una lesió cerebral

En condicions normals el metabolisme aeròbic és depenent de dos factors: 1) de la disponibilitat de substrats adequada i 2) de l'existència de mitocondris amb una funció apropiada. Si qualsevol dels dos està alterat l'altre factor és irrellevant. Els mitocondris han d'estar suficientment intactes per poder augmentar la seva funció en resposta a la hiperòxia.

Un estudi experimental de Lifshitz y col. (Lifshitz et al., 2003) va determinar que la morfologia mitocondrial i la seva funció estan alterats després de provocar una lesió traumàtica al cervell de rates. L'anàlisi per microscopia electrònica va revelar que existia una elevada variabilitat en el tamany, la forma i l'estructura interna dels mitocondris, depenent del grau d'afectació. El treball va suggerir que en la tumefacció produïda per l'entrada massiva de Ca^{2+} a l'interior de mitocondris aïllats del teixit lesionat, intervenia el porus de transició de permeabilitat mitocondrial. Finalment, aquest estudi va demostrar també que al SNC existeixen poblacions de mitocondris, amb diferent sensibilitat a les lesions per l'entrada del Ca^{2+} . Un increment significatiu de la PtiO_2 no és suficient per millorar el metabolisme aeròbic si la majoria de mitocondris no es troben intactes i normofuncionants. A més, si existeix una disfunció mitocondrial el metabolisme aeròbic canvia a l'anaeròbic, inclús amb una oxigenació normal (Verweij et al., 2000).

Darrerament s'ha determinat que el traumatisme cranial condueix a un estat d'alteració metabòlica persistent que no es correlaciona primordialment amb un fenomen isquèmic (Vespa et al., 2005). En aquest treball, els investigadors varen observar que existia una baixa incidència de isquèmia cerebral, tot i que el PET es realitzava passades les 24 hores desde el traumatisme, la qual cosa difereix amb estudis previs que van detectar una elevada incidència de isquèmia a la fase aguda del TCE (Bouma et al., 1991; Graham and Adams, 1971). En un altre estudi, els increments mantinguts en el cocient L/P eren més freqüents en el teixit pericontusional que en el teixit normal, però l'índex L/P no es correlacionava amb la PPC (Vespa et al., 2007). En futurs estudis seria molt interessant avaluar l'efecte de la hiperòxia

normobàrica només en pacients hipòxics, per analitzar si aquests pacients obtindrien una millora metabòlica respecte els millor oxigenats.

Un altre aspecte a considerar en el tractament hiperòxic és la vasoconstricció induïda pels nivells elevats d'O₂, que en el present estudi (Vilalta et al., 2009b) no s'ha analitzat. Mentre que la vasodilatació a la hipoxèmia té una explicació fisiològica clara (manteniment de l'alliberació cerebral d'O₂), les raons de la vasoconstricció després de la hiperòxia són menys òbvies. Una hipòtesi seria que la vasoreactivitat cerebral a l'O₂ és un mecanisme amb el qual el cervell intenta protegir-se d'elevades pressions d'O₂, potser per reduir la producció de radicals lliures d'O₂ (Johnston et al., 2003). És conegut que després de la hiperòxia la producció de radicals d'O₂ augmenta i podria provocar un increment en la peroxidació lipídica (Raha and Robinson, 2001). Contràriament que als pulmons, que estan exposats a elevades concentracions d'O₂ inhalat, els demás òrgans (com el cervell) es troben protegits de les elevades pressions d'O₂, per enzims anitoxidants i *scavengers* de radicals lliures, podent ser lesionats per l'estrés oxidatiu si els mecanismes de protecció no són suficients. Per tots aquests motius és recomanable tenir present aquest efecte deleteri de la hiperòxia. El límit màxim permès per evitar l'aparició de toxicitat d'O₂ al pulmó s'estima que és de 24 hores (Alves et al., 2004), tot i que aquest límit no ha estat establert per altres òrgans com l'encèfal.

Una de les limitacions del nostre estudi de hiperòxia (Vilalta et al., 2009b) és que no vam disposar del càlcul del CMRO₂ amb PET o fosfats cerebrals d'elevada energia mitjançant la ressonància magnètica, com en estudis recents (Diringer et al., 2007; Nortje et al., 2008). En l'estudi de Diringer i col. (Diringer et al., 2007) el CMRO₂ no va canviar quan la FiO₂ es va pujar del 40% al 100%, mentre que en el de Nortje i col. (Nortje et al., 2008) el CMRO₂ va augmentar en el teixit en situació de "risc", en absència de canvis significatius en altres paràmetres, implicant un benefici metabòlic preferencial amb la hiperòxia.

7. Mecanismes tissulars de regulació de l'O₂

Malgrat que existeixen poques dades disponibles en humans, nombrosos estudis experimentals han demostrat que l'O₂ està controlat de forma molt precisa al cervell dels mamífers, independentment de canvis abruptes en la PaO₂ (Massabuau, 2003). En aquests estudis s'observa que un increment en la FiO₂ i posteriorment en la PaO₂ indueixen inicialment un increment moderat en la PtiO₂, que ràpidament es segueix d'una fase de meseta o *plateau* (Rossi et al., 2001). Aquesta estratègia s'ha denominat "estratègia de baix PaO₂ sanguini", que d'acord amb Massabuau és un mecanisme filogenèticament evolutiu dirigit a protegir els diferents òrgans de la potencial toxicitat de l'O₂. A més, les dades proporcionades tant per estudis clínics com experimentals objectiven que la resposta més freqüent del cervell traumàtic a la hiperòxia és que la PtiO₂ augmenta de forma important, sense arribar a una meseta de forma ràpida o arribant a valors supranormals d'O₂. Aquestes dades es troben en una clara contradicció amb el que es podria considerar una resposta fisiològica. Aquesta resposta fisiològica moderada a l'increment de PaO₂ també el vam observar en un estudi preliminar de 6 pacients que es van sotmetre a una cirurgia per l'evacuació d'un tumor supratentorial o una malformació arteriovenosa, els quals van ser monitoritzats intraoperatòriament, sota anestèsia general i en els que es va incrementar la FiO₂ per avaluar els canvis de la PtiO₂ en el teixit cerebral normal (dades no publicades). Els valors de PtiO₂ del sensor situat a una regió aparentment sana no es van modificar substancialment després de l'augment de la PtiO₂ (dades no publicades).

Una hipòtesi factible seria que la PtiO₂ es troba estrictament regulada al teixit cerebral normal i que els increments en la PtiO₂ després de la hiperòxia haurien de ser moderats si els mecanismes de regulació de l'O₂ estiguessin intactes. Així, els increments pronunciats de PtiO₂ observats després del tractament hiperòxic en els pacients amb un TCE moderat o greu, podrien considerar-se una resposta anormal del cervell traumatitzat, en el que els mecanismes de regulació de l'O₂ s'han perdut parcial o completament.

De totes formes, tot i que els increments pronunciats de P_{tiO_2} que s'han observat després del tractament hiperòxic fossin deguts a una resposta anormal del cervell lesionat, aquests increments podrien ser beneficiosos si s'acompanyessin de beneficis en altres aspectes del metabolisme cerebral, com la disminució del cocient L/P o per un augment del consum cerebral d' O_2 . No obstant això, no és el que hem observat de forma global a la nostra sèrie de malalts, a excepció de quan analitzem la diferent resposta dels pacients a la hiperòxia on semblaria que un subgrup de malalts es podria beneficiar, en disminuir tant el lactat com el cocient L/P. De totes maneres és necessari incrementar el tamany mostral d'aquest subtipus de pacients, així com estudiar més a fons el comportament del piruvat i el significat real del seu augment o descens en relació amb el cocient L/P. En futurs estudis també seria important estudiar l'efecte de la hiperòxia en un grup homogeni de pacients amb lactats basals elevats ($>4\text{mM}$) i hipòxics ($P_{tiO_2} < 15\text{mmHg}$), ja que en situacions de hipòxia cerebral isquèmica o no isquèmica és quan el tractament hiperòxic podria ser potencialment beneficiós, en incrementar els gradients d' O_2 desde el capil·lar al mitocondri.

En el moment actual, la hiperòxia normobàrica és motiu d'importantes controvèrsies i no existeix encara una opinió unànime sobre si pot ser o no útil per millorar el metabolisme cerebral després d'un TCE. Abans de posar en marxa assajos clínics controlats en fase III per intentar demostrar la possible millora significativa en el resultat neurològic d'aquests pacients, s'hauria de clarificar el perquè de les discrepàncies obtingudes pels diferents grups de investigació. Fins el moment actual, no existeixen sèries que puguin ser comparades. Un altre punt a considerar és obtenir un millor coneixement de quina és la resposta normal de l'encèfal després d'un augment de PaO_2 . Finalment s'hauria d'identificar i definir de forma precisa si realment existeix un subgrup de pacients on la hiperòxia normobàrica podria ser beneficiosa.

8. La neuroinflamació al traumatisme cranial

Les lesions secundàries juguen un paper molt important a la fase aguda del traumatisme cranial i contribueixen significativament al resultat neurològic final dels pacients amb un TCE (McIntosh et al., 1998). Estudis recents han suggerit que la neuroinflamació representa un paper primordial en la fisiopatologia del TCE, tradicionalment relegada a un segon pla. El procés inflamatori té com principal diana la BHE, alterant la seva integritat estructural, la seva permeabilitat i permetent la infiltració de leucòcits a través d'ella i facilitant d'aquesta manera la formació d'edema cerebral (Morganti-Kossmann et al., 2002; Schmidt et al., 2005; Stamatovic et al., 2006).

Existeix una evidència creixent que certes proteases es troben sobreexpressades després d'un ictus i un TCE. La sobreexpressió de les gelatinases afavoreix la degradació de la MEC, danyant així l'estructura de la BHE, incrementant la seva permeabilitat i facilitant el desenvolupament de l'edema cerebral (Gasche et al., 2006; Mun-Bryce and Rosenberg, 1998; Pfefferkorn and Rosenberg, 2003; Rosenberg et al., 1998; Zhao et al., 2007). Per exemple, s'han detectat nivells elevats de MMP-9 al plasma de pacients amb un ictus a la fase aguda, i amb certa correlació amb el resultat neurològic (Montaner et al., 2003; Ning et al., 2006). Tot i així, el paper de les gelatinases al TCE encara està molt poc explorat.

9. Perfil temporal de les gelatinases al plasma

Al nostre estudi (Vilalta et al., 2008b), vam observar que existien nivells elevats de les dues proformes de les gelatinases (MMP-2 i MMP-9) a la fase aguda dels TCE moderats i greus. Els nivells d'aquestes gelatinases tendien a disminuir espontàniament durant les primeres 24 hores després del traumatisme, suggerint una "explosió" de la resposta inflamatòria sistèmica induïda pel traumatisme. Els nivells de MMP-9 van romandre elevats a les 24 hores post-TCE quan es compararen amb els voluntaris sans, tot i que amb una clara tendència a la normalització. El mateix patró fou observat per la proforma de la MMP-2, però els canvis entre el temps basal i a les 24 hores no

van ser tant marcats com els trobats amb la MMP-9. Les nostres dades també apunten a que la MMP-2 tindria un paper més selectiu que la MMP-9 a la fase aguda del TCE. Els valors de la MMP-9 van disminuir a les 24 hores tant en el grup control de politraumàtics sense TCE com en el grup de pacients amb TCE. D'altra banda, els nivells de MMP-2 a les 24 hores post-TCE només van romandre elevats al grup d'estudi (pacients amb TCE moderat i greu).

Una possible hipòtesi per explicar aquests resultats seria que la MMP-9 pot tenir un paper essencial en la resposta inflamatòria general a qualsevol traumatisme amb o sense lesió cerebral, tot i que en els pacients amb TCE seria més elevada degut a la font addicional provinent del cervell, mentre que la MMP-2 seria més específica de la lesió cerebral. La sobreexpressió precoç de gelatinases i la tendència a la reducció en el nostre estudi és un fenomen novedós. Suehiro i col. van observar un patró similar i el van atribuir a la utilització de la hipotèrmia moderada que van aplicar als pacients del seu estudi (Suehiro et al., 2004). Donat que nosaltres no vam utilitzar la hipotèrmia moderada en els pacients inclosos al nostre estudi i el descens observat és similar a l'observat pel seu grup (Suehiro et al., 2004), podem suggerir que aquest descens no està relacionat amb la hipotèrmia, sinó que es tracta més aviat d'un descens espontani. Existeix evidència experimental que la hipotèrmia moderada pot modular la resposta neuroinflamatòria i pot ser neuroprotectora al TCE (Truettner et al., 2005) i a l'ictus (Han et al., 2003; Lee et al., 2005; Wang et al., 2002). Malgrat tot, la qüestió sobre si la hipotèrmia produiria un descens més ràpid en els nivells de gelatinases encara queda per resoldre.

10. Les gelatinases a l'espai extracel·lular cerebral

En el nostre estudi de les MMPs en plasma i microdialitzat cerebral (Vilalta et al., 2008b) vam observar un nivells elevats de MMP-2 i MMP-9 a l'espai extracel·lular cerebral dels pacients amb TCE, mostrant que l'alliberació d'aquestes gelatinases no només ocorre a nivell sistèmic sino també localment al teixit cerebral. Segons el nostre coneixement, és el primer cop que es reporta una elevació dels nivells de gelatinases a l'espai extracel·lular cerebral de

pacients amb un TCE. El perfil temporal trobat als microdialitzats cerebrals va ésser molt similar al trobat en mostres plasmàtiques, la MMP-2 i la MMP-9 estaven sempre més elevades al temps basal, tot i que la MMP-9 es va observar més sobreexpressada que la MMP-2, potser degut a un rang més ampli de factors (citocines, factors de creixement, mol·lècules d'adhesió etc) que poden induir la transcripció de la MMP-9 al cervell traumatitzat (Rosenberg, 1995), en comparació amb els de la MMP-2. Aquesta informació és important perquè en aquest estudi els catèters monitoritzaven una zona del cervell no lesionada. Conseqüentment, és esperable que el teixit cerebral danyat (contusions, lesions isquèmiques, etc) presenti nivells més elevats de gelatinases. Així, es demostra que inclús en zones macroscòpicament normals existeix una resposta inflamatòria que pot contribuir a la fisiopatologia de les lesions focals i difuses. De la mateixa manera, hem observat en una sèrie més àmplia de microdialitzats cerebrals que els pacients amb lesions focals presenten nivells més elevats que els que presenten lesions difuses (dades no publicades), probablement en existir en els primers una major alteració de la BHE.

L'edema intra i extracel·lular coexisteix en les diferents fases del TCE, però les alteracions en la permeabilitat de la BHE després del TCE i el perfil temporal de la seva alteració, encara és un trencaclosques per resoldre. Diversos estudis experimentals han objectivat una relació molt estreta entre nivells elevats de MMP al parènquima cerebral i un augment en la permeabilitat de la BHE durant la isquèmia cerebral (Gasche et al., 2006; Mun-Bryce and Rosenberg, 1998; Pfefferkorn and Rosenberg, 2003; Rosenberg et al., 1998). A més, aquest tipus d'associació s'ha realitzat recentment en models experimentals de TCE (Shigemori et al., 2006). Shigemori i col. van observar una gran associació entre els nivells de MMP-9, l'obertura de la BHE i la formació d'edema després d'una contusió cortical en rates. Els nivells de MMP-9 van fer un pic plasmàtic a les 18 hores després del TCE. La màxima disrupció de la BHE es va observar a les 6 hores desde la lesió i l'edema cerebral va ser més sever a les 24 hores de la lesió (Shigemori et al., 2006).

Un altre punt a tenir en compte seria poder aclarir quines cèl·lules produeixen MMPs al cervell traumatitzat humà. Després de la isquèmia

cerebral i de la lesió mecànica, varies cèl·lules al cervell són capaces de secretar MMPs. Les cèl·lules endotelials, microgials, astròcits i inclús les neurones, poden secretar gelatinases després de la simulació d'una lesió mecànica *in vitro* (Wang et al., 2002). Una altra potencial font de MMPs són els leucòcits que travessen el cervell a través de la BHE (Sellebjerg and Sorensen, 2003). Rosell i col. van observar que la MMP-9 es trobava localitzada al voltant dels vasos sanguinis, conjuntament amb la presència de neutròfils immunoreactius perivasculars, en mostres de teixit obtingudes de pacients que van ser exitus per un ictus isquèmic (Rosell et al., 2006).

Una interpretació possible d'aquests resultats és que immediatament després del TCE la resposta inflamatòria s'activaria, i les citocines i els radicals lliures d'O₂ alliberats promourien la sobreexpressió de MMPs. Tot i que la MMP-2 i la MMP-9 poden provenir de la via sistèmica mitjançant la infiltració de leucòcits, part important es produiria localment al teixit cerebral per la microgila i altres cèl·lules nervioses (Rosenberg, 2002; Rosenberg and Mun-Bryce, 2004). Aquesta "explosió" inflamatoria podria contribuir a l'alteració precoç de la BHE i a la formació d'edema postraumàtic.

Estudis preliminars en models experimentals han mostrat que el bloqueig farmacològic de la cinasa regulada extracel·lular pot reduir els nivells de MMP-9 atenuant l'edema cerebral i el dany tissular en ratolins (Mori et al., 2002). Si aquests resultats es poguessin confirmar en humans, existiria l'oportunitat de bloquejar farmacològicament aquesta via o d'altres involucrades en la sobreexpressió d'aquestes proteases (Asahi et al., 2000; Mandal et al., 2003). A més ha estat observat en un model experimental de rata, que la terapia amb O₂ hiperbàric redueix la neuroinflamació i l'expressió de MMP-9 a la fase aguda del TCE (Vlodavsky et al., 2006), obrint una nova línia de recerca amb una potencial implicació en la modulació de la neuroinflamació.

La principal limitació d'aquest estudi és el tamany mostral i en particular, el nombre reduït de mostres obtingudes per microdiàlisi d'alta resolució. Així mateix, una altra limitació és que el nostre estudi es va centrar en esbrinar la sobreexpressió inicial de les gelatinases després del TCE. Les MMPs també

tenen un paper rellevant en la reparació del dany cerebral, i per tant la sobreexpressió que ocorre en una fase tardana del TCE constituiria una resposta necessària, possiblement beneficiosa pel procés de reparació cerebral (Zhao et al., 2007). A més, gràcies a les tècniques de immunohistoquímica en teixit de contusió cerebral i en teixit normal obtingut en intervencions neuroquirúrgiques, podem ser capaços de conèixer quines cèl·lules produeixen MMPs al cervell lesionat.

11. Presència de les gelatinases a les contusions cerebrals

A nivell macroscòpic, l'edema cerebral, ja sigui intracel·lular o extracel·lular, és la causa més important de l'augment de la PIC després del TCE (Marmarou et al., 2006). Diversos estudis han suggerit que una quantitat important d'edema es troba a la part central de les contusions cerebrals i que pot contribuir al fenomen d'edema massiu precoç (Katayama and Kawamata, 2003). Segons els estudis pioners del grup de Katayama, l'edema observat a la part central de les contusions no és estrictament citotòxic o vasogènic sinó que es tracta d'una difusió passiva d'aigua degut a l'elevada osmolalitat produïda per la necrosi de neurones, cèl·lules glials i vasos en aquesta regió (Katayama and Kawamata, 2003). De totes maneres, l'edema vasogènic provocat per la disrupció de la BHE també facilita l'augment del contingut cerebral d'aigua.

En el nostre estudi en contusions cerebrals (Vilalta et al., 2008a) vam trobar nivells elevats de MMP-9 en contusions cerebrals, en comparació amb els teixit control. Aquestes troballes van ser confirmades amb la zimografia in situ, que va mostrar una activitat gelatinasa superior a les contusions que als teixit control. Les dues gelatinases van presentar diferent perfil temporal a les contusions cerebrals, on la MMP-9 fou més elevada en tot el període amb dos pics a les primeres 24 hores i de les 48 a les 96 hores desde el TCE. Tot i que els nivells de MMP-2 van ser més elevats a les contusions cerebrals extretes de les 24 a les 96 hores desde el TCE, les petites diferències entre els grups control i els d'estudi, a més de l'ampli rang de MMP-2 detectat en controls, impedeixen formular cap conclusió respecte els nivells de MMP-2, tot i que potser amb un tamany mostral superior les diferències podrien ser majors. Les nostres troballes,

si es confirmen en sèries més grans, suggereixen una sobreexpressió precoç de MMP-9, obrint expectatives terapèutiques dirigides a noves dianes pel tractament farmacològic de les contusions cerebrals. Estudis experimentals recents han mostrat que el bloqueig farmacològic de la cinasa regulada extracel·lular pot reduir els nivells de MMP-9, atenuant l'edema cerebral i el dany tissular en ratolins (Katayama and Kawamata, 2003; Mori et al., 2002), implicant un futur prometedor per la intervenció farmacològica dels pacients amb TCE.

Diversos estudis també han demostrat una relació estreta entre diferents citocines i l'increment de les MMPs a la fase aguda. En aquests estudis (Aibiki et al., 1999; Mori et al., 2002; Suehiro et al., 2004), es va detectar una correlació significativa entre els nivells sanguinis de MMP-9 i la IL-6, la qual cosa implica que d'una forma encara desconeguda la IL-6 s'associaria amb els increments de MMP-9. A més, en un estudi preliminar realitzat pel nostre grup, vam observar un increment dels nivells de IL-6 i IL-1 β de les 24 a les 48 hores postraumatisme cranial, seguits per un increment dels nivells de MMP-9 de les 48 a les 96 hores postraumatisme cranial en els homogenitzats dels teixits de contusió cerebral (Vilalta et al., 2008a).

El nostre estudi en contusions cerebrals (Vilalta et al., 2008a) no va ésser dissenyat per investigar el resultat funcional en relació als nivells de gelatinases, però vam observar que els pacients amb pitjor resultat presentaven nivells més elevats de MMP-9 que els pacients amb millor resultat funcional. Tot i així, és necessari realitzar estudis dissenyats acuradament i en sèries més grans per verificar o refutar aquests resultats.

Tal i com s'ha comentat anteriorment, les MMPs es sobreexpressen en el TCE però també poden tenir un paper important en la reparació del dany tissular cerebral (Zhao et al., 2007). És necessari aprofundir en aquest tema per determinar si l'augment de qualsevol gelatinasa s'hauria de bloquejar completa o parcialment, depenent de la seva naturalesa reparadora o de la seva condició patològica i sobretot en funció de la seva expressió temporal després del traumatisme.



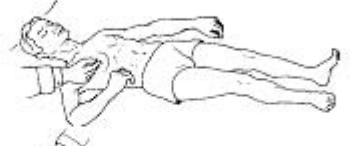



CONCLUSIONS

Les conclusions d'aquesta tesi són les següents:

1. La microdiàlisi cerebral és una tècnica extremadament sensible que pot aportar informació metabòlica precoç sobre la instauració d'una lesió tissular i sobre els efectes de certes teràpies en el metabolisme energètic, aportant una informació molt superior a altres sistemes de neuromonitoratge.
2. La microdiàlisi cerebral és la tècnica d'elecció quan es requereix monitoritzar el lactat cerebral a la capçalera del pacient amb traumatisme cranial. Les AVDL o les variables calculades (LOI) no són tècniques fiables per determinar un increment en la producció de lactat cerebral en aquest tipus de pacients.
3. La hiperòxia normobàrica incrementa els valors de P_{tiO_2} i de P_{aO_2} en els pacients amb traumatisme cranioencefàlic moderat i greu, tot i que aquest augment no segueix una correlació de tipus lineal. No obstant això, aquest augment de P_{tiO_2} no és indicatiu d'una millora en el metabolisme energètic cerebral, ja que no disminueix els valors de lactat ni de l'índex L/P cerebral de forma global.
4. Existeix una sobreexpressió de gelatinases a la fase aguda del traumatisme cranial que sembla ser inespecífica de qualsevol lesió traumàtica, tot i que superior en els malalts que han sofert un traumatisme cranioencefàlic moderat o greu. Existeixen nivells plasmàtics elevats a la fase aguda de les gelatinases MMP-2 i MMP-9 que disminueixen significativament a les 24 hores de la lesió. Existeixen nivells elevats de gelatinases, i especialment de la MMP-9, a les contusions cerebrals en la fase aguda dels pacients amb un traumatisme cranial moderat o greu. Els pacients amb pitjor resultat funcional presenten nivells més elevats de MMP-9 que els pacients amb un millor resultat neurològic. A l'espai extracel·lular cerebral d'aquests pacients, la MMP-2 y la MMP-9 segueixen un perfil temporal similar al plasmàtic.
5. Les gelatinases podrien estar implicades en la disrupció de la barrera hematoencefàlica i en la formació de l'edema cerebral, després d'un traumatisme cranioencefàlic en humans. Aquestes proteases, podrien ser en un futur una nova diana terapèutica per millorar el resultat dels pacients amb TCE moderat i greu.

ANNEXES

1. Escala del Coma de Glasgow (GCS)

Escala del Coma de Glasgow			
Resposta motora		Pupiles	
6 Obeeix ordres		● 9	
5 Localitza el dolor		● 8	
4 Retirada al dolor		● 7	
3 Flexió anormal		● 6	
2 Extensió		● 5	
1 No resposta		● 4	
		● 3	
		● 2	
		● 1	
		mm	
Resposta Verbal		Obertura ulls	
Orientada	5	Espontània	4
Confusa	4	A l'orde	3
Inapropiada	3	Al dolor	2
Incomprensible	2	No obertura	1
No resposta	1		

Escala de valoració del nivell de consciència.

Consideracions a tenir en compte per la valoració del GCS

- 1) Aplicar un estímul adequat fins a aconseguir la màxima resposta
- 2) Puntuació total: resposta motora + resposta verbal + obertura ulls
- 3) Proporcionar la puntuació en cada un dels apartats
- 4) Registrar sempre la millor observació
- 5) Puntuació mínima: 3 (pacient sense cap tipus de resposta)
- 6) Puntuació màxima: 15 (nivell de consciència normal)
- 7) Coma: puntuació igual o inferior a 8 en el GCS
- 8) TCE lleu: GCS = 14-15; TCE moderat: GCS ≥ 8-13; TCE greu: GCS ≤ 8

2. Traumatic Coma Data Bank (TCDB)

Classificació dels tipus d'anomalies visualitzades a la TC cerebral	
Tipus	Definició
Lesió difusa tipus I (patologia no visible)	La TC cerebral no mostra cap imatge patològica
Lesió difusa tipus II	Cisternes visibles. Línia mitja centrada o desviació entre 0-5 mm. No lesions hemàtiques > 25 cc.
Lesió difusa tipus III (<i>swelling difús</i>)	Cisternes comprimides o absents. Línia mitja centrada o desviació entre 0-5 mm. No lesions hemàtiques > 25cc.
Lesió difusa tipus IV (<i>swelling unilateral</i>)	Línia mitja desviada > 5 mm No lesions hemàtiques > 25 cc.
Massa evacuada	Lesió que ha estat evacuada quirúrgicament
Massa no evacuada	Lesió > 25 cc no evacuada quirúrgicament

3. Injury Severity Score (ISS)

L'escala ISS avalua la severitat del traumatisme en funció de la gravetat de les lesions anatòmiques en els diferents sistemes de l'organisme. L'ISS (Baker et al., 1974) pren pel càlcul la lesió més greu de cada una de les tres zones anatòmiques més greument afectades segons l'escala AIS (a continuació). Aquesta puntuació de gravetat s'eleva al quadrat i es sumen els resultats. La puntuació màxima teòrica és de 75 i la mínima és de 3 punts.

Classificació

Traumatisme lleu: 1 a 15 punts

Traumatisme moderat: 16 a 24 punts

Traumatisme greu: > 25 punts

Escala AIS pel càlcul de l'ISS

Respiratori	Punts
Dolor toràcic: troballes mínimes	1
Contusió de la paret toràcica: fractura costal o esternal.	2
Fractura 1 ^a costella o múltiple, hemotòrax, neumotòrax.	3
Ferida oberta, neumotòrax a tensió, volet o contusió pulmonar bilateral.	4
Insuficiència respiratòria aguda, aspiració, volet o contusió pulmonar bilateral, laceració diafragmàtica.	5
Sistema nerviós	
Traumatisme tancat sense fractures ni pèrdua de consciència.	1
Fractura cranial, una fractura facial, pèrdua de consciència (GCS = 15).	2
Lesió cerebral, fx cranial deprimida, fractura facial múltiple, pèrdua consciència (GCS < 15)	3
Pèrdua de consciència, (GCS < 6), fractura cervical amb paraplàgia.	4
Coma durant més de 24 hores, fractura cervical amb tetraplàgia.	5
Coma, pupil·les dilatades i fixes	6
Cardiovascular	
Pèrdua hemàtica <10%.	1
Pèrdua hemàtica del 10 al 20 %, contusió miocàrdica.	2
Pèrdua hemàtica del 20 al 30 %, taponament, tensió arterial (TA) normal.	3
Pèrdua hemàtica del 30 al 40 %, taponament, TA sistòlica < 80.	4
Pèrdua hemàtica del 40 al 50 %. Coma. Agitació.	5
Pèrdua hemàtica >50 %. Coma. Parada cardíaca.	6
Abdomen- Pelvis	
Sensibilitat moderada a la paret abdominal o flancs amb signes peritoneals.	1
Fractura costelles 7- 12, dolor abdominal moderat.	2
Una lesió: menor hepàtica, intestí prim, melsa, ronyó, pàncrees o urèter.	3
Dos lesions majors: ruptura hepàtica, bufeta, pàncrees, duodé o còlon.	4
Dos lesions greus: lesió per aixafament del fetge, lesió vascular major.	5
Extremitats- Pelvis òssea	
Esguinç o fractura menor, no afectació d'ossos llargs.	1
Fractura simple: húmer, clavícula, radi, cúbit, tíbia, peroné.	2
Fractures múltiples: simple de fèmur, pèlvica estable, luxació major.	3
Dues fractures majors: complexa de fèmur, aixafament membre o amputació, fractura pèlvica inestable.	4
Dues fractures greus: fractures majors múltiples.	5
General o Externa	
Cremades < 5%, abrasions, contusions, laceracions.	1
Cremades del 5 al 15 %, contusions extenses.	2
Cremades del 15 al 30 %, avulsions severes.	3
Cremades del 30 al 45 %.	4
Cremades del 45 al 60 %.	5
Cremades > 60%.	6

4. Glasgow Outcome Scale Extended (GOSE)

Entrevista estructurada pels resultats de l'escala de Glasgow – Ampliada

Entrevistador _____ Data _____ Id Pacient _____

CONSCIÈNCIA	
<p>1. La persona amb lesió cranial és capaç d'obeir ordres senzilles o de dir alguna paraula?</p>	<input type="checkbox"/> 1= Si 2=No (VS)
<p>Qualsevol persona que mostri una habilitat per obeir encara que siguin ordres senzilles, o de dir qualsevol paraula o comunicar específicament de qualsevol manera, ja no es considera en estat vegetatiu (VS). Els moviments oculars no formen una evidència fiable de resposta. Corroborar amb l'equip d'infermeria i/o altres cuidadors. La confirmació de VS necessita una valoració completa.</p>	
INDEPENDÈNCIA A CASA	
<p>2a. És necessària l'ajuda d'una altra persona a casa per realitzar algunes de les activitats de la vida diària?</p>	<input type="checkbox"/> 1= Si 2= No Anar a 3
<p>Per una resposta "No" haurien de ser capaços de cuidar-se a casa durant 24 hores si calgués, tot i que no ho hagin de fer. La independència inclou l'habilitat de programar i dur a terme les activitats següents: rentar-se, posar-se roba neta sense ser induït per això, preparar-se el menjar, controlar les trucades i les crisis domèstiques menors. La persona hauria de ser capaç de dur a terme activitats sense la necessitat de que algú l'indueixi per això o li recordi, i hauria de ser capaç de quedar-se sola per la nit.</p>	
<p>2b. Necessiten ajuda amb freqüència o necessiten estar amb algú la majoria del temps?</p>	<input type="checkbox"/> 1= Si (SD baixa) 2= No (SD alta)
<p>Per una resposta "No" haurien de ser capaços de cuidar-se a casa durant 8 hores al dia si fos necessari, encara que no ho hagin de fer a la pràctica.</p>	
<p>2c. El pacient era independent a casa abans de l'accident?</p>	<input type="checkbox"/> 1= Si 2= No
INDEPENDÈNCIA FORA DE CASA	
<p>3a. Poden realitzar compres sense ajuda?</p>	<input type="checkbox"/> 1= Si 2= No (SD alta)
<p>Això inclou ser capaç de programar el que s'ha de comprar, controlar els diners ells mateixos, i comportar-se adequadament en públic. No fa falta que facin les compres normalment però si han de ser capaços de fer-ho si és necessari.</p>	
<p>3b. Eren capaços de realitzar compres abans de l'accident?</p>	<input type="checkbox"/> 1= Si 2= No

<p>4a. Són capaços de viatjar localment sense ajuda?</p>	<input type="checkbox"/> 1= Si 2= No (SD alta)
<p>Poden conduir o utilitzar el transport públic per desplaçar-se. L'habilitat per poder agafar un taxi és suficient sempre i quan la persona pugui trucar al servei de taxis ella mateixa i donar les instruccions al conductor.</p>	
<p>4b. Eren capaços de viatjar sense ajuda abans de l'accident?</p>	<input type="checkbox"/> 1= Si 2= No
<p>FEINA</p>	
<p>5a. Són capaços actualment de treballar i/o cuidar a altres?</p>	<input type="checkbox"/> 1= Si <i>Anar a 6</i> 2= No
<p>Per contestar "Si" no han d'haver tornat necessàriament a la feina però se'ls considera capacitats.</p>	
<p>5b. Fins a quin punt estan limitats? a) Capacitat de treball reduïda? b) Capaç de treballar únicament en un grup de treball protegit o en un treball no competitiu o actualment incapaç de treballar.</p>	<input type="checkbox"/> 1= a (MD alta) 2= b (MD baixa)
<p>5c. El nivell de limitació representa un canvi respecte a la situació pre-traumàtica?</p>	<input type="checkbox"/> 1= Si 2= No
<p>ACTIVITATS SOCIALS I D'OCI</p>	
<p>6a. Són capaços de tenir de nou de forma regular activitats socials i d'oci fora de casa?</p>	<input type="checkbox"/> 1= Si <i>Anar a 7</i> 2= No
<p>No han d'haver començat altre cop les seves activitats d'oci prèvies, però no han de veure's incapacitats per desenvolupar-les per discapacitat física o mental. Si han deixat la majoria d'activitats per falta de interès o de motivació, això també es considera com una discapacitat.</p>	
<p>6b. Quina és la restricció en les seves activitats socials i d'oci? a) Participa una mica menys: almenys la meitat menys. b) Participa molt menys: menys de la meitat que abans. c) Incapaç de participar: rarament participa o mai.</p>	<input type="checkbox"/> 1= a (GR) 2= b (MD alta) 3=c (MD baixa)
<p>6c. L'extensió de la restricció en les seves activitats socials o d'oci regulars fora de casa han canviat respecte a la situació pre-traumàtica?</p>	<input type="checkbox"/> 1= Si 2= No

FAMÍLIA I AMISTATS	
<p>7a. S'han vist afectades les relacions amb la família o amb les amistats degut a problemes psicològics?</p> <p>Els canvis de personalitat post-traumàtics típics són: geni viu, irritabilitat, angoixa, falta de sensibilitat cap als demés, canvis d'ànim, depressió i comportament no raonable o infantil.</p>	<input type="checkbox"/> 1= Si <input type="checkbox"/> 2= No <i>Anar a 8</i>
<p>7b. Quina ha estat l'extensió dels problemes o de les tensions?</p> <p>a) Ocasional – Menys d'un cop per setmana b) Freqüent – Un cop per setmana o més, però tolerable c) Constant – Diàriament i intolerable</p>	<input type="checkbox"/> 1= a (GR baixa) <input type="checkbox"/> 2= b (MD alta) <input type="checkbox"/> 3= c (MD baixa)
<p>7c. El nivell de problemes o la tensió representen un canvi respecte a la situació pre-traumàtica?</p> <p>Si existien problemes abans de l'accident però aquests han empitjorat significativament després de l'accident, aleshores contesti "Si" a la pregunta 7c.</p>	<input type="checkbox"/> 1= Si <input type="checkbox"/> 2= No
TORNADA A LA VIDA NORMAL	
<p>8a. Existeixen altres problemes a l'actualitat relacionats amb l'accident que afecten la vida diària?</p> <p>Altres problemes típics comunicats després d'un trauma cerebral són: mal de cap, marejos, sensibilitat al soroll o a la llum, enlentiment, errades de memòria i problemes de concentració.</p>	<input type="checkbox"/> 1= Si (GR baix) <input type="checkbox"/> 2= No (GR alt)
<p>8b. Si existien problemes similars abans de l'accident, aquests han empitjorat significativament?</p>	<input type="checkbox"/> 1= Si <input type="checkbox"/> 2= No
<p>9. Quin és el factor més important en el resultat?</p> <p>a) Efecte del trauma cerebral b) Efecte de la malaltia o lesió en una altra part del cos c) Una barreja dels dos</p>	<input type="checkbox"/>

BIBLIOGRAFÍA

The Brain Trauma Foundation. The American Association of Neurological Surgeons. The Joint Section on Neurotrauma and Critical Care. Trauma systems. (2000). *J Neurotrauma* 17, 457-462.

The Brain Trauma Foundation. The American Association of Neurological Surgeons. The Joint Section on Neurotrauma Critical Care. Management and prognosis of severe traumatic brain injury. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. (2007). 3rd Edition. *J Neurotrauma* 24[S1], 1-106.

Abilleira,S., Montaner,J., Molina,C.A., Monasterio,J., Castillo,J., and Alvarez-Sabin,J. (2003). Matrix metalloproteinase-9 concentration after spontaneous intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg* 99, 65-70.

Aibiki,M., Maekawa,S., Ogura,S., Kinoshita,Y., Kawai,N., and Yokono,S. (1999). Effect of moderate hypothermia on systemic and internal jugular plasma IL-6 levels after traumatic brain injury in humans. *J Neurotrauma* 16, 225-232.

Al Rawi,P.G. (2005). Near infrared spectroscopy in brain injury: today's perspective. *Acta Neurochir Suppl* 95, 453-457.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, and Watson,J. (1994). *Biología Molecular de la Cèl·lula*.

Alessandri,B., Doppenberg,E.M., Zauner,A., Woodward,J., Choi,S., and Bullock,M.R.R. (1999). Evidence for time-dependent glutamate-mediated glycolysis in head-injured patients: a microdialysis study. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 75, 25-28.

Alessandri,B., Reinert,M., Young,H.F., and Bullock,R. (2000). Low extracellular (ECF) glucose affects the neurochemical profile in severe head-injured patients. *Acta Neurochir Suppl* 76, 425-430.

Almeida,A., Delgado-Esteban,M., Bolanos,J.P., and Medina,J.M. (2002). Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture. *J Neurochem* 81, 207-217.

Alves,O.L., Daugherty,W.P., and Rios,M. (2004). Arterial Hyperoxia in Severe Head Injury: A Useful or Harmful Option? *Curr Pharm Design* 10, 2163-2176.

Amberg,G. and Lindefors,N. (1989). Intracerebral microdialysis: II. Mathematical studies of diffusion kinetics. *J Pharmacol Methods* 22, 157-183.

Arikan,F., Vilalta,J., Minoves,T., Moncho,D., Vilalta,A., Moguer,M., Ibarra,B., and Sahuquillo,J. (2008). Detección de episodios isquémicos tisulares mediante la monitorización intraoperatoria neurofisiológica combinada con la monitorización de la oxigenación tisular en la cirugía de aneurismas. *Neurocirugía (Astur.)* 19, 113-120.

Asahi,M., Asahi,K., Jung,J.C., del Zoppo,G.J., Fini,M.E., and Lo,E.H. (2000). Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 1681-1689.

Asensio,V.C. and Campbell,I.L. (1999). Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. *Trends Neurosci* 22, 504-512.

Atkins,P.W. (1994). Molecules in motion. In *Physical Chemistry*, (Oxford: Oxford University Press), pp. 817-860.

Baker,S.P., O'Neill,B., Haddon,W., Jr., and Long,W.B. (1974). The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *J Trauma* 14, 187-196.

Barnum,S.R. (2002). Complement in central nervous system inflammation. *Immunol Res* 26, 7-13.

Basu,A., Krady,J.K., and Levison,S.W. (2004). Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation. *J Neurosci Res* 78, 151-156.

Bellander,B.M., Cantais,E., Enblad,P., Hutchinson,P., Nordstrom,C.H., Robertson,C., Sahuquillo,J., Smith,M., Stocchetti,N., Ungerstedt,U., Unterberg,A., and Olsen,N.V. (2004). Consensus meeting on microdialysis in neurointensive care. *Intensive Care Med.* 30, 2166-2169.

Benveniste,H. (1989). Brain microdialysis. *J Neurochem* 1667-1679.

Bergsneider,M., Hovda,D.A., Shalmon,E., Kelly,D.F., Vespa,P.M., Martin,N.A., Phelps,M.E., McArthur,D.L., Caron,M.J., Kraus,J.F., and Becker,D.P. (1997). Cerebral hyperglycolysis following severe traumatic brain injury in humans: a positron emission tomography study. *J Neurosurg* 86, 241-251.

Bito,L., Davson,H., Levin,E., Murray,M., and Snider,N. (1966). Concentrations of Free Amino Acids and Other Electrolytes in Cerebrospinal Fluid, in Vivo Dialysate of Brain, and Blood plasma on the dog. *J Neurochem* 13, 1057-1067.

Boto,G.R., Gomez,P.A., De La,C.J., and Lobato,R.D. (2006). Severe head injury and the risk of early death. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77, 1054-1059.

Bouma,G.J., Muizelaar,J.P., Choi,S.C., Newlon,P.G., and Young,H.F. (1991). Cerebral circulation and metabolism after severe traumatic brain injury: the elusive role of ischemia. *J Neurosurg* 75, 685-693.

Bullock,M.R. (2003). Hyperoxia: good or bad? *J Neurosurg* 98, 943-944.

Bullock,M.R., Randall,M., Clifton,G.L., Ghajar,J., Marion,D., Narayan,R.K., Newell,J.C., Pitts,L.H., Rosner,M.J., and Walters,B.C. (2000). Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. In *Journal of neurotrauma*, Mary Ann Liebert, Inc., pp. 450-553.

Bullock,R., Zauner,A., Woodward,J.J., Myseros,J., Choi,S.C., Ward,J.D., Marmarou,A., and Young,H.F. (1998). Factors affecting excitatory amino acid release following severe human head injury. *J Neurosurg* 89, 507-518.

Bungay,P.M., Dedrick,R.L., Fox,E., and Balis,F.M. (2001). Probe calibration in transient microdialysis in vivo. *Pharm Res* 18, 361-366.

Bungay,P.M., Morrison,P.F., and Dedrick,R.L. (1990). Steady-state theory for quantitative microdialysis of solutes and water in vivo and in vitro. *Life Sci.* 46, 105-119.

Cesarini,K.G., Enblad,P., Ronne-Engstrom,E., Marklund,N., Salci,K., Nilsson,P., Hardemark,H.G., Hillered,L., and Persson,L. (2002). Early cerebral hyperglycolysis after subarachnoid haemorrhage correlates with favourable outcome. *Acta Neurochir (Wien)* 144, 1121-1131.

Chakraborti,S., Mandal,M., Das,S., Mandal,A., and Chakraborti,T. (2003). Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem* 253, 269-285.

Chen,K.C., Hoistad,M., Kehr,J., Fuxe,K., and Nicholson,C. (2002). Theory relating in vitro and in vivo microdialysis with one or two probes. *J. Neurochem.* 81, 108-121.

Chen,T., Qian,Y.Z., Di,X., Zhu,J.P., and Bullock,R. (2000). Evidence for lactate uptake after rat fluid percussion brain injury. *Acta Neurochir Suppl* 76, 359-364.

Chen,Y. and Swanson,R.A. (2003). Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 137-149.

Chih,C.P. and Roberts Jr,E.L. (2003). Energy substrates for neurons during neural activity: a critical review of the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 1263-1281.

Cho,H., Nemoto,E.M., Sanders,M., Fernandez,K., and Yonas,H. (2000). Comparison of two commercially available near-infrared spectroscopy instruments for cerebral oximetry. Technical note. *J Neurosurg* 93, 351-354.

Cole,T.B. (2004). Global road safety crisis remedy sought: 1.2 million killed, 50 million injured annually. *JAMA* 291, 2531-2532.

Coles,J.P. (2004). Regional ischemia after head injury. *Curr Opin Crit Care* 10, 120-125.

Cornio,M., Valadka,A.B., and Robertson,C.S. (1999). Elevated jugular venous oxygen saturation after severe head injury. *J Neurosurg* 90, 9-15.

Cremer,O.L., van Dijk,G.W., van Wensen,E., Brekelmans,G.J., Moons,K.G., Leenen,L.P., and Kalkman,C.J. (2005). Effect of intracranial pressure monitoring and targeted intensive care on functional outcome after severe head injury. *Crit Care Med* 33, 2207-2213.

Crespo,S.D. (2004). La matriz extracelular del sistema nervioso central: los proteoglicanos del tipo condroitinsulfato y la reparación neural. *Rev Neurol* 38, 843-851.

Crockard,H.A. and Taylor,A.R. (1972). Serial CSF lactate-pyruvate values as a guide to prognosis in head injury coma. *Eur Neurol* 8, 151-157.

Cruz,J., Miner,M.E., Allen,S.J., Alves,W.M., and Gennarelli,T.A. (1990). Continuous monitoring of cerebral oxygenation in acute brain injury: injection of mannitol during hyperventilation. *J Neurosurg* 73, 725-730.

Cruz,J., Raps,E.C., Hoffstad,O.J., Jaggi,J.L., and Gennarelli,T.A. (1993). Cerebral oxygenation monitoring. *Crit Care Med* 21, 1242-1246.

Cunningham,L.A., Wetzel,M., and Rosenberg,G.A. (2005). Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia* 50, 329-339.

Czosnyka,M., Matta,B.F., Smielewski,P., Kirkpatrick,P.J., and Pickard,J.D. (1998). Cerebral perfusion pressure in head-injured patients: a noninvasive assessment using transcranial Doppler ultrasonography. *J Neurosurg* 88, 802-808.

Dearden,N.M. and Midgley,S. (1993). Technical considerations in continuous jugular venous oxygen saturation measurement. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 59, 91-97.

Delgado,JM., DeFeudis,FV., Roth RH., Ryugo,D., and Mitruka,BM. (1972). Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 198, 9-21.

Dings,J., Meixensberger,J., Jager,A., and Roosen,K. (1998). Clinical experience with 118 brain tissue oxygen partial pressure catheter probes. *Neurosurgery* 43, 1082-1095.

Diringer,M.N. (2008). Hyperoxia: good or bad for the injured brain? *Curr Opin Crit Care* 14, 167-171.

Diringer,M.N., Aiyagari,V., Zazulia,A.R., Videen,T.O., and Powers,W.J. (2007). Effect of hyperoxia on cerebral metabolic rate for oxygen measured using positron emission tomography in patients with acute severe head injury. *J Neurosurg* 106, 526-529.

Doppenberg,E.M., Zauner,A., Watson J.C., and Bullock,R. (1998). Determination of the ischemic threshold for brain oxygen tension. *Acta Neurochir Suppl* 71, 166-169.

Dringen,R., Gebhardt,R., and Hamprecht,B. (1993). Glycogen in astrocytes: possible function as lactate supply for neighboring cells. *Brain Res* 623, 208-214.

Dzwonek,J., Rylski,M., and Kaczmarek,L. (2004). Matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in neuronal physiology of the adult brain. *FEBS Lett* 567, 129-135.

Enblad,P., Valtysson,J., Andersson,J., Lilja,A., Valind,S., Antoni,G., Langstrom,B., Hillered,L., and Persson,L. (1996). Simultaneous intracerebral microdialysis and positron emission tomography in the detection of ischemia in patients with subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 16, 637-644.

Engstrom,M., Polito,A., Reinstrup,P., Romner,B., Ryding,E., Ungerstedt,U., and Nordstrom,C.H. (2005). Intracerebral microdialysis in severe brain trauma: the importance of catheter location. *J Neurosurg* 102, 460-469.

Fandino,J., Stocker,R., Prokop,S., Trentz,O., and Imhof,H.G. (2000). Cerebral oxygenation and systemic trauma related factors determining neurological outcome after brain injury. *J Clin Neurosci* 7, 226-233.

Fassbender,K., Schneider,S., Bertsch,T., Schlueter,D., Fatar,M., Ragoschke,A., Kuhl,S., Kischka,U., and Hennerici,M. (2000). Temporal profile of release of interleukin-1beta in neurotrauma. *Neurosci Lett* 284, 135-138.

Fehlings,M.G. and Baker,A. (2007). Is there a role for hyperoxia in the management of severe traumatic brain injury? *J Neurosurg* 106, 525.

Fellows,L.K., Boutelle,M.G., and Fillenz,M. (1993). Physiological stimulation increases nonoxidative glucose metabolism in the brain of the freely moving rat. *J Neurochem* 60, 1258-1263.

Finfer,S.R. and Cohen,J. (2001). Severe traumatic brain injury. *Resuscitation* 48, 77-90.

Fink,M.P. (2001). Cytopathic hypoxia. Mitochondrial dysfunction as mechanism contributing to organ dysfunction in sepsis. *Crit Care Clin* 1, 219-237.

Frowein R.A. and Firsching R (2008). Handbook of clinical neurology. Head injury, R. Braakman, ed., pp. 101-122.

Gasche,Y., Soccac,P.M., Kanemitsu,M., and Copin,J.C. (2006). Matrix metalloproteinases and diseases of the central nervous system with a special emphasis on ischemic brain. *Front Biosci* 11, 1289-1301.

Gelabert-Gonzalez,M., Ginesta-Galan,V., Sernamito-Garcia,R., Allut,A.G., Bandin-Diequez,J., and Rumbo,R.M. (2006). The Camino intracranial pressure device in clinical practice. Assessment in a 1000 cases. *Acta Neurochir (Wien)* 148, 435-441.

Gelabert-Gonzalez,M. and Villa,J.M. (2003). Aplicaciones de la determinación de la presión tisular cerebral del oxígeno (PtiO₂). *Rev. Neurol.* 36, 744-749.

Ghajar,J. (2000). Traumatic brain injury. *Lancet* 356, 923-929.

Glenn,T.C., Kelly,D.F., Boscardin,W.J., McArthur,D.L., Vespa,P., Oertel,M., Hovda,D.A., Bergsneider,M., Hillered,L., and Martin,N.A. (2003). Energy dysfunction as a predictor of outcome after moderate or severe head injury: indices of oxygen, glucose, and lactate metabolism. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 1239-1250.

Golding,E.M., Robertson,C.S., and Bryan,R.M., Jr. (1999). The consequences of traumatic brain injury on cerebral blood flow and autoregulation: a review. *Clin Exp Hypertens.* 21, 299-332.

Gomersall,C.D., Joynt,G.M., Gin,T., Freebairn,R.C., and Stewart,I.E. (1997). Failure of the INVOS 3100 cerebral oximeter to detect complete absence of cerebral blood flow. *Crit Care Med* 25, 1252-1254.

Goodman,J.C., Valadka,A.B., Gopinath,S.P., Uzura,M., and Robertson,C.S. (1999). Extracellular lactate and glucose alterations in the brain after head injury measured by microdialysis. *Crit Care Med* 27, 1965-1973.

Gopinath,S.P., Robertson,C.S., Contant,C.F., Hayes,C., Feldman,Z., Narayan,R.K., and Grossman,R.G. (1994). Jugular venous desaturation and outcome after head injury. *J Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 57, 717-723.

Gottschall,P.E. and Yu,X. (1995). Cytokines regulate gelatinase A and B (matrix metalloproteinase 2 and 9) activity in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 64, 1513-1520.

Graham,D.I. and Adams,J.H. (1971). Ischaemic brain damage in fatal head injuries. *Lancet* 1, 265-266.

Gupta,A.K., Hutchinson,P.J., Al Rawi,P., Gupta,S., Swart,M., Kirkpatrick,P.J., Menon,D.K., and Datta,A.K. (1999). Measuring brain tissue oxygenation compared with jugular venous oxygen saturation for monitoring cerebral oxygenation after traumatic brain injury. *Anesth Analg* 88, 549-553.

Gupta,A.K., Hutchinson,P.J., Fryer,T., Al Rawi,P.G., Parry,D.A., Minhas,P.S., Kett-White,R., Kirkpatrick,P.J., Mathews,J.C., Downey,S., Aigbirhio,F., Clark,J., Pickard,J.D., and Menon,D.K. (2002). Measurement of brain tissue oxygenation performed using positron emission tomography scanning to validate a novel monitoring method. *J Neurosurg* 96, 263-268.

Haitsma,I.K. and Maas,A.I. (2002). Advanced monitoring in the intensive care unit: brain tissue oxygen tension. *Curr Opin Crit Care* 8, 115-120.

Haitsma,I.K. and Maas,A.I. (2007). Monitoring cerebral oxygenation in traumatic brain injury. *Prog Brain Res* 161, 207-216.

Hamrin,K., Rosdahl,H., Ungerstedt,U., and Henriksson,J. (2002). Microdialysis in human skeletal muscle: effects of adding a colloid to the perfusate. *J Appl Physiol* 92, 385-393.

Han,H.S., Karabiyikoglu,M., Kelly,S., Sobel,R.A., and Yenari,M.A. (2003). Mild hypothermia inhibits nuclear factor-kappaB translocation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 589-598.

Hillered,L. (1999). Neurochemical monitoring of the acutely injured human brain. *Scand J Clin Lab Invest* 59, 9-18.

Hillered,L., Persson,L., Ponten,U., and Ungerstedt,U. (1990). Neurometabolic monitoring of the ischaemic human brain using microdialysis. *Acta Neurochir (Wien)* 102, 91-97.

Hillered,L., Valtysson,J., and Enblad,P. (1998). Interstitial glycerol as a marker for membrane phospholipid degradation in the acutely injured human brain. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 64, 486-491.

Hillered,L., Vespa,P.M., and Hovda,D.A. (2005). Translational neurochemical research in acute human brain injury: the current status and potential future for cerebral microdialysis. *J Neurotrauma* 22, 3-41.

Hlatky,R., Valadka,A.B., Goodman,J.C., Contant,C.F., and Robertson,C.S. (2004). Patterns of energy substrates during ischemia measured in the brain by microdialysis. *J Neurotrauma* 21, 894-906.

Hoffman,W.E., Charbel,F.T., and Edelman,G. (1996). Brain tissue oxygen, carbon dioxide, and pH in neurosurgical patients at risk for ischemia. *Anesth Analg* 82, 582-586.

Hutchinson,P.J. (2000). Clinical cerebral microdialysis:a methodological study. *J Neurosurg* 93, 37-43.

Hutchinson,P.J., Al Rawi,P.G., O'Connell,M.T., Gupta,A.K., Maskell,L.B., Hutchinson,D.B., Pickard,J.D., and Kirkpatrick,P.J. (2000). On-line monitoring of substrate delivery and brain metabolism in head injury. *Acta Neurochir. Suppl* 76, 431-435.

Ibañez,J., Vilalta,A., Mena,M.P., Vilalta,J., Topczewski,T., Noguer,M., Sahuquillo,J., and Rubio,E. (2003). Detección intraoperatoria de hipoxia cerebral isquémica mediante sensores de presión tisular de oxígeno. *Neurocirugía (Astur.)* 14, 483-489.

Ince,C. and Sinaasappel,M. (1999). Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. *Crit Care Med* 27, 1369-1377.

Jaworski,D.M. (2000). Differential regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase mRNA expression in response to intracranial injury. *Glia* 30, 199-208.

Jennett,B. and Teasdale,G. (1977). Aspects of coma after severe head injury. *Lancet* 1, 878-881.

Johnston,A.J. and Gupta,A.K. (2002). Advanced monitoring in the neurology intensive care unit: microdialysis. *Curr Opin Crit Care* 8, 121-127.

Johnston,A.J., Steiner,L.A., Gupta,A.K., and Menon,D.K. (2003). Cerebral oxygen vasoreactivity and cerebral tissue oxygen reactivity. *Br J Anaesth* 90, 774-786.

Jung,S., Moon,K.S., Jung,T.Y., Kim,I.Y., Lee,Y.H., Rhu,H.H., Sun,H.S., Jeong,Y.I., Kim,K.K., and Kang,S.S. (2006). Possible pathophysiological role of vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinases (MMPs) in metastatic brain tumor-associated intracerebral hemorrhage. *J Neurooncol* 76, 257-263.

Kala,G. and Hertz,L. (2005). Ammonia effects on pyruvate/lactate production in astrocytes--interaction with glutamate. *Neurochem Int* 47, 4-12.

Katayama,Y., Becker,D.P., Tamura,T., and Hovda,D.A. (1990). Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury. *J Neurosurg* 73, 889-900.

Katayama,Y. and Kawamata,T. (2003). Edema fluid accumulation within necrotic brain tissue as a cause of the mass effect of cerebral contusion in head trauma patients. *Acta Neurochir Suppl* 86, 323-327.

Kawai,N., Kawanishi,M., and Nagao,S. (2003). Treatment of cold injury-induced brain edema with a nonspecific matrix metalloproteinase inhibitor MMI270 in rats. *Acta Neurochir Suppl* 291-295.

Kehr,J. (1993). A survey on quantitative microdialysis: theoretical models and practical implications. *J Neurosci Methods* 48, 251-261.

Kett-White,R., Hutchinson,P.J., Czosnyka,M., Boniface,S., Pickard,J.D., and Kirkpatrick,P.J. (2002). Multi-modal monitoring of acute brain injury. *Adv Tech Stand Neurosurg* 27, 87-134.

Kety,S.S. and Schmidt,C.F. (1948). The effects of altered arterial tensions of carbon dioxide and oxygen on cerebral blood flow and cerebral oxygen consumption of normal young men. *J Clin Invest* 27, 484-492.

Kiening,K.L., Unterberg,A.W., Bardt,T.F., Schneider,G.H., and Lanksch,W.R. (1996). Monitoring of cerebral oxygenation in patients with severe head injuries: brain tissue PO₂ versus jugular vein oxygen saturation. *J Neurosurg* 85, 751-757.

Kossmann,T., Hans,V.H., Imhof,H.G., Stocker,R., Grob,P., Trentz,O., and Morganti-Kossmann,C. (1995). Intrathecal and serum interleukin-6 and the acute-phase response in patients with severe traumatic brain injuries. *Shock* 4, 311-317.

Kunishio,K., Okada,M., Matsumoto,Y., and Nagao,S. (2003). Matrix metalloproteinase-2 and -9 expression in astrocytic tumors. *Brain Tumor Pathol* 20, 39-45.

Lam, J.M., Chan, M.S., and Poon, W.S. (1996). Cerebral venous oxygen saturation monitoring: is dominant jugular bulb cannulation good enough? *Br J Neurosurg.* 10, 357-364.

Lee, J.E., Yoon, Y.J., Moseley, M.E., and Yenari, M.A. (2005). Reduction in levels of matrix metalloproteinases and increased expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in response to mild hypothermia therapy in experimental stroke. *J Neurosurg* 103, 289-297.

Leniger-Follert, E., Lubbers, D.W., and Wrabetz, W. (1975). Regulation of local tissue PO₂ of the brain cortex at different arterial O₂ pressures. *Pflugers Arch.* 359, 81-95.

Lenzlinger, P.M., Morganti-Kossmann, M.C., Laurer, H.L., and McIntosh, T.K. (2001). The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. *Mol Neurobiol* 24, 169-181.

Levicar, N., Nuttall, R.K., and Lah, T.T. (2003). Proteases in brain tumour progression. *Acta Neurochir (Wien)* 145, 825-838.

Lifshitz, J., Friberg, H., Neumar, R.W., Raghupathi, R., Welsh, F.A., Janmey, P., Saatman, K.E., Wieloch, T., Grady, M.S., and McIntosh, T.K. (2003). Structural and functional damage sustained by mitochondria after traumatic brain injury in the rat: evidence for differentially sensitive populations in the cortex and hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 219-231.

Liu, P., Sun, M., and Sader, S. (2006). Matrix metalloproteinases in cardiovascular disease. *Can J Cardiol* 22 *Suppl B*, 25B-30B.

Lo, E.H., Wang, X., and Cuzner, M.L. (2002). Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J Neurosci Res* 69, 1-9.

Lobato, R.D., Alen, J.F., Perez-Nunez, A., Alday, R., Gomez, P.A., Pascual, B., Lagares, A., Miranda, P., Arrese, I., and Kaen, A. (2005). [Value of serial CT scanning and intracranial pressure monitoring for detecting new intracranial mass effect in severe head injury patients showing lesions type I-II in the initial CT scan]. *Neurocirugía (Astur.)* 16, 217-234.

Lobato,R.D., Cordobes,F., Rivas,J.J., de la,F.M., Montero,A., Barcena,A., Perez,C., Cabrera,A., and Lamas,E. (1983). Outcome from severe head injury related to the type of intracranial lesion. A computerized tomography study. *J Neurosurg* 59, 762-774.

Lobato,R.D., Gomez,P.A., Alday,R., Rivas,J.J., Dominguez,J., Cabrera,A., Turanzas,F.S., Benitez,A., and Rivero,B. (1997). Sequential computerized tomography changes and related final outcome in severe head injury patients. *Acta Neurochir (Wien.)* 139, 385-391.

Lobato,R.D., Rivas,J.J., Gomez,P.A., Castaneda,M., Canizal,J.M., Sarabia,R., Cabrera,A., and Munoz,M.J. (1991). Head-injured patients who talk and deteriorate into coma. Analysis of 211 cases studied with computerized tomography. *J Neurosurg* 75, 256-261.

Lobato,R.D., Sarabia,R., Cordobes,F., Rivas,J.J., Adrados,A., Cabrera,A., Gomez,P., Madera,A., and Lamas,E. (1988). Posttraumatic cerebral hemispheric swelling. Analysis of 55 cases studied with computerized tomography. *J Neurosurg* 68, 417-423.

Longhi,L., Valeriani,V., Rossi,S., De Marchi,M., Egidi,M., and Stocchetti,N. (2002). Effects of hyperoxia on brain tissue oxygen tension in cerebral focal lesions. *Acta Neurochir Suppl* 87, 315-317.

Maas,A.I., Fleckenstein,W., de Jong,D.A., and van Santbrink,H. (1993). Monitoring cerebral oxygenation: experimental studies and preliminary clinical results of continuous monitoring of cerebrospinal fluid and brain tissue oxygen tension. *Acta Neurochir Suppl* 59, 50-57.

Maas,A.I., Stocchetti,N., and Bullock,R. (2008). Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol* 7, 728-741.

Macmillan,C.S., Andrews,P.J., and Easton,V.J. (2001). Increased jugular bulb saturation is associated with poor outcome in traumatic brain injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 70, 101-104.

Magistretti, P. J. and Pellerin, L. (1997).The cellular bases of functional brain imaging: evidence for astrocyte-neuron metabolic coupling. *The Neuroscientist* 3, 361-365.

Magnoni,S., Ghisoni,L., Locatelli,M., Caimi,M., Colombo,A., Valeriani,V., and Stocchetti,N. (2003). Lack of improvement in cerebral metabolism after hyperoxia in severe head injury: a microdialysis study. *J Neurosurg* 98, 952-958.

Mandal,M., Mandal,A., Das,S., Chakraborti,T., and Sajal,C. (2003). Clinical implications of matrix metalloproteinases. *Mol Cell Biochem* 252, 305-329.

Mannello,F. and Gazzanelli,G. (2001). Tissue inhibitors of metalloproteinases and programmed cell death: conundrums, controversies and potential implications. *Apoptosis*. 6, 479-482.

Marmarou,A., Signoretti,S., Fatouros,P.P., Portella,G., Aygok,G.A., and Bullock,M.R. (2006). Predominance of cellular edema in traumatic brain swelling in patients with severe head injuries. *J Neurosurg* 104, 720-730.

Marshall L.F., Eisenberg H.M., Jane J.A., Luerssen T.G., Marmarou A., and Foulkes M.A. (1991). A new classification of head injury based on computerized tomography. *J Neurosurg* 75, S14-S20.

Massabuau,J.C. (2001). From low arterial- to low tissue-oxygenation strategy. An evolutionary theory. *Respir Physiol* 15, 249-261.

Massabuau,J.C. (2003). Primitive, and protective, our cellular oxygenation status? *Mech Ageing Dev* 124, 857-863.

Maurer,M.H., Berger,C., Wolf,M., Futterer,C.D., Feldmann,R.E., Jr., Schwab,S., and Kuschinsky,W. (2003). The proteome of human brain microdialysate. *Proteome Sci* 14,7.

McIntosh,T.K., Saatman,K.E., Raghupathi,R., Graham,D.I., Smith,D.H., Lee,V.M., and Trojanowski,J.Q. (1998). The Dorothy Russell Memorial Lecture. The molecular and cellular sequelae of experimental traumatic brain injury: pathogenetic mechanisms. *Neuropathol Appl Neurobiol* 24, 251-267.

McLeod,A.D., Igielman,F., Elwell,C., Cope,M., and Smith,M. (2003). Measuring cerebral oxygenation during normobaric hyperoxia: a comparison of tissue microprobes, near-infrared spectroscopy, and jugular venous oximetry in head injury. *Anesth Analg* 97, 851-856.

Medina,J.M. and Taberero,A. (2005). Lactate utilization by brain cells and its role in CNS development. *J Neurosci Res* 79, 2-10.

Meixensberger,J., Dings,J., Kuhnigk,H., and Roosen,K. (1993). Studies of tissue PO₂ in normal and pathological human brain cortex. *Acta Neurochir Suppl* 59, 58-63.

Mendes,O., Kim,H.T., and Stoica,G. (2005). Expression of MMP2, MMP9 and MMP3 in breast cancer brain metastasis in a rat model. *Clin Exp Metastasis* 22, 237-246.

Menge,T., Jander,S., and Stoll,G. (2001). Induction of the proinflammatory cytokine interleukin-18 by axonal injury. *J Neurosci Res* 65, 332-339.

Menzel,M., Doppenberg,E.M., Zauner,A., Soukup,J., Reinert,M.M., and Bullock,R. (1999a). Increased inspired oxygen concentration as a factor in improved brain tissue oxygenation and tissue lactate levels after severe human head injury. *J Neurosurg* 91, 1-10.

Menzel,M., Doppenberg,E.M., Zauner,A., Soukup,J., Reinert,M.M., Clausen,T., Brockenbrough,P.B., and Bullock,R. (1999b). Cerebral oxygenation in patients after severe head injury: monitoring and effects of arterial hyperoxia on cerebral blood flow, metabolism and intracranial pressure. *J Neurosurg Anesthesiol* 11, 240-251.

Merrill,J.E. and Benveniste,E.N. (1996). Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci* 19, 331-338.

Minambres,E., Cemborain,A., Sanchez-Velasco,P., Gandarillas,M., Diaz-Reganon,G., Sanchez-Gonzalez,U., and Leyva-Cobian,F. (2003). Correlation between transcranial interleukin-6 gradient and outcome in patients with acute brain injury. *Crit Care Med* 31, 933-938.

Montaner,J., Alvarez-Sabin,J., Barbera,G., Angles,A., Molina,C., Abilleira,S., Arenillas,J., Chacon,P., and Monasterio,J. (2001a). Correlación entre la expresión de citocinas proinflamatorias y metaloproteinasas de matriz en la fase aguda del ictus isquémico. *Rev Neurol* 33, 115-118.

Montaner,J., Alvarez-Sabin,J., Molina,C., Angles,A., Abilleira,S., Arenillas,J., Gonzalez,M.A., and Monasterio,J. (2001b). Matrix metalloproteinase expression after

human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* 32, 1759-1766.

Montaner,J., Alvarez-Sabin,J., Molina,C.A., Angles,A., Abilleira,S., Arenillas,J., and Monasterio,J. (2001c). Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke* 32, 2762-2767.

Montaner,J., Molina,C.A., Monasterio,J., Abilleira,S., Arenillas,J.F., Ribo,M., Quintana,M., and Alvarez-Sabin,J. (2003). Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* 107, 598-603.

Morganti-Kossmann,M.C., Rancan,M., Otto,V.I., Stahel,P.F., and Kossmann,T. (2001). Role of cerebral inflammation after traumatic brain injury: a revisited concept. *Shock* 16, 165-177.

Morganti-Kossmann,M.C., Rancan,M., Stahel,P.F., and Kossmann,T. (2002). Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care* 8, 101-105.

Mori,T., Wang,X., Aoki,T., and Lo,E.H. (2002). Downregulation of matrix metalloproteinase-9 and attenuation of edema via inhibition of ERK mitogen activated protein kinase in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 19, 1411-1419.

Morita-Fujimura,Y., Fujimura,M., Gasche,Y., Copin,J.C., and Chan,P.H. (2000). Overexpression of copper and zinc superoxide dismutase in transgenic mice prevents the induction and activation of matrix metalloproteinases after cold injury-induced brain trauma. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 130-138.

Muir,E.M., Adcock,K.H., Morgenstern,D.A., Clayton,R., von Stillfried,N., Rhodes,K., Ellis,C., Fawcett,J.W., and Rogers,J.H. (2002). Matrix metalloproteases and their inhibitors are produced by overlapping populations of activated astrocytes. *Mol Brain Res* 100, 103-117.

Mun-Bryce,S. and Rosenberg,G.A. (1998). Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. *Am J Physiol* 274, 1203-1211.

Murillo,F., Gilli M., and Muñoz M.A. (1999). Epidemiología del traumatismo craneoencefálico. In *Traumatismo craneoencefálico grave*, Net.A and Marruecos-Sant L., eds., pp. 1-9.

Murr,R., Stummer,W., Schurer,L., and Polasek,J. (1996). Cerebral lactate production in relation to intracranial pressure, cranial computed tomography findings, and outcome in patients with severe head injury. *Acta Neurochir (Wien)* 138, 928-936.

Murray,G.D., Teasdale,G.M., Braakman,R., Cohadon,F., Dearden,M., Iannotti,F., Karimi,A., Lapierre,F., Maas,A., Ohman,J., Persson,L., Servadei,F., Stocchetti,N., Trojanowski,T., and Unterberg,A. (1999). The European Brain Injury Consortium survey of head injuries. *Acta Neurochir (Wien)* 141, 223-236.

Nagase,H. and Woessner,J.F., Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274, 21491-21494.

Ning,M., Furie,K.L., Koroshetz,W.J., Lee,H., Barron,M., Lederer,M., Wang,X., Zhu,M., Sorensen,A.G., Lo,E.H., and Kelly,P.J. (2006). Association between tPA therapy and raised early matrix metalloproteinase-9 in acute stroke. *Neurology* 66, 1550-1555.

Nordstrom,C.H., Messeter,K., Sundbarg,G., Schalen,W., Werner,M., and Ryding,E. (1988). Cerebral blood flow, vasoreactivity, and oxygen consumption during barbiturate therapy in severe traumatic brain lesions. *J Neurosurg* 68, 424-431.

Nortje,J., Coles,J.P., Timofeev,I., Fryer,T.D., Aigbirhio,F.I., Smielewski,P., Outtrim,J.G., Chatfield,D.A., Pickard,J.D., Hutchinson,P.J., Gupta,A.K., and Menon,D.K. (2008). Effect of hyperoxia on regional oxygenation and metabolism after severe traumatic brain injury: preliminary findings. *Crit Care Med.* 36, 273-281.

Okamoto,T., Akaike,T., Sawa,T., Miyamoto,Y., van,d., V, and Maeda,H. (2001). Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. *J Biol Chem* 276, 29596-29602.

Oldendorf,W.H. (1973). Carrier-mediated blood-brain barrier transport of short-chain monocarboxylic organic acids. *Am J Physiol* 224, 1450-1453.

Olesen,J. and Leonardi,M. (2003). The burden of brain diseases in Europe. *Eur J Neurol* 10, 471-477.

Pardridge,W.M., Connor,J.D., and Crawford,I.L. (1975). Permeability changes in the blood-brain barrier: causes and consequences. *CRC Crit Rev Toxicol.* 3, 159-199.

Pardridge,W.M. and Oldendorf,W.H. (1977). Transport of metabolic substrates through the blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry.* 28, 5-12.

Patel,H.C., Boutin,H., and Allan,S.M. (2003). Interleukin-1 in the brain: mechanisms of action in acute neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci* 992, 39-47.

Pellerin,L. and Magistretti,P.J. (2003). Food for thought: challenging the dogmas. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 1282-1286.

Perez,A., Mincez,P.G., Schnitzler,E.J., Agosta,G.E., Medina,S.A., and Ciruolo,C.A. (2003). Jugular venous oxygen saturation or arteriovenous difference of lactate content and outcome in children with severe traumatic brain injury. *Pediatr. Crit Care Med.* 4, 33-38.

Persson,L. and Hillered,L. (1976). Chemical monitoring of neurosurgical intensive care patients using intracerebral microdialysis. *J. Neurosurg.* 72-80.

Persson,L., Valtysson,J., Enblad,P., Warme,P.E., Cesarini,K., Lewen,A., and Hillered,L. (1984). Neurochemical monitoring using intracerebral microdialysis in patients with subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg* 606-616.

Pfefferkorn,T. and Rosenberg,G.A. (2003). Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rTPA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke* 34, 2025-2030.

Piez,K.A. (1997). History of extracellular matrix: a personal view. *Matrix Biol* 16, 85-92.

Poca,M.A., Sahuquillo,J., Arribas,M., Baguena,M., Amoros,S., and Rubio,E. (2002). Fiberoptic intraparenchymal brain pressure monitoring with the Camino V420 monitor: reflections on our experience in 163 severely head-injured patients. *J Neurotrauma* 19, 439-448.

Poca,M.A., Sahuquillo,J., Baguena,M., Pedraza,S., Gracia,R.M., and Rubio,E. (1998). Incidence of intracranial hypertension after severe head injury: a prospective study using the Traumatic Coma Data Bank classification. *Acta Neurochir Suppl* 71, 27-30.

Poca,M.A., Sahuquillo,J., Mena,M.P., Vilalta,A., and Riveiro,M. (2005). Actualizaciones en los métodos de monitorización cerebral regional en los pacientes neurocríticos: presión tisular de oxígeno, microdiálisis cerebral y técnicas de espectroscopía por infrarrojos. *Neurocirugía (Astur.)* 16, 385-410.

Poca,M.A., Sahuquillo,J., Vilalta,A., de los,R.J., Robles,A., and Exposito,L. (2006). Percutaneous implantation of cerebral microdialysis catheters by twist-drill craniostomy in neurocritical patients: description of the technique and results of a feasibility study in 97 patients. *J Neurotrauma* 23, 1510-1517.

Poca,M.A., Sahuquillo,J., Vilalta,A., and Garnacho,A. (2007). Lack of utility of arteriojugular venous differences of lactate as a reliable indicator of increased brain anaerobic metabolism in traumatic brain injury. *J Neurosurg* 106, 530-537.

Poole,R.C. and Halestrap,A.P. (1993). Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol* 264, C761-C782.

Prasad,M.R., Ramaiah,C., McIntosh,T.K., Dempsey,R.J., Hipkens,S., and Yurek,D. (1994). Regional levels of lactate and norepinephrine after experimental brain injury. *J Neurochem* 63, 1086-1094.

Price,N.T., Jackson,V.N., and Halestrap,A.P. (1998). Cloning and sequencing of four new mammalian monocarboxylate transporter (MCT) homologues confirms the existence of a transporter family with an ancient past. *Biochem J* 329, 321-328.

Raha,S. and Robinson,B.H. (2001). Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am J Med Genet* 106, 62-70.

Ramilo,O., Saez-Llorens,X., Mertsola,J., Jafari,H., Olsen,K.D., Hansen,E.J., Yoshinaga,M., Ohkawara,S., Nariuchi,H., and McCracken,G.H., Jr. (1990). Tumor necrosis factor alpha/cachectin and interleukin 1 beta initiate meningeal inflammation. *J Exp Med* 172, 497-507.

Ransohoff,R.M. (2002). The chemokine system in neuroinflammation: an update. *J Infect Dis* 186 Suppl 2, S152-S156.

Redelmeier,D.A., Tibshirani,R.J., and Evans,L. (2003). Traffic-law enforcement and risk of death from motor-vehicle crashes: case-crossover study. *Lancet* 361, 2177-2182.

Reinert,M., Barth,A., Rothen,H.U., Schaller,B., Takala,J., and Seiler,R.W. (2003). Effects of cerebral perfusion pressure and increased fraction of inspired oxygen on brain tissue oxygen, lactate and glucose in patients with severe head injury. *Acta Neurochir 145*, 341-350.

Reinert,M., Hoelper,B., Doppenberg,E., Zauner,A., and Bullock,R. (2000). Substrate delivery and ionic balance disturbance after severe human head injury. *Acta Neurochir Suppl 76*, 439-444.

Reinert,M., Schaller,B., Rudolf Widmer,H., Seiler,R., and Bullock,R. (2004). Influence of oxygen therapy on glucose-lactate metabolism after diffuse brain injury. *J Neurosurg 101*, 323-329.

Reinstrup,P., Stahl,N., Mellergard,P., Uski,T., Ungerstedt,U., and Nordstrom,C.H. (2000). Intracerebral microdialysis in clinical practice: baseline values for chemical markers during wakefulness, anesthesia, and neurosurgery. *Neurosurgery 47 discussion 709-10.*, 701-200.

Robertson,C.S., Contant,C.F., Gokaslan,Z.L., Narayan,R.K., and Grossman,R.G. (1992). Cerebral blood flow, arteriovenous oxygen difference, and outcome in head injured patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry 55*, 594-603.

Robertson,C.S., Gopinath,S.P., Uzura,M., Valadka,A.B., and Goodman,J.C. (1998). Metabolic changes in the brain during transient ischemia measured with microdialysis. *Neurol Res 20*, S91-S94.

Robertson,C.S., Grossman,R.G., Goodman,J.C., and Narayan,R.K. (1987). The predictive value of cerebral anaerobic metabolism with cerebral infarction after head injury. *J Neurosurg 67*, 361-368.

Robertson,C.S., Narayan,R.K., Gokaslan,Z.L., Pahwa,R., Grossman,R.G., Caram,P., Jr., and Allen,E. (1989). Cerebral arteriovenous oxygen difference as an estimate of cerebral blood flow in comatose patients. *J Neurosurg 70*, 222-230.

Rockswold,G.L., Ford,S.E., Anderson,D.C., Bergman,T.A., and Sherman,R.E. (1992). Results of a prospective randomized trial for treatment of severely brain-injured patients with hyperbaric oxygen. *J Neurosurg 76*, 929-934.

Rockswold,G.L. and Rockswold,S.B. (2007). Hyperoxia. *J Neurosurg* 107, 898-899.

Rockswold,S.B., Rockswold,G.L., Vargo,J.M., Erickson,C.A., Sutton,R.L., Bergman,T.A., and Biros,M.H. (2001). Effects of hyperbaric oxygenation therapy on cerebral metabolism and intracranial pressure in severely brain injured patients. *J Neurosurg* 94, 403-411.

Romanic,A.M., White,R.F., Arleth,A.J., Ohlstein,E.H., and Barone,F.C. (1998). Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 29, 1020-1030.

Ronne-Engstrom,E., Cesarini,K.G., Enblad,P., Hesselager,G., Marklund,N., Nilsson,P., Salci,K., Persson,L., and Hillered,L. (2001). Intracerebral microdialysis in neurointensive care: the use of urea as an endogenous reference compound. *J Neurosurg* 94, 397-402.

Rosell,A., Ortega-Aznar,A., Alvarez-Sabin,J., Fernandez-Cadenas,I., Ribo,M., Molina,C.A., Lo,E.H., and Montaner,J. (2006). Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke* 37, 1399-1406.

Rosenberg,G.A. (1995). Matrix metalloproteinases in brain injury. *J Neurotrauma* 12, 833-842.

Rosenberg,G.A. (2002). Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 39, 279-291.

Rosenberg,G.A., Estrada,E.Y., and Dencoff,J.E. (1998). Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 29, 2189-2195.

Rosenberg,G.A. and Mun-Bryce,S. (2004). Matrix metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Ernst Schering Res Found Workshop* 47, 1-16.

Ross,S.A., Halliday,M.I., Campbell,G.C., Byrnes,D.P., and Rowlands,B.J. (1994). The presence of tumour necrosis factor in CSF and plasma after severe head injury. *Br. J Neurosurg* 8, 419-425.

Rossi,S., Stocchetti,N., Longhi,L., Balestreri,M., Spagnoli,D., Zanier,E.R., and Bellinzona,G. (2001). Brain oxygen tension, oxygen supply, and oxygen consumption during arterial hyperoxia in a model of progressive cerebral ischemia. *J Neurotrauma* 18, 163-174.

Rouis,M. (2005). Matrix metalloproteinases: a potential therapeutic target in atherosclerosis. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 5, 541-548.

Rubin,L.L. and Staddon,J.M. (1999). The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu. Rev Neurosci.* 22, 11-28.

Sahuquillo,J. (2008). Does multimodality monitoring make a difference in neurocritical care? *Eur J Anaesthesiol Suppl* 42, 83-86.

Sahuquillo,J., Amoros,S., Poca,M.A., Mena,M.P., Ibanez,J., Baguena,M., and Dominguez,L. (2002a). Coexistence of regional cerebral hypoxia with normal or hyperemic brain detected by global monitoring methods. Analysis of apparently contradictory findings based on the Siggaard-Andersen model of tissue hypoxia. *Acta Neurochir* 87, 303-305.

Sahuquillo,J., Amoros,S., Santos,A., Poca,M.A., Panzardo,H., Dominguez,L., and Pedraza,S. (2000). Does an increase in cerebral perfusion pressure always mean a better oxygenated brain? A study in head-injured patients. *Acta Neurochir Suppl* 76, 457-462.

Sahuquillo,J., Biestro,A., Mena,M.P., Amoros,S., Lung,M., Poca,M.A., De Nadal,M., Baguena,M., Panzardo,H., Mira,J.M., Garnacho,A., and Lobato,R.D. (2002b). Medidas de primer nivel en el tratamiento de la hipertensión intracraneal en el paciente con un traumatismo craneoencefálico grave. Propuesta y justificación de un protocolo. *Neurocirugia (Astur.)* 13, 78-100.

Sahuquillo,J., Poca,M.A., and Amoros,S. (2001). Current aspects of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury. *Curr Pharm Design* 7, 1475-1503.

Sahuquillo,J., Poca,M.A., Garnacho,A., Robles,A., Coello,F., Godet,C., Triginer,C., and Rubio,E. (1993). Early ischaemia after severe head injury. Preliminary results in patients with diffuse brain injuries. *Acta Neurochir. (Wien.)* 122, 204-214.

Sahuquillo,J., Vilalta,J., Lamarca J., Rubio,E., and Rodriguez-Pazos M. (1987). Hipertensión intracraneal en los traumatismos craneoencefálicos. *JANO* 33, 1780.

Salci,K., Nilsson,P., Howells,T., Ronne-Engstrom,E., Piper,I., Contant,C.F., Jr., and Enblad,P. (2006). Intracerebral microdialysis and intracranial compliance monitoring of patients with traumatic brain injury. *J Clin Monit Comput.* 20, 25-31.

Sappey-Marinié,D., Calabrese,G., Fein,G., Hugg,J.W., Biggins,C., and Weiner,M.W. (1992). Effect of photic stimulation on human visual cortex lactate and phosphates using ¹H and ³¹P magnetic resonance spectroscopy. *J Cereb Blood Flow Metab* 12, 584-592.

Sarratzadeh,A.S., Sakowitz,O.W., Callsen T.A., Lanksch,W.R., and Unterberg,A.W. (2000). Bedside microdialysis for early detection of cerebral hypoxia in traumatic brain injury. *Neurosurg Focus* 9 5, 1-6.

Sarratzadeh,A.S., Sakowitz,O.W., Callsen,T.A., Lanksch,W.R., and Unterberg,A.W. (2002a). Detection of secondary insults by brain tissue PO₂ and bedside microdialysis in severe head injury. *Acta Neurochir. Suppl* 87, 319-321.

Sarratzadeh,A.S., Sakowitz,O.W., Kiening,K.L., Benndorf,G., Lanksch,W.R., and Unterberg,A.W. (2002b). Bedside microdialysis: a tool to monitor cerebral metabolism in subarachnoid hemorrhage patients? *Crit Care Med.* 30, 1062-1070.

Sarratzadeh,A.S., Sakowitz,O.W., Lanksch,W.R., and Unterberg,A.W. (2001). Time course of various interstitial metabolites following subarachnoid hemorrhage studied by on-line microdialysis. *Acta Neurochir Suppl* 77, 145-147.

Schmidt,O.I., Heyde,C.E., Ertel,W., and Stahel,P.F. (2005). Closed head injury--an inflammatory disease? *Brain Res Rev* 48, 388-399.

Schurr,A. (2006). Lactate: the ultimate cerebral oxidative energy substrate? *J. Cereb. Blood Flow Metab* 26, 142-152.

Schurr,A., Payne,R.S., Miller,J.J., and Rigor,B.M. (1997a). Brain lactate, not glucose, fuels the recovery of synaptic function from hypoxia upon reoxygenation: an in vitro study. *Brain Res* 1997, 105-111.

Schurr,A., Payne,R.S., Miller,J.J., and Rigor,B.M. (1997b). Glia are the main source of lactate utilized by neurons for recovery of function posthypoxia. *Brain Res* 774, 221-224.

Schurr,A. and Rigor,B.M. (1998). Brain anaerobic lactate production: a suicide note or a survival kit? *Dev Neurosci* 20, 348-357.

Schurr,A., West,C.A., and Rigor,B.M. (1988). Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. *Science* 240, 1326-1328.

Sellebjerg,F. and Sorensen,T.L. (2003). Chemokines and matrix metalloproteinase-9 in leukocyte recruitment to the central nervous system. *Brain Res Bull* 61, 347-355.

Shibayama,M., Kuchiwaki,H., Inao,S., Ichimi,K., Yoshida,J., and Hamaguchi,M. (1997). Induction of matrix metalloproteinases following brain injury in rats. *Acta Neurochir Suppl* 70, 220-221.

Shigemori,Y., Katayama,Y., Mori,T., Maeda,T., and Kawamata,T. (2006). Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats. *Acta Neurochir Suppl* 96, 130-133.

Siesjo,B.K. (1992). Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 77, 169-184.

Siggaard-Andersen,M., Ulrich,A., and Gothgen,I.H. (1995). Classes of tissue hypoxia. *Acta Anaesthesiol Scand* 39, 137-142.

Stahl,N., Møllergaard,P., Hallström,A., Ungerstedt,U., and Nordström,C.H. (2001). Intracerebral microdialysis and bedside biochemical analysis in patients with fatal traumatic brain lesions. *Acta Anaesthesiol Scand* 45, 977-985.

Stamatovic,S.M., Dimitrijevic,O.B., Keep,R.F., and Andjelkovic,A.V. (2006). Inflammation and brain edema: new insights into the role of chemokines and their receptors. *Acta Neurochir Suppl* 96, 444-450.

Suehiro,E., Fujisawa,H., Akimura,T., Ishihara,H., Kajiwara,K., Kato,S., Fujii,M., Yamashita,S., Maekawa,T., and Suzuki,M. (2004). Increased matrix metalloproteinase-9 in blood in association with activation of interleukin-6 after traumatic brain injury: influence of hypothermic therapy. *J Neurotrauma* 21, 1706-1711.

Sukoff,M.H. (2001). Effects of hyperbaric oxygenation. *J Neurosurg* 95, 544-546.

Teasdale,G. and Jennett,B. (1974). Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* 2, 81-84.

Thiagarajan,A., Goverdhan,P.D., Chari,P., and Somasunderam,K. (1998). The effect of hyperventilation and hyperoxia on cerebral venous oxygen saturation in patients with traumatic brain injury. *Anesth Analg*, 850-853.

Tisdall,M.M. and Smith,M. (2007). Multimodal monitoring in traumatic brain injury: current status and future directions. *Br J Anaesth* 99, 61-67.

Tofteng,F. and Larsen,F.S. (2002). Monitoring extracellular concentrations of lactate, glutamate, and glycerol by in vivo microdialysis in the brain during liver transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl* 8, 302-305.

Tolias,C.M., Reinert,M., Seiler,R., Gilman,C., Scharf,A., and Bullock,M.R. (2004). Normobaric hyperoxia--induced improvement in cerebral metabolism and reduction in intracranial pressure in patients with severe head injury: a prospective historical cohort-matched study. *J Neurosurg* 101, 435-444.

Truettner,J.S., Alonso,O.F., and Dalton,D.W. (2005). Influence of therapeutic hypothermia on matrix metalloproteinase activity after traumatic brain injury in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 1505-1516.

Tsacopoulos,M. and Magistretti,P.J. (1996). Metabolic coupling between glia and neurons. *Journal of neuroscience* 16, 877-885.

Ungerstedt,U. and Rostami,E. (2004). Microdialysis in Neurointensive Care. *Curr Pharm Design* 10, 2145-2152.

Valadka,A.B., Goodman,J.C., Gopinath,S.P., Uzura,M., and Robertson,C.S. (1998). Comparison of brain tissue oxygen tension to microdialysis-based measures of cerebral ischemia in fatally head-injured humans. *J Neurotrauma* 15, 509-519.

Valadka,A.B., Gopinath,S.P., Contant,C.F., Uzura,M., and Robertson,C.S. (2003). Relationship of brain tissue PO₂ to outcome after severe head injury. *Crit Care Med* 26, 1576-1581.

Valdueza,J.M., Balzer,J.O., Villringer,A., Vogl,T.J., Kutter,R., and Einhaupl,K.M. (1997). Changes in blood flow velocity and diameter of the middle cerebral artery during hyperventilation: assessment with MR and transcranial Doppler sonography. *AJNR Am J Neuroradiol* 18, 1929-1934.

van den Brink,W.A., van Santbrink,H., Steyerberg,E.W., Avezaat,C.J., Suazo,J.A., Hogesteeger,C., Jansen,W.J., Kloos,L.M., Vermeulen,J., and Maas,A.I. (2000). Brain oxygen tension in severe head injury. *Neurosurgery* 46, 868-878.

van Santbrink,H., Maas,A.I., and Avezaat,C.J. (1996). Continuous monitoring of partial pressure of brain tissue oxygen in patients with severe head injury. *Neurosurgery* 38, 21-31.

Vecil,G.G., Larsen,P.H., Corley,S.M., Herx,L.M., Besson,A., Goodyer,C.G., and Yong,V.W. (2000). Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo. *J Neurosci Res* 61, 212-224.

Verweij,B.H., Amelink,G.J., and Muizelaar,J.P. (2007). Current concepts of cerebral oxygen transport and energy metabolism after severe traumatic brain injury. *Prog Brain Res* 167, 111-124.

Verweij,B.H., Muizelaar,J.P., Vinas,F.C., Peterson,P.L., Xiong,Y., and Lee,C.P. (2000). Impaired cerebral mitochondrial function after traumatic brain injury in humans. *J Neurosurg* 93, 815-820.

Vespa,P., Bergsneider,M., Hattori,N., Wu,H.M., Huang,S.C., Martin,N.A., Glenn,T.C., McArthur,D.L., and Hovda,D.A. (2005). Metabolic crisis without brain ischemia is common after traumatic brain injury: a combined microdialysis and positron emission tomography study. *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 763-774.

Vespa,P.M., McArthur,D., O'Phelan,K., Glenn,T., Etchepare,M., Kelly,D., Bergsneider,M., Martin,N.A., and Hovda,D.A. (2003). Persistently low extracellular glucose correlates with poor outcome 6 months after human traumatic brain injury despite a lack of increased lactate: a microdialysis study. *J Cereb Blood Flow Metab* 23, 865-877.

Vespa,P.M., Nuwer,M.R., Nenov,V., Ronne-Engstrom,E., Hovda,D.A., Bergsneider,M., Kelly,D.F., Martin,N.A., and Becker,D.P. (1999). Increased incidence and impact of

nonconvulsive and convulsive seizures after traumatic brain injury as detected by continuous electroencephalographic monitoring. *J Neurosurg* 91, 750-760.

Vespa,P.M., O'Phelan,K., McArthur,D., Miller,C., Eliseo,M., Hirt,D., Glenn,T., and Hovda,D.A. (2007). Pericontusional brain tissue exhibits persistent elevation of lactate/pyruvate ratio independent of cerebral perfusion pressure. *Crit Care Med* 35, 1153-1160.

Vila,E. and Salaices,M. (2005). Cytokines and vascular reactivity in resistance arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H1016-H1021.

Vilalta,A., Sahuquillo,J., Merino M.A., and Poca M.A. (2009a). *Effects of normobaric hyperoxia on brain metabolism in the injured brain*. Article en preparació. *Crit Care Med*.

Vilalta,A., Sahuquillo,J., Merino,M.A., and Poca,M.A. (2009b). Normobaric hyperoxia: is lack of improvement evidence due to an incorrect target population? Article en preparació.

Vilalta, A., Sahuquillo, J., Poca, M. A., de los Rios J., Cuadrado E., Ortega-Aznar A., Riveiro, M., and Montaner, J. (2008a). Brain contusions induce a strong local overexpression of MMP-9. Results of a pilot study. *Acta Neurochir Suppl* (En premsa).

Vilalta,A., Sahuquillo,J., Rosell,A., Poca,M.A., Riveiro,M., and Montaner,J. (2008b). Moderate and severe traumatic brain injury induce early overexpression of systemic and brain gelatinases. *Intensive Care Med* 34, 1384-1392.

Vilalta,J., Vaque,J., Olona,M., Castano,C.H., Guitart,J.M., Rossello,J., and Rubio,E. (1992). [Predictive factors of mortality in severe craniocerebral trauma]. *Med Clin* 99, 441-443.

Vlodavsky,E., Palzur,E., and Soustiel,J.F. (2006). Hyperbaric oxygen therapy reduces neuroinflammation and expression of matrix metalloproteinase-9 in the rat model of traumatic brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 32, 40-50.

von Gertten,C., Holmin,S., Mathiesen,T., and Nordqvist,A.C. (2003). Increases in matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 mRNA after cerebral contusion and depolarisation. *J Neurosci Res* 73, 803-810.

Wallace,J.A., Alexander,S., Estrada,E.Y., Hines,C., Cunningham,L.A., and Rosenberg,G.A. (2002). Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 is associated with neuronal death in reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 22, 1303-1310.

Wang,X., Jung,J., Asahi,M., Chwang,W., Russo,L., Moskowitz,M.A., Dixon,C.E., Fini,M.E., and Lo,E.H. (2000). Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on morphological and motor outcomes after traumatic brain injury. *J Neurosci* 20, 7037-7042.

Wang,X., Mori,T., Jung,J.C., Fini,M.E., and Lo,E.H. (2002). Secretion of matrix metalloproteinase-2 and -9 after mechanical trauma injury in rat cortical cultures and involvement of MAP kinase. *J Neurotrauma* 19, 615-625.

Weibel E.R. (1984). *The Pathway for Oxygen. Structure and Function in the Mammalian Respiratory System.* Harvard University Press).

Whittle,I.R., Glasby,M., Lammie,A., Bell,H., and Ungerstedt,U. (1998). Neuropathological findings after intracerebral implantation of microdialysis catheters. *Neuroreport* 9, 2821-2825.

Winter,C.D., Iannotti,F., Pringle,A.K., Trikkas,C., Clough,G.F., and Church,M.K. (2002). A microdialysis method for the recovery of IL-1beta, IL-6 and nerve growth factor from human brain in vivo. *J Neurosci Methods* 119, 45-50.

Yang,M.S., DeWitt,D.S., Becker,D.P., and Hayes,R.L. (1985). Regional brain metabolite levels following mild experimental head injury in the cat. *J Neurosurg* 63, 617-621.

Yatsiv,I., Morganti-Kossmann,M.C., Perez,D., Dinarello,C.A., Novick,D., Rubinstein,M., Otto,V.I., Rancan,M., Kossmann,T., Redaelli,C.A., Trentz,O., Shohami,E., and Stahel,P.F. (2002). Elevated intracranial IL-18 in humans and mice after traumatic brain injury and evidence of neuroprotective effects of IL-18-binding protein after experimental closed head injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 22, 971-978.

Yong,V.W., Krekoski,C.A., Forsyth,P.A., Bell,R., and Edwards,D.R. (1998). Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci* 21, 75-80.

Zauner,A., Bullock,M.R.R., Kuta,A.J., Woodward,J., and Young,H.F. (1996). Glutamate Release and Cerebral Blood Flow After Severe Human Head Injury. *Acta Neurochir Suppl* 40-44.

Zauner,A., Bullock,R., Di,X., and Young,H.F. (1995). Brain oxygen, CO₂, pH, and temperature monitoring: evaluation in the feline brain. *Neurosurgery* 37, 570-571.

Zauner,A., Daugherty,W.P., Bullock,M.R., and Warner,D.S. (2002). Brain oxygenation and energy metabolism: part I-biological function and pathophysiology. *Neurosurgery* 51, 289-301.

Zauner,A., Doppenberg,E., Soukup,J., Menzel,M., Young,H.F., and Bullock,R. (1998). Extended neuromonitoring: new therapeutic opportunities? *Neurol Res* 20, S85-S90.

Zauner,A., Doppenberg,E.M., Woodward,J.J., Choi,S.C., Young,H.F., and Bullock,R. (1997). Continuous monitoring of cerebral substrate delivery and clearance: initial experience in 24 patients with severe acute brain injuries. *Neurosurgery* 41, 1082-1093.

Zhao,B.Q., Tejima,E., and Lo,E.H. (2007). Neurovascular proteases in brain injury, hemorrhage and remodeling after stroke. *Stroke* 38, 748-752.