

Tesis Doctoral: Laura González García



**BIOMARCADORES DE LESIÓN CEREBRAL,
ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN EN EL TRAUMATISMO
CRANEOENCEFÁLICO GRAVE Y SU MODULACIÓN *IN VITRO*
POR ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA**

Programa de Doctorado en Biología Molecular,
Biomedicina e Investigación Clínica

Universidad de Sevilla

**Tesis Doctoral presentada por Laura González García,
Graduada en Farmacia y Facultativa Especialista de Área en Análisis
Clínicos, por la que opta al grado de Doctora en Farmacia**

Directores de la Tesis

*Dra. Ana Rodríguez Rodríguez
Dr. Juan José Egea Guerrero*

Tutor de la Tesis

Dr. Ángel Vilches Arenas

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



Tesis Doctoral: Laura González García

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



Tesis Doctoral: Laura González García

Dña. ANA RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, DOCTORA EN BIOLOGÍA POR LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA, FACULTATIVA ESPECIALISTA DE ÁREA EN BIOQUÍMICA, Y

D. JUAN JOSÉ EGEA GUERRERO, DOCTOR EN MEDICINA POR LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA, FACULTATIVO ESPECIALISTA DE ÁREA EN MEDICINA INTENSIVA,

INFORMAN: Que Dña. LAURA GONZÁLEZ GARCÍA, ha obtenido, estudiado y desarrollado bajo nuestra dirección el material necesario para la realización de su Tesis Doctoral titulada: **"BIOMARCADORES DE LESIÓN CEREBRAL, ESTRÉS OXIDATIVO E INFLAMACIÓN EN EL TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO GRAVE Y SU MODULACIÓN IN VITRO POR ADMINISTRACIÓN DE MELATONINA"**, reuniendo las condiciones necesarias para optar al grado de Doctora.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes expiden el presente,

En Sevilla, a 9 de marzo de 2020.



Fdo. Ana Rodríguez Rodríguez



Fdo. Juan José Egea-Guerrero

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

Tesis Doctoral: Laura González García

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



AGRADECIMIENTOS

A mis directores, la Dra. Ana Rodríguez Rodríguez y el Dr. Juan José Egea-Guerrero, que tanto me han ayudado y guiado en este recorrido. Ana, gracias por tu tiempo y dedicación, por ofrecerme oportunidades para crecer a tu lado, eres una excelente profesional. Juanjo, gracias por tu seguimiento, tus consejos y aportaciones. Ha sido un gran privilegio poder contar con vuestra experiencia, criterio y ayuda.

A mi tutor, el Dr. Ángel Vilches Arenas, gracias por tu asesoramiento en el análisis estadístico; y a mi compañero de laboratorio Lluís Sempere Bordes, por tu predisposición y colaboración en el desarrollo de varias técnicas.

A mi padre, por creer siempre en mí de forma incondicional, en mis capacidades y mis inquietudes, por enseñarme a ser como soy. A Mónica, gracias por tu generosidad, cariño y positividad.

A Jesús Manuel, mi compañero de vida, por estar a mi lado desde el primer momento en esta gran aventura. Contigo todo es más fácil.

A Pepi y Marta, mis mayores descubrimientos durante la residencia, gracias por apoyarme y estar siempre presentes.



Tesis Doctoral: Laura González García

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

Tesis Doctoral: Laura González García

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado.

Un esfuerzo total es una victoria completa”

Mahatma Gandhi

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

Tesis Doctoral: Laura González García

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

Tesis Doctoral: Laura González García

ÍNDICE

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

I. INTRODUCCIÓN	17
1.1 El traumatismo craneoencefálico	18
1.1.1 Epidemiología.....	18
1.1.2 Concepto de traumatismo craneoencefálico	19
1.2 Fisiopatología del traumatismo craneoencefálico	20
1.2.1 Alteraciones intracraneales	22
1.2.2 Alteraciones sistémicas.....	24
1.2.3 Principales cascadas bioquímicas desencadenadas en el traumatismo craneoencefálico grave	25
- Excitotoxicidad y alteración de la homeostasis iónica.....	26
- Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo.....	27
- Peroxidación lipídica y degradación de la membrana celular	28
- Respuesta neuroinflamatoria	29
1.3 Clasificación y pronóstico del traumatismo craneoencefálico.....	30
1.3.1 Clasificación tomográfica de Marshall o Traumatic Coma Data Bank.....	30
1.3.2 Glasgow Coma Scale	32
1.3.3 Abbreviated Injury Scale	34
1.3.4 Injury Severity Scale y New Injury Severity Score.....	35
1.3.5 Glasgow Outcome Scale.....	35
1.4 Biomarcadores de lesión cerebral traumática	37



Tesis Doctoral: Laura González García

1.4.1 Enolasa Neuroespecífica 38

1.4.2 Proteína S100B..... 40

1.5 Biomarcadores de estrés oxidativo 41

1.5.1 Capacidad antioxidante total 42

1.5.2 Malondialdehído 43

1.6 Biomarcadores de neuroinflamación 45

1.6.1 Interleuquina -1 46

1.6.2 Interleuquina -8 47

1.6.3 Interleuquina -10 47

1.7 Vulnerabilidad genética del traumatismo craneoencefálico: Apolipoproteína E 48

1.8 Estrategias antioxidantes y antiinflamatorias en el traumatismo craneoencefálico:
La melatonina 50

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS 53

2.1 HIPÓTESIS 54

2.2 OBJETIVOS 54

III. METODOLOGÍA..... 55

3.1 Tipo de estudio 56

3.1.1 Estudio observacional 56

3.1.2 Ensayo *in vitro* 56

3.2 Unidad de estudio y localización 56



Tesis Doctoral: Laura González García

3.3 Diseño del estudio y recogida de datos..... 57

 3.3.1 Criterios de inclusión 57

 3.3.2 Criterios de exclusión..... 58

3.4 Variables de estudio 59

 3.4.1 Variables demográficas..... 59

 3.4.2 Variables clínicas 59

 3.4.3 Manejo clínico y tratamiento de los pacientes..... 60

 3.4.4 Recogida y procesamiento de muestras..... 60

 - Estudio observacional 60

 - Ensayo *in vitro* 60

 3.4.5 Variables analíticas 62

 - Proteína S100B..... 62

 - Enolasa neuroespecífica..... 63

 - Capacidad antioxidante total..... 64

 - Malondialdehído..... 65

 - Interleuquinas -1beta, -8 y -10..... 65

 - Apolipoproteína E 66

3.5 Consideraciones éticas y legales 67

 3.5.1 Confidencialidad 68

 3.5.2 Información al paciente/representante legal..... 68



Tesis Doctoral: Laura González García

3.6 Análisis estadístico..... 68

 3.6.1 Análisis descriptivo 69

 3.6.2 Análisis inferencial bivalente 69

 3.6.3 Análisis de supervivencia mediante regresión de Cox..... 70

 3.6.4 Curvas ROC..... 71

IV. RESULTADOS 73

4.1 Estudio observacional..... 74

 4.1.1. Datos demográficos 74

 4.1.2. Datos clínicos 75

 4.1.3. Datos analíticos..... 77

 4.1.4. Relación entre las diferentes variables clínicas y analíticas y la supervivencia... 82

 - Evaluación de la supervivencia a la salida de UCI 82

 - Evaluación de la supervivencia a los 6 meses..... 88

 4.1.5. Variables clínicas y analíticas candidatas para los modelos de supervivencia.... 94

 4.1.6. Modelos de supervivencia en pacientes con traumatismo craneoencefálico grave 98

4.2 Ensayo *in vitro* 102

 4.2.1 Datos demográficos 102

 4.2.2 Datos clínicos 103

 4.2.3 Datos analíticos..... 105

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



Tesis Doctoral: Laura González García

- Evolución temporal de los biomarcadores en sobrenadante de cultivos de PBMCs 105

4.2.4 La melatonina como modulador de inflamación 106

4.2.5 La melatonina como modulador del estrés oxidativo 108

4.2.6 Implicación del genotipo de APOE 109

- Efecto de la melatonina sobre el estrés oxidativo en cultivos de PBMCs según el genotipo de APOE 110

V. DISCUSIÓN 115

5.1 Capacidad predictora de mortalidad de los biomarcadores de daño cerebral y estrés oxidativo 116

5.2 Modelos predictores de mortalidad 121

5.3 Papel de la melatonina como fármaco modulador de la respuesta inflamatoria y oxidativa 123

5.4 Implicación del genotipo de APOE en el efecto modulador de la melatonina sobre la respuesta oxidativa 126

5.5 Limitaciones 127

5.6 Fortalezas 128

5.7 Aplicabilidad del estudio 130

VI. CONCLUSIONES 131

VII. SIGLAS Y ACRÓNIMOS 133

VIII. BIBLIOGRAFÍA 139



Tesis Doctoral: Laura González García

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

Tesis Doctoral: Laura González García

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

I. INTRODUCCIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



1.1 El traumatismo craneoencefálico

El Traumatismo Craneoencefálico (TCE) representa un problema de salud pública de enorme y creciente importancia debido a su elevada morbilidad a nivel mundial (1).

De forma general, el TCE ocurre frecuentemente asociado a otros traumatismos, siendo responsable de forma específica de casi la tercera parte de la mortalidad por trauma. Es la primera causa de muerte en el segmento de población que se encuentra por debajo de los 45 años; y en el resto, constituye la segunda causa, tras las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, pero si tenemos en cuenta la potencialidad de años de vida útil y productivos que se pierden, es muy superior a los otros dos. Afecta más a hombres que a mujeres, en proporción 3:2; y entre los principales mecanismos causantes de lesión destacan los accidentes de tráfico, las caídas y las agresiones, aunque la frecuencia relativa varía ampliamente (2–4).

1.1.1 Epidemiología

Teniendo en cuenta que los accidentes de tráfico constituyen el principal mecanismo lesional, Dewan *et al.* estimaron la incidencia global del TCE mediante una revisión sistemática y posterior metaanálisis sobre la proporción de accidentes de tráfico y otros mecanismos lesionales que resultaron en un TCE, y junto con los datos obtenidos del *Global Burden of Disease Study* (GBD) de 2015, concluyeron que la incidencia global de TCE es de 69 millones de casos al año (1).

A nivel europeo, en los últimos años se han publicado cuatro revisiones sistemáticas que estiman los patrones epidemiológicos del TCE. Los resultados obtenidos son muy similares,



Tesis Doctoral: Laura González García

reflejando una incidencia en torno a 265-287 casos nuevos por cada 100.000 habitantes (5-8).

En cuanto a la incidencia reportada en nuestro país, hace unos años, un grupo de profesionales de la Medicina Intensiva en España diseñó el proyecto RETRAUCI: Registro de Trauma en UCI, con objeto de crear un registro nacional multicéntrico de pacientes traumáticos críticos (9). A partir del mismo se podrá estimar la incidencia de TCE a nivel nacional, pues en la actualidad España no dispone de datos precisos acerca de la incidencia de TCE.

1.1.2 Concepto de traumatismo craneoencefálico

La definición más aceptada es la recogida en el estudio epidemiológico prospectivo realizado en San Diego (USA) en el que el TCE se define como *“el daño físico y la alteración funcional del contenido craneal debido a un intercambio brusco de energía mecánica, producido por un impacto directo o por mecanismos de aceleración – desaceleración”* (10).

De forma general, se estima que alrededor del 70% de los pacientes que sufren un TCE tienen una buena recuperación. Del 30% restante, un 9% fallecen antes de llegar al hospital, el 6% lo hacen durante su estancia hospitalaria y el 15% quedan funcionalmente incapacitados en diferentes grados. Además, como consecuencia de un TCE, se pueden producir una serie de secuelas psicológicas asociadas a trastornos conductuales y cambios en la personalidad, lo que hace que se incremente la tasa de incapacidad postraumática. Estos cambios, junto con los problemas cognitivos, constituyen una de las causas más relevantes de la prolongada discapacidad y, a menudo, causan aislamiento social,



problemas familiares y dificultades para volver a la situación educacional y/o laboral anterior al accidente (11).

1.2 Fisiopatología del traumatismo craneoencefálico

En la lesión cerebral traumática se producen una serie de acontecimientos fisiopatológicos evolutivos en el tiempo. Estos eventos van a conducir a daño cerebral, el cual surge como consecuencia de dos tipos de lesiones: primaria y secundaria. La lesión cerebral primaria acontece inmediatamente tras el traumatismo y es responsable de lesiones funcionales o estructurales, que pueden ser reversibles o irreversibles. Una vez transcurrido un intervalo de tiempo más o menos prolongado y como consecuencia del traumatismo, tiene lugar la lesión cerebral secundaria (12,13).

En el momento actual, el control sobre el daño primario, excluyendo las medidas de prevención primaria, no es posible. Es por ello que se debe incidir en el diseño de diferentes estrategias para minimizar el daño secundario. Una actuación terapéutica eficaz constituye el objetivo esencial para mejorar el pronóstico del TCE, por lo que es de especial importancia el conocimiento de su fisiopatología y de las medidas que pueden aplicarse para minimizarlo (11).

La lesión cerebral primaria se relaciona con el mecanismo y la energía desarrollada en el traumatismo, los cuales van a ocasionar un daño inmediato y generalmente irreversible sobre las neuronas, los axones, las dendritas, las células de la glía y los vasos sanguíneos (14).



Tesis Doctoral: Laura González García

La lesión cerebral primaria responde a dos mecanismos lesionales:

- a) *Estático*: se produce como consecuencia de la aproximación de un agente externo con una determinada energía cinética que finalmente colisiona con el cráneo. Esta energía cinética es proporcional a la masa y a la velocidad, siendo estos dos parámetros los determinantes de la gravedad de las lesiones resultantes. Este tipo de mecanismo lesional es responsable de las lesiones focales, como son las fracturas de cráneo, los hematomas epidurales, subdurales e intracerebrales, así como hemorragia subaracnoidea (15).
- b) *Dinámico*: se produce como resultado de la colisión, en este caso del cráneo, contra un agente externo. Durante el incidente se van a producir dos tipos de movimiento como consecuencia del mecanismo de aceleración-desaceleración soportado por el cráneo: un primer movimiento de tensión o elongación y un segundo movimiento de distorsión angular (15), que son el reflejo de un efecto mecánico de traslación y rotación sobre el cerebro. Este tipo de mecanismo lesional es responsable de las lesiones difusas como son el daño axonal difuso, las lesiones cerebrales hipóxicas y el “*swelling*” cerebral.

En el caso de la lesión cerebral secundaria, aunque desencadenada por el impacto, se manifiesta después de un intervalo más o menos prolongado de tiempo tras el TCE. Se van a producir una serie de alteraciones intracraneales y sistémicas que pueden agravar o conducir a nuevas lesiones cerebrales. Entre las alteraciones intracraneales básicas que acompañan sistemáticamente al TCE destacan las alteraciones del flujo sanguíneo cerebral (FSC), de la presión intracraneal (PIC) y del metabolismo cerebral. Otras lesiones asociadas serían las alteraciones de la barrera hematoencefálica (BHE), edemas intra y extracelulares,



Tesis Doctoral: Laura González García

e isquemia. Y entre las alteraciones sistémicas, las de mayor repercusión serían la hipotensión, hipoxemia, coagulopatías, distrés respiratorio, diabetes insípida, fiebre central, infecciones, alteraciones gastrointestinales y alteraciones hidroelectrolíticas (hipo- e hipernatremia) (11,13).

1.2.1 Alteraciones intracraneales

El sistema cerebral utiliza tres tipos de mecanismos regulatorios para mantenerse en equilibrio: regulación del FSC, regulación de la PIC y regulación metabólica. Cuando estos procesos se desequilibran tras el daño producido por el TCE, se produce descompensación del sistema cerebral.

a) *Alteraciones del flujo sanguíneo cerebral*

A pesar de que el cerebro humano constituye el 2% del peso corporal, recibe, aproximadamente, el 15-25% del gasto cardiaco con un FSC de 40-50 mL/100g de tejido cerebral/min (16). Este FSC va a estar determinado por el consumo metabólico de oxígeno cerebral, vía autorregulación mediante la resistencia vascular cerebral, y por la presión de perfusión cerebral (17).

La autorregulación cerebral se basa en la modificación de la resistencia vascular cerebral, mediante vasodilatación o vasoconstricción, con el fin de mantener un FSC acorde a las necesidades metabólicas cerebrales de oxígeno de cada momento. En la mayoría de los TCE graves la vía de autorregulación cerebral se rompe y el sistema cerebral no es capaz de corregir y regular el FSC que necesita. Como consecuencia, se produce un estado de hipoperfusión y posterior isquemia cerebral que puede empeorar el pronóstico y elevar la tasa de mortalidad del TCE (18,19).



Tesis Doctoral: Laura González García

b) *Alteraciones de la presión intracraneal*

El “*swelling cerebral difuso*” o hinchazón, es el tipo de lesión cerebral traumática más frecuente en el TCE grave. Este término se aplica de forma general cuando se produce un aumento del volumen global del cerebro y se asocia estrechamente a un aumento de la PIC (20).

La hipertensión endocraneal (HTEC) va a producir una alteración de la función cerebral como consecuencia de la disminución de la presión de perfusión cerebral y por consiguiente del FSC. Como se ha mencionado anteriormente, un descenso llamativo del FSC va a dar lugar a hipoperfusión y como consecuencia a isquemia cerebral. Si esta situación se prolonga en el tiempo, la situación de falta de flujo puede evolucionar a infartos cerebrales y a necrosis tisular, ocasionando un estado de daño estructural permanente (21–23). Como respuesta a esta situación, el sistema cerebral responde mediante un aumento en el FSC, lo cual va a ser contraproducente ya que originará un aumento de la PIC, y de no actuar de forma precoz, se generará una progresión de la lesión cerebral (22,23).

c) *Alteraciones del metabolismo cerebral*

Los procesos que consumen energía para asegurar un correcto funcionamiento cerebral dan cuenta del 25% del total de la glucosa utilizada en el organismo y casi del 20% del consumo de oxígeno (16). Esta elevada demanda metabólica se debe a que las neuronas se sirven casi exclusivamente del metabolismo de la glucosa para la generación de energía suficiente para mantener un adecuado gradiente iónico a través de las membranas celulares, así como para el proceso de neurotransmisión.



Tesis Doctoral: Laura González García

Tras el TCE se va a producir un desequilibrio del gradiente iónico celular como consecuencia de una liberación aumentada de neurotransmisores excitotóxicos, principalmente glutamato, que alteran la permeabilidad de la membrana celular (24,25). En un intento de restaurar la homeostasis iónica mediante una mayor actividad de las bombas iónicas (ATPasas) de la membrana celular, se va a producir un consumo desorbitado de glucosa y ATP que va a reducir las reservas de energía del cerebro. Esto va a causar una alteración en el proceso de fosforilación oxidativa mitocondrial iniciándose la glucólisis anaerobia, así como la activación del estrés oxidativo. Además, como consecuencia de esta descompensación iónica y metabólica, se va a estimular la producción de diferentes enzimas como proteasas (calpaínas y caspasas), lipasas y endonucleasas, que van a conducir a la muerte celular inmediata por necrosis y/o por apoptosis celular (25,26).

1.2.2 Alteraciones sistémicas

De entre las muchas alteraciones sistémicas descritas tras un TCE, cabe destacar como primera variable individual, la hipotensión arterial. Diversos estudios han demostrado que ésta, incluso cuando actúa durante períodos cortos, empeora el pronóstico y eleva la tasa de mortalidad del TCE grave, pues conduce a un estado de hipoperfusión e isquemia cerebral (18,19). Por lo que respecta a las alteraciones hidroelectrolíticas, la hiponatremia es un factor determinante de mal pronóstico ya que promueve el desarrollo del edema intracelular (27). Y determinadas situaciones como la fiebre, la sepsis y las crisis comiciales conducen a un aumento del metabolismo cerebral por lo que los efectos de la isquemia serían, teóricamente, aún más devastadores (28). Sin embargo, salvo en el caso de la fiebre prolongada, no se ha podido demostrar que dichos elementos constituyan variables independientes con alguna influencia significativa sobre el pronóstico del TCE (11).



1.2.3 Principales cascadas bioquímicas desencadenadas en el traumatismo craneoencefálico grave

Las alteraciones intracraneales descritas anteriormente se van a generar como consecuencia de la activación de una serie de cascadas bioquímicas y fisiológicas (figura 1) que se describen a continuación.

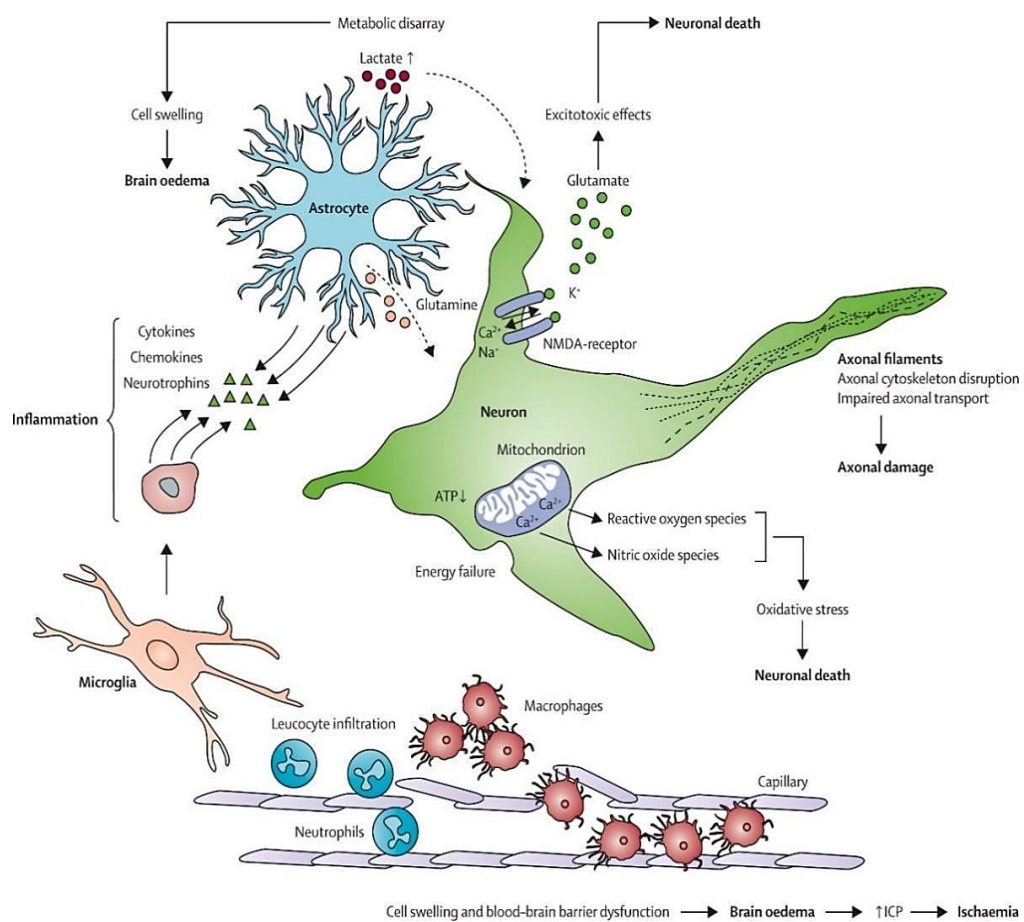


Figura 1. Fisiopatología de la lesión cerebral traumática (Tomado de Rosenfeld *et al.*) (12).



Tesis Doctoral: Laura González García**- Excitotoxicidad y alteración de la homeostasis iónica**

Tras el TCE se va a producir una liberación excesiva de neurotransmisores en las terminales nerviosas presinápticas de las neuronas despolarizadas. La rápida difusión de neurotransmisores excitatorios, como son el glutamato y aspartato, van a desencadenar una estimulación desmesurada y no regulada de los receptores NMDA y AMPA, provocando una alteración de la homeostasis iónica. Como consecuencia se va a producir una acumulación masiva de sodio y calcio intracelular y una liberación de potasio al espacio extracelular, debido a la difusión de estos iones a través de los canales iónicos activados por los receptores de glutamato (25). Los astrocitos van a ser las células más susceptibles a esta excitotoxicidad debido a que se encuentran especialmente expuestos a la influencia del aumento de potasio. En un intento de recuperar y mantener la homeostasis iónica, los astrocitos responden a este exceso de potasio mediante el fenómeno de “*swelling*”, permitiendo así recuperar la repolarización de la membrana. Pero este mecanismo puede influir de forma negativa sobre el FSC debido a que la conexión de los astrocitos a través de su pie perivascular con los vasos sanguíneos puede ocasionar una compresión de los mismos entorpeciendo el FSC (29,30). Diversos estudios como el de Gopinath *et al.*, han demostrado que este aumento de neurotransmisores excitatorios es directamente proporcional a la gravedad del traumatismo e inversamente proporcional a la supervivencia postraumática (31).

También son importantes los cambios intracelulares que están determinados por el flujo excesivo de calcio, ya que van a inducir daño a través de una serie de cascadas bioquímicas como son: la activación de proteasas (calpaínas y caspasas) dependientes de calcio, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés “*reactive oxygen species*”) y



Tesis Doctoral: Laura González García

nitrógeno (RNS, del inglés “*reactive nitrogen species*”), y el deterioro mitocondrial causado por el exceso de calcio. Todos estos mecanismos van a conducir, en última instancia, a la muerte celular por apoptosis (32).

- Disfunción mitocondrial y estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una situación dinámica y compleja caracterizada por un desequilibrio entre la producción de ROS y RNS; y la disponibilidad y acción de los mecanismos antioxidantes para neutralizarlas. Entre las ROS, la más abundante es el anión superóxido ($O_2\cdot^-$) que se convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o en el radical hidroxilo ($OH\cdot$) de forma espontánea o mediante la acción de enzimas. Entre las RNS, la especie mayoritaria es el óxido nítrico ($NO\cdot$) que da lugar a otras RNS como el peroxinitrito ($ONOO\cdot$).

Tras la lesión traumática, se van a activar varios mecanismos productores de radicales libres. Como se ha visto anteriormente, la acumulación de calcio intracelular observada como consecuencia del desequilibrio homeostático va a activar la captación de calcio mitocondrial. Esta sobrecarga de calcio de las mitocondrias es la responsable de la inducción del estrés oxidativo y la alteración de la función mitocondrial (33). Además, el sistema nervioso central (SNC) consume grandes cantidades de oxígeno para llevar a cabo los procesos fisiológicos, lo que conduce a una mayor probabilidad de generación de radicales libres (34).

Otra fuente de ROS en el TCE es la lisis de glóbulos rojos que tiene lugar tras el trauma mecánico. Esta lisis de hematíes va a ocasionar la liberación de grandes cantidades de hemoglobina libre, que es extremadamente tóxica ya que su degradación da lugar a la liberación de aniones de hierro, lo que aumenta la formación de ROS y RNS a través de la



Tesis Doctoral: Laura González García

cadena de transporte de electrones. Además, la oxidación de la hemoglobina a oxihemoglobina y metahemoglobina va a incrementar aún más la producción de ROS (35). También existen diferentes sistemas enzimáticos de generación de ROS como son la xantina oxidasa y la NADPH oxidasa (36).

Finalmente, todos estos procesos confluyen en un denominador común: la activación del mecanismo de muerte celular programada o apoptosis como consecuencia del daño ocasionado a la membrana celular, la destrucción de ADN, la oxidación de proteínas y el deterioro del citoesqueleto (37).

- Peroxidación lipídica y degradación de la membrana celular

Los lípidos y lipoproteínas de las membranas biológicas se encuentran entre los compuestos más vulnerables frente al estrés oxidativo, dando lugar a la reacción denominada peroxidación lipídica (LPO).

El SNC es especialmente sensible debido a que contiene altas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados que son susceptibles a la LPO. El proceso de LPO se va a iniciar mediante el ataque de un radical libre a un ácido graso poliinsaturado provocando la oxidación de la cadena hidrocarbonada, rompiendo y acortando la misma, y liberando pequeños productos alifáticos. Estas modificaciones pueden alterar la estructura hidrofóbica de la membrana perturbando su correcto funcionamiento. Además, los productos alifáticos liberados, principalmente 4-hidroxi alquenos, hidroperóxidos y malondialdehído (MDA), pueden reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos, lo que determina sus efectos citotóxicos, genotóxicos y mutagénicos, así como su papel



Tesis Doctoral: Laura González García

patogénico en varias patologías como es el caso del TCE y las enfermedades neurodegenerativas (38–40).

- Respuesta neuroinflamatoria

Durante la fase aguda del TCE y como consecuencia del impacto mecánico, se produce la ruptura de la BHE, lo que va a desencadenar una activación endotelial y reclutamiento e infiltración de leucocitos circulantes. Adicionalmente, las células del parénquima cerebral (microglía y astrocitos) van a iniciar un proceso de activación donde exhiben respuestas de migración, fagocitosis, presentación de antígenos, producción de citoquinas y otros factores solubles (DAMPs, del inglés “*damage-associated molecular patterns*”), participando no solo como sensores del daño sino también coordinando la respuesta inflamatoria del SNC (41).

Los astrocitos son otro tipo de células que participan en la respuesta neuroinflamatoria. Aquellos que sobreviven al daño celular inicial sufren un cambio fenotípico denominado astrocitosis reactiva, que se caracteriza por hipertrofia, hiperplasia y aumento de la expresión del filamento intermedio denominado proteína ácida fibrilar glial (GFAP) (42,43). En un TCE moderado y focal, la astrocitosis va a delimitar el área dañada y a favorecer la remodelación neurolástica; sin embargo, en un TCE grave, esta astrocitosis puede resultar en una cicatriz glial que posteriormente dificultará los cambios neurolásticos necesarios para la recuperación funcional de la zona lesionada (44).

Si bien la inflamación, tal y como se ha descrito puede considerarse como un mecanismo con un marcado componente nocivo, no deja de tener como función principal el limitar y controlar posibles daños, así como eliminar en algunos casos las causas de los mismos. En este sentido, durante la respuesta neuroinflamatoria también se van a producir factores



neurotróficos y de supervivencia neuronal; y será este equilibrio entre los aspectos nocivos y los protectores el que determinará el resultado final de la zona dañada (45).

1.3 Clasificación y pronóstico del traumatismo craneoencefálico

La gravedad y el riesgo evolutivo de los pacientes tras un TCE depende de diferentes factores como son la edad, el sexo, el mecanismo de la lesión, la calidad de la atención médica proporcionada y las comorbilidades que puedan sobreañadir al cuadro clínico un incremento en el riesgo. Un sistema de puntuación para aquellos pacientes que han sufrido un traumatismo convierte la gravedad de la lesión en un número, por lo que ayuda a los médicos a hablar un idioma común en los programas de mejora de la calidad asistencial. Aunque destacan varios sistemas, en la actualidad no existe un consenso sobre cuál es el mejor para predecir la mortalidad, pero todos ellos deben ser tenidos en cuenta para establecer la evolución y pronóstico del paciente.

1.3.1 Clasificación tomográfica de Marshall o Traumatic Coma Data Bank

Con la introducción de la tomografía axial computarizada (TAC) por Hounsfield y Ambrose, en 1973, la metodología y la exploración neurorradiológica del paciente con lesión cerebral traumática se ha modificado notablemente (46).

La clasificación del *Traumatic Coma Data Bank* (TCDB) fue descrita por Marshall en 1991. El objetivo de la elaboración de esta escala fue identificar a aquellos pacientes con un mayor riesgo de presentar una mala evolución clínica en función de los hallazgos de la TAC craneal, entendiéndose como aquellos que puedan desarrollar episodios de HTEC durante su



Tesis Doctoral: Laura González García

evolución, que presenten lesiones con una elevada mortalidad asociada y aquellos casos que reflejen signos radiológicos de mal pronóstico (47).

Esta clasificación está constituida por seis categorías dependientes de las lesiones observadas en la TAC (tabla 1). Cuatro de ellas indican la presencia de lesión difusa mientras que las otras dos indican la presencia de lesión con efecto masa evacuada, o no evacuada quirúrgicamente.

Marshall *et al.*, tras aplicar esta clasificación en 746 pacientes con TCE grave, demostraron la existencia de una relación directa entre el tipo de lesión y el resultado final del paciente, evaluado a partir de la *Glasgow Outcome Scale* (GOS). El porcentaje de HTEC y de mal resultado clínico fue más elevado a medida que aumentaba el grado de lesión difusa, así como en las lesiones tipo masa no evacuada frente a las evacuadas; hallando así un fuerte vínculo entre la evolución, el grado de “*swelling*” cerebral y los milímetros de desviación de la línea media (49).

Posteriormente, diversos estudios como el de Maas *et al.* y Servadei *et al.*, demostraron que la clasificación de Marshall hace posible una descripción más detallada de las lesiones intracraneales y una identificación precoz de los pacientes con riesgo de HTEC. Ambos trabajos concluyeron que la clasificación de la TCDB era la escala radiológica de referencia por su elevada capacidad pronóstica de mortalidad (50,51).



Tabla 1. Clasificación tomográfica del TCE según la *Traumatic Coma Data Bank* (48).

Grado	Tipo de lesión	TAC
I	Lesión difusa I	Sin patología visible en la TAC
II	Lesión difusa II	Cisternas presentes con desplazamiento de la línea media de 0-5mm y/o lesiones densas presentes. Sin lesiones de densidad alta o mixta > 25cc. Puede incluir fragmentos óseos y cuerpos extraños
III	Lesión difusa III (<i>Swelling</i>)	Cisternas comprimidas o ausentes con desplazamiento de la línea media de 0-5mm. Sin lesiones de densidad alta o mixta > 25cc
IV	Lesión difusa IV (<i>Shift</i>)	Desplazamiento de la línea media > 5mm. Sin lesiones de densidad alta o mixta > 25cc
V	Lesión focal evacuada	Cualquier lesión evacuada quirúrgicamente
VI	Lesión focal no evacuada	Lesión de densidad alta o mixta > 25cc no evacuada quirúrgicamente

1.3.2 Glasgow Coma Scale

La publicación de la Escala de coma de Glasgow (GCS) en 1974 por Teasdale proporcionó un medio confiable y práctico para la evaluación del coma y alteración de la consciencia (52). Poco después de su publicación, la GCS fue ampliamente aceptada como un instrumento para clasificar la gravedad de los TCE.



Tesis Doctoral: Laura González García

La GCS lleva a cabo una valoración del nivel de consciencia, que permite a través de los cambios en su puntuación reflejar el estado evolutivo del paciente. Para ello es necesario evaluar la suma de tres respuestas independientes: respuesta motora, ocular y verbal (tabla 2). La escala representa la suma del valor numérico de cada una de las categorías siendo el valor de 15 puntos, y que implica un nivel de consciencia normal. El valor mínimo se corresponde con 3 puntos, y que implica una respuesta de coma arreactivo.

La estratificación de los niveles de gravedad de la GCS tras el TCE se asocia a la intensidad de la lesión cerebral del individuo permitiendo clasificar la gravedad del TCE como TCE leve (puntuación en la GCS comprendida entre 14 y 15 puntos), TCE moderado (puntuación comprendida entre 9 y 13 puntos) o TCE grave (puntuación inferior o igual a 8 puntos).

Tabla 2. Glasgow Coma Scale (52).

Respuesta Motora		Respuesta Ocular		Respuesta Verbal	
Espontánea, normal	6	Espontánea	4	Orientada	5
Localizada al tacto	5	A la voz	3	Confusa	4
Localizada al dolor	4	Al dolor	2	Palabras inapropiadas	3
Decorticación	3	Ninguna	1	Sonidos incomprensibles	2
Descerebración	2			Ninguna	1
Ninguna	1				



Tesis Doctoral: Laura González García

Es importante tener en cuenta que el uso de la GCS depende de una situación clínica apropiada, debido a que ciertas circunstancias fisiopatológicas extracraneales, tales como la hipotensión arterial, la hipotermia y los trastornos metabólicos, pueden alterar de manera significativa la exploración del paciente y por tanto su resultado.

1.3.3 Abbreviated Injury Scale

Como consecuencia del interés despertado por el aumento en la incidencia de accidentes de tráfico, un grupo de médicos desarrolló en 1969, un sistema puntuación empleado para describir la gravedad de las lesiones, se denominó Escala Abreviada de Lesiones o *Abbreviated Injury Scale (AIS)*.

En su primera publicación, esta escala incluyó 73 lesiones puntuando la gravedad de las mismas según el siguiente consenso: 1 (menor), 2 (moderada), 3 (grave pero no amenaza la vida), 4 (amenaza la vida, aunque la supervivencia es probable), 5 (amenaza la vida, supervivencia poco probable) y 6 (fatal, incompatible con la vida). Desde entonces le han seguido posteriores revisiones y actualizaciones, siendo las más notables la revisión de 1985 (AIS-85) y la de 1990 (AIS-90). En la actualidad se utiliza el AIS-90 que ofrece una clasificación bastante exacta de la gravedad de la lesión traumática (53,54).

Es importante recalcar que esta escala surge como una representación del grado de “amenaza para la vida” que suponen las lesiones para el paciente, lo que impide su utilidad como una medida global de gravedad (54).



1.3.4 Injury Severity Scale y New Injury Severity Score

La *Injury Severity Scale* (ISS) es un sistema de puntuación anatómico empleado en aquellos pacientes que presentan lesiones traumáticas múltiples. Depende de la AIS, pero difiere en el método de cálculo. La mayoría de los estudios han demostrado que la escala *New Injury Severity Score* (NISS) es superior a la ISS (55–57), pero esta última sigue siendo la puntuación más utilizada en todo el mundo (57).

Según esta escala, a cada lesión se le otorga una puntuación AIS y se asigna a una de las seis regiones del cuerpo (cabeza, cara, tórax, abdomen, extremidades - incluida la pelvis - y estructuras externas). Solo se utiliza la puntuación AIS más alta en cada región del cuerpo. Las tres regiones corporales con lesiones más graves tienen su puntuación al cuadrado y se suman para dar lugar a la puntuación ISS (58). La puntuación máxima alcanzable es 75 y por consenso, a cualquier paciente con una puntuación de 6 en cualquier región del cuerpo (sin posibilidad de supervivencia ante dicha lesión), se le otorga un ISS de 75.

1.3.5 Glasgow Outcome Scale

La Escala de Resultados de Glasgow (GOS) se publicó por primera vez en 1975 por Bryan Jennett y Michael Bond. Con más de 4.000 citas al artículo original, es la medida de resultado más empleada en estudios de lesión cerebral. Además, varios organismos nacionales recomiendan la utilización de esta escala junto con el GOS Extendido (GOSE) desarrollado posteriormente, como medida de resultado y pronóstico para traumatismos graves y lesiones en la cabeza (59).



Tesis Doctoral: Laura González García

Esta escala fue desarrollada inicialmente como una herramienta de medición de la repercusión social que originaba el TCE a los seis meses, y ha sido utilizada típicamente para evaluar resultados en estudios neuroquirúrgicos, así como en ensayos clínicos de fármacos relacionados con el TCE. La escala posee cinco categorías, siendo la puntuación más alta la que corresponde al mejor resultado (Tabla 3).

Tabla 3. *Glasgow Outcome Scale* (59).

Puntuación	Descripción
1	Muerte
2	Estado Vegetativo. No hay evidencia de actividad cortical
3	Incapacidad Grave. Consciente, pero discapacitado. Necesita asistencia para las tareas diarias por discapacidad mental y/o física
4	Incapacidad Moderada. Discapacitado, pero independiente. Puede hacer sus tareas diarias, pero no reintegrarse al trabajo o al estudio. Las discapacidades incluyen distintos grados de disfasia, hemiparesia o ataxia, como así también déficits de memoria, intelectuales y cambios de personalidad
5	Buena recuperación. Se reintegra a su actividad previa. Puede presentar déficits neurológicos o psicológicos menores



1.4 Biomarcadores de lesión cerebral traumática

Hace ya más de 20 años se describió cómo debería ser el marcador ideal para el TCE, definiéndose como aquel que presente una elevada especificidad y sensibilidad por el tejido cerebral, siendo liberado únicamente tras una lesión irreversible y detectándose en líquido cefalorraquídeo (LCR) y sangre periférica rápidamente tras el daño. Además, es conveniente que refleje la extensión y la gravedad de dicha lesión siguiendo un curso temporal conocido. A su vez, deben existir mínimas variaciones entre los grupos de edad y sexo; y las herramientas para su análisis y detección inmediata deben estar disponibles y ser reproducibles. Por último, y con mayor importancia, su determinación debe tener implicaciones clínicas (60).

Por otra parte, existe cierta controversia en cuanto al tipo de líquido biológico objeto de análisis. La toma de una muestra directa del parénquima cerebral lesionado no es una opción plausible, aunque sería la única fuente de biomarcadores con información inequívoca y directa sobre los cambios que acontecen tras el TCE. En cuanto al resto de las determinaciones, éstas se encuentran subrogadas a los comportamientos de liberación de los biomarcadores, el paso a través de membranas, así como el fenómeno de dilución una vez alcanzado el compartimento sistémico. Teniendo en cuenta todo esto, existen técnicas como la microdiálisis, que permiten la determinación de metabolitos y biomarcadores del espacio intersticial cerebral. Por otro lado, el LCR se encuentra más próximo a la zona lesionada, por lo que las determinaciones a este nivel no se ven condicionadas por la integridad de la BHE. Sin embargo, la toma de muestras de LCR es de difícil acceso y disponibilidad, y son con frecuencia contraindicadas en sujetos con TCE grave. Es por ello



Tesis Doctoral: Laura González García

que la mayoría de los biomarcadores son estudiados en sangre periférica, pues se trata de una matriz biológica más accesible y reproducible (61–63).

Una vez establecidas las condiciones que debe cumplir el biomarcador ideal y el tipo de líquido biológico donde se va a estudiar, hay que tener en cuenta, además, que los biomarcadores son elementos dinámicos sujetos a cambios que responden a diferentes estados inflamatorios, lesiones por estrés oxidativo y fenómenos de necrosis tisular tras el TCE (35). Por tanto, es conveniente realizar mediciones seriadas en lugar de determinaciones aisladas para que los resultados obtenidos adquieran mayor significación. Teniendo en cuenta esto, varios estudios proponen que sería de gran ayuda disponer de un panel de biomarcadores complementarios que muestren diferentes perfiles temporales y que reflejen las distintas condiciones fisiopatológicas desencadenadas tras el TCE (64,65).

Aunque actualmente no existen biomarcadores con utilidad clínica demostrada para el diagnóstico de la lesión cerebral, ya sea causada por un TCE, accidente cerebrovascular u otras lesiones cerebrales agudas, los diversos estudios de investigación llevados a cabo en este área han puesto de manifiesto el potencial que presentan muchos de ellos (66,67). Algunos de los biomarcadores que han resultado ser más prometedores en este campo son la enolasa neuroespecífica (NSE) y la proteína S100B (68–70).

1.4.1 Enolasa Neuroespecífica

La NSE es una de las cinco isozimas de la enzima glucolítica enolasa. Tiene un peso molecular de 78 kDa, una vida media de 24 horas y presenta un aclaramiento renal. Debido a este tipo de aclaramiento, debemos considerar una posible interferencia en aquellos pacientes con insuficiencia renal (71).



Tesis Doctoral: Laura González García

En cuanto a su localización, se ubica mayoritariamente en el citoplasma de las neuronas, y en menor medida, en los nervios periféricos, así como en otras localizaciones extracerebrales como el sistema endocrino, las plaquetas y los eritrocitos (72). Esta última localización es de gran importancia, pues hay que considerar una posible interferencia en aquellas situaciones clínicas y preanalíticas en las que se produzca hemólisis (73).

En cuanto a la función que desempeña la NSE, ésta se relaciona con el incremento en los niveles de cloruro que tienen lugar durante la actividad neuronal, participando en la comunicación axonal y el mantenimiento de la homeostasis. Una vez se produce el daño cerebral, la NSE va a difundir al espacio extracelular pasivamente a través de la membrana celular, y de ahí a sangre periférica como consecuencia del daño ocasionado en la BHE (74).

Modelos experimentales de lesión traumática han encontrado una correlación entre los niveles séricos de NSE con la gravedad lesional en el TCE (75) y pese a que inicialmente la NSE, por ser más específica sobre el tejido neuronal que sobre las células gliales, se definió como un biomarcador de gravedad en el TCE muy prometedor, hasta la fecha los resultados publicados sobre NSE son contradictorios, dado que algunos trabajos no han encontrado correlación con el pronóstico clínico de los pacientes con TCE grave (76).

Niveles séricos de NSE inferiores a 10 ng/mL se consideran dentro del rango de normalidad (77). Varios estudios han establecido un punto de corte de 20 ng/mL, de manera que niveles de NSE superiores se correlacionan con una tórpida evolución de los pacientes tras el TCE. Pero esta estrategia sólo se ha sugerido como herramienta de cribado debido a su baja sensibilidad (67%) y especificidad (69%) (78). La combinación de NSE y S100B ha



Tesis Doctoral: Laura González García

demostrado ser un mejor indicador de lesión cerebral grave que cualquiera de dichos biomarcadores por separado (79).

1.4.2 Proteína S100B

La proteína S100B es una pequeña molécula de 10-12 kDa que pertenece a la familia de proteínas fijadoras de calcio denominadas S100, y cuyo nombre deriva de su solubilidad al 100% en una solución saturada de sulfato de amonio (80).

S100B se ubica en el núcleo y citoplasma de los astrocitos del SNC y las células de Schwann de los nervios periféricos (81), pero su síntesis y presencia no sólo queda relegada al SNC, sino que también puede encontrarse en la médula ósea, adipocitos, condrocitos y melanocitos (82). Al igual que la NSE, la proteína S100B presenta una eliminación renal, por lo que este dato es importante en aquellos pacientes que presenten insuficiencia renal (83).

En cuanto a su función biológica, aunque aún no está totalmente definida, se ha descrito que, a nivel intracelular, S100B está involucrada en la homeostasis del calcio (84), mientras que, a nivel extracelular, S100B participa en procesos de neuromodulación y promueve la neurogénesis y plasticidad neuronal (85–87). Sin embargo, se ha demostrado que el efecto y las funciones fisiológicas de esta proteína dependen de la concentración. Así pues, en condiciones fisiológicas ronda una concentración de nM y actúa como un factor neurotrópico, protegiendo a las neuronas de la apoptosis, estimulando el crecimiento de las neuritas, la astrocitosis y la proliferación axonal (85,88,89); mientras que a una concentración de μ M se correlaciona con efectos nocivos, actuando como agente neurotóxico e induciendo fenómenos de apoptosis (90).



Tesis Doctoral: Laura González García

Tras el TCE, diversos estudios han demostrado que la máxima concentración sérica de S100B se alcanza transcurridos 20 minutos desde la lesión cerebral, por tanto, es detectable prácticamente desde el ingreso del paciente en el hospital (62). Presenta una vida media corta, de 30 a 60 minutos, por lo que una elevación mantenida de los niveles de S100B en el tiempo hace pensar en una secreción constante por los tejidos dañados (62).

Un dato importante a tener en cuenta a la hora de evaluar las concentraciones séricas de S100B en pacientes que presentan daño cerebral consiste en la presencia de localizaciones extracraneales de S100B, por lo que su liberación también puede tener otro origen a parte del SNC, como son el músculo esquelético, la piel y el tejido adiposo (91–93).

En cuanto a su utilidad en el TCE, varios autores coinciden en señalar la elevada capacidad predictora de lesión intracraneal que caracteriza a la proteína S100B (94–96). Algunos de sus trabajos han demostrado que la determinación de S100B junto con las variables clínicas del paciente, puede predecir la evolución a muerte encefálica (97). Además, una concentración sérica elevada se correlacionaría con el grado de extensión del daño cerebral según los resultados de técnicas de neuroimagen, así como con una mayor probabilidad de muerte (98–100).

1.5 Biomarcadores de estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una condición fisiológica donde existe un desequilibrio entre las concentraciones de ROS y RNS respecto a los mecanismos antioxidantes. El incremento en la producción de ROS y RNS favorece los fenómenos de LPO, la oxidación de proteínas y de ácidos nucleicos (101). Todos estos procesos en conjunto juegan un papel clave en el proceso neurodegenerativo apoptótico y la consiguiente evolución a necrosis. El daño



Tesis Doctoral: Laura González García

celular causado por el estrés oxidativo se ha implicado en el desarrollo de numerosos estados patológicos, como el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares, la aterosclerosis y las enfermedades neurodegenerativas entre otras; por lo que han sido numerosos los estudios que se han centrado en el estudio de biomarcadores de estrés oxidativo que puedan ayudar al manejo clínico y evaluación pronóstica de los pacientes que sufren este tipo de patologías (102–107).

1.5.1 Capacidad antioxidante total

Tras un TCE se produce un aumento considerable en la producción de ROS, de manera que el estrés oxidativo juega un papel decisivo (108,109). Si bien los productos del estrés oxidativo inducido por ROS se usan ampliamente para controlar sus efectos biológicos, también es importante evaluar la capacidad antioxidante de los fluidos biológicos y las células.

Para evitar que se desborde la cascada de estrés oxidativo, las células requieren generar y mantener defensas antioxidantes de manera óptima e incrementarlas acorde al tamaño de la agresión (110). Este sistema amortiguador antioxidante puede ser evaluado indirectamente como una capacidad antioxidante total (CAT). Por lo tanto, la medición de CAT en suero o plasma puede proporcionar información más relevante desde el punto de vista biológico sobre el estado antioxidante del paciente que la obtenida al medir las concentraciones de compuestos antioxidantes de forma individual (111).

Las técnicas desarrolladas para la cuantificación de CAT en muestras biológicas se basan en evaluar la habilidad de los compuestos antioxidantes (donantes de un hidrógeno o un electrón) presentes en el fluido a estudio, para reducir las especies oxidantes introducidas en el sistema de ensayo. De forma general, estas técnicas son clasificadas como métodos



Tesis Doctoral: Laura González García

de inhibición directos o indirectos del poder oxidante de una molécula estándar determinada que es el iniciador, y se conocen como métodos SET (del inglés, “*single electron transfer*”) (110).

Hasta la fecha, la cuantificación de CAT en pacientes que han sufrido un TCE grave ha sido poco evaluada, pero ciertos estudios como el de Kavakli *et al.* y Lorente *et al.*, han constatado unos niveles más elevados de CAT en los pacientes que fallecen como consecuencia del trauma respecto a aquellos que sobreviven (112), sugiriendo su determinación como un biomarcador predictor de mortalidad (111).

1.5.2 Malondialdehído

El principal producto de la LPO son los hidroperóxidos, pero debido a su corta vida media, el estudio de la LPO en el TCE se ha basado en gran medida en la detección de otros productos finales más estables, como son los isoprostanos, el MDA y el hidroxinonal (38).

La medición de los productos finales de la LPO es uno de los ensayos más ampliamente aceptados para evaluar el daño oxidativo, por lo que estos productos secundarios aldehídicos de la LPO son marcadores generalmente aceptados de estrés oxidativo. Sin embargo, su cuantificación no está exenta de inconvenientes, pues debido a su falta de especificidad deben usarse con precaución (40).

Para determinar el grado de oxidación lipídica de un tejido se puede cuantificar el contenido en sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (113). Entre estas sustancias se encuentra el MDA que forma un aducto 1:2 con el ácido tiobarbitúrico (figura 2) que posteriormente se puede medir colorimétricamente o fluorimétricamente. Los niveles de TBARS se determinan a partir de un estándar de equivalencia de MDA.



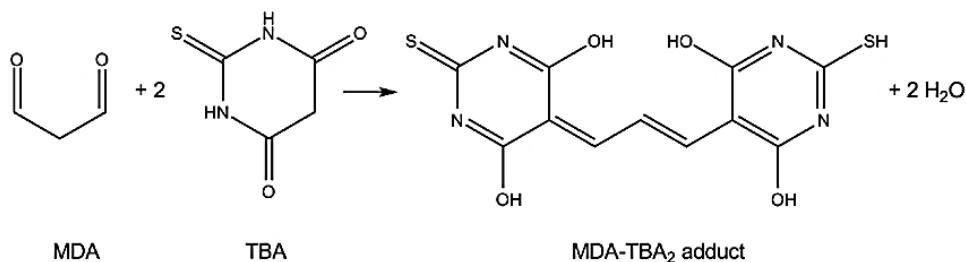


Figura 2. Reacción entre MDA y dos moléculas de TBA para formar el aducto MDA-TBA₂ (Tomado de Weitneret *al.*) (114).

Aunque la especificidad del ensayo TBARS hacia compuestos distintos de MDA ha sido controvertida, el ensayo continúa siendo el formato más empleado para evaluar el estado de LPO (38).

Tras un TCE grave y como consecuencia de una sobreproducción de ROS, se produce un estado hiperoxidativo. Algunos de los productos de la LPO, como el MDA, pasan fácilmente del tejido cerebral al LCR y a sangre periférica (115,116). Por tanto, los procesos de LPO que tienen lugar en el cerebro se reflejarán en concentraciones elevadas de TBARS en LCR y en sangre periférica. Diversos estudios han encontrado niveles más elevados de MDA en pacientes que han sufrido un TCE respecto a controles, y dentro de los pacientes con TCE, niveles superiores en aquellos que no sobreviven al mismo (108,117,118). Otros estudios han demostrado una correlación entre los niveles de MDA y la gravedad del traumatismo, valorada en términos de la puntuación alcanzada en la escala APACHE (*Acute Physiology And Chronic Health Evaluation*), GCS y mortalidad (119). Sin embargo, estos resultados deben ser tratados con cautela, pues diversos estudios han constatado que no existe asociación entre los niveles elevados de MDA y una mayor mortalidad en pacientes con TCE (120,121).



1.6 Biomarcadores de neuroinflamación

Uno de los principales fenómenos que integran la cascada bioquímica desencadenada como consecuencia de un TCE grave es la reacción neuroinflamatoria iniciada y regulada por un conjunto de citoquinas, quimiocinas y moléculas asociadas a daño celular (DAMPs, del inglés “*Damage-Associated Molecular Patterns*”) liberadas por la microglía.

Tras el TCE, las células de la microglía en reposo se activan expresando el fenotipo M1 o M2. La microglía M1 libera múltiples citoquinas proinflamatorias, lo que provoca daño celular y exacerbación de la lesión cerebral. Sin embargo, la microglía M2 secreta citoquinas antiinflamatorias y factores de crecimiento que contribuyen a la reparación de los tejidos (figura 3).

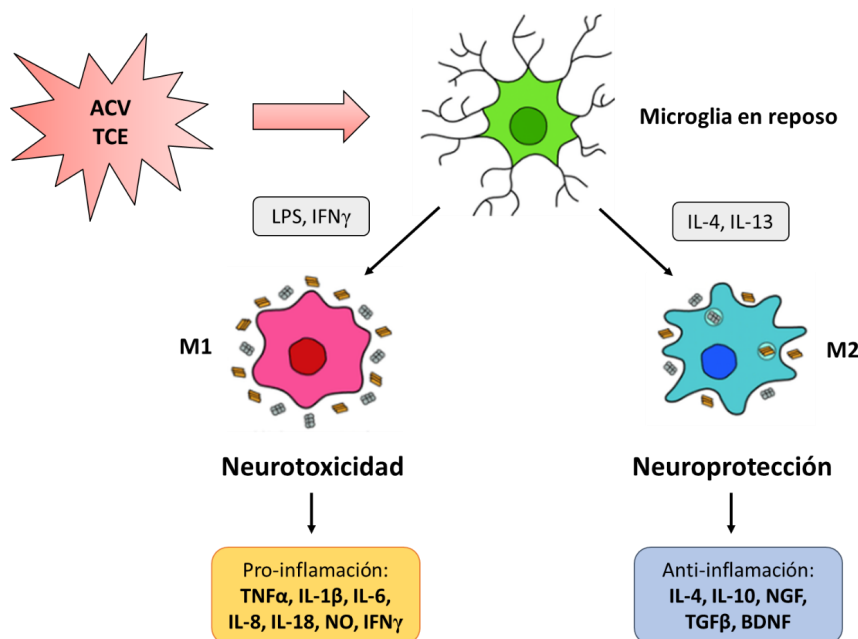


Figura 3. Activación microglial tras un accidente cerebrovascular o lesión cerebral traumática. ACV: Accidente Cerebrovascular, TCE: Traumatismo Craneoencefálico (Adaptado de Shi *et al.*) (122).



Tesis Doctoral: Laura González García

Las citoquinas son proteínas de vida media corta, producidas por los linfocitos y células gliales. Se liberan rápidamente en respuesta al TCE, y su perfil de expresión varía en función del tejido o fluido analizado, así como del perfil temporal (123). Tanto estudios de investigación en modelos animales, como epidemiológicos en pacientes con TCE grave, han demostrado una alteración en los perfiles de producción de citoquinas tales como IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10, entre otras (124–127).

1.6.1 Interleuquina -1

La IL-1, una citoquina con propiedades proinflamatorias, es uno de los biomarcadores más estudiados en el TCE. Su liberación está mediada por TNF- α y se ha visto que juega un papel determinante en la patogénesis de gran cantidad de enfermedades neurológicas debido a sus efectos neurotóxicos. Se conocen tres formas: IL-1 α , IL-1 β e IL-1RA.

Tras un TCE, IL-1 es rápidamente liberada por la activación de la microglía y astrocitos, estimulando así la producción de proteínas de fase aguda (128) y desencadenando un estado proinflamatorio y de riesgo de muerte neuronal (129).

Son muchos los trabajos que han demostrado que un incremento en los niveles de IL-1 se asocian con un peor pronóstico en el TCE (130,131). Además, diversos estudios han establecido que IL-1 es un marcador precoz de gravedad debido a que sus propiedades proinflamatorias se acentúan en la fase aguda de la respuesta jugando un papel crucial en el comienzo y refuerzo de dicha respuesta inflamatoria (132). Concretamente, los niveles de IL-1 β son detectables desde la primera hora en el lugar de la lesión (133,134).

IL-1 β es producida como una pre-proteína por macrófagos activados. Su forma activa surge por proteólisis por acción de la caspasa 1. La microglía es la principal fuente de producción



Tesis Doctoral: Laura González García

de IL-1 β y entre sus funciones destaca por ser un mediador importante de la respuesta inflamatoria y por estimular la proliferación, diferenciación y apoptosis celular (135). Tras una lesión cerebral, se ha visto que la liberación de IL-1 β por las neuronas desempeña un papel importante en la respuesta inflamatoria, así como en la activación y reclutamiento de células inmunitarias (136).

1.6.2 Interleuquina -8

La IL-8 es una citoquina de naturaleza proinflamatoria que se incluye dentro de la familia de las quimiocinas. Actúa como factor quimiotáctico para los leucocitos, fundamentalmente neutrófilos, y es considerada junto con la IL-6, como una de las principales citoquinas implicadas en la fisiopatología del TCE grave (137). Un incremento en los niveles de IL-8 en pacientes con TCE grave se ha asociado con un mal pronóstico (124,137), así como con la puntuación en la escala de gravedad de GCS, APACHE y edad del paciente (138). Sin embargo, estos resultados deben ser tomados con cautela, pues otros autores no han encontrado relación alguna entre los niveles de IL-8 y el pronóstico tras el TCE (139,140). El motivo de estos resultados contradictorios puede estar relacionado con la presencia de lesiones múltiples tras el TCE. Seekamp *et al.* encontraron niveles disminuidos de IL-8 en pacientes con TCE aislado y niveles elevados en pacientes con lesiones traumáticas múltiples, lo que sugiere que el aumento sérico de IL-8 en pacientes con TCE no está únicamente relegado al parénquima cerebral (141).

1.6.3 Interleuquina -10

La IL-10, es una de las principales citoquinas antiinflamatorias. Su mecanismo de acción se basa en su capacidad para inhibir la producción de ciertas citoquinas proinflamatorias en



Tesis Doctoral: Laura González García

macrófagos y monocitos (IL-1, TNF- α e IL-6, entre otras) además de reducir su síntesis como consecuencia de la supresión de la expresión de receptores de citoquinas proinflamatorias en el SNC (142).

Tras un TCE grave se produce un aumento de los niveles de IL-10 con el objetivo de reducir y contrarrestar las consecuencias de la reacción inflamatoria aguda. Son varios los estudios que han demostrado una relación entre los niveles de IL-10 y el nivel de gravedad del TCE, así como la mortalidad a corto y largo plazo (143,144).

**1.7 Vulnerabilidad genética del traumatismo craneoencefálico:
Apolipoproteína E**

Tras una lesión cerebral traumática, los factores genéticos pueden determinar la gravedad de las lesiones, la capacidad de recuperación y la evolución. Hoy en día, son varios los genes que se postulan en relación con el TCE. El más estudiado de ellos es el gen de la Apolipoproteína E o gen APOE, más conocido por su papel en la aparición y curso de la Enfermedad de Alzheimer (EA) (145,146).

La Apolipoproteína E (ApoE) es una glicoproteína polimórfica perteneciente a la familia de las apolipoproteínas, que se localiza principalmente en el hígado, aunque también se expresa ampliamente en el SNC, concretamente en astrocitos y microglía (147).

ApoE es el componente mayoritario de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs, del inglés "*Very low density lipoproteins*"), las cuáles juegan un papel esencial en el mantenimiento de los niveles de colesterol en sangre. Pero, además, interviene en el



Tesis Doctoral: Laura González García

mantenimiento de la integridad estructural y funcional de las neuronas tras una lesión cerebral (148,149).

La proteína tiene tres isoformas, E2, E3 y E4, codificadas por los alelos $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$ en el brazo largo del cromosoma 19 y tienen una prevalencia respectiva del 7%, 78% y 15% en la población, aunque estas tasas pueden variar significativamente según la etnia (150).

El mecanismo a través del cual ApoE influye en la recuperación después de un TCE no se comprende completamente; sin embargo, se ha postulado que ApoE está involucrada en diferentes mecanismos como son el mantenimiento y la reparación de la membrana celular, la formación de sinapsis, el mantenimiento del citoesqueleto neuronal y la transmisión sináptica, la homeostasis intracelular del calcio y la mediación del estrés oxidativo (151).

En 1995, el grupo de Mayeux *et al.* sugirió una posible relación entre el genotipo de APOE, la EA y el daño cerebral producido tras un TCE. Establecieron que dicha asociación podría contribuir a la patogénesis de la enfermedad y, por tanto, a un aumento del riesgo de padecerla, pero sólo en aquellos pacientes que presentaban el alelo $\epsilon 4$ de APOE (152). A partir de ese momento, fueron numerosos estudios los que ratificaron que la isoforma $\epsilon 4$ se relacionaba con un mayor riesgo de padecer enfermedades caracterizadas por una situación de estrés oxidativo y proinflamación, como es el caso de la EA (153). En relación con el TCE, se ha puesto de manifiesto que la presencia del alelo $\epsilon 4$ se asocia con un peor pronóstico, una menor respuesta al tratamiento con terapias antioxidantes y una mayor mortalidad (154).



1.8 Estrategias antioxidantes y antiinflamatorias en el traumatismo craneoencefálico: La melatonina

Como ya hemos visto, el estrés oxidativo y la neuroinflamación son dos de los múltiples mecanismos patogénicos desencadenados en el TCE. Son varios los estudios que han establecido una estrecha relación entre el estrés oxidativo, la neuroinflamación y la patogénesis del TCE. Sin embargo, los resultados obtenidos en relación a la administración de agentes antioxidantes y antiinflamatorios como estrategia terapéutica siguen siendo contradictorios (155). Entre las diferentes terapias estudiadas se encuentra la melatonina (MLT), una hormona secretada por la glándula pineal que destaca por su capacidad neutralizadora de radicales libres y su actividad reguladora sobre la producción de citoquinas inflamatorias.

La MLT tiene una actividad pleiotrópica debido a la gran versatilidad funcional que posee, entre sus principales mecanismos destacan: su capacidad antioxidante al actuar como un neutralizador directo de radicales libres, estimular la actividad de enzimas antioxidantes (156–158), mejora la función mitocondrial al aumentar el transporte de electrones y la función de los complejos I y IV; y disminuir el daño oxidativo mitocondrial directo (159,160), modula los efectos de los neurotransmisores excitatorios actuando sobre la excitotoxicidad (161), ejerce un papel inmunomodulador mediante la regulación de citoquinas (162,163), e inhibe la apoptosis como consecuencia de todos estos mecanismos (164,165). Además, sus propiedades lipófilas le permiten atravesar fácilmente la BHE y alcanzar compartimentos intracelulares donde actúa como un agente neuroprotector, efecto que ha sido demostrado en varios modelos animales de daño neurológico (166–168).



Tesis Doctoral: Laura González García

Una reciente revisión del grupo de Barlow *et al.* sobre la utilidad de la MLT en el TCE, reveló que esta molécula ejerce un efecto favorable sobre el estado neurológico y cognitivo, y además disminuye el tamaño de la lesión traumática, el edema cerebral y los fenómenos de estrés oxidativo (169). Estos hallazgos demuestran que la MLT es una buena estrategia terapéutica para mejorar el resultado funcional y patológico de aquellos pacientes que han sufrido un TCE.

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



Tesis Doctoral: Laura González García

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



2.1 HIPÓTESIS

El TCE desencadena una serie de cascadas bioquímicas como consecuencia de la pérdida de homeostasis cerebral, las cuales ocasionan estrés oxidativo e inflamación, favoreciendo la lesión cerebral. La determinación de marcadores de lesión cerebral, estrés oxidativo e inflamación en sangre periférica constituye una herramienta con capacidad pronóstica a corto/medio plazo en los pacientes que sufren un TCE grave o potencialmente grave. A su vez, la producción *in vitro* de marcadores de estrés oxidativo e inflamación por parte de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de dichos pacientes puede regularse mediante la administración de MLT.

2.2 OBJETIVOS

Principal:

1. Evaluar la utilidad de la determinación de diferentes marcadores clínicos y bioquímicos en la valoración del pronóstico en pacientes que sufren un TCE grave o potencialmente grave, así como valorar su modulación mediante una intervención *in vitro* sobre PBMCs tras la aplicación de MLT.

Secundarios:

1. Analizar la capacidad pronóstica de las proteínas de daño cerebral S100B y NSE en suero de pacientes con TCE grave o potencialmente grave.
2. Valorar el nivel de estrés oxidativo en pacientes con TCE grave o potencialmente grave mediante la cuantificación de CAT, MDA y ApoE y su posible relación con el pronóstico del paciente.
3. Evaluar los niveles de citoquinas pro- y anti-inflamatorias (IL-1 β , IL-8 e IL-10) en pacientes con TCE grave y su papel como biomarcadores de gravedad.



III. METODOLOGÍA

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



3.1 Tipo de estudio

3.1.1 Estudio observacional

Se llevó a cabo un primer estudio observacional, con seguimiento longitudinal y de carácter prospectivo, desarrollado en la Unidad de Neurocríticos del Hospital de Rehabilitación y Traumatología (HRT) del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, entre junio de 2010 y noviembre de 2014. En este estudio se evaluó la utilidad de diferentes marcadores pronósticos de mortalidad en pacientes con TCE grave o potencialmente grave.

3.1.2 Ensayo *in vitro*

Posteriormente, se realizó un segundo estudio observacional analítico, con seguimiento longitudinal y de carácter prospectivo, desarrollado en la Unidad de Neurocríticos del Hospital de Rehabilitación y Traumatología del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, entre abril de 2017 y abril de 2019. En este estudio se evaluó el papel de la MLT como fármaco modulador de la respuesta oxidativa e inflamatoria tras su administración *in vitro* sobre PBMCs de pacientes con TCE grave o potencialmente grave.

3.2 Unidad de estudio y localización

Los presentes estudios han sido realizados en el Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla, complejo hospitalario gestionado por el Servicio Andaluz de Salud y constituido por 4 centros hospitalarios (Hospital General, Hospital de Rehabilitación y Traumatología, Hospital Materno-Infantil y Hospital Duques del Infantado).



Tesis Doctoral: Laura González García

El HRT es uno de los principales centros de referencia para la patología neurotraumatológica existentes en España. En él está ubicada la Unidad de Cuidados Intensivos Neuroquirúrgicos, formada por 22 camas y dividida en dos subunidades clínicas: en una de ellas se atienden a pacientes con TCE grave y grandes quemados; y en la otra, a pacientes politraumatizados, traumatismos raquímedulares, patología neuroquirúrgica y neurovascular.

Además, el Hospital Universitario Virgen del Rocío también integra el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), centro de investigación biomédica que permite a los profesionales clínicos dirigir y participar en proyectos competitivos de investigación. En dicho centro se encuentra el Laboratorio de Neurocríticos, el cual se haya adscrito a la Unidad de Cuidados Intensivos Neuroquirúrgicos y lleva a cabo diversos proyectos de investigación como los desarrollados en este trabajo.

3.3 Diseño del estudio y recogida de datos

3.3.1 Criterios de inclusión

Pacientes que sufrieron un TCE grave o potencialmente grave y que cumplieron los siguientes criterios:

1. Pacientes mayores de 18 años.
2. Puntuación en la GCS igual o inferior a 8 en el momento del ingreso y tras resucitación hemodinámica, y/o que presentando un GCS superior a 8 en el momento del ingreso, el paciente sufra un empeoramiento en su evolución y requiera ingreso en UCI como consecuencia del TCE.
3. Extracción de la primera muestra de suero dentro de las primeras 6 horas post-traumatismo.



Tesis Doctoral: Laura González García

4. Obtención de muestras sanguíneas no hemolizadas para la realización del presente estudio.
5. Presencia de estabilidad hemodinámica, con una presión arterial media > 75 mm Hg, con o sin apoyo de drogas vasoactivas.
6. Que el representante legal autorizara y firmara el consentimiento informado para la inclusión del paciente en el estudio.

3.3.2 Criterios de exclusión

Basados en los siguientes puntos:

1. Pacientes embarazadas.
2. Pacientes con historia médica de abusos de alcohol u otras drogas.
3. Parada cardiorrespiratoria tras el TCE.
4. Insuficiencia renal crónica o aguda tras el TCE.
5. Politraumatizado múltiple con una puntuación en la escala AIS > 2 en dos órganos diferentes del cerebro.
6. Presencia de antecedentes en la historia médica del paciente de algún tipo de lesión histológica compatible con melanoma.
7. Presencia de antecedentes en la historia médica del paciente de otras patologías previas a nivel del SNC que pudieran interferir en la evaluación del resultado final.



3.4 Variables de estudio

La información recopilada para los estudios fue la siguiente:

3.4.1 Variables demográficas

- Edad expresada en años
- Sexo

3.4.2 Variables clínicas

- **Nivel de consciencia:** evaluada mediante la escala GCS [Tabla 2].
- **Examen pupilar:** al ingreso, evaluando el tamaño, simetría y reactividad a la luz de ambas pupilas. Las alteraciones fotomotoras fueron catalogadas como: respuesta conservada (isocoria) y respuesta no conservada (anisocoria y midriasis bilateral arreactiva).
- **Existencia de hipotensión prehospitalaria:** definida como una presión arterial sistólica < 90 mm Hg.
- **Existencia de hipoxia prehospitalaria:** definida como una saturación periférica de oxígeno (SaO₂%) < 90%.
- **Presencia de sepsis de origen infeccioso y de inicio precoz** (durante los primeros cuatro días de ingreso).
- **Presencia de SIRS** (del inglés, “*Systemic Inflammatory Response Syndrome*”).
- **Resultados de la TAC:** clasificados según la escala TCDB [Tabla 1].
- **Presencia de lesiones extracraneales:** la gravedad de las lesiones extracraneales fue estimada en función de la ISS.
- **Supervivencia de los pacientes a la salida de UCI y a los 6 meses post-traumatismo.**



3.4.3 Manejo clínico y tratamiento de los pacientes

Todos los pacientes fueron tratados siguiendo las guías de práctica clínica de la *Brain Trauma Foundation*, así como mediante los protocolos de manejo de la propia Unidad de Neurotrauma (170,171).

3.4.4 Recogida y procesamiento de muestras

- Estudio observacional

Para el primer estudio, se extrajeron dos tubos BD VACUTAINER® para suero con gel separador (Becton Dickinson®) de 4 mL para la extracción de suero, tan pronto como fue posible en el momento del ingreso, aceptando un periodo ventana de 6 horas desde el momento del traumatismo. También se recogieron muestras a las 24 y 48 horas tras esa primera extracción.

Una vez extraídas las muestras, éstas eran enviadas al laboratorio para proceder a su centrifugación a 3.500 rpm durante 10 minutos. Posteriormente, el suero fue alicuotado en criotubos debidamente identificados y congelados en ultracongeladores de -80°C hasta el momento de su análisis.

- Ensayo *in vitro*

Para el segundo estudio, se realizaron dos extracciones sanguíneas por cada paciente: una en las primeras 48 horas de evolución, y una segunda extracción en las siguientes 48 horas (hasta las 96 horas del traumatismo). En cada extracción se tomaron un tubo BD VACUTAINER® con EDTA K2 para determinación de genotipo de APOE y dos tubos VACUTAINER® CPT™ de 8 mL para el aislamiento de PBMCs.



Tesis Doctoral: Laura González García

Una vez extraídas las muestras, éstas eran recogidas y llevadas en mano al laboratorio. Respecto al protocolo de aislamiento de PBMCs, se procedió de la siguiente forma: los tubos VACUTAINER® CPT™ contienen un anticoagulante (heparina de sodio) y un medio de separación de células consistente en un gel y un líquido de gradiente de densidad (ficoll). El CPT permite en un solo paso la separación de PBMCs centrifugándolos durante 20 minutos a 3.000 rpm. Durante la centrifugación, las PBMCs, por su menor densidad, se trasladan desde el plasma y se suspenden en el líquido gradiente de densidad por encima del gel, el cual forma una barrera estable e impermeable a los eritrocitos y los neutrófilos, los cuales se depositan en el fondo del tubo. Se recuperaron las PBMCs de la interfase por aspiración y se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS, del inglés “*Phosphate-Buffered Saline*”). Tras eliminar el sobrenadante, se resuspendieron las células en 3 mL de PBS y se procedió al recuento de células en cámara de Neubauer.

Para la preparación de los cultivos celulares, se trabajó a una concentración de un millón de células/mL a partir de las células extraídas de los CPT. Las células se incubaron con medio RPMI completo (RPMI 1640, L-glutamina, penicilina, estreptomycin y HEPES; Lonza Bioscience®), y suero fetal bobino al 10% en placas de 6, 24 o 48 pocillos según volumen de cultivo (Biolite Multidish Thermo Fisher Scientific®). Para la estimulación de los cultivos se aplicó fitohemaglutinina (PHA) como agente mitogénico, a una concentración de 8 µg/mL, en presencia o ausencia de MLT a una concentración de 10⁻³ M. Se empleó dimetilsulfóxido como agente vehículo (estos tres últimos reactivos fueron de Sigma-Aldrich®, Dorset; UK). Los cultivos se llevaron a cabo en atmósfera húmeda, con CO₂ al 5% y 37°C. Para la medición de la producción de marcadores de estrés oxidativo los cultivos se incubaron durante 24 horas, mientras que para la determinación de citoquinas se incubaron 48 horas.



Tesis Doctoral: Laura González García

Transcurrido ese tiempo, se recogió el contenido de cada pocillo en tubos Eppendorf®, los cuales se centrifugaron a 1.500 rpm 5 minutos. A continuación, se pasaron los sobrenadantes a nuevos tubos Eppendorf® y se congelaron a -80°C hasta su posterior manipulación.

3.4.5 Variables analíticas**- Proteína S100B**

Cuantificación mediante técnica de electroquimioluminiscencia (ECLIA, Elecsys 2010 Inmunoassay Systems, Roche Diagnostics®) que permite la determinación cuantitativa *in vitro* de S100B en suero humano. Este test sigue una técnica tipo sándwich con una primera incubación con un anticuerpo monoclonal biotinilado anti-S100B y un anticuerpo monoclonal anti-S100B marcado con quelato de rutenio para formar el complejo sándwich; y una segunda incubación con micropartículas recubiertas de estreptavidina en la que el complejo formado se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina. La mezcla de reacción es trasladada a una célula de medida donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente. Al aplicar una corriente eléctrica controlada se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide con un fotomultiplicador. Los resultados se determinan mediante una curva de calibración generada específicamente para el instrumento a partir de una calibración a 2 puntos y una curva máster suministrada a través del código de barras del reactivo utilizado. La duración total de la técnica es de 18 minutos y requiere un volumen de muestra de 20 µL.



Tesis Doctoral: Laura González García

El intervalo de medición es de 0,005-39 µg/L y el límite de detección inferior es de <0,005 µg/L. Los valores inferiores al límite de detección se indicaron como <0,005 µg/L y los superiores habrían sido diluidos con calibrador Elecsys S100 Cal1 o bien con suero negativo para S100 hasta obtener un valor cuantitativo, pero en ningún caso fue necesario. Los estudios de repetitividad y precisión intermedia de la técnica muestran una desviación estándar <0,056 µg/L y un coeficiente de variación <2,8%.

- Enolasa neuroespecífica

Cuantificación mediante técnica de electroquimioluminiscencia (ECLIA, Elecsys 2010 Inmunoassay Systems, Roche Diagnostics®) que permite la determinación cuantitativa de NSE en suero humano. El principio de la técnica se basa en una metodología tipo sándwich la cual tiene una primera incubación con un anticuerpo monoclonal biotilado anti-NSE y un anticuerpo monoclonal anti-NSE marcado con quelato de rutenio para formar el complejo sándwich; y una segunda incubación con micropartículas recubiertas de estreptavidina en la que el complejo formado se fija a la fase sólida por interacción entre la biotina y la estreptavidina. La mezcla de reacción es trasladada a una célula de medida donde, por magnetismo, las micropartículas se fijan a la superficie del electrodo. Los elementos no fijados se eliminan posteriormente. Al aplicar una corriente eléctrica controlada se produce una reacción quimioluminiscente cuya emisión de luz se mide con un fotomultiplicador. Los resultados se determinan mediante una curva de calibración generada específicamente para el instrumento a partir de una calibración a 2 puntos y una curva máster suministrada a través del código de barras del reactivo utilizado. La duración total de la técnica es de 18 minutos y requiere un volumen de muestra de 20 µL.



Tesis Doctoral: Laura González García

El intervalo de medición es de 0,050-370 ng/mL y el límite de detección inferior es de <0,050 ng/mL. Los valores inferiores al límite de detección se indicaron como <0,050 ng/mL y los superiores habrían sido diluidos con Diluent NSE hasta obtener un valor cuantitativo, pero en ningún caso fue necesario. Los estudios de repetitividad y precisión intermedia de la técnica muestran una desviación estándar <3,87 µg/L y un coeficiente de variación <4,4%.

- Capacidad antioxidante total

Cuantificación mediante técnica de absorbancia: OxiSelect™ Total Antioxidant Capacity Assay kit (Cell Biolabs®, Inc). Los reactivos que incluye la técnica son: un tampón de reacción, un reactivo de iones de cobre y una solución de parada. El principio de la técnica se basa en una comparación de las muestras frente a unas concentraciones conocidas de ácido úrico. Se emplearon 20 µL de muestra y se añadieron 180 µL de tampón de reacción. Sobre esta mezcla se añadieron 50 µL de reactivo de iones de cobre y se dejó incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se paró la reacción con 50 µL de solución de parada y se cuantificó la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm. En presencia de antioxidantes, el cobre en forma oxidada (Cu²⁺) se reduce a Cu⁺ y éste último se une al cromógeno presente en la mezcla de reacción absorbiendo luz a 490 nm. A partir de una curva estándar se calculó la “concentración equivalente de mM de ácido úrico” (UAE). Para determinar la concentración “equivalente a los µM de reductores de cobre” (CRE), se multiplicó el valor de UAE por 2.189 µM Cu²⁺/mM ácido úrico, ya que 1 mM de ácido úrico equivale a 2.189 µM de reductores de cobre. Así, el valor de CRE es proporcional al poder antioxidante o CAT de la muestra. Debido a que se trata de una técnica manual, el tiempo empleado para su realización fue de aproximadamente tres horas. El rango establecido para la curva estándar es 0-1 mM. No fue necesario llevar a cabo diluciones sobre las muestras



Tesis Doctoral: Laura González García

de suero ni sobre los sobrenadantes de los cultivos celulares. Para el análisis de resultados en sobrenadantes de cultivos PBMCs se emplearon aquellos que no fueron estimulados con PHA.

- Malondihaldehído

Cuantificación mediante técnica de absorbancia: OxiSelect™ TBARS Assay Kit (MDA Quantitation) (Cell Biolabs®, Inc). Los reactivos que incluye la técnica son: ácido tiobarbitúrico (TBA), diluyente de ácido tiobarbitúrico, dodecilsulfato sódico como solución de lisis e hidróxido de sodio para ajustar el pH del reactivo de TBA. Se emplearon 100 µL de muestra y se añadieron 100 µL de solución de lisis, dejando incubar durante cinco minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 150 µL de reactivo TBA y se dejó incubar a 95°C durante 45-60 minutos. Posteriormente, los tubos se dejaron enfriar en hielo durante 5 minutos y se procedió a su centrifugación a 3.000 rpm durante 15 minutos. Para terminar, se transfirieron 200 µL de los sobrenadantes a una placa de 96 pocillos para realizar una lectura de absorbancia a 532 nm, longitud de onda a la que el complejo formado entre el MDA y el TBA absorbe luz. La concentración de MDA se calculó por extrapolación a partir de una curva estándar. Debido a que se trata de una técnica manual, el tiempo empleado para su realización fue de aproximadamente cuatro horas. El rango establecido para la curva estándar es 0-125 µM. No fue necesario llevar a cabo diluciones sobre las muestras de suero.

- Interleuquinas -1beta, -8 y -10

La determinación de la producción de interleuquinas se realizó mediante técnica ELISA tipo sándwich. Las tres determinaciones siguieron el mismo principio utilizando los reactivos de



Tesis Doctoral: Laura González García

la casa comercial Thermo Fisher Scientific®. Dichos reactivos incluyen: anticuerpo de captura, anticuerpo de detección biotinilado, streptavidina conjugada con peroxidasa y tetrametil bencidina como sustrato. Para finalizar la reacción se empleó ácido sulfúrico. La cuantificación de la concentración de interleuquinas en los sobrenadantes de cultivos de PBMCs se realizó por extrapolación a una curva estándar. Para el análisis de resultados en sobrenadantes de cultivos de PBMCs se emplearon aquellos que fueron estimulados con PHA y se normalizaron los valores de IL-1 β , IL-8 e IL-10 mediante transformación logarítmica. Las características específicas de la técnica ELISA para cada citoquina se resumen en la tabla 4.

Tabla 4. Características analíticas de las técnicas de ELISA empleadas para la cuantificación de citoquinas.

	IL-1 β	IL-8	IL-10
Sensibilidad (pg/mL)	2	2	2
Rango Curva estándar (pg/mL)	2-150	2-250	2-300
Dilución de sobrenadantes con PHA	1/40	1/1.600	1/10

- Apolipoproteína E

Cuantificación mediante técnica de ELISA tipo sándwich: *Human Apolipoprotein E Elisa development kit* (Mabtech®). Los reactivos suministrados en la técnica son: anticuerpo de captura, anticuerpo de detección biotinilado, estreptavidina conjugada con peroxidasa y tetrametil bencidina como sustrato. Para finalizar la reacción se empleó ácido sulfúrico. La concentración de ApoE se calculó por extrapolación a partir de una curva estándar, siguiendo el protocolo establecido por los fabricantes. La sensibilidad de la técnica es de 0,1



Tesis Doctoral: Laura González García

ng/mL y el rango establecido para la curva estándar es 0,1-10 ng/mL. Fue necesario realizar una dilución de 1/20.000 sobre las muestras de suero. Para el análisis de resultados en sobrenadantes de cultivos de PBMCs se emplearon aquellos que no fueron estimulados con PHA.

Análisis de expresión génica de APOE

Detección y genotipado de los alelos de APOE mediante la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (*Real-Time PCR*) usando el equipo LightCycler 480 (Roche Diagnostics®) y sondas específicas fluorescentes (TaqMan® de Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific®). La fluorescencia emitida por cada fluoróforo fue proporcional a la cantidad de producto específico de ADN amplificado. De esta forma se pudo discriminar entre los diferentes alelos de APOE (E2, E3 y E4) en sus formas homocigota y heterocigota.

3.5 Consideraciones éticas y legales

Los dos proyectos que constituyen el presente estudio fueron presentados al comité de ética del Hospital Universitario Virgen del Rocío para su aprobación previo al inicio de los mismos. Para ello se generó una hoja de consentimiento informado específica que fue entregada a los familiares de los pacientes para la toma de decisiones a efectos de inclusión en el estudio.

Se han seguido las recomendaciones para médicos en investigación bioquímica en las que participan seres humanos, según la Declaración de Helsinki (Adoptada en la 18 Asamblea Médica Mundial en 1964 en Helsinki, Finlandia, revisada en la 29 Asamblea Médica Mundial en 1975 en Tokio, Japón y en la 35 Asamblea Médica Mundial en septiembre de 1989).



3.5.1 Confidencialidad

Se ha mantenido la confidencialidad de los pacientes que formaron parte de este estudio. Para ello se adjudicó a cada paciente un código constituido por 3 dígitos que corresponden al número de orden de inclusión en el estudio.

3.5.2 Información al paciente/representante legal

Dado que muchos de los pacientes a incluir en el presente estudio presentaban un nivel de consciencia insuficiente para poder ser informados, bien los pacientes o el/los representante/s legal/es de los pacientes, fueron informados de forma oral y por escrito de un modo comprensible, sobre los objetivos del mismo y los resultados que se pretendían obtener, así como que la participación en este estudio no conllevaba ningún tipo de riesgo adicional.

Fue necesaria la autorización escrita expresa, por ser un estudio en el que se obtuvieron muestras biológicas extraordinarias para análisis, no incluidas entre las habituales de la práctica clínica diaria.

3.6 Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante el software estadístico: *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS®) (versión 20.0, Chicago, IL, USA).

En primer lugar, se realizó una exploración de los datos generando estadísticos de resumen y representaciones gráficas con el objetivo de identificar valores atípicos y caracterizar diferencias entre subpoblaciones y/o grupos de casos.



3.6.1 Análisis descriptivo

Las variables numéricas se expresaron como medias y desviaciones estándar (DE). En el caso de que las distribuciones fueran muy asimétricas, se expresaron con medianas y percentiles (P_{25} y P_{75}). Para las variables no numéricas se emplearon tablas de frecuencias y porcentajes. La descripción de la muestra se completó con distintas representaciones gráficas según el tipo de información (cuantitativa o cualitativa). Además, para los diferentes estadísticos se obtuvieron intervalos de confianza al 95%.

3.6.2 Análisis inferencial bivalente

Para evaluar la relación entre dos variables cualitativas, se realizaron tablas de contingencias y se aplicó el test de Chi-cuadrado, Chi-cuadrado con corrección de continuidad o test exacto de Fisher (para tablas 2x2 poco pobladas) según criterios de aplicación.

Para analizar la relación entre una variable cualitativa dicotómica y una variable cuantitativa se empleó la prueba de t de Student una vez validados los requisitos de aleatoriedad, independencia, normalidad e igualdad de varianza. En el caso de no cumplirse el requisito de normalidad, evaluado mediante la prueba de Shapiro-Wilk, se realizó la prueba U de Mann-Whitney.

En el caso de variables numéricas relacionadas, una vez comprobados los supuestos de aleatoriedad, independencia de las observaciones, homocedasticidad y normalidad de las distribuciones, se realizó el test de Wilcoxon en caso de evaluar dos variables, o el test de Friedman si las variables eran más de dos. Para la comparación de variables numéricas no relacionadas, se realizó la prueba ANOVA (análisis de la varianza) o en su defecto el test de



Tesis Doctoral: Laura González García

Kruskal-Wallis. En caso de encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes subgrupos se efectuaron pruebas de comparación “a posteriori” (prueba de Bonferroni o U de Mann-Whitney según criterios de aplicación) con el nivel de significación corregido.

Para comparar la información de tipo cuantitativo en dos subgrupos de estudio se utilizó la prueba de comparación de medias t de Student o, en caso de que no cumplieran los requisitos de aplicación de ésta, la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Para analizar la relación entre variables de tipo cualitativo, se elaboraron tablas de contingencia y se aplicó la prueba de Chi-cuadrado o, en su caso, el test exacto de Fisher (tablas 2x2 poco pobladas).

Todos los resultados obtenidos de estas pruebas de hipótesis se presentaron con intervalos de confianza al 95% para diferencias de medias o proporciones.

3.6.3 Análisis de supervivencia mediante regresión de Cox

La regresión de Cox o modelo de los riesgos proporcionales se utiliza para generar modelos de tiempos de supervivencia para detectar relaciones existentes entre el riesgo que se produce en un determinado individuo en el estudio y algunas variables independientes y/o explicativas sobre la función de riesgo, y por ello también sobre la función de supervivencia.

Tras un análisis univariante previo que identificó aquellas variables relacionadas con el tiempo hasta que se produce la muerte, se establecieron diferentes modelos de supervivencia multivariantes mediante regresión de Cox. De esta forma, se examinó la relación entre el tiempo hasta que se produce la muerte y cada variable explicatoria, controlado por el resto de las variables incluidas en el modelo.



Tesis Doctoral: Laura González García

En el análisis univariante previo al análisis multivariante se ha considerado un nivel de significación de 0,15. Para las variables seleccionadas por el mismo se calcularon los *hazard ratio* (HR) e intervalos de confianza al 95%.

3.6.4 Curvas ROC

La realización de curvas ROC (*“Receiver Operating Characteristic”*) permitió evaluar la capacidad discriminativa del test diagnóstico para clasificar a los individuos en uno de los dos grupos en base al valor de una determinada variable. Para ello se obtuvo como estadístico el área situada bajo la curva ROC (AUC, del inglés *“Area Under the Curve”*) y una tabla con los puntos de coordenadas de dicha curva (falsos positivos y sensibilidad).

En todos los contrastes de hipótesis se ha considerado un nivel de significación de 0,05.



Tesis Doctoral: Laura González García

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

IV. RESULTADOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



4.1 Estudio observacional

4.1.1. Datos demográficos

Se incluyeron un total de 74 pacientes, con una edad comprendida entre los 16 y 81 años, siendo el promedio de ésta de 44,57 y la desviación estándar de 18,56 años. El 81,1% de los pacientes fueron varones. En relación con el mecanismo lesional, predominaron los accidentes de tráfico, seguido por las caídas. Los datos demográficos de estos pacientes se encuentran recogidos en la tabla 5.

Tabla 5. Características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio observacional.

IC: Intervalo de Confianza. DE: Desviación Estándar.

Variables demográficas	n (%)	IC95%
Edad (años), media (DE)	44,57 (18,56)	40,54;48,74
Sexo		
Hombres	60 (81,1)	61,60;89,20
Mujeres	14 (18,9)	10,80;28,40
Mecanismo lesional		
Accidente de tráfico	30 (40,5)	29,70;51,40
Caída	20 (27,0)	17,60;37,80
Atropello	11 (14,9)	8,10;24,30
Agresión	5 (6,8)	1,40;12,20
Otros	8 (10,8)	4,10;17,60



4.1.2. Datos clínicos

En la tabla 6 se representan los datos clínicos de los pacientes incluidos en el estudio observacional.

En relación con las complicaciones prehospitalarias, se detectó la presencia de hipoxia e hipotensión en un 16,2% de los pacientes en ambos casos. La complicación por parada cardiorrespiratoria no fue relevante, con tan solo un caso.

Al ingreso, el nivel de GCS expresado como valor mediano fue de 7 (P₂₅;P₇₅ = 4;8) y el valor de ISS fue de 29 (P₂₅;P₇₅ = 25;38). También se evaluaron las alteraciones fotomotoras, observándose un 62,1% de pacientes con respuesta fotomotora conservada (pupilas isocóricas) y un 37,9% con respuesta fotomotora no conservada (31,1% con anisocoria y 6,8% con midriasis bilateral arreactiva).

En relación a las lesiones extracraneales, constatamos que un 35,1% de los pacientes sufrieron un TCE grave puro sin otras lesiones asociadas. Al analizar los hallazgos radiológicos, expresados mediante la escala TCDB, todos los pacientes presentaron hallazgos patológicos en la TAC, es decir, ningún paciente presentó una puntuación de uno en la TCDB. Se observó una clara predominancia de las lesiones tipo difusas (43,2%, TCDB II) y de las lesiones tipo masa evacuada (35,1%). En 29 pacientes (39,2%) fue preciso llevar a cabo procedimientos neuroquirúrgicos para la evacuación de hematomas intracraneales.

Se detectó la presencia de HTEC en 17 pacientes, correspondiendo al 23% de la muestra. La presencia de SIRS se encontró en un 35,1% de los pacientes y la aparición de sepsis precoz en un 24,3%.



Tesis Doctoral: Laura González García

Para el seguimiento de los pacientes se valoró la supervivencia en dos puntos temporales: a la salida de UCI (85,1%) y a los 6 meses desde el TCE (79,7%). Hay que destacar que de aquellos pacientes que fallecieron a la salida de UCI, un 4,1% fue como consecuencia de evolución a muerte encefálica (ME).

Tabla 6. Datos clínicos de los pacientes reclutados. *En el momento del ingreso. **Pre-hospitalaria. IC: Intervalo de Confianza. TCDB: *Traumatic Coma Data Bank*. GCS: *Glasgow Coma Scale*. ISS: *Injury Severity Score*. TCE: Traumatismo Craneoencefálico. HTEC: Hipertensión Endocraneal. SIRS: *Systemic Inflammatory Response Syndrome*.

Variables clínicas	n (%)	IC95%
Escalas de gravedad		
TCDB		
I	0 (0)	0;0
II	32 (43,2)	31,9;54,2
III	5 (6,8)	1,4;13,9
IV	1 (1,4)	0,0;4,2
Lesión evacuada quirúrgicamente	26 (35,1)	25,0;47,2
Lesión no evacuada	8 (10,8)	4,2;18,1
GCS*, mediana (P₂₅; P₇₅)	7 (4;8)	5,0;8,0
ISS*, mediana (P₂₅; P₇₅)	29 (25;38)	27,0;35,0
Supervivencia a la salida de UCI	63 (85,1)	77,0;93,2
Supervivencia a los 6 meses	59 (79,7)	70,3;89,2



Valoración clínica		
Hipoxia**	12 (16,2)	8,1;24,3
Hipotensión**	12 (16,2)	8,1;25,7
Respuesta fotomotora*		
Conservada	46 (62,1)	51,4;73,0
No conservada	28 (37,9)	21,6;41,9
TCE puro	26 (35,1)	24,3;45,9
HTEC	17 (23,0)	13,5;32,4
Muerte encefálica	3 (4,1)	0;9,5
Infección		
SIRS	26 (35,1)	23,0;45,9
Sepsis	18 (24,3)	14,9;35,1
Intervenciones neuroquirúrgicas	29 (39,2)	28,4;50,0

4.1.3. Datos analíticos

En la tabla 7 se representan los datos analíticos de los biomarcadores analizados en los pacientes incluidos en el estudio.



Tesis Doctoral: Laura González García

Tabla 7. Datos analíticos de los pacientes reclutados en el estudio. IC: Intervalo de Confianza.
NSE: Enolasa Neuroespecífica. CAT: Capacidad Antioxidante Total. MDA: Malondialdehido.

Variables analíticas	Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)	IC95%
S100B (µg/L)		
Al ingreso	0,304 (0,195;0,603)	0,258;0,370
A las 24 horas	0,229 (0,127;0,375)	0,181;0,301
A las 48 horas	0,142 (0,079;0,244)	0,116;0,175
NSE (ng/mL)		
Al ingreso	13,30 (7,24;22,42)	8,42;17,26
A las 24 horas	9,71 (4,72;17,96)	7,25;13,15
A las 48 horas	6,88 (3,63;11,74)	4,97;9,30
CAT (mM CRE)		
Al ingreso	0,772 (0,643;0,968)	0,723;0,859
A las 24 horas	0,777 (0,588;1,012)	0,698;0,864
A las 48 horas	0,880 (0,578;1,169)	0,754;1,022
MDA (µM)		
Al ingreso	12,963 (6,895;21,004)	9,820;16,587
A las 24 horas	10,390 (7,347;16,822)	8,856;13,511
A las 48 horas	10,206 (6,289;16,787)	8,823;12,351
ApoE (µg/mL)		
Al ingreso	35,50 (24,22;54,30)	29,17;45,00
A las 24 horas	36,92 (24,23;51,57)	30,32;40,68
A las 48 horas	36,98 (24,72;45,38)	31,85;40,23



Tesis Doctoral: Laura González García

Cuando evaluamos el perfil temporal de los distintos biomarcadores, observamos una disminución de los niveles séricos de S100B desde el ingreso hasta las 48 horas. Lo mismo ocurrió cuando se valoraron los niveles séricos de NSE. En ambos casos, se alcanzaron diferencias significativas entre las muestras extraídas en el momento del ingreso y a las 24 horas ($p=0,004$, $p=0,035$; respectivamente), así como entre el momento del ingreso y a las 48 horas ($p<0,001$, para ambos biomarcadores). Sin embargo, aunque sí se observó una tendencia en la disminución de los niveles séricos de S100B y NSE entre las 24 y 48 horas, estos no alcanzaron significación estadística (figuras 4 y 5).

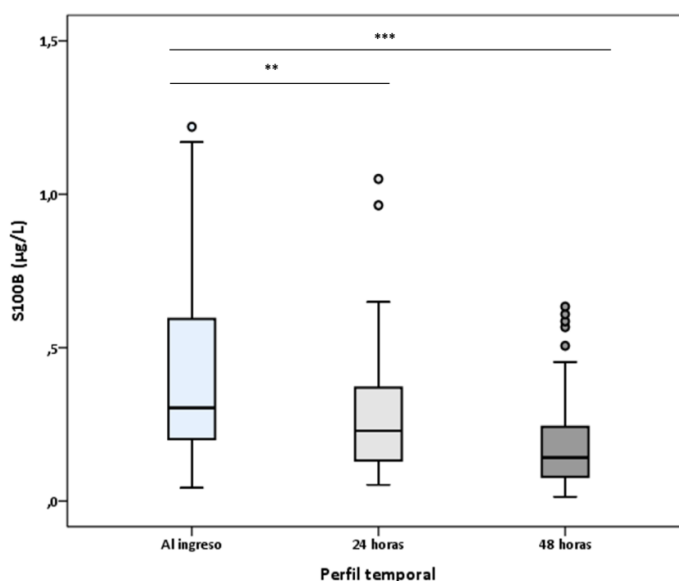


Figura 4. Diagrama de cajas y bigotes del perfil temporal de los niveles séricos de S100B.

* si $p<0,05$; **si $p<0,01$ y *** si $p<0,001$.



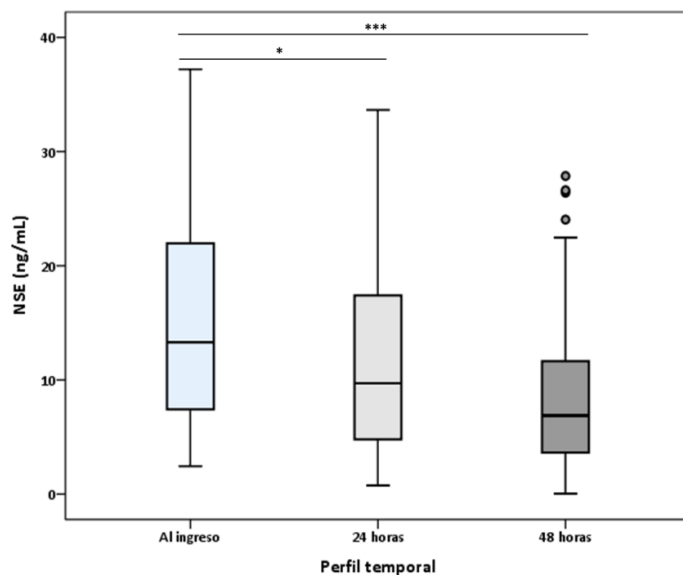


Figura 5. Diagrama de cajas y bigotes del perfil temporal de los niveles séricos de NSE.

* si $p < 0,05$ y *** si $p < 0,001$. NSE: Enolasa Neuroespecífica.

En el caso de la CAT, MDA, y ApoE, los niveles séricos tendieron a mantenerse constantes a lo largo del perfil temporal, por lo que no se objetivaron diferencias significativas (figuras 6, 7 y 8).



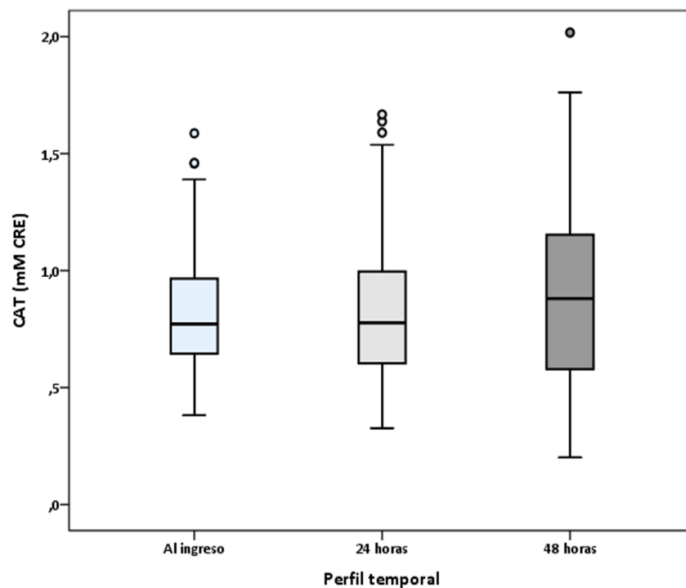


Figura 6. Diagrama de cajas y bigotes del perfil temporal de los niveles séricos de CAT.

CAT: Capacidad Antioxidante Total.

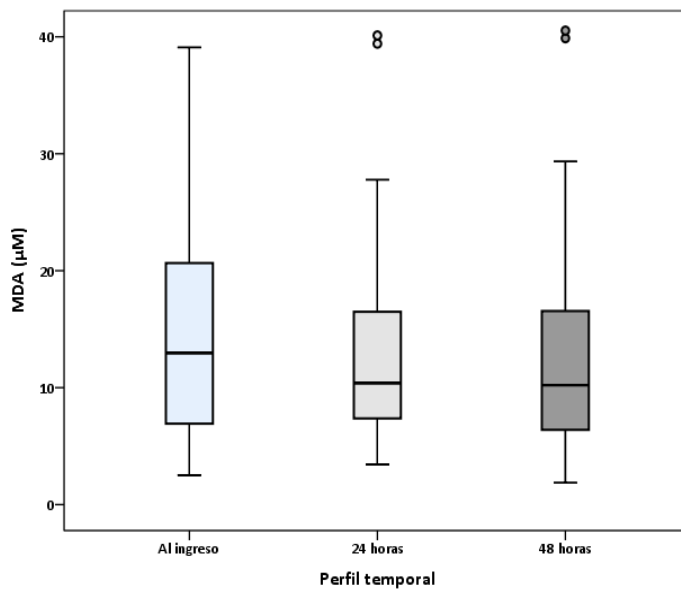


Figura 7. Diagrama de cajas y bigotes del perfil temporal de los niveles séricos de MDA.

MDA: Malondialdehído.



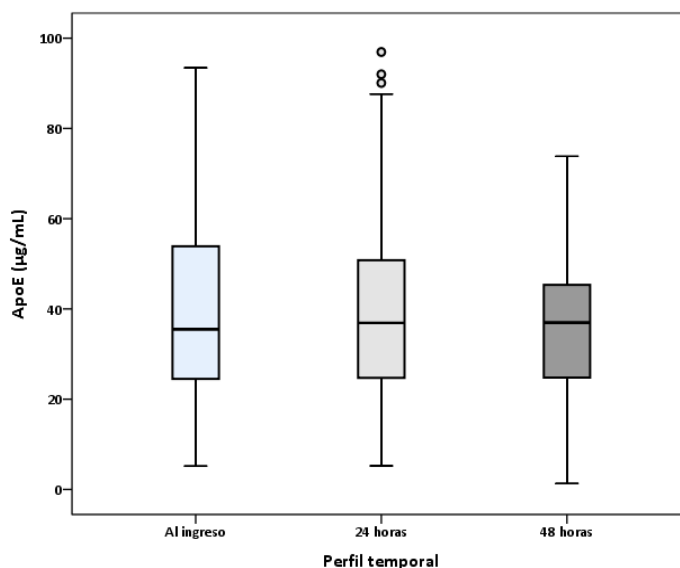


Figura 8. Diagrama de cajas y bigotes del perfil temporal de los niveles séricos de ApoE.

4.1.4. Relación entre las diferentes variables clínicas y analíticas y la supervivencia

Se analizaron las diferentes variables clínicas y analíticas de los pacientes en función de la supervivencia a la salida de UCI y a los 6 meses tras el TCE grave.

- Evaluación de la supervivencia a la salida de UCI

A la salida de UCI, y según la escala de gravedad TCDB, se objetivó que los pacientes que fallecieron tenían mayor presencia de lesiones intracraneales tipo masa (tanto evacuada como no evacuada) en la TAC del ingreso. Además, se observó una mayor prevalencia de pacientes con TCE puro, así como la necesidad de intervención neuroquirúrgica. También destacó una prevalencia superior de sepsis. Estos resultados se reflejan en la tabla 8.



Tesis Doctoral: Laura González García

Tabla 8. Características clínicas de los pacientes agrupados en función de la supervivencia a la salida de UCI. *En el momento del ingreso. **Pre-hospitalaria. IC: Intervalo de Confianza. DE: Desviación estándar. TCDB: *Traumatic Coma Data Bank*. GCS: *Glasgow Coma Scale*. ISS: *Injury Severity Score*. TCE: Traumatismo Craneoencefálico. HTEC: Hipertensión Endocraneal. SIRS: *Systemic Inflammatory Response Syndrome*. Los resultados significativos son resaltados en negrita.

	Sobrevive (n=63)		Exitus (n=11)		p
	n (%)	IC95%	n (%)	IC95%	
Edad media (DE)	42,84 (18,58)	38,32;47,46	54,45 (15,74)	45,00;63,00	0,369
Sexo					0,946
Hombre	51 (81,0)	69,80;90,50	9 (81,8)	54,50;100	
Mujer	12 (19,0)	9,50;30,20	2 (18,2)	0;45,50	
Escalas de gravedad					
TCDB					0,014
Lesión tipo difusa	36 (57,1)	46,70;70,00	2 (18,2)	0;45,50	
Lesión tipo masa	25 (42,9)	30,00;53,30	9 (81,8)	54,50;100	
GCS*, mediana (P₂₅;P₇₅)	7 (5;9)	6,00;8,00	6 (3;8)	3,00;8,00	0,080
ISS*, mediana (P₂₅;P₇₅)	29 (25;38)	27,00;35,00	34 (27;50)	26,00;58,50	0,344
Valoración clínica					
Hipoxia**	11 (17,5)	7,90;27,00	1 (9,1)	0;27,30	0,680
Hipotensión**	10 (15,9)	7,90;25,40	2 (18,2)	0;45,50	0,999
Respuesta fotomotora*					0,462
Conservada	41 (65,1)	54,00;77,80	5 (45,5)	18,20;72,70	
No conservada	26 (34,9)	17,50;39,70	6 (54,5)	18,20;74,30	
TCE puro	18 (28,6)	17,50;39,70	8 (72,7)	45,50;99,80	0,013
HTEC	15 (23,8)	14,30;34,90	2 (18,2)	0,00;45,50	0,999
Infección					
SIRS	20 (31,7)	20,60;42,90	6 (54,5)	27,30;81,80	0,178
Sepsis	12 (19,0)	9,50;28,60	6 (54,5)	27,30;81,80	0,020
Intervenciones neuroquirúrgicas	21 (33,3)	22,20;46,00	8 (72,7)	45,50;100	0,020



Tesis Doctoral: Laura González García

En relación a los biomarcadores evaluados, aquellos pacientes que fallecieron durante su estancia en UCI presentaron mayores niveles de CAT a las 24 horas y a las 48 horas, así como de ApoE a las 48 horas (tabla 9).

Tabla 9. Resultados analíticos de los pacientes agrupados en función de la supervivencia a la salida de UCI. IC: Intervalo de Confianza. NSE: Enolasa Neuroespecífica. CAT: Capacidad Antioxidante Total. MDA: Malondialdehído. Los resultados significativos son resaltados en negrita.

	Sobrevive (n=63)		Exitus (n=11)		p
	Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)	IC95%	Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)	IC95%	
S100B (µg/L)					
Al ingreso	0,295 (0,184;0,589)	0,256;0,379	0,365 (0,229;1,152)	0,218;0,913	0,432
A las 24 horas	0,224 (0,121;0,357)	0,176;0,286	0,334 (0,170;1,050)	0,170;1,050	0,165
A las 48 horas	0,141 (0,078;0,225)	0,109;0,171	0,346 (0,076;0,642)	0,090;0,609	0,140
NSE (ng/mL)					
Al ingreso	13,70 (7,48;22,65)	8,75;18,77	8,65 (6,20;21,40)	6,59;23,50	0,699
A las 24 horas	10,21 (4,44;17,40)	6,76;14,15	8,34 (5,67;24,10)	5,75;23,46	0,817
A las 48 horas	6,63 (3,58;10,34)	4,79;8,71	10,75 (3,41;16,63)	3,67;15,58	0,370
CAT (mM CRE)					
Al ingreso	0,763 (0,602;0,933)	0,712;0,852	0,909 (0,714;1,116)	0,699;1,086	0,215
A las 24 horas	0,768 (0,557;0,976)	0,665;0,829	0,955 (0,809;1,493)	0,809;1,493	0,027
A las 48 horas	0,795 (0,540;1,112)	0,725;0,952	1,228 (0,991;1,845)	0,959;2,017	0,009
MDA (µM)					
Al ingreso	12,41 (6,89;18,84)	9,26;14,98	21,36 (8,66;30,92)	11,12;33,84	0,155
A las 24 horas	10,08 (7,36;16,24)	8,57;13,49	12,30 (5,43;12,30)	6,19;26,42	0,372
A las 48 horas	10,70 (6,26;16,86)	9,11;12,62	8,03 (6,45;18,13)	6,10;21,69	0,550
ApoE (µg/mL)					
Al ingreso	35,96 (23,68;54,99)	28,50;44,50	33,55 (21,12;56,74)	14,97;64,40	0,814
A las 24 horas	36,15 (24,72;52,45)	29,61;41,33	39,59 (22,99;49,28)	22,99;49,28	0,713
A las 48 horas	35,44 (22,95;43,49)	29,27;39,09	45,95 (39,23;58,20)	40,05;59,26	0,016



Tesis Doctoral: Laura González García

Cuando analizamos el perfil temporal de cada biomarcador dentro de cada grupo, observamos que los niveles séricos de S100B y NSE disminuían a lo largo del tiempo en aquellos pacientes que sobrevivieron. Se alcanzaron diferencias significativas en el descenso de niveles entre la muestra del ingreso y a las 24 horas ($p=0,006$, $p=0,020$, respectivamente); y entre el ingreso y las 48 horas ($p<0,001$ para ambos biomarcadores). Sin embargo, en el grupo de pacientes que fallecieron, los niveles séricos de S100B se mantuvieron constantes a lo largo de todo el perfil temporal. Lo mismo ocurrió para los niveles de NSE, aunque con una tendencia al aumento en los valores obtenidos a las 48 horas, sin alcanzar significación estadística (figuras 9 y 10).

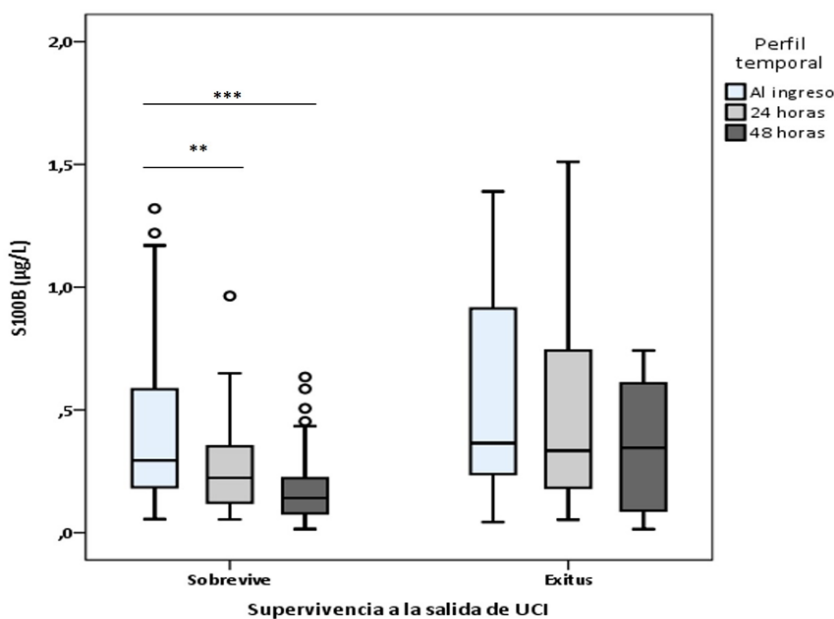


Figura 9. Diagramas de cajas y bigotes del perfil temporal de los niveles séricos de S100B en función de la supervivencia a la salida de UCI. ** si $p<0,01$ y *** si $p<0,001$.



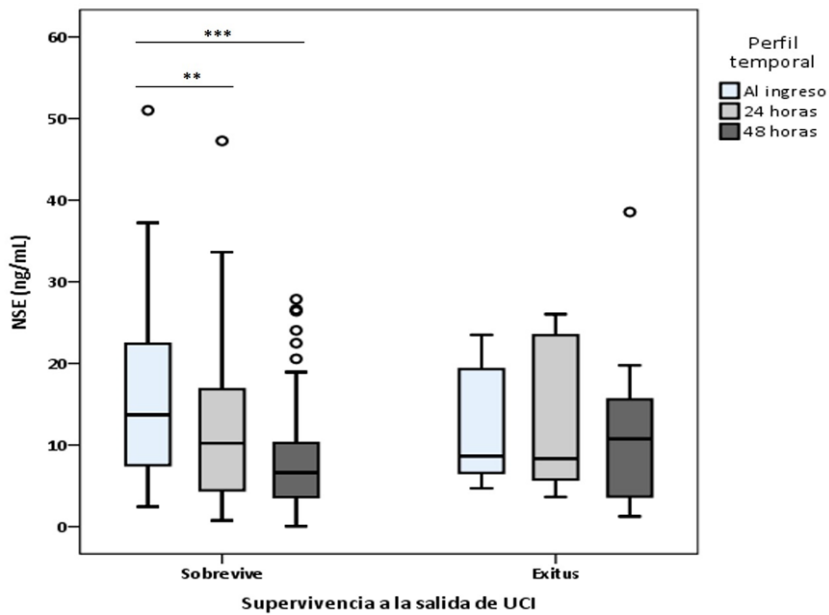


Figura 10. Diagramas de cajas y bigotes del perfil temporal de los niveles séricos de NSE en función de la supervivencia a la salida de UCI. ** si $p < 0,01$ y *** si $p < 0,001$. NSE: Enolasa Neuroespecífica.

En cuanto a los niveles de CAT, MDA y ApoE, estos se mantuvieron constantes en los pacientes que sobrevivieron; mientras que en los que fallecieron se observó una tendencia al aumento de los niveles séricos de CAT y ApoE; y un descenso de los niveles de MDA, sin alcanzar en ningún caso significación estadística (figuras 11, 12 y 13).



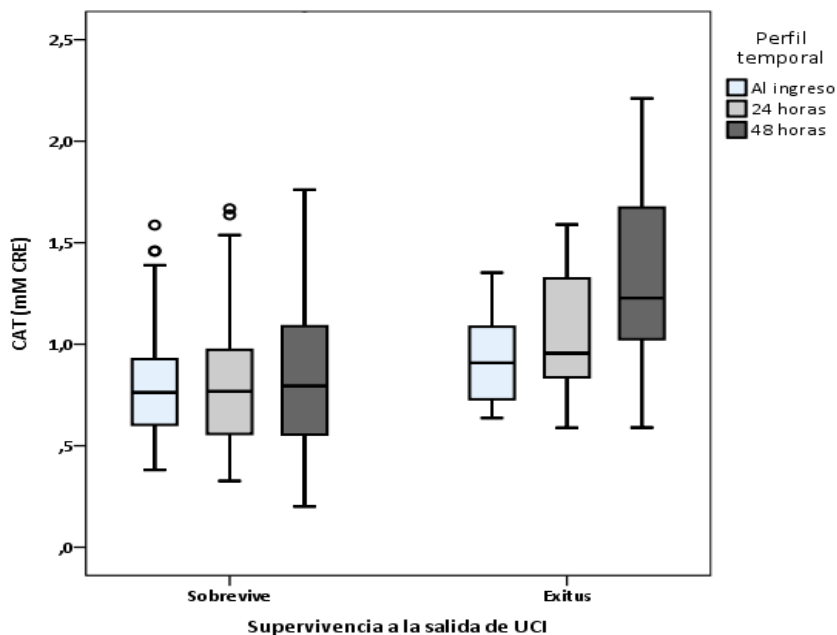


Figura 11. Diagramas de cajas y bigotes del perfil temporal de CAT en función de la supervivencia a la salida de UCI. CAT: Capacidad Antioxidante Total.

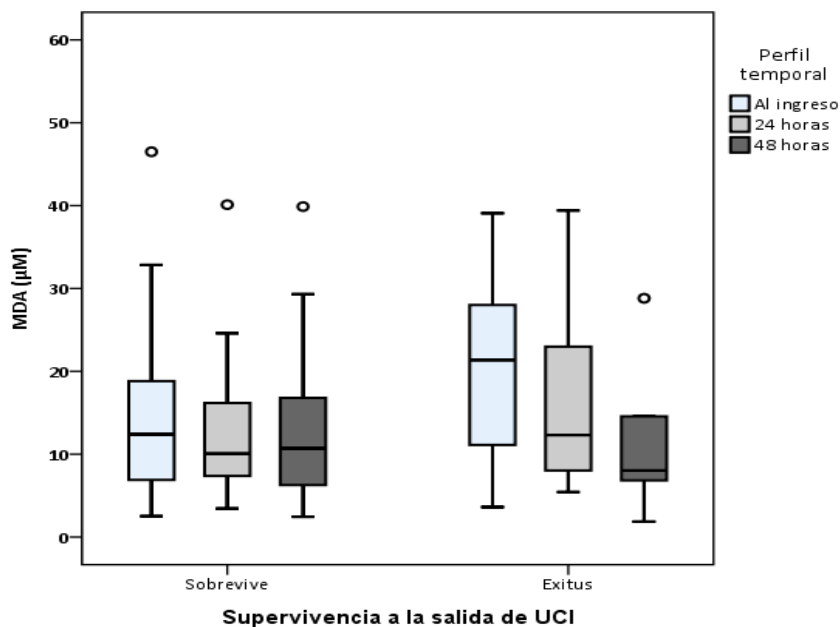


Figura 12. Diagramas de cajas y bigotes del perfil temporal de MDA en función de la supervivencia a la salida de UCI. MDA: Malondialdehído.



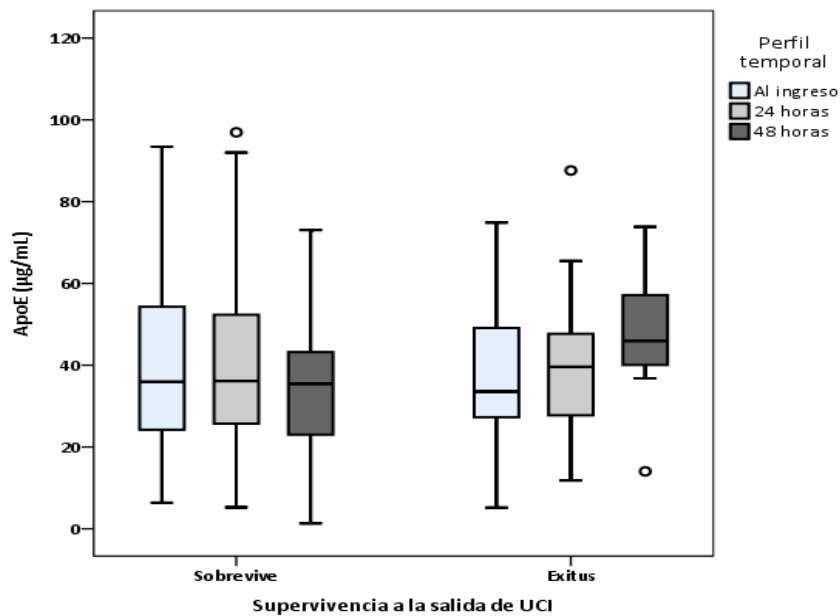


Figura 13. Diagramas de cajas y bigotes del perfil temporal de ApoE en función de la supervivencia a la salida de UCI.

- Evaluación de la supervivencia a los 6 meses

Cuando evaluamos la supervivencia a los 6 meses, se objetivó que aquellos pacientes que fallecieron presentaban una edad superior. A su vez, y según la escala de gravedad TCDB, estos pacientes presentaron mayor proporción de lesiones intracraneales tipo masa (tanto evacuada como no evacuada) en la TAC del ingreso. Además, también destacó una mayor prevalencia de TCE puro, sepsis, así como la necesidad de intervención neuroquirúrgica. Estos resultados se reflejan en la tabla 10.



Tesis Doctoral: Laura González García

Tabla 10. Características clínicas de los pacientes agrupados en función de la supervivencia a los 6 meses desde el TCE. *En el momento del ingreso. **Pre-hospitalaria. IC: Intervalo de Confianza. DE: Desviación estándar. TCDB: *Traumatic Coma Data Bank*. GCS: *Glasgow Coma Scale*. ISS: *Injury Severity Score*. TCE: Traumatismo Craneoencefálico. HTEC: Hipertensión Endocraneal. SIRS: *Systemic Inflammatory Response Syndrome*. Los resultados significativos son resaltados en negrita.

	Sobrevive (n=59)		Exitus (n=15)		p
	n (%)	IC95%	n (%)	IC95%	
Edad media (DE)	41,83 (18,51)	36,90;46,54	55,33 (14,89)	47,67;62,46	0,011
Sexo					0,721
Hombre	47 (79,7)	69,50;89,80	13 (86,7)	66,70;100	
Mujer	12 (20,3)	10,20;30,50	2 (13,3)	0;33,30	
Escalas de gravedad					
TCDB					0,005
Lesión tipo difusa	35 (61,4)	48,20;75,00	3 (20)	0;40,00	
Lesión tipo masa	22 (38,6)	25,00;51,80	12 (80)	60,00;100	
GCS*, mediana (P₂₅; P₇₅)	7 (5;8)	6,00;8,00	6 (3;9)	4,00;8,00	0,515
ISS*, mediana (P₂₅; P₇₅)	29 (25;38)	27,00;35,00	30 (26;42)	27,00;42,00	0,490
Valoración clínica					
Hipoxia**	11 (18,6)	10,20;28,80	1 (6,7)	0;20,00	0,439
Hipotensión**	10 (16,9)	8,50;27,10	2 (13,3)	0,00;33,30	0,999
Respuesta fotomotora*					0,978
Conservada	37 (62,7)	49,20;74,60	9 (60)	33,30;86,70	
No conservada	22 (37,3)	18,60;42,40	6 (40)	13,30;60,00	
TCE puro	16 (27,1)	16,90;39,00	10 (66,7)	40,00;86,70	0,004
HTEC	13 (22,0)	11,90;33,90	4 (26,7)	6,70;53,30	0,736
Infección					
SIRS	19 (32,2)	20,60;44,10	7 (46,7)	20,00;66,70	0,295
Sepsis	10 (16,9)	8,50;27,10	8 (53,3)	26,70;80,00	0,007
Intervenciones neuroquirúrgicas	19 (32,2)	20,30;44,10	10 (66,7)	40,00;86,70	0,015



Tesis Doctoral: Laura González García

En relación a los biomarcadores, aquellos pacientes que fallecieron presentaron mayores niveles de S100B y ApoE a las 48 horas, así como de CAT al ingreso, a las 24 y 48 horas (tabla 11).

Tabla 11. Determinaciones analíticas de los pacientes agrupados en función de la supervivencia a los 6 meses desde el TCE. Los resultados significativos son resaltados en negrita. NSE: Enolasa Neuroespecífica, CAT: Capacidad Antioxidante Total, MDA: Malondialdehído.

	Sobrevive (n=59)		Exitus (n=15)		p
	Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)	IC95%	Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)	IC95%	
S100B (µg/L)					
Al ingreso	0,290 (0,181;0,595)	0,246;0,362	0,404 (0,239;0,913)	0,239;0,913	0,254
A las 24 horas	0,216 (0,199;0,370)	0,172;0,271	0,311 (0,190;0,588)	0,200;0,434	0,128
A las 48 horas	0,127 (0,077;0,211)	0,104;0,165	0,350 (0,113;0,616)	0,166;0,609	0,007
NSE (ng/mL)					
Al ingreso	14,10 (7,54;23,44)	8,42;19,06	10,18 (6,01;18,62)	6,20;17,93	0,414
A las 24 horas	10,43 (4,43;18,54)	7,21;14,26	8,00 (5,67;16,48)	5,77;14,09	0,686
A las 48 horas	6,63 (3,41;10,34)	4,88;8,96	8,51 (3,66;14,09)	3,70;12,72	0,522
CAT (mM CRE)					
Al ingreso	0,757 (0,598;0,922)	0,697;0,846	1,002 (0,759;1,167)	0,759;1,167	0,032
A las 24 horas	0,744 (0,550;0,953)	0,652;0,829	0,955 (0,809;1,390)	0,809;1,390	0,008
A las 48 horas	0,787 (0,533;1,112)	0,720;0,950	1,058 (0,959;1,477)	0,959;1,280	0,014
MDA (µM)					
Al ingreso	12,31 (6,76;18,82)	9,08;14,33	20,60 (12,06;27,26)	12,99;26,52	0,072
A las 24 horas	9,97 (7,36;16,16)	8,45;13,51	13,322(7,16;19,52)	9,89;18,19	0,256
A las 48 horas	11,10 (6,19;16,86)	8,82;13,00	9,08 (6,84;16,55)	6,84012,63	0,700
ApoE (µg/mL)					
Al ingreso	35,50 (22,05;53,48)	28,23;43,15	39,27 (27,32;68,15)	27,38;66,90	0,506
A las 24 horas	35,80 (24,73;52,45)	29,39;40,48	40,12 (22,98;49,28)	32,50;49,28	0,528
A las 48 horas	35,44 (22,95;42,10)	28,26;38,44	45,20 (35,72;53,05)	36,78;51,69	0,026



En relación al perfil temporal de los biomarcadores, observamos que los pacientes que sobrevivieron presentaron un descenso de los niveles séricos de S100B y NSE a lo largo del tiempo, alcanzándose diferencias significativas entre la muestra del ingreso y a las 24 horas ($p=0,006$, $p=0,010$, respectivamente); y entre el ingreso y las 48 horas ($p<0,001$ para ambos biomarcadores). En el grupo de pacientes que fallecieron, observamos que los niveles séricos de S100B y NSE se mantuvieron constantes a lo largo de todo el perfil temporal (figuras 14 y 15).

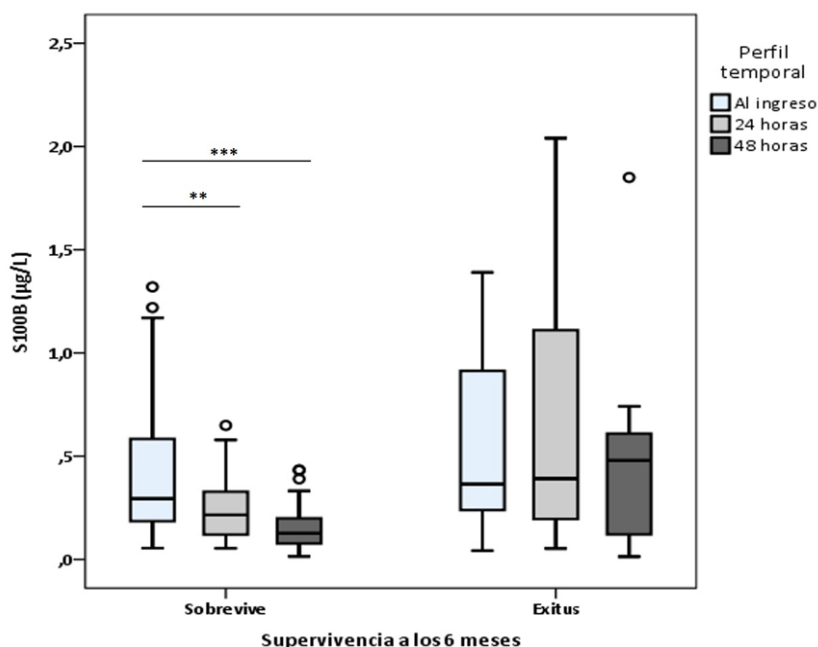


Figura 14. Diagramas de cajas y bigotes del perfil temporal de S100B en función de la supervivencia a los 6 meses. ** si $p<0,01$ y *** si $p<0,001$.



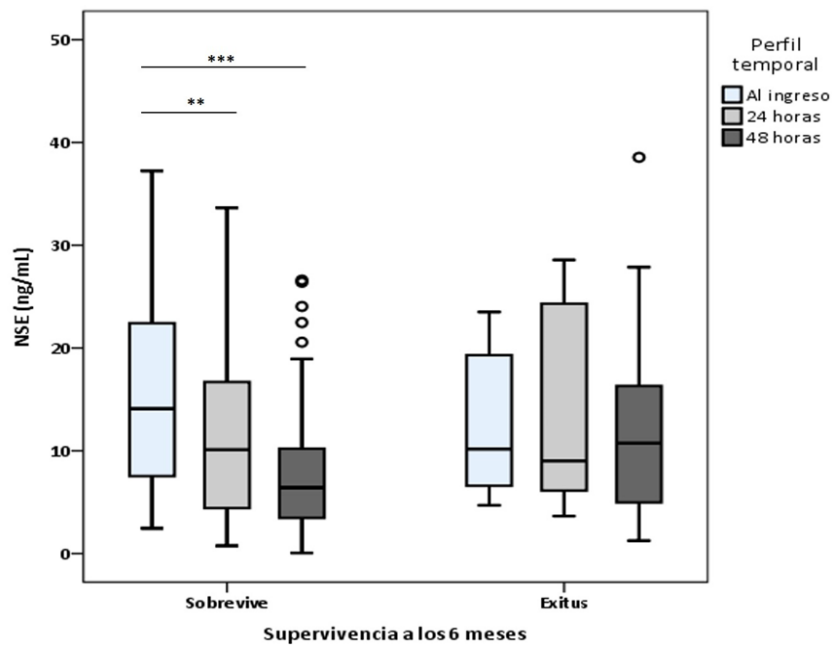


Figura 15. Diagramas de cajas y bigotes del perfil temporal de NSE en función de la supervivencia a los 6 meses. ** si $p < 0,01$ y *** si $p < 0,001$. NSE: Enolasa Neuroespecífica.

Respecto a los niveles de CAT, MDA y ApoE, estos se mantuvieron constantes en los pacientes que sobrevivieron; y, en los que fallecieron, se observó una tendencia al aumento de los niveles séricos de CAT y ApoE; y un descenso de los niveles de MDA, sin alcanzar significación estadística en ningún caso (figuras 16, 17 y 18).



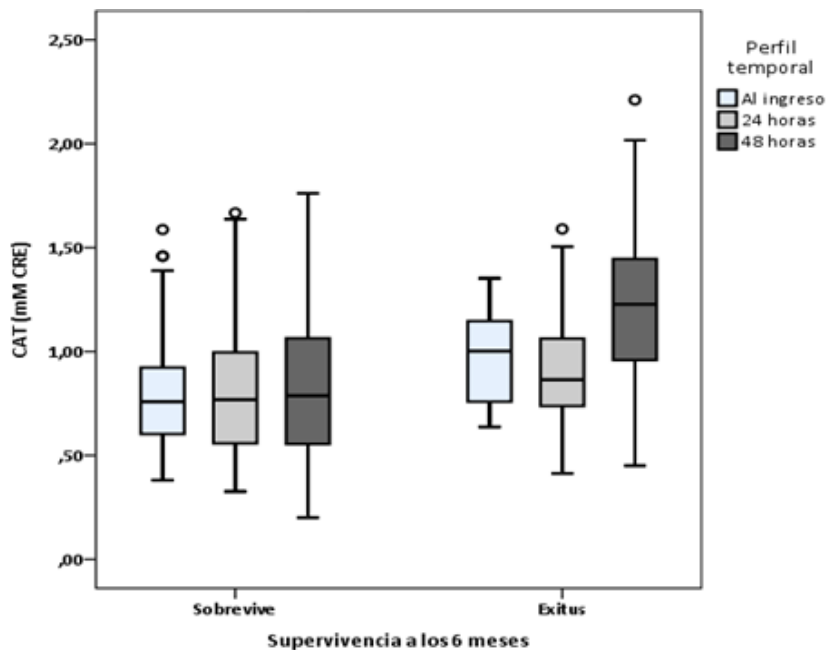


Figura 16. Diagramas de cajas y bigotes del perfil temporal de CAT en función de la supervivencia a los 6 meses. CAT: Capacidad Antioxidante Total.

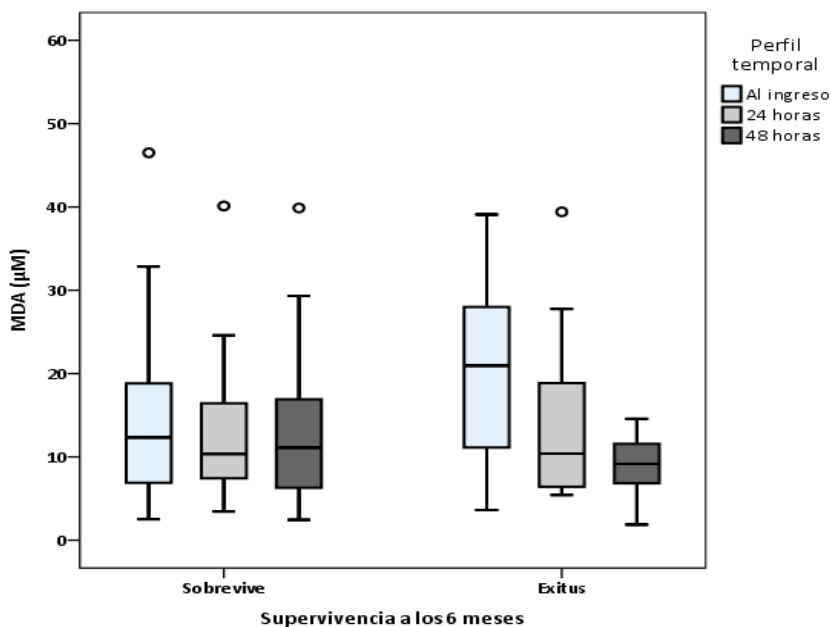


Figura 17. Diagramas de cajas y bigotes del perfil temporal de MDA en función de la supervivencia a los 6 meses. MDA: Malondialdehído.



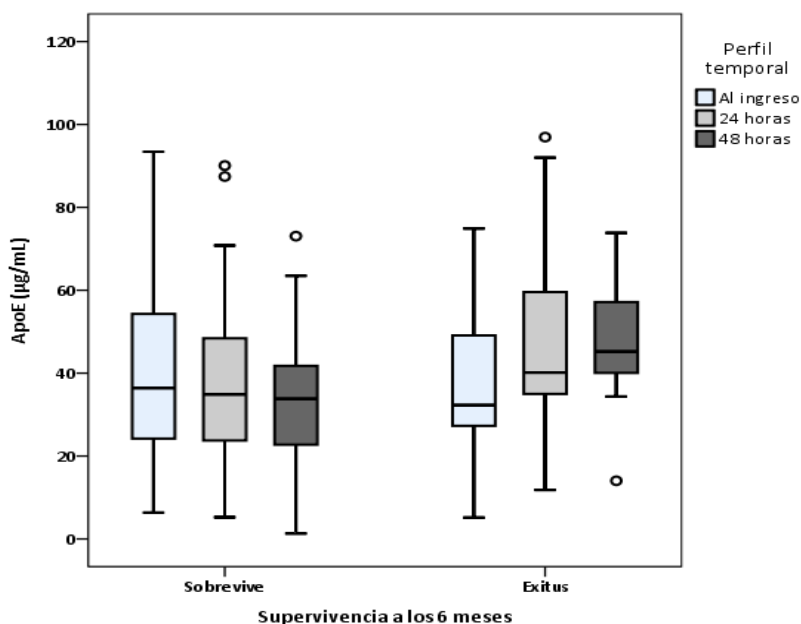


Figura 18. Diagramas de cajas y bigotes del perfil temporal de ApoE en función de la supervivencia a los 6 meses.

4.1.5. Variables clínicas y analíticas candidatas para los modelos de supervivencia

El análisis de regresión múltiple univariante para determinar qué variables presentaban algún papel en la supervivencia y/o mortalidad de los pacientes reveló los siguientes resultados:

Observamos que las siguientes variables clínicas aumentaban el riesgo de mortalidad a la salida de UCI: presencia de lesión tipo masa según la TCDB, presencia de TCE puro, sepsis y necesidad de intervención neuroquirúrgica, siendo la presencia de TCE aislado la variable con mayor HR. Respecto a los biomarcadores estudiados, encontramos que mayores niveles de S100B y CAT a las 24 y 48 horas aumentaban el riesgo de mortalidad, destacando el HR



Tesis Doctoral: Laura González García

alcanzado por los valores de S100B a las 48 horas: por cada incremento de 1 µg/L, el HR para evolucionar a muerte era de 60,047 (tablas 12 y 13).

Tabla 12. Análisis univariante de las variables clínicas que pueden influir en la supervivencia a la salida de UCI tras un TCE. HR: *Hazard Ratio*. IC: Intervalo de Confianza. TCDB: *Traumatic Coma Data Bank*. TCE: Traumatismo Craneoencefálico. Los resultados significativos son resaltados en negrita.

Variables clínicas	HR	IC95%	p
Edad	1,029	0,997;1,062	0,080
Sexo masculino	1,075	0,232;4,985	0,927
TCDB lesión tipo masa	4,748	1,026;21,985	0,046
GCS	0,777	0,602;1,002	0,052
ISS	1,029	0,969;1,093	0,350
Hipoxia	1,971	0,252;15,418	0,518
Hipotensión	1,008	0,218;4,673	0,992
Respuesta fotomotora no conservada	1,784	0,543;5,861	0,341
TCE aislado	6,056	1,602;22,889	0,008
SIRS	2,064	0,628;6,790	0,233
Sepsis	3,457	0,861;13,881	0,080
Neurocirugía	3,699	0,980;13,965	0,054



Tesis Doctoral: Laura González García

Tabla 13. Análisis univariante de las variables analíticas que pueden influir en la supervivencia a la salida de UCI tras un TCE. HR: *Hazard Ratio*. IC: Intervalo de Confianza. CAT: Capacidad Antioxidante Total. Los resultados significativos son resaltados en negrita.

Variables analíticas	HR	IC95%	<i>p</i>
S100B al ingreso	1,130	0,697;1,831	0,619
S100B 24 horas	2,217	0,759;6,477	0,146
S100B 48 horas	60,047	4,355;827,946	0,002
CAT al ingreso	2,841	0,381;21,179	0,308
CAT 24 horas	6,930	1,424;33,737	0,017
CAT 48 horas	3,848	1,458;10,157	0,006
ApoE al ingreso	0,993	0,965;1,022	0,642
ApoE 24 horas	1,005	0,977;1,034	0,737
ApoE 48 horas	1,014	0,994;1,034	0,179

En relación a la supervivencia a los 6 meses, observamos que las variables clínicas de edad, lesión tipo masa según la TCDB, presencia de TCE puro, necesidad de intervención neuroquirúrgica y presencia de sepsis aumentaban el riesgo de mortalidad, siendo la presencia de lesión tipo masa la variable clínica con mayor HR. Cuando evaluamos los biomarcadores, se objetivó que mayores niveles séricos de S100B a las 48 horas, y niveles séricos de CAT a las 24 y 48 horas, también aumentaban el riesgo de mortalidad. Observamos que por cada incremento de 1 µg/L en los valores de S100B a las 48 horas, el HR para evolucionar a muerte era de 235,394; mientras que, en el caso de los niveles de



Tesis Doctoral: Laura González García

CAT, por cada incremento de 1 M CRE en sus valores a las 24 y 48 horas, el HR para evolucionar a muerte era de 5,308 y 3,341; respectivamente (tablas 14 y 15).

Tabla 14. Análisis univariante de las variables clínicas que pueden influir en la supervivencia a los 6 meses desde el TCE. *En el momento del ingreso. HR: *Hazard Ratio*. IC: Intervalo de Confianza. TCDB: *Traumatic Coma Data Bank*. TCE: Traumatismo Craneoencefálico. Los resultados significativos son resaltados en negrita.

Variables clínicas	HR	IC95%	p
Edad	1,035	1,007;1,065	0,014
Sexo masculino	1,452	0,328;6,437	0,623
TCDB lesión tipo masa	5,016	1,414;17,790	0,013
GCS	0,938	0,794;1,109	0,455
ISS	1,025	0,975;1,078	0,336
Hipoxia	1,239	0,280;5,493	0,778
Hipotensión	2,839	0,373;21,592	0,313
Respuesta fotomotora no conservada	1,201	0,427;3,374	0,728
TCE aislado	4,449	1,519;13,034	0,006
SIRS	1,711	0,620;4,722	0,300
Sepsis	4,746	1,426;15,797	0,011
Neurocirugía	3,494	1,193;10,236	0,023



Tesis Doctoral: Laura González García

Tabla 15. Análisis univariante de las variables analíticas que pueden influir en la supervivencia a los 6 meses desde el TCE. *En el momento del ingreso. HR: *Hazard Ratio*. IC: Intervalo de Confianza. CAT: Capacidad Antioxidante Total. Los resultados significativos son resaltados en negrita.

Variables analíticas	HR	IC95%	p
S100B al ingreso	1,117	0,725;1,718	0,616
S100B 24 horas	2,430	0,895;6,597	0,082
S100B 48 horas	235,394	17,040;3251,740	<0,001
CAT al ingreso	3,678	0,818;16,543	0,090
CAT 24 horas	5,308	1,439;19,578	0,012
CAT 48 horas	3,341	1,375;8,117	0,008
ApoE al ingreso	1,010	0,990;1,030	0,319
ApoE 24 horas	1,005	0,982;1,030	0,662
ApoE 48 horas	1,014	0,996;1,032	0,134

4.1.6. Modelos de supervivencia en pacientes con traumatismo craneoencefálico grave

Las variables que alcanzaron un nivel de significación $p < 0,15$ en el análisis univariante fueron sometidas a análisis multivariante. Las variables incluidas fueron: edad, presencia de lesión tipo masa según la TCDB, puntuación obtenida en la escala GCS, presencia de TCE puro, necesidad de intervención neuroquirúrgica, presencia de sepsis, niveles séricos de S100B a las 24 y 48 horas; niveles séricos de CAT al ingreso, a las 24 y 48 horas; y niveles séricos de ApoE a las 48 horas.



Tesis Doctoral: Laura González García

Para evaluar la supervivencia a la salida de UCI, las variables que permanecieron en el modelo fueron los niveles séricos de S100B y CAT a las 48 horas, alcanzando el modelo un AUC de 0,864 (tabla 16) (figura 19).

Tabla 16. Modelo de supervivencia para evaluar la supervivencia a la salida de UCI. HR: Hazard Ratio. IC: Intervalo de Confianza. AUC: Area Under the Curve. CAT: Capacidad Antioxidante Total.

	Variable	HR	IC95%	p	AUC	IC95%	p
Modelo 1	S100B 48h	65,05	4,27;992,11	0,003	0,864	0,761;0,967	<0,001
	CAT 48h	4,74	1,34;16,78	0,016			

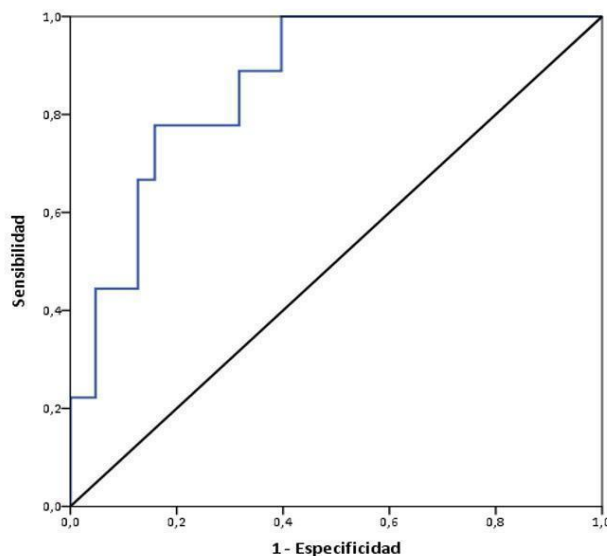


Figura 19. Curva ROC que compara sensibilidad frente a especificidad del modelo (S100B + CAT a las 48h) para predecir la supervivencia/mortalidad a la salida de UCI.



Tesis Doctoral: Laura González García

Cuando evaluamos la supervivencia a los 6 meses desde el TCE, el modelo resultante fue el mismo que a la salida de UCI con un AUC de 0,868 (tabla 17) (figura 20).

Tabla 17. Modelo de supervivencia para evaluar la mortalidad a los 6 meses desde el TCE. HR: Hazard Ratio. IC: Intervalo de Confianza. AUC: Area Under the Curve. CAT: Capacidad Antioxidante Total.

	Variable	HR	IC95%	p	AUC	IC95%	p
Modelo 1	S100B 48h	191,71	15,11;2432,45	<0,001	0,868	0,769;0,968	<0,001
	CAT 48h	3,55	1,06;11,93	0,040			

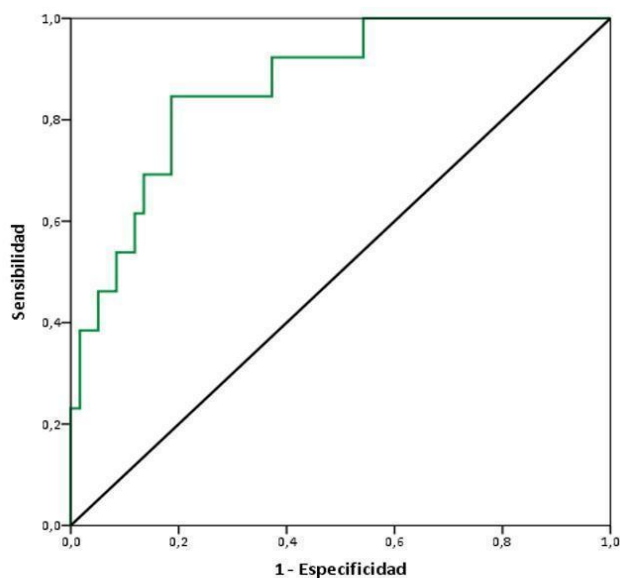


Figura 20. Curva ROC que compara sensibilidad frente a especificidad del primer modelo (S100B + CAT a las 48h) evaluado para predecir la supervivencia/mortalidad a los 6 meses.

Puesto que al evaluar la supervivencia a los 6 meses se observó una influencia de la edad en el resultado, decidimos explorar un segundo modelo que tuviera en cuenta dicha



Tesis Doctoral: Laura González García

variable. En este caso, las variables que permanecieron en este segundo modelo fueron la edad y los niveles séricos de S100B y CAT a las 24 horas, con un AUC de 0,801 (tabla 18) (figura 21).

Tabla 18. Modelo de supervivencia para evaluar la mortalidad a los 6 meses desde el TCE. HR: Hazard Ratio. IC: Intervalo de Confianza. AUC: Area Under the Curve. CAT: Capacidad Antioxidante Total.

	Variable	HR	IC95%	p	AUC	IC95%	p
Modelo 2	Edad	1,04	1,00-1,07	0,030	0,801	0,679-0,923	0,001
	S100B 24h	4,05	1,51-10,89	0,006			
	CAT 24h	6,57	1,42-30,27	0,016			

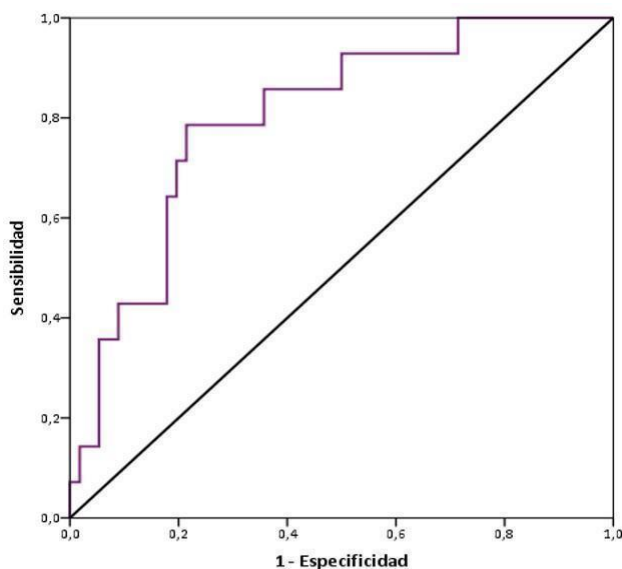


Figura 21. Curva ROC que compara sensibilidad frente a especificidad del segundo modelo (Edad + S100B + CAT a las 24h) para predecir la supervivencia/mortalidad a los 6 meses.



4.2 Ensayo *in vitro*

4.2.1 Datos demográficos

En esta segunda parte del estudio, se incluyeron un total de 35 pacientes, con una edad comprendida entre los 18 y 83 años, siendo el promedio de ésta de 49,94 y la desviación estándar de 19,42 años. El 80% de los pacientes fueron varones. En relación con el mecanismo lesional, predominaron los TCE como consecuencia de las caídas, seguido por los accidentes de tráfico. Los datos demográficos de estos pacientes se encuentran recogidos en la tabla 19.

Tabla 19. Características demográficas de los pacientes incluidos en el ensayo *in vitro*.

IC: Intervalo de Confianza. DE: Desviación Estándar.

Variables demográficas	n (%)	IC95%
Edad (años), media (DE)	49,94 (19,42)	43,09;56,28
Sexo		
Hombres	28 (80,0)	65,7;94,3
Mujeres	7 (20,0)	5,7;34,3
Mecanismo lesional		
Accidente de tráfico	10 (31,3)	15,6;46,9
Caída	14 (43,8)	28,1;62,5
Atropello	2 (6,3)	0,0;15,6
Agresión	3 (9,4)	0,0;18,8
Otros	3 (9,4)	0,0;21,9



4.2.2 Datos clínicos

En la tabla 20 se representan los datos clínicos de los pacientes incluidos en el ensayo *in vitro*.

En relación con las complicaciones prehospitalarias, se detectó la presencia de hipoxia e hipotensión en un 3,8% y 16,1%, respectivamente. Al ingreso, el nivel de GCS expresado como valor mediano fue de 9 (P₂₅;P₇₅ = 3;12,8) y el valor de ISS fue de 23,50 (P₂₅;P₇₅ = 16;25). También se evaluaron las alteraciones fotomotoras, observándose un 75,9% de pacientes con respuesta fotomotora conservada (pupilas isocóricas) y un 24,1% con respuesta fotomotora no conservada (17,2% con anisocoria y 6,9% con midriasis bilateral arreactiva). Además, se recogieron datos de PIC en 14 pacientes, detectándose la presencia de HTEC en un 28,6% de los mismos.

Al analizar los hallazgos radiológicos, expresados mediante la escala TCDB, todos los pacientes presentaron hallazgos patológicos en la TAC, es decir, ningún paciente presentó una puntuación de uno en la TCDB. Se detectó una clara predominancia de las lesiones tipo difusas (48,6%, TCDB II) y de las lesiones tipo masa evacuada (28,6%). En 15 pacientes (46,9%) fue preciso llevar a cabo intervenciones neuroquirúrgicas para proceder a la evacuación de hematomas intracraneales.

La supervivencia de los pacientes se evaluó a la salida de UCI y a los 6 meses desde el TCE, constatándose una supervivencia del 85,3% y del 75,8% respectivamente.



Tesis Doctoral: Laura González García

Tabla 20. Datos clínicos de los pacientes reclutados. *En el momento del ingreso.
 **Pre-hospitalaria. IC: Intervalo de Confianza. TCDB: *Traumatic Coma Data Bank*.
 GCS: *Glasgow Coma Scale*. ISS: *Injury Severity Score*. HTEC: Hipertensión Endocraneal.

Variables clínicas	n (%)	IC95%
Escalas de gravedad		
TCDB		
I	0 (0)	0;0
II	17 (48,6)	33,6;66,7
III	1 (2,9)	0,0;9,1
IV	0 (0,0)	0,0;0,0
Lesión evacuada quirúrgicamente	10 (28,6)	15,2;45,5
Lesión no evacuada	5 (14,3)	6,1;27,3
GCS*, mediana (P₂₅; P₇₅)	9 (6,3;12,8)	8,00;10,00
ISS*, mediana (P₂₅; P₇₅)	23,50 (16,25)	16,00;25,75
Supervivencia a la salida de UCI	29 (85,3)	73,5;97,0
Supervivencia a los 6 meses	25 (75,8)	60,6;90,9
Valoración clínica		
Hipoxia**	1 (3,8)	0,0;11,5
Hipotensión**	5 (16,1)	3,3;29,0
Respuesta fotomotora*		
Conservada	22 (75,9)	58,7;89,7
No conservada	7 (24,1)	3,5;31,0
HTEC	4 (28,6)	7,1;50,0
Intervenciones neuroquirúrgicas	15 (46,9)	31,3;65,6



4.2.3 Datos analíticos

- Evolución temporal de los biomarcadores en sobrenadante de cultivos de PBMCs

En las tablas 21 y 22 se representan los datos analíticos de los biomarcadores analizados en sobrenadantes de cultivos de PBMCs de los pacientes incluidos en el estudio.

Observamos una disminución de los niveles de IL-10 entre los resultados obtenidos en el primer intervalo de tiempo (0-48 horas) y el segundo (48-96 horas), tanto en las muestras estimuladas con el mitógeno (PHA) como en las suplementadas con MLT. En el resto de los biomarcadores analizados no se objetivaron diferencias significativas en su perfil temporal.

Tabla 21. Datos analíticos de los biomarcadores analizados en sobrenadantes de cultivos de PBMCs en función del perfil temporal y sin MLT. MLT: Melatonina, CAT: Capacidad Antioxidante Total, IC: Intervalo de Confianza. Los resultados significativos son resaltados en negrita.

	Sin MLT				
	Muestra A (0-48 horas)		Muestra B (48-96 horas)		p
	Mediana (P ₂₅ , P ₇₅)	IC95%	Mediana (P ₂₅ , P ₇₅)	IC95%	
IL-1β (log10 pg/mL)	2,86 (2,63;3,34)	2,75;3,25	3,02 (2,60;3,57)	2,65;3,25	0,521
IL-8 (log10 pg/mL)	5,33 (5,22;5,48)	5,25;5,44	5,23 (5,08;5,39)	5,14;5,33	0,191
IL-10 (log10 pg/mL)	2,93 (2,75;3,09)	2,86;3,02	2,80 (2,61;2,97)	2,67;2,91	0,045
CAT (μM CRE)	174,81 (139,88;228,32)	149,92;197,86	175,46 (135,29;226,40)	153,64;201,16	0,932
ApoE (μg/mL)	1,61 (0,41;4,20)	0,77;2,70	1,65 (0,74;4,37)	0,99;2,56	0,441



Tabla 22. Datos analíticos de los biomarcadores analizados en sobrenadantes de cultivos de PBMCs en función del perfil temporal y con MLT. MLT: Melatonina, CAT: Capacidad Antioxidante Total, IC: Intervalo de Confianza. Los resultados significativos son resaltados en negrita.

	Con MLT				
	Muestra A (0-48 horas)		Muestra B (48-96 horas)		p
	Mediana (P ₂₅ , P ₇₅)	IC95%	Mediana (P ₂₅ , P ₇₅)	IC95%	
IL-1β (log10 pg/mL)	3,44 (3,21;3,59)	3,35;3,58	3,35 (3,14;3,52)	3,18;3,44	
IL-8 (log10 pg/mL)	5,33 (5,20;5,44)	5,25;5,39	5,20 (5,01;5,37)	5,06;5,33	0,053
IL-10 (log10 pg/mL)	2,89 (2,72;3,00)	2,81;2,98	2,62 (2,42;2,87)	2,52;2,79	0,005
CAT (μM CRE)	258,59 (222,64;325,95)	234,12;294,03	268,53 (213,25;256,20)	227,09;309,14	0,704
ApoE (μg/mL)	1,07 (0,22;2,75)	0,54;1,52	1,05 (0,51;2,22)	0,59;1,89	0,751

4.2.4 La melatonina como modulador de inflamación

Cuando analizamos el efecto de la MLT como posible modulador de la respuesta inflamatoria en cultivos de PBMCs estimulados con PHA, observamos que provocaba un aumento en la producción de IL-1β ($p < 0,001$ en ambas muestras) y una disminución de IL-10 en la segunda muestra ($p < 0,05$). No observamos efecto significativo sobre la producción de IL-8.

Los diagramas de cajas y bigotes de cada una de las citoquinas se representan en las figuras 22, 23 y 24.



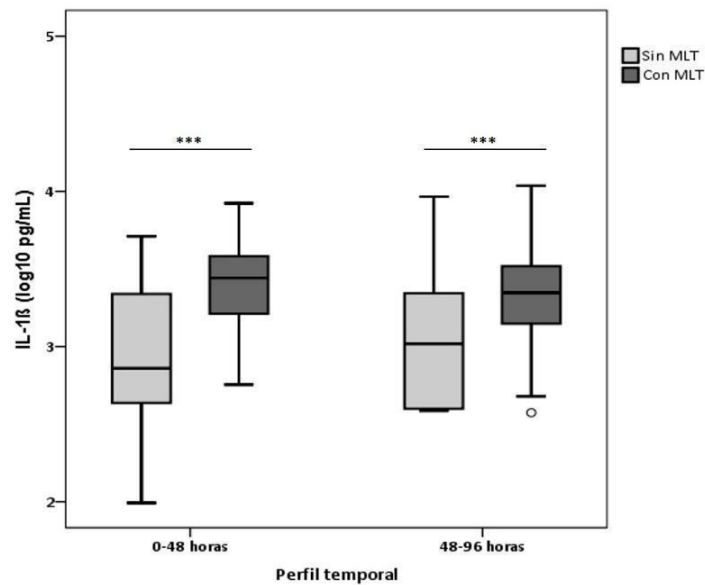


Figura 22. Diagrama de cajas y bigotes de los niveles de IL-1β en sobrenadantes de cultivos de PBMCs en función del efecto de la MLT. *** si $p < 0,001$. MLT: Melatonina.

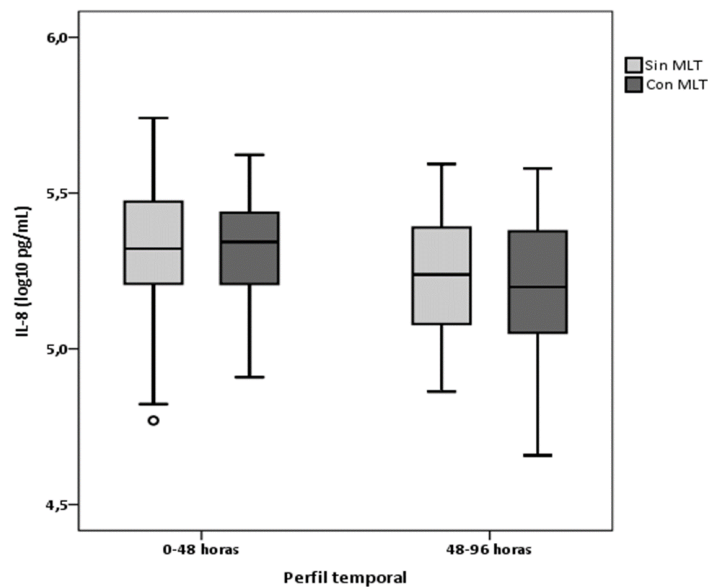


Figura 23. Diagrama de cajas y bigotes de los niveles de IL-8 en sobrenadantes de cultivos de PBMCs en función del efecto de la MLT. MLT: Melatonina.



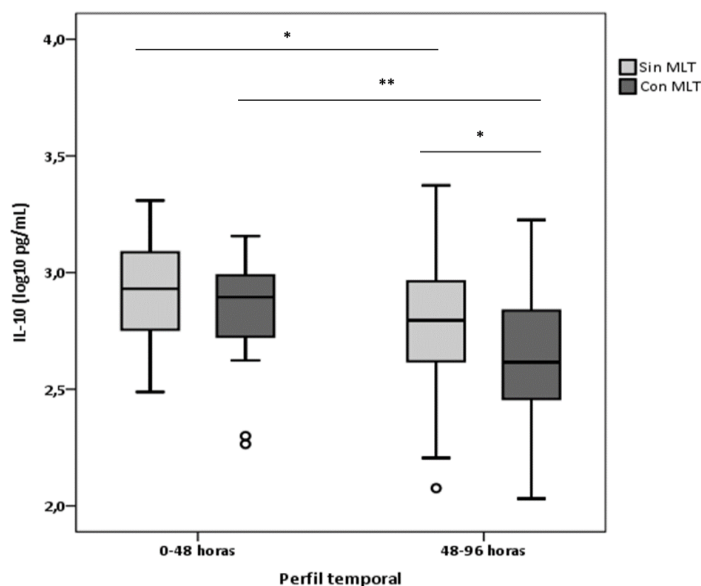


Figura 24. Diagrama de cajas y bigotes de los niveles de IL-10 en sobrenadantes de cultivos de PBMCs en función del efecto de la MLT. * si $p < 0,05$ y ** si $p < 0,01$. MLT: Melatonina.

4.2.5 La melatonina como modulador del estrés oxidativo

Para evaluar los posibles efectos de la MLT sobre el estrés oxidativo celular, se cuantificaron los niveles de CAT en sobrenadantes de PBMCs sin estimular con PHA.

Se objetivó un marcado incremento en los valores de CAT en los sobrenadantes de cultivos de PBMCs tratados con MLT, alcanzando diferencias significativas en ambas muestras ($p < 0,001$) (figura 25).



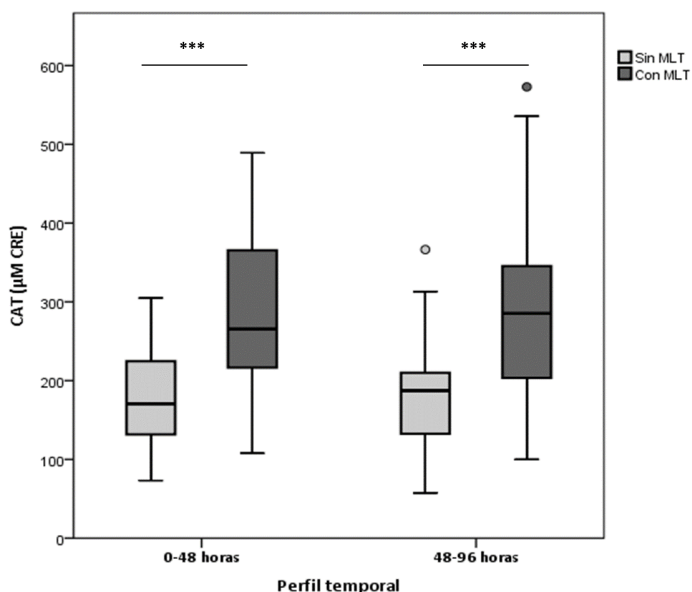


Figura 25. Diagrama de cajas y bigotes de los niveles de CAT en sobrenadantes de cultivos de PBMCs en función del efecto de la MLT. ***si $p < 0,001$. CAT: Capacidad Antioxidante Total, MLT: Melatonina.

4.2.6 Implicación del genotipo de APOE

Se recogieron resultados de genotipo de APOE en 34 pacientes. Estos resultados se muestran en la tabla 23.

Tabla 23. Distribución del genotipo de APOE en nuestra población de estudio.

	n (%)	IC95%
ε2/ε3	3 (8,6)	0,0;20,0
ε3/ε3	27 (80)	65,7;91,4
ε3/ε4	4 (11,4)	2,9;22,9



- Efecto de la melatonina sobre el estrés oxidativo en cultivos de PBMCs según el genotipo de APOE

A continuación, se evaluó la posible interacción del genotipo de APOE en la respuesta oxidativa a la MLT. Evaluamos el efecto del fármaco sobre la CAT en función del genotipo (tablas 24 y 25), considerando el balance de CAT como el porcentaje (%) de incremento de la CAT basal (sin MLT) tras la administración de MLT.

Tabla 24. Efecto de la MLT sobre la CAT en función del genotipo de APOE en el primer intervalo de tiempo (0-48 horas). CAT: Capacidad Antioxidante Total, MLT: Melatonina, IC: Intervalo de Confianza.

	CAT (µM CRE) [Sin MLT]		CAT (µM CRE) [Con MLT]		Balance de CAT (%)	
	Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)	IC95%	Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)	IC95%	Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)	IC95%
ε2/ε3	273,4 (136,2;306,4)	136,2;306,4	356,1 (165,9;524,6)	165,9;524,6	49,9 (49,5;50,3)	49,5;50,3
ε3/ε3	158,2 (138,7;216,2)	144,2;196,6	247,8 (217,3;317,2)	225,4;286,9	47,7 (30,3;60,7)	36,6;50,4
ε3/ε4	207,9 (180,8;254,4)	174,9;266,7	305,6 (270,6;352,6)	262,9;354,4	51,3 (38,8;66,7)	35,1;71,3



Tesis Doctoral: Laura González García

Tabla 25. Efecto de la MLT sobre la CAT en función del genotipo de APOE en el segundo intervalo de tiempo (48-96 horas). CAT: Capacidad Antioxidante Total, MLT: Melatonina, IC: Intervalo de Confianza.

	CAT (μ M CRE) [Sin MLT]		CAT (μ M CRE) [Con MLT]		Balance de CAT (%)	
	Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)	IC95%	Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)	IC95%	Mediana (P ₂₅ ; P ₇₅)	IC95%
ε2/ε3	234,6 (191,6;319,0)	191,6;319,0	364,2 (334,8;515,6)	334,8;515,6	67,6 (63,02;72,1)	63,02;72,1
ε3/ε3	165,2 (127,2;218,3)	136,7;181,2	232,8 (209,7;321,5)	213,9;293,3	49,8 (36,5;61,6)	39,7;61,5
ε3/ε4	178,6 (170,5;298,4)	169,8;336,5	323,2 (263,5;409,3)	253,9;427,6	52,5 (46,9;58,8)	46,2;59,8

En todos los casos constatamos que la MLT producía un incremento del balance de CAT en menor o mayor medida en función del genotipo de APOE expresado. Observamos que los pacientes con genotipo ε3/ε3 eran los que presentaban menores niveles de CAT, así como menor balance de CAT, pero en ningún caso se observaron diferencias estadísticamente significativas (figura 26).



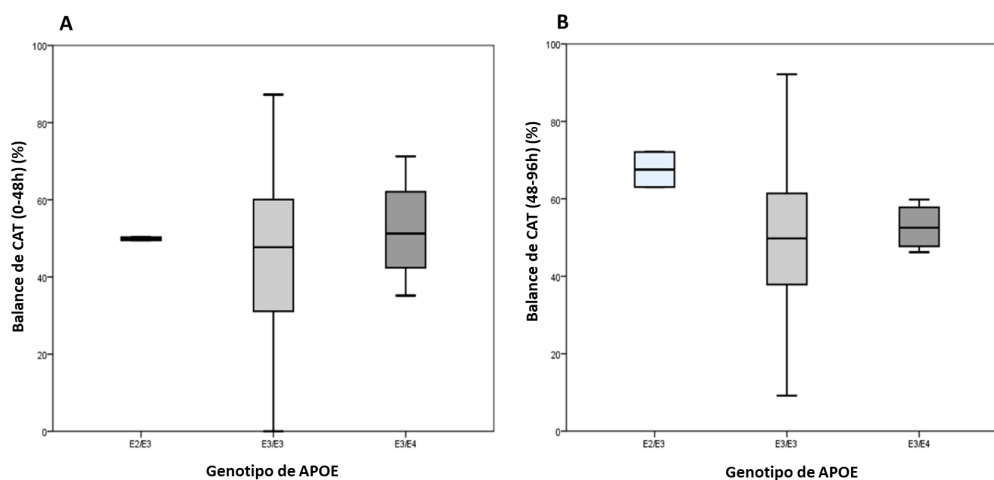


Figura 26. Diagrama de cajas y bigotes del balance neto de CAT resultante del efecto de la MLT en sobrenadantes de cultivos de PBMCs según el genotipo de APOE en el primer (0-48h) (A) y segundo (48-96h) (B) intervalo de tiempo. CAT: Capacidad Antioxidante Total.

Adicionalmente, cuantificamos los niveles de ApoE en sobrenadantes de cultivos de PBMCs y observamos que existía una correlación positiva entre los niveles de ApoE y de CAT. Tal correlación alcanzaba significación estadística en los sobrenadantes sin suplementar con MLT en el segundo intervalo de tiempo (48-96 h) y en los sobrenadantes suplementados con MLT en todo el perfil temporal (figuras 27-30).



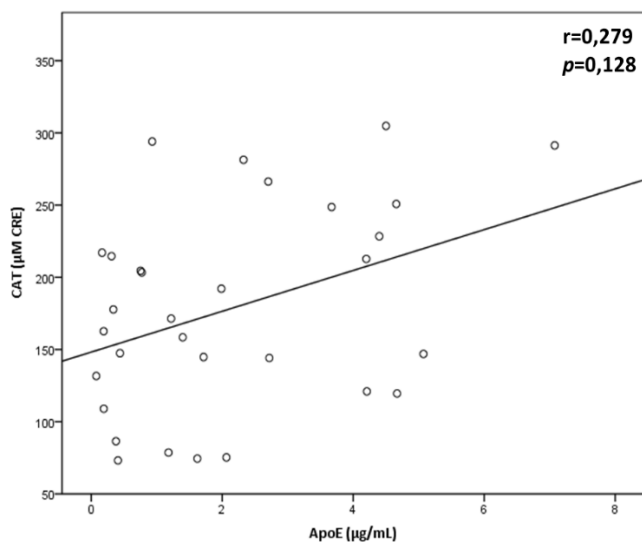


Figura 27. Diagrama de dispersión y análisis de correlación lineal mediante coeficiente Rho de Spearman entre los niveles de ApoE y CAT en sobrenadantes de cultivos de PBMCs sin suplementar con MLT en el primer intervalo de tiempo (0-48h).

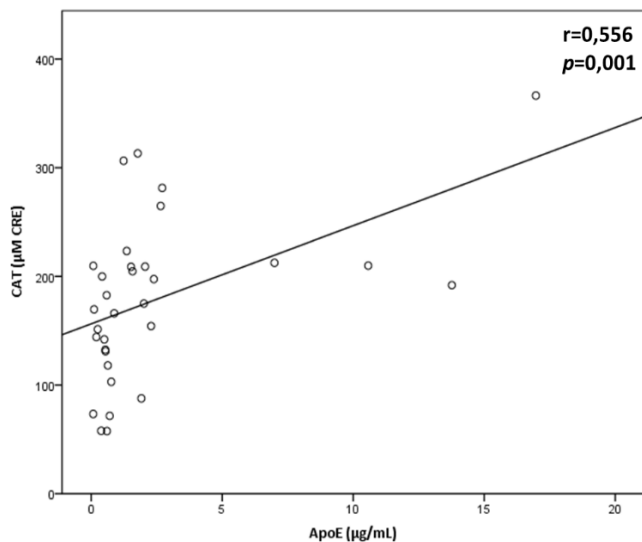


Figura 28. Diagrama de dispersión y análisis de correlación lineal mediante coeficiente Rho de Spearman entre los niveles de ApoE y CAT en sobrenadantes de cultivos de PBMCs sin suplementar con MLT en el segundo intervalo de tiempo (48-96h).



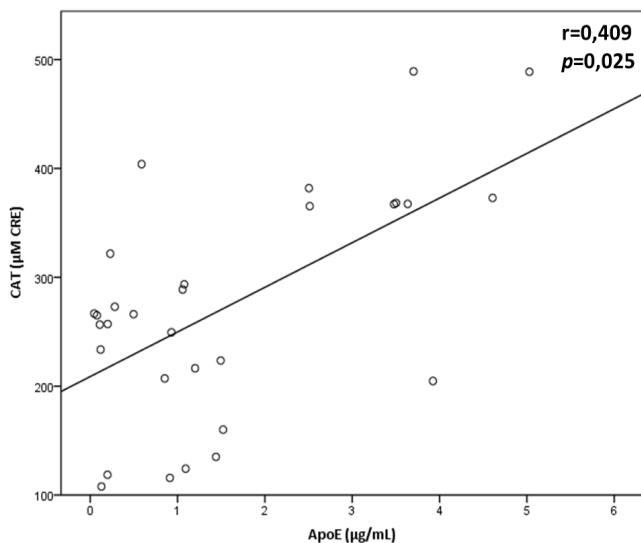


Figura 29. Diagrama de dispersión y análisis de correlación lineal mediante coeficiente Rho de Spearman entre los niveles de ApoE y CAT en sobrenadantes de cultivos de PBMCs suplementados con MLT en el primer intervalo de tiempo (0-48h).

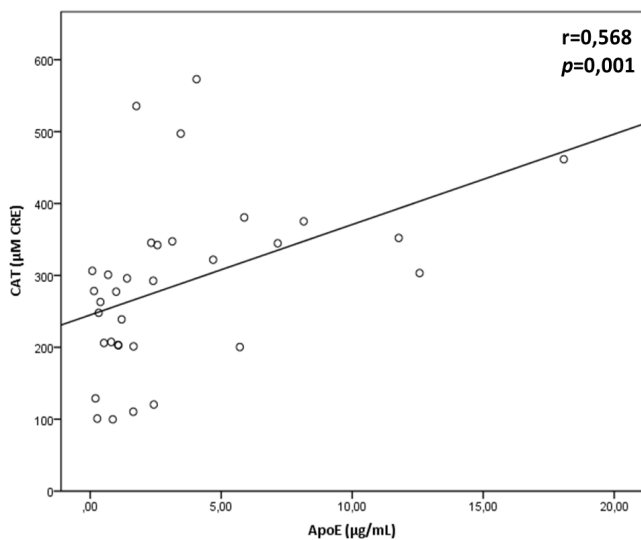


Figura 30. Diagrama de dispersión y análisis de correlación lineal mediante coeficiente Rho de Spearman entre los niveles de ApoE y CAT en sobrenadantes de cultivos de PBMCs suplementados con MLT en el segundo intervalo de tiempo (48-96h).



V. DISCUSIÓN

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



Tesis Doctoral: Laura González García

El presente estudio se diseñó con el objetivo de evaluar la utilidad de diferentes marcadores pronósticos de mortalidad en pacientes que sufren un TCE grave o potencialmente grave. Nuestros hallazgos revelan que la determinación sérica de la proteína S100B, así como de la CAT constituyen herramientas útiles para la predicción de mortalidad a corto y medio plazo tras un TCE. A su vez, hemos constatado que la producción de CAT, así como de una serie de citoquinas implicadas en el proceso inflamatorio, por parte de PBMCs, pueden regularse por la administración *in vitro* de MLT.

A lo largo de las últimas décadas se han desarrollado diversos estudios científicos con el objetivo de evaluar el papel de diferentes biomarcadores en el pronóstico de pacientes con TCE grave. Como consecuencia de esta gran utilidad, estos biomarcadores también han despertado interés desde el punto de vista terapéutico, ya que la modulación de algunos de ellos podría abrir nuevas líneas de investigación en el tratamiento de pacientes con TCE con el objetivo de mejorar su resultado funcional. Por lo tanto, el abanico de posibilidades que puede ofrecer la búsqueda de nuevos biomarcadores es muy amplio, pues podrían utilizarse no sólo como predictores de mortalidad y gravedad clínica, sino también como herramientas de ayuda en el diagnóstico y evolución, así como en la efectividad del tratamiento y la recuperación tras un TCE.

5.1 Capacidad predictora de mortalidad de los biomarcadores de daño cerebral y estrés oxidativo

En nuestro estudio observacional, hemos podido determinar que los pacientes que fallecen tras sufrir un TCE grave o potencialmente grave presentan, en las primeras 48 horas tras el trauma, unos niveles séricos elevados de S100B y CAT en comparación con aquellos que



Tesis Doctoral: Laura González García

sobreviven. Estos resultados de supervivencia fueron evaluados en dos puntos temporales, a la salida de UCI y a los 6 meses desde el accidente, para valorar la mortalidad a corto y medio plazo. Nuestros resultados coinciden con lo descrito en la bibliografía, pues varios autores han constatado la utilidad de estos biomarcadores como factores predictores de mortalidad (69,111).

La proteína S100B ha sido ampliamente validada como marcador de lesión cerebral y diversos estudios han mostrado una clara relación de los niveles de este biomarcador con la gravedad clínica y pronóstico de los pacientes con TCE grave. Goyal *et al.* analizaron de forma paralela los niveles de S100B en suero (n=80) y LCR (n=138) durante un período de 6 días desde el TCE grave. Observaron que los niveles de S100B eran superiores en los pacientes con TCE grave respecto al grupo control, y tras evaluar su valor pronóstico en la supervivencia a los 6 meses, reportaron una clara asociación con la mortalidad (172). Resultados semejantes fueron observados por nuestro propio grupo de investigación cuando analizamos, en otra serie de pacientes con TCE, que aquellos que fallecían como consecuencia del TCE (bien a la salida de UCI, bien a los 6 meses del accidente) presentaban niveles superiores de S100B en suero respecto a los supervivientes (69).

Otros autores han analizado distintos periodos de mortalidad. Korfias *et al.* evaluaron en 102 pacientes con TCE grave la posible relación entre los niveles séricos de S100B y la gravedad de la lesión, el curso clínico, la supervivencia y eficacia del tratamiento. Concluyen que los niveles séricos iniciales de S100B son buenos predictores de mortalidad al mes desde el TCE grave siempre que se acompañen de la presencia de pupilas dilatadas y edad avanzada (172). De forma similar a los resultados obtenidos por Korfias *et al.*, hay que destacar que, aunque en nuestro estudio no observamos una relación entre los niveles de



Tesis Doctoral: Laura González García

S100B y el estado pupilar, sí objetivamos una asociación significativa entre la mortalidad y la concentración de S100B, siendo ésta superior en aquellos pacientes que fallecieron.

En cuanto al perfil temporal evaluado, observamos que los niveles de S100B en los pacientes que fallecen se mantienen elevados de forma persistente desde el momento del ingreso hasta pasadas 48 horas desde el traumatismo. Sin embargo, en los pacientes que sobreviven, las concentraciones de S100B descienden a partir de las 24 horas. De acuerdo con nuestros resultados, Petzold *et al.* remarcan que la concentración sérica de S100B fue significativamente mayor durante las primeras 24 horas tras la lesión primaria en los pacientes que fallecieron (173). Estos hechos pueden ser basados en que, una vez producida la lesión primaria en forma de daño tisular local y ruptura de la BHE, se desencadena la lesión secundaria que propiciará una elevación persistente de los niveles de S100B en sangre. La mayoría de los trabajos encontrados en la literatura coinciden con nuestros resultados, y revelan concentraciones séricas elevadas de S100B que se mantienen constantes en los pacientes que fallecen (69,174,175).

La NSE, otra proteína ampliamente estudiada en modelos de lesión traumática, fue definida como un biomarcador muy prometedor de gravedad en el TCE debido a su mayor especificidad por el tejido neuronal. Sin embargo, en nuestro estudio no hemos obtenido unos resultados satisfactorios. Aunque sí vimos diferencias entre los niveles de NSE en los pacientes que sobreviven y fallecen en todo el perfil temporal, éstos no fueron significativos cuando se evaluó su valor pronóstico en el resultado funcional tras el TCE. Creemos que esto puede ser debido a la baja sensibilidad y especificidad de esta proteína. Tras realizar una búsqueda bibliográfica, encontramos que los resultados publicados sobre NSE son contradictorios, pues algunos autores hablan de su posible utilización como herramienta de



Tesis Doctoral: Laura González García

cribado inicial de gravedad en el TCE grave (78), mientras que otros no han encontrado correlación con el pronóstico clínico de estos pacientes (76).

En referencia al posible efecto del estrés oxidativo sobre el resultado funcional tras el TCE, éste fue evaluado mediante la cuantificación de la CAT y MDA. Observamos un aumento de los niveles séricos de CAT y un mantenimiento de éstos, en las primeras 48 horas desde el trauma, en los pacientes que fallecen a corto y medio plazo. En los pacientes que sobreviven, los niveles de CAT también se mantienen constantes, aunque a concentraciones significativamente inferiores. La explicación de estos hallazgos radica en que una elevación en la concentración sérica de la CAT tendría lugar como consecuencia de un exceso de producción de radicales libres y de productos oxidantes en los pacientes que fallecen tras el TCE. En un intento de contrarrestar el exceso de ROS, se produce un aumento en la concentración de sustancias antioxidantes para tratar de mantener un balance oxidante-antioxidante adecuado y minimizar así los efectos perjudiciales del estrés oxidativo que postulamos.

En el estudio de Kavakli *et al.*, 54 pacientes con TCE grave fueron incluidos para evaluar la asociación entre el estrés oxidativo y los hallazgos clínicos observados tras el traumatismo. Evaluaron el estado oxidante (TOS, del inglés “*Total Oxidant Status*”) y antioxidante (TAS, del inglés “*Total Antioxidant Status*”) y calcularon el índice de estrés oxidativo, observando que los pacientes que fallecieron presentaban niveles superiores de todos estos parámetros. De forma adicional constataron una correlación positiva entre los valores de los parámetros de estrés oxidativo y la GCS, así como con varios síntomas clínicos como la presencia de náuseas, vómitos, pérdida de consciencia y convulsiones (112).



Tesis Doctoral: Laura González García

El grupo de Lorente *et al.* obtuvo resultados similares, en este caso sobre una cohorte de 100 pacientes con TCE grave. Evaluaron el estado de estrés oxidativo mediante la cuantificación de CAT; y de la LPO a través de la cuantificación de MDA, para analizar posteriormente su posible implicación en la mortalidad a los 30 días desde el TCE (111,119). Destacaron que los pacientes que fallecieron presentaban niveles superiores de CAT resaltando su utilidad como marcador predictor de supervivencia. Estos datos coinciden con los observados en el presente estudio. De forma paralela objetivaron una asociación positiva entre los niveles de CAT y la escala de gravedad APACHE II y GCS (112).

Respecto a la cuantificación de MDA como marcador de LPO, no obtuvimos resultados tan concluyentes como con la CAT, y creemos que esto puede ser debido a la baja especificidad de la técnica empleada. Varios trabajos han obtenido resultados similares, que reportan la necesidad de complementar esta determinación con otros biomarcadores de LPO como el 4-hidroxinonenal, los isoprostanos y/o las proteínas carboniladas para evaluar con mayor especificidad la contribución de la LPO en la fisiopatología del TCE (40,120,121). Sin embargo, Lorente *et al.*, sí que mencionan una clara asociación entre los niveles de MDA y la mortalidad de los pacientes tras un TCE grave (119). Cabe destacar que los reactivos empleados por este grupo de investigación difieren de los empleados en el presente estudio.

En relación a la cuantificación de ApoE, constatamos unos niveles superiores a las 48 horas desde el TCE en los pacientes que fallecen a corto y medio plazo con respecto a los supervivientes. A pesar de haber realizado una exhaustiva búsqueda bibliográfica, no hemos encontrado ningún trabajo donde se analicen los niveles séricos de ApoE en pacientes neurocríticos, pues la mayoría de los estudios se centran en analizar el genotipo



Tesis Doctoral: Laura González García

de APOE. Dado que ApoE es sintetizado, entre otras células, por astrocitos y microglía, una mayor tasa de destrucción de tales células conllevaría un aumento de su concentración en sangre periférica, así como en LCR (147), igual que en el caso de la proteína S100B. Esto explicaría que los pacientes que fallecen como consecuencia del TCE, presenten niveles superiores de ApoE a las 48 horas que aquellos que presentan un mejor pronóstico y sobreviven.

5.2 Modelos predictores de mortalidad

Tras analizar todos los biomarcadores incluidos en el estudio, concluimos que la proteína S100B y la CAT pueden predecir la mortalidad a corto y medio plazo tras un TCE grave y/o potencialmente grave. Posteriormente decidimos evaluar ambos biomarcadores de forma conjunta observando que la capacidad predictiva para evaluar la mortalidad aumentaba. Fueron los niveles de S100B y CAT a las 48 horas desde el TCE los que mejor capacidad pronóstica presentaron a la hora de analizar la mortalidad tanto a la salida de UCI como a los 6 meses desde el traumatismo. A la vista de estos resultados y de acuerdo con lo descrito en la literatura, consideramos que es más ventajoso disponer de un panel de biomarcadores complementarios que muestren diferentes perfiles temporales y que reflejen las distintas condiciones fisiopatológicas desencadenadas tras el traumatismo, algo así como una firma biológica para el TCE (64,65). Anada *et al.* exponen que la combinación de varios biomarcadores puede ayudar a estratificar a los pacientes según la gravedad del TCE y servir como herramienta complementaria a la GCS (176). Por otra parte, Gradisek *et al.* establecen que la combinación de los biomarcadores S100B y GFAP junto con las características clínicas y radiológicas al ingreso o tras el traumatismo, puede predecir con precisión la mortalidad al año de los pacientes que sufren un TCE grave (177).



Tesis Doctoral: Laura González García

Hay que destacar en este punto, que a pesar de que la mayoría de los estudios incluyen la GCS como una valiosa herramienta de predicción, en nuestro análisis no resultó incluida probablemente debido a uno de estos dos motivos: bien al tamaño muestral, o bien a que analizamos una población un tanto heterogénea en cuanto al GCS, pues no nos ceñimos exclusivamente a un GCS inferior a 8, sino a pacientes que presentaron TCE graves y/o potencialmente graves.

En nuestro estudio también se objetivó una influencia de la edad sobre el pronóstico, la cual añadía valor predictivo a la combinación de los biomarcadores S100B y CAT a las 24 horas desde el TCE para evaluar la mortalidad a medio plazo. De acuerdo con la bibliografía, la edad es una de las principales variables demográficas que se deben tener en cuenta a la hora de evaluar la supervivencia tras un TCE, y los resultados reportados hasta la fecha en diversos estudios remarcan la importancia de combinar no sólo las características clínicas de mal pronóstico con el análisis de biomarcadores, sino también las características demográficas como la edad y el sexo (178). En la actualidad, existe una herramienta de cálculo para evaluar el pronóstico tras un TCE grave, la *International Mission for Prognosis and Clinical Trials in Traumatic Brain Injury database* (IMPACT). Este modelo de cálculo se basa en la combinación de variables demográficas (edad y sexo), variables clínicas y radiológicas, y parámetros bioquímicos validados en una muestra poblacional de gran tamaño (179,180). Creemos que la inclusión de nuevos biomarcadores específicos de daño cerebral y sistémico como S100B y CAT podría mejorar la capacidad predictiva de este tipo de modelos, pero siempre sin generalizar y considerando a los pacientes de forma individual.



5.3 Papel de la melatonina como fármaco modulador de la respuesta inflamatoria y oxidativa

- Efecto de la melatonina sobre la respuesta inflamatoria

Los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro* mostraron un efecto modulador por parte de la MLT sobre la respuesta inflamatoria y sobre el estrés oxidativo en los sobrenadantes de cultivos de PBMCs de pacientes que sufrieron un TCE grave y/ o potencialmente grave.

En relación con la modulación de la respuesta inflamatoria tras el TCE, objetivamos que la MLT provoca un aumento en la producción de IL-1 β y un descenso de IL-10 en las dos muestras analizadas. Estos datos sugieren que la MLT ejerce acciones moduladoras sobre la respuesta proinflamatoria y antiinflamatoria.

Varios estudios han reportado un efecto de la MLT sobre los niveles de diferentes citoquinas. Dehghan *et al.* observaron un efecto modulador de la MLT sobre los niveles en tejido cerebral de varias citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias (163). Su modelo experimental estaba constituido por siete ratas macho que se dividieron en cinco grupos: un grupo placebo y cuatro grupos de TCE (control, administración del vehículo de MLT, administración de 5mg/kg de MLT y administración de 20 mg/kg de MLT a la primera hora y a las 24, 28 y 72 horas tras el TCE). Una vez concluido el protocolo, se midieron los niveles de citoquinas (IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-10) en las muestras de homogenizado de cerebro, de manera que en los grupos que fueron sometidos a suplementación con MLT, se observó un descenso de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , así como un incremento de IL-10 en comparación con los grupos sin suplementación (control y vehículo) (163).



Tesis Doctoral: Laura González García

El grupo de Ding *et al.* también desarrolló un modelo experimental de TCE similar al de Dehghan *et al.*, en el que constataron una disminución de los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α) en tejido cerebral, una restricción de la activación microglial y un incremento del número de neuronas viables en el grupo tratado con MLT a una concentración de 10 mg/kg. Además, también resaltaron la implicación de la vía mTOR como posible mecanismo responsable del efecto modulador de la MLT sobre la neuroinflamación (166).

En cuanto a nuestro estudio, creemos que estas discrepancias en relación a los resultados obtenidos por otros grupos de investigación pueden ser debidas a las diferencias en la ejecución de los estudios, y más concretamente a la muestra de análisis empleada en cada caso. En nuestro trabajo evaluamos el efecto de la MLT a nivel sistémico en cultivos de PBMCs de pacientes con TCE grave, mientras que en el resto de los trabajos publicados hasta la fecha se evalúa su efecto a nivel local en muestras de homogenizados de cerebro de modelos experimentales.

Tras realizar una búsqueda exhaustiva en la bibliografía, no encontramos ningún trabajo que evaluara los efectos de la MLT sobre cultivos de PBMCs de pacientes con TCE grave. Pero sí constatamos el efecto regulador de la MLT sobre la producción de citoquinas en cultivos de PBMCs en varios estudios que evaluaban la función de ésta sobre el sistema inmune. Kühlwein *et al.* analizaron la expresión de citoquinas Th1/Th2 y, al igual que en nuestro trabajo, observaron una reducción en la producción de IL-10 en los sobrenadantes de cultivos de PBMCs suplementados con MLT (181); y Sutherland *et al.* resaltan los efectos inmunomoduladores de la MLT en pacientes con asma nocturno, donde observaron un



Tesis Doctoral: Laura González García

aumento de la producción de IL-1, IL-6 y TNF- α en los sobrenadantes de cultivos de PBMCs (182).

Como podemos observar, existen diferencias en cuanto a la dosis de MLT empleada en cultivos de PBMCs, en su mayoría de 10^{-12} , 10^{-10} y 10^{-5} M; mientras que en nuestro trabajo utilizamos concentraciones de 10^{-3} M. Sin embargo, los resultados obtenidos van en consonancia con los publicados en la bibliografía, reflejando una disminución de la producción de IL-10 y un aumento de IL-1 β (181,182).

- Efecto de la melatonina sobre la respuesta oxidativa

Cuando evaluamos el efecto de la MLT sobre el estrés oxidativo, observamos que los sobrenadantes de cultivos de PBMCs suplementados presentaban niveles superiores de CAT en las dos muestras analizadas, determinando así que la MLT es una sustancia moduladora del estrés oxidativo que potencia el efecto antioxidante.

Un estudio reciente del grupo de Barlow *et al.* resalta que la MLT es un buen agente neuroprotector debido a su amplia variedad de mecanismos, destacando su efecto directo en la reducción de ROS y su acción antioxidante al aumentar las enzimas y reservas antioxidantes (169). Lorente *et al.* analizaron la correlación entre los niveles séricos de MLT y la concentración de CAT y MDA en 118 pacientes con TCE grave. Observaron que los pacientes que no sobrevivieron tenían niveles superiores de CAT, MDA y MLT; existiendo una correlación positiva entre ellos. Además, los niveles séricos de MLT eran buenos predictores de mortalidad a los 30 días desde el TCE (174).



5.4 Implicación del genotipo de APOE en el efecto modulador de la melatonina sobre la respuesta oxidativa

Cuando analizamos el efecto del genotipo de APOE en la respuesta oxidativa de la MLT, objetivamos que los pacientes que presentaban el genotipo $\epsilon 3/\epsilon 3$ eran los que menor balance de CAT presentaban. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el balance de CAT ejercido por la MLT entre ninguno de los genotipos expresados por los pacientes.

Si bien la revisión de la literatura acuerda en postular que el genotipo $\epsilon 4$ en pacientes con TCE grave está asociado a mayor vulnerabilidad a la oxidación, así como a una menor respuesta a tratamientos antioxidantes (154-156), lamentablemente no hemos podido constatar esta hipótesis en el presente estudio, dada la baja prevalencia de dicho genotipo en nuestra población de estudio, la cual a su vez coincide con la prevalencia descrita en la bibliografía (184).

Sin embargo, sí pudimos destacar una relación entre los niveles de ApoE y la CAT en sobrenadantes de cultivos de PBMCs, donde observamos que existía una correlación positiva en las muestras suplementadas con MLT. El grupo de Hayek *et al.*, observó que en ratones ApoE-deficientes se producía un incremento de la respuesta oxidativa, así como de la LPO; y remarcan que la presencia de ApoE permite regular este estado de oxidación intentando equilibrar el balance oxidante-antioxidante. De acuerdo con nuestros resultados, podemos ver cómo los niveles de CAT se correlacionan con los de ApoE, lo que sugiere una implicación de esta molécula en el efecto antioxidante desencadenado tras el TCE (185).



5.5 Limitaciones

Desde el inicio del diseño de este trabajo se intentaron controlar todas las variables confusoras y sesgos que pudieran interferir en la calidad de los resultados obtenidos, pero a pesar de ello, se encontraron algunas limitaciones que deben ser comentadas.

En primer lugar, habría que destacar la baja prevalencia de mortalidad en la población estudiada. Se consideró que una marcada variación en la distribución de los grupos de estudio podría repercutir en los resultados, pero una vez analizados y teniendo en cuenta la bibliografía reportada hasta el momento, pudimos confirmar que lo expuesto es consistente con lo descrito en la literatura sobre la tasa de mortalidad de pacientes que han sufrido un TCE grave (111,186), por lo que finalmente no consideramos que pueda suponer una alteración de los resultados obtenidos.

Otro limitante a tener en consideración fue la distribución del género. Se encontró una mayor proporción de pacientes varones, sin embargo, este comportamiento es acorde con los datos demográficos existentes en la actualidad en relación a los estudios realizados sobre el TCE grave (187,188). Además, diversos autores han demostrado que la concentración de los biomarcadores analizados en el estudio no varía en función del sexo (119,189).

Respecto a la cuantificación de MDA, creemos que, debido a la baja especificidad de la técnica empleada, es posible que los resultados no sean concluyentes, lo que nos hace pensar que sería necesario complementar esta determinación con la medición de otros productos finales de la LPO (40,120,121). Aun así, hemos de afirmar que la evaluación del estrés oxidativo mediante la cuantificación de la CAT ha resultado satisfactoria, lo que



Tesis Doctoral: Laura González García

corroborar el papel principal que juega el estrés oxidativo en la fisiopatología del TCE grave (111,190).

También podemos considerar como otra limitación el no haber cuantificado marcadores séricos en la parte del estudio *in vitro* para constatar que estos analitos estaban alterados como consecuencia del TCE y que además se relacionaban con la evolución del paciente. Pero debido a que el objetivo de ese estudio era analizar el efecto de la MLT *in vitro* sobre la producción de dichos marcadores en sobrenadantes de cultivos de PBMCs, no se planteó su análisis en suero.

5.6 Fortalezas

La principal fortaleza de este trabajo radica en su ejecución, así como en el diseño observacional y longitudinal que presenta. Además, la inclusión de varios biomarcadores para analizar su contribución en la fisiopatología a nivel local y sistémica en el TCE, hacen que el estudio sea aún más consistente. De forma secundaria, resulta interesante cómo se ha plasmado a través del segundo estudio, la valoración de una terapia *in vitro* para intentar obtener una respuesta sobre los biomarcadores analizados.

A su vez, hay que destacar el periodo de seguimiento de los pacientes en el estudio observacional. Éste se llevó a cabo en dos momentos, con un primer punto de evaluación a la salida de UCI y un segundo punto a los 6 meses. Esto nos permitió obtener no sólo una valoración precoz de la evolución de los pacientes, sino también una valoración funcional y de supervivencia a medio plazo.



Tesis Doctoral: Laura González García

Otro punto a favor es la valoración del perfil temporal de los biomarcadores analizados. Gracias a la realización de extracciones de muestras más allá de las 24 horas tras el TCE, se pudo optimizar la información aportada por los biomarcadores en ambos trabajos. Diversos estudios han constatado que la muestra óptima para la valoración de biomarcadores es una vez transcurridas las 24 horas, pues hasta entonces el organismo presenta una respuesta exacerbada y una vez superada la misma, es cuando podemos valorar cómo está respondiendo cada individuo (172,191,192). Esta afirmación coincidiría con los resultados observados en el presente estudio, pues hemos observado que la muestra que presenta mejor capacidad pronóstica es la de las 48 horas.

Otra fortaleza de este trabajo se basa en la selección de muestras. Dado que las muestras extraídas a partir de las vías de los pacientes a menudo presentan hemólisis, con objeto de trabajar con una muestra homogénea y completa, en la que todos los pacientes tuviesen valores fiables de NSE, descartamos para el estudio aquellos pacientes que presentaron alguna de las extracciones con un índice hemolítico superior a 25. Esto también supuso una mayor demora en el tiempo de reclutamiento de los pacientes candidatos. Hay que destacar que la mayoría de la bibliografía consultada al respecto no hace referencia ni tiene en consideración el efecto de la hemólisis sobre la cuantificación de NSE, o al menos no se especifica si las muestras que presentaron hemólisis fueron o no descartadas (177,193–195).

También hay que señalar la restricción que se tuvo en cuanto a la selección de pacientes. Se excluyeron aquellos con una puntuación en la escala AIS > 2 en dos órganos diferentes del cerebro, con el fin de evitar la interferencia de una liberación incrementada de cualquiera de los biomarcadores analizados por localizaciones diferentes al cerebro



Tesis Doctoral: Laura González García

(72,73,91–93). También se excluyeron aquellos pacientes con presencia de otras patologías previas concurrentes a nivel del SNC, que pudieran artefactar la evaluación del resultado final.

Por último, resaltar que las determinaciones de los niveles de los biomarcadores estudiados, así como la realización e interpretación de las pruebas de neuroimagen, fueron llevadas a cabo por los especialistas correspondientes, analista y radiólogo, de manera ciega, sin tener conocimiento alguno sobre el estado o situación del paciente, lo cual exonera a este estudio de sesgos de interés.

5.7 Aplicabilidad del estudio

En base a los resultados obtenidos en el estudio observacional y una vez destacado el papel de S100B y CAT como predictores de mortalidad tras el TCE grave, consideramos que la cuantificación de ambos biomarcadores podría ser efectiva y de gran ayuda en la valoración de la gravedad y pronóstico de estos pacientes. Acompañando esta valoración analítica junto con las variables demográficas, clínicas y radiológicas que se pueden obtener de la anamnesis de estos pacientes, consideramos que se añadiría valor predictivo a la hora de evaluar el estado y evolución del paciente con TCE grave y/o potencialmente grave.

En relación al ensayo *in vitro*, ponemos de manifiesto el papel modulador que ejerce la MLT sobre la respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo en sobrenadantes de cultivos de PBMCs de pacientes con TCE grave. Creemos que la MLT podría aportar nuevas estrategias de tratamiento para el TCE, aliviando el daño encefálico y minimizando su morbimortalidad. Esta terapia podría ser utilizada para optimizar el tratamiento y minimizar las secuelas del TCE grave.



VI. CONCLUSIONES

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



Tesis Doctoral: Laura González García

1. La proteína S100B, CAT y ApoE se elevan de manera patológica, en las primeras 48 horas tras un TCE grave y/o potencialmente grave, en aquellos pacientes que fallecen a corto y medio plazo.
2. La proteína S100B y la CAT pueden ser predictores de mortalidad a corto y medio plazo tras un TCE grave. Concretamente, los niveles de S100B y CAT a las 48 horas desde el TCE son los que mejor capacidad pronóstica presentan.
3. La edad también es un factor de riesgo en los pacientes que sufren un TCE. Ésta junto con los niveles de S100B y CAT a las 24 horas, presentan una mayor capacidad predictora de mortalidad a corto y medio plazo tras un TCE grave.
4. La MLT ejerce un efecto modulador sobre la respuesta inflamatoria provocando un aumento en la producción de IL-1 β y un descenso de IL-10 en los sobrenadantes de cultivos de PBMCs de pacientes que sufren un TCE grave y/o potencialmente grave.
5. La MLT ejerce un efecto modulador sobre la respuesta oxidativa provocando un aumento de la CAT en los sobrenadantes de cultivos de PBMCs de pacientes que sufren un TCE grave y/o potencialmente grave.
6. Existe una correlación entre los niveles de CAT y ApoE en los sobrenadantes de cultivos de PBMCs de pacientes que sufren un TCE grave, lo que sugiere una implicación de ApoE en el efecto antioxidante desencadenado tras el TCE.



VII. SIGLAS Y ACRÓNIMOS

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



Tesis Doctoral: Laura González García

AIS: Abbreviated Injury Scale

AMPA: Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

APACHE: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation

ApoE: Apolipoproteína E

ATP: Adenosín Trifosfato

AUC: Area Under the Curve

BHE: Barrera Hematoencefálica

CAT: Capacidad antioxidante total

CRE: Concentración Equivalente a los μ M de Reductores de Cobre

DAMPs: Damage-Associated Molecular Patterns

DE: Desviación Estándar

EA: Enfermedad de Alzheimer

ECLIA: Electrochemiluminescence

ELISA: Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay

FSC: Flujo Sanguíneo Cerebral

GBD: Global Burden of Disease Study



Tesis Doctoral: Laura González García

GCS: Glasgow Coma Scale

GFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial

GOS: Glasgow Outcome Scale

GOSE: Extended Glasgow Outcome Scale

HR: Hazard Ratio

HRT: Hospital de Rehabilitación y Traumatología

HTEC: Hipertensión Endocraneal

IC: Intervalo de Confianza

IMPACT: International Mission for Prognosis and Clinical Trials in Traumatic Brain Injury

ISS: Injury Severity Scale

LCR: Líquido Cefalorraquídeo

LPO: Peroxidación lipídica

MDA: Malondialdehído

ME: Muerte Encefálica

MLT: Melatonina

NISS: New Injury Severity Score



Tesis Doctoral: Laura González García

NMDA: N-metil-D-aspartato

NSE: Enolasa Neuroespecífica

PBMCs: Células Mononucleares de Sangre Periférica

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

PHA: Fitohemaglutinina

PIC: Presión Intracraneal

RETRAUCI: Registro de Trauma en UCI

RNS: Reactive Nitrogen Species

ROC: Receiver Operating Characteristic

ROS: Reactive Oxigen Species

SET: Single Electron Transfer

SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome

SNC: Sistema Nervioso Central

TAC: Tomografía Axial Computarizada

TBA: Ácido Tiobarbitúrico



Tesis Doctoral: Laura González García

TBARS: Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico

TCDB: Traumatic Coma Data Bank

TCE: Traumatismo Craneoencefálico

TNF- α : Tumor Necrosis Factor α

UAE: Concentración Equivalente de mM de Ácido Úrico

VLDLs: Very Low-Density Lipoprotein

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



Tesis Doctoral: Laura González García

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

VIII. BIBLIOGRAFÍA

ÁMBITO- PREFIJO

GEISER

Nº registro

00008745e2000017666

CSV

GEISER-99c2-c78d-4c0a-4d2a-8376-9187-2202-5d3d

DIRECCIÓN DE VALIDACIÓN

<https://sede.administracionespublicas.gob.es/valida>

FECHA Y HORA DEL DOCUMENTO

27/03/2020 11:54:50 Horario peninsular



Tesis Doctoral: Laura González García

1. Dewan MC, Rattani A, Gupta S, Baticulon RE, Hung Y-C, Punchak M, et al. Estimating the global incidence of traumatic brain injury. *J Neurosurg.* 2018;4:1–18.
2. Abelson-Mitchell N. Epidemiology and prevention of head injuries: Literature review. *J Clin Nurs.* 2008;17:46–57.
3. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth.* 2007;99:4–9.
4. Hukkelhoven CWPM, Steyerberg EW, Rampen AJJ, Farace E, Habbema JDF, Marshall LF, et al. Patient age and outcome following severe traumatic brain injury: an analysis of 5600 patients. *J Neurosurg.* 2003;99:666–73.
5. Brazinova A, Rehorcikova V, Taylor MS, Buckova V, Majdan M, Psota M, et al. Epidemiology of Traumatic Brain Injury in Europe: A Living Systematic Review. *J Neurotrauma.* 2016;33:1–65.
6. Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir (Wien).* 2006;148:255–67.
7. Majdan M, Plancikova D, Brazinova A, Rusnak M, Nieboer D, Feigin V, et al. Epidemiology of traumatic brain injuries in Europe: a cross-sectional analysis. *Lancet Public Heal.* 2016;1:76–83.
8. Peeters W, van den Brande R, Polinder S, Brazinova A, Steyerberg EW, Lingsma HF, et al. Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochir (Wien).* 2015;157:1683–96.
9. Chico-Fernández M, Llompарт-Pou JA, Guerrero-López F, Sánchez-Casado M, García-Sáez I, Mayor-García MD, et al. Epidemiología del trauma grave en España. REgistro de TRAuma en UCI (RETRAUCI). Fase piloto. *Med Intensiva.* 2016;40:327–47.
10. Klauber MR, Barrett-Connor E, Marshall LF, Bowers SA. The epidemiology of head injury: a prospective study of an entire community-San Diego County, California, 1978. *Am J Epidemiol.* 1981;113:500–9.



Tesis Doctoral: Laura González García

11. Bárcena-Orbe A, Rodríguez-Arias C, Rivero-Martín B, Cañizal-García J, Mestre-Moreiro C, Pérez J, et al. Revisión del traumatismo craneoencefálico. In: Neurocirugía. 2006. p. 495–518.
12. Rosenfeld J V, Maas AI, Bragge P, Morganti-Kossmann C, Rey G, Manley T, et al. Early management of severe traumatic brain injury. Lancet. 2012;380:1088–98.
13. Gaddam SSK, Buell T, Robertson CS. Systemic manifestations of traumatic brain injury. In: Handbook of clinical neurology. 2015. p. 205–18.
14. McKee AC, Daneshvar DH. The neuropathology of traumatic brain injury. In: Handbook of Clinical Neurology. 2016. p. 68.
15. McQuillan KA, Thurman PA. Traumatic Brain Injuries [Internet]. [cited 2019 Mar 21]. Available from: <https://musculoskeletalkey.com/traumatic-brain-injuries/>
16. Murillo, F., Gilli, M., Muñoz M. Traumatismo craneoencefálico grave. In Springer Verlag Ibérica; 1996. p. 1–9.
17. Rodríguez-Boto G, Rivero-Garvía M, Gutiérrez-González R, Márquez-Rivas J. Conceptos básicos sobre la fisiopatología cerebral y la monitorización de la presión intracraneal. Neurología. 2015;30:16–22.
18. Fuller G, Hasler RM, Mealing N, Lawrence T, Woodford M, Juni P, et al. The association between admission systolic blood pressure and mortality in significant traumatic brain injury: A multi-centre cohort study. Injury. 2014;45:612–7.
19. McHugh GS, Engel DC, Butcher I, Steyerberg EW, Lu J, Mushkudiani N, et al. Prognostic Value of Secondary Insults in Traumatic Brain Injury: Results from The IMPACT Study. J Neurotrauma. 2007;24:287–93.
20. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. Neuroscience. 2004;129:1019–27.



Tesis Doctoral: Laura González García

21. The Brain Trauma Foundation, The American Association of Neurological Surgeons, The Joint Section on Neurotrauma and Critical Care. Guidelines for the Management of Severe Traumatic Brain Injury. Vol. 24. Mary Ann Liebert, Inc; 2007.
22. Sahuquillo J, Poca M, Rubio E. Monitorización de la presión intracraneal. Metodología en el paciente con patología neurológica aguda. *Neurol Crit.* 2008;2:57–78.
23. Wells AJ, Hutchinson PJ. The management of traumatic brain injury. *Neurosurgery.* 2018;36:613–20.
24. Alted López E, Bermejo Aznárez S, Chico Fernández M. Actualizaciones en el manejo del traumatismo craneoencefálico grave. *Med Intensiva.* 2009;33:16–30.
25. McGinn MJ, Povlishock JT. Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Neurosurg Clin N Am.* 201;4:3362–79.
26. Blennow K, Hardy J, Zetterberg H. The Neuropathology and Neurobiology of Traumatic Brain Injury. *Neuron.* 2012;76.
27. Human T, Cook AM, Anger B, Bledsoe K, Castle A, Deen D, et al. Treatment of Hyponatremia in Patients with Acute Neurological Injury. *Neurocrit Care.* 2017;27:242–8.
28. Selassie AW, Fakhry SM, Ford DW. Population-Based Study of the Risk of In-Hospital Death After Traumatic Brain Injury: The Role of Sepsis. *J Trauma Inj Infect Crit Care.* 2011;71:1226–34.
29. Reinert M, Khaldi A, Zauner A, Doppenberg E, Choi S, Bullock R. High extracellular potassium and its correlates after severe head injury: relationship to high intracranial pressure. *Neurosurg Focus.* 2000;8:10.
30. Katayama Y, Becker DP, Tamura T, Hovda DA. Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury. *J Neurosurg.* 1990;73:889–900.



Tesis Doctoral: Laura González García

31. Gopinath SP, Valadka AB, Goodman JC, Robertson CS. Extracellular Glutamate and Aspartate in Head Injured Patients. In: Brain Edema XI. Springer Vienna; 2000. p. 437–8.
32. Weber JT. Altered Calcium Signaling Following Traumatic Brain Injury. *Front Pharmacol.* 2012;3:60.
33. Peng T-I, Jou M-J. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1201:183–8.
34. Shukla V, Mishra SK, Pant HC. Oxidative stress in neurodegeneration. *Adv Pharmacol Sci.* 2011;8.
35. Rodríguez-Rodríguez A, Egea-Guerrero JJ, Murillo-Cabezas F, Carrillo-Vico A. Oxidative Stress In Traumatic Brain Injury. *Curr Med Chem.* 2014;21:1201–11.
36. Kelley EE, Khoo NKH, Hundley NJ, Malik UZ, Freeman BA, Tarpey MM. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radic Biol Med.* 2010;48:493–8.
37. Mustafa AG, Alshboul OA. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Neurosciences.* 2013;18:222–34.
38. Anthonymuthu TS, Kenny EM, Lamade AM, Kagan VE, Bayır H. Oxidized phospholipid signaling in traumatic brain injury. *Free Radic Biol Med.* 2018;124:493–503.
39. Reed TT. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radic Biol Med.* 2011;51:1302–19.
40. Butterfield DA, Reed TT. Lipid peroxidation and tyrosine nitration in traumatic brain injury: Insights into secondary injury from redox proteomics. *Proteomics Clin Appl.* 2016;10:1191–204.



Tesis Doctoral: Laura González García

41. Ransohoff RM, Perry VH. Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:119–45.
42. Campbell IL. Cytokine-mediated inflammation and signaling in the intact central nervous system. *Prog Brain Res.* 2001;132:481–98.
43. Rabchevsky AG, Streit WJ. Role of microglia in postinjury repair and regeneration of the CNS. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev.* 1998;4:187–92.
44. Laird MD, Vender JR, Dhandapani KM. Opposing roles for reactive astrocytes following traumatic brain injury. *Neurosignals.* 2008;16:154–64.
45. Correale J, Villa A. The neuroprotective role of inflammation in nervous system Injuries. *J Neurol.* 2004;251:1304–16.
46. Marshall LF, Toole BM, Bowers SA. The National Traumatic Coma Data Bank. *J Neurosurg.* 1983;59:285–8.
47. Marshall LF, Marshall SB, Klauber MR, Van Berkum Clark M, Eisenberg H, Jane JA, et al. The diagnosis of head injury requires a classification based on computed axial tomography. *J Neurotrauma.* 1992;287–92.
48. Marshall LFLF, Gautille T, Klauber MRMR, Eisenberg HMHM, Jane JAJA, Luerssen TGTG, et al. The outcome of severe closed head injury. *J Neurosurg.* 1991;15:28–36.
49. Marshall LF, Marshall SB, Klauber MR, Van Berkum Clark M, Eisenberg H, Luerssen TG, et al. A new classification of head injury based on computerized tomography. *J Neurosurg.* 1991;75.
50. Maas AIR, Hukkelhoven CWPM, Marshall LF, Steyerberg EW. Prediction of outcome in traumatic brain injury with computed tomographic characteristics: a comparison between the computed tomographic classification and combinations of computed tomographic predictors. *Neurosurgery.* 2005;57:1173–82.



Tesis Doctoral: Laura González García

51. Servadei F, Murray GD, Penny K, Teasdale GM, Dearden M, Iannotti F, et al. The value of the computed tomographic scan in clinical studies of moderate and severe head injury. European Brain Injury Consortium. Neurosurgery. 2000;46:75–7.
52. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. Lancet. 1974;2:81–4.
53. Civil ID, Schwab CW. The Abbreviated Injury Scale, 1985 revision: a condensed chart for clinical use. J Trauma. 1988;28:87–90.
54. Copes WS, Sacco WJ, Champion HR, Bain LW, Gann DS, Mackenzie E, et al. Progress in characterizing anatomic injury. In: Association for the Advancement of Automotive Medicine (AAAM), Conference, 33rd, 1989, Baltimore, Maryland, USA. 1989.
55. Lavoie A, Moore L, LeSage N, Liberman M, Sampalis JS. The New Injury Severity Score: a more accurate predictor of in-hospital mortality than the Injury Severity Score. J Trauma. 2004;56:1312–20.
56. Osler T, Baker SP, Long W. A modification of the injury severity score that both improves accuracy and simplifies scoring. J Trauma. 1997;43:922–5.
57. Eid HO, Abu-Zidan FM. New Injury Severity Score Is a Better Predictor of Mortality for Blunt Trauma Patients Than the Injury Severity Score. World J Surg. 2015;39:165–71.
58. Chawda M., Hildebrand F, Pape H., Giannoudis P. Predicting outcome after multiple trauma: which scoring system? Injury. 2004;35:347–58.
59. McMillan T, Wilson L, Ponsford J, Levin H, Teasdale G, Bond M. The Glasgow Outcome Scale — 40 years of application and refinement. Nat Rev Neurol. 2016;12:477–85.
60. Papa L, Robinson G, Oli M, Pineda J, Demery J, Brophy G, et al. Use of biomarkers for diagnosis and management of traumatic brain injury patients. Expert Opin Med Diagn. 2008;2:937–45.



Tesis Doctoral: Laura González García

61. Revuelto-Rey J, Egea-Guerrero JJ, Muñoz-Sánchez MA, Murillo-Cabezas F. La microdiálisis cerebral en el ámbito clínico actual. *Med Intensiva*. 2012;36:213–9.
62. Neher MD, Keene CN, Rich MC, Moore HB, Stahel PF. Serum Biomarkers for Traumatic Brain Injury. *South Med J*. 2014;107:248–55.
63. Marchi N, Cavaglia M, Fazio V, Bhudia S, Hallene K, Janigro D. Peripheral markers of blood–brain barrier damage. *Clin Chim Acta*. 2004;342:1–12.
64. Mondello S, Hayes RL. Biomarkers. In: *Handbook of clinical neurology*. 2015. p. 245–65.
65. Thelin EP, Zeiler FA, Ercole A, Mondello S, Büki A, Bellander BM, et al. Serial sampling of serum protein biomarkers for monitoring human traumatic brain injury dynamics: A systematic review. *Front Neurol*. 2017;8:1–23.
66. Childs C, Martínez-Morillo E, Wai AP, Zu MM, Diamandis A, Diamandis EP. Exploring the relationship between serum biomarkers, acute intracerebral changes and outcome after severe traumatic brain injury (TBI). *Clin Chem Lab Med*. 2013;51:195–7.
67. Brea D, Sobrino T, Blanco M, Cristobo I, Rodríguez-González R, Rodríguez-Yañez M, et al. Temporal profile and clinical significance of serum neuron-specific enolase and S100 in ischemic and hemorrhagic stroke. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47:1513–8.
68. Egea-Guerrero JJ, Revuelto-Rey J, Murillo-Cabezas F, Muñoz-Sánchez MA, Vilches-Arenas A, Sánchez-Linares P, et al. Accuracy of the S100 β protein as a marker of brain damage in traumatic brain injury. *Brain Inj*. 2012;26:76–82.
69. Rodríguez-Rodríguez A, Egea-Guerrero JJ, León-Justel A, Gordillo-Escobar E, Revuelto-Rey J, Vilches-Arenas Á, et al. Role of S100B protein in urine and serum as an early predictor of mortality after severe traumatic brain injury in adults. *Clin Chim Acta*. 2012;414:228–33.



Tesis Doctoral: Laura González García

70. Krohn M, Dreßler J, Bauer M, Schober K, Franke H, Ondruschka B. Immunohistochemical Investigation of S100 and NSE in Cases of Traumatic Brain Injury and Its Application for Survival Time Determination. *J Neurotrauma*. 2015;32:430–40.
71. Kaiser E, Kuzmits R, Pregant P, Burghuber O, Worofka W. Clinical biochemistry of neuron specific enolase. *Clin Chim Acta*. 1989;183:13–31.
72. Marangos PJ, Campbell IC, Schmechel DE, Murphy DL, Goodwin FK. Blood platelets contain a neuron-specific enolase subunit. *J Neurochem*. 1980;34:1254–8.
73. Mussack T, Biberthaler P, Kanz KG, Heckl U, Gruber R, Linsenmaier U, et al. Immediate S-100B and neuron-specific enolase plasma measurements for rapid evaluation of primary brain damage in alcohol-intoxicated, minor head-injured patients. *Shock*. 2002;18:395–400.
74. Sieber M, Dreßler J, Franke H, Pohlers D, Ondruschka B. Post-mortem biochemistry of NSE and S100B: A supplemental tool for detecting a lethal traumatic brain injury? *J Forensic Leg Med*. 2018;55:65–73.
75. Woertgen C, Rothoerl RD, Brawanski A. Neuron-Specific Enolase Serum Levels After Controlled Cortical Impact Injury in the Rat. *J Neurotrauma*. 2001;18:569–73.
76. Raabe A, Grolms C, Keller M, Döhnert J, Sorge O, Seifert V. Correlation of computed tomography findings and serum brain damage markers following severe head injury. *Acta Neurochir (Wien)*. 1998;140:787–91.
77. Nygaard A, Langbakk B, Romner B. Neuron-specific enolase concentrations in serum and cerebrospinal fluid in patients with no previous history of neurological disorder. *Scand J Clin Lab Invest*. 1998;58:183–6.



Tesis Doctoral: Laura González García

78. Cheng F, Yuan Q, Yang J, Wang W, Liu H. The prognostic value of serum neuron-specific enolase in traumatic brain injury: Systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9
79. Berger RP, Pierce MC, Wisniewski SR, Adelson PD, Clark RSB, Ruppel RA, et al. Neuron-specific enolase and S100B in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in infants and children. *Pediatrics*. 2002;109:31.
80. Moore BW. A soluble protein characteristic of the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun*. 1965;19:739–44.
81. Isobe T, Ishioka N, Masuda T, Takahashi Y, Ganno S, Okuyama T. A rapid separation of S100 subunits by high performance liquid chromatography: the subunit compositions of S100 proteins. *Biochem Int*. 1983;6:419–26.
82. Chan RWY, Graham CA, Rainer TH, Lam NYL, Chiu RWK, Chik K-W, et al. Use of a Bone Marrow Transplantation Model System to Demonstrate the Hematopoietic Origin of Plasma S100B mRNA. *Clin Chem*. 2007;53:1874–6.
83. Molina R, Navarro J, Filella X, Castel T, Ballesta AM. S-100 Protein Serum Levels in Patients with Benign and Malignant Diseases: False-Positive Results Related to Liver and Renal Function. *Tumor Biol*. 2002;23:39–44.
84. Heizmann CW, Fritz G, Schäfer BW. S100 proteins: structure, functions and pathology. *Front Biosci*. 2002;7:1356–68.
85. Ahlemeyer B, Beier H, Semkova I, Schaper C, Kriegstein J. S-100B protects cultured neurons against glutamate- and staurosporine-induced damage and is involved in the antiapoptotic action of the 5 HT(1A)-receptor agonist, Bay x 3702. *Brain Res*. 2000;858:121–8.
86. Nishiyama H, Knöpfel T, Endo S, Itohara S. Glial protein S100B modulates long-term neuronal synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99:4037–42.
87. Kleindienst A, Grünbeck F, Buslei R, Emtmann I, Buchfelder M. Intraperitoneal



Tesis Doctoral: Laura González García

- treatment with S100B enhances hippocampal neurogenesis in juvenile mice and after experimental brain injury. *Acta Neurochir (Wien)*. 2013;155:1351–60.
88. Sorci G, Bianchi R, Riuzzi F, Tubaro C, Arcuri C, Giambanco I, et al. S100B Protein, a Damage-Associated Molecular Pattern Protein in the Brain and Heart, and Beyond. *Cardiovasc Psychiatry Neurol*. 2010;2010:1–13.
89. Winningham-Major F, Staecker JL, Barger SW, Coats S, Van Eldik LJ. Neurite extension and neuronal survival activities of recombinant S100 beta proteins that differ in the content and position of cysteine residues. *J Cell Biol*. 1989;109:3063–71.
90. Van Eldik LJ, Christie-Pope B, Bolin LM, Shooter EM, Whetsell WO. Neurotrophic activity of S-100 beta in cultures of dorsal root ganglia from embryonic chick and fetal rat. *Brain Res*. 1991;542:280–5.
91. Hidaka H, Endo T, Kawamoto S, Yamada E, Umekawa H, Tanabe K, et al. Purification and characterization of adipose tissue S-100b protein. *J Biol Chem*. 1983;258:2705–9.
92. Eckert RL, Broome A-M, Ruse M, Robinson N, Ryan D, Lee K. S100 Proteins in the epidermis. *J Invest Dermatol*. 2004;123:23–33.
93. Cheong KA, Noh M, Kim C-H, Lee A-Y. S100B as a potential biomarker for the detection of cytotoxicity of melanocytes. *Exp Dermatol*. 2014;23:165–71.
94. Schültke E, Sadanand V, Kelly ME, Griebel RW, Juurlink BHJ. Can admission S-100beta predict the extent of brain damage in head trauma patients? *Can J Neurol Sci*. 2009;36:612–6.
95. Bloomfield SM, McKinney J, Smith L, Brisman J. Reliability of S100B in predicting severity of central nervous system injury. *Neurocrit Care*. 2007;6:121–38.
96. Woertgen C, Rothoerl RD, Brawanski A. Early S-100B serum level correlates to quality



Tesis Doctoral: Laura González García

- of life in patients after severe head injury. *Brain Inj.* 2002;16:807–16.
97. Raabe A, Grolms C, Sorge O, Zimmermann M, Seifert V. Serum S-100B protein in severe head injury. *Neurosurgery.* 1999;45:477–83.
98. Pleines UE, Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Joller H, Trentz O, Kossmann T. S-100B Reflects the Extent of Injury and Outcome, Whereas Neuronal Specific Enolase Is a Better Indicator of Neuroinflammation in Patients With Severe Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma.* 2001;18:491–8.
99. Raabe A, Seifert V. Protein S-100B as a serum marker of brain damage in severe head injury: preliminary results. *Neurosurg Rev.* 2000;23:136–8.
100. Mondello S, Papa L, Buki A, Bullock MR, Czeiter E, Tortella FC, et al. Neuronal and glial markers are differently associated with computed tomography findings and outcome in patients with severe traumatic brain injury: A case control study. *Crit Care.* 2011;15:56.
101. Ansari MA, Roberts KN, Scheff SW. A Time Course of Contusion-Induced Oxidative Stress and Synaptic Proteins in Cortex in a Rat Model of TBI. *J Neurotrauma.* 2008;25:513–26.
102. Tramutola A, Lanzillotta C, Perluigi M, Butterfield DA. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Res Bull.* 2017;133:88–96.
103. Faria A, Persaud SJ. Cardiac oxidative stress in diabetes: Mechanisms and therapeutic potential. *Pharmacol Ther.* 2017;172:50–62.
104. Gill JG, Piskounova E, Morrison SJ. Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2016;81:163–75.
105. Perez C, Grupo de trabajo de la Sociedad Española de Epidemiología. Medida del impacto en salud de las lesiones por tráfico en España. *Jornadas sobre Prevención de lesiones y promoción de la seguridad.* 2009.



Tesis Doctoral: Laura González García

106. Saha SK, Lee S Bin, Won J, Choi HY, Kim K, Yang G-M, et al. Correlation between Oxidative Stress, Nutrition, and Cancer Initiation. *Int J Mol Sci.* 2017;18:1544.
107. Maulik SK, Kumar S. Oxidative stress and cardiac hypertrophy: a review. *Toxicol Mech Methods.* 2012;22:359–66.
108. Nayak C, Nayak D, Bhat S, Raja A, Rao A. Relationship between neurological outcome and early oxidative changes in erythrocytes in head injury patients. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45.
109. Petronilho F, Feier G, De Souza B, Guglielmi C, Constantino LS, Walz R, et al. Oxidative stress in brain according to traumatic brain injury intensity. *J Surg Res.* 2010;164:316–20.
110. Quintanar Escorza MA, Calderón Salinas JV. La capacidad antioxidante total. Bases y aplicaciones. *Rev Educ Bioquímica.* 2009;28:89–101.
111. Lorente L, Martín MM, Almeida T, Abreu-González P, Ramos L, Argueso M, et al. Total antioxidant capacity is associated with mortality of patients with severe traumatic brain injury. *BMC Neurol.* 2015;15:1–7.
112. Sahin Kavakli H, Erel O, Karakayali O, Neselioglu S, Tanriverdi F, Coskun F, et al. Oxidative stress in isolated blunt traumatic brain injury. *Sci Res Essays.* 2010;5:2832–6.
113. Draper HH, Hadley M. A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde. *Xenobiotica.* 1990;20:901–7.
114. Weitner T, Inić S, Jablan J, Gabričević M, Domijan A-M. Spectrophotometric Determination of Malondialdehyde in Urine Suitable for Epidemiological Studies. *Croat Chem Acta.* 2016;89:133–9.
115. Das BS, Mohanty S, Mishra SK, Patnaik JK, Satpathy SK, Mohanty D, et al. Increased cerebrospinal fluid protein and lipid peroxidation products in patients with cerebral malaria. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1991;85:733–4.



Tesis Doctoral: Laura González García

116. Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D, Milzani A. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clin Chem.* 2006;52:601–23.
117. Hu S, Zheng L, Chen B, Xie J, Yang C. The role of the leukocytes in pathogenesis of secondary brain injury. *Hunan Med Univ.* 1999;24:56–8.
118. Kasprzak HA, Woźniak A, Drewa G, Woźniak B. Enhanced Lipid Peroxidation Processes in Patients after Brain Contusion. *J Neurotrauma.* 2001;18:793–7.
119. Lorente L, Martín MM, Abreu-González P, Ramos L, Argueso M, Cáceres JJ, et al. Association between serum malondialdehyde levels and mortality in patients with severe brain trauma injury. *J Neurotrauma.* 2015;32:1–6.
120. Hohl A, Gullo J da S, Silva CCP, Bertotti MM, Felisberto F, Nunes JC, et al. Plasma levels of oxidative stress biomarkers and hospital mortality in severe head injury: A multivariate analysis. *J Crit Care.* 2012;27:523–4.
121. Scholpp J, Schubert JK, Miekisch W, Noeldge-Schomburg GFE. Lipid peroxidation early after brain injury. *J Neurotrauma.* 2004;21:667–77.
122. Shi H, Hu X, Leak RK, Shi Y, An C, Suenaga J, et al. Demyelination as a rational therapeutic target for ischemic or traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2015;272:17–25.
123. Woodcock T, Morganti-Kossmann MC. The role of markers of inflammation in traumatic brain injury. *Front Neurol.* 2013;4:18.
124. Yousefzadeh-Chabok S, Dehnadi Moghaddam A, Kazemnejad-Leili E, Saneei Z, Hosseinpour M, Kouchakinejad-Eramsadati L, et al. The Relationship Between Serum Levels of Interleukins 6, 8, 10 and Clinical Outcome in Patients With Severe Traumatic Brain Injury. *Arch trauma Res.* 2015;8:18357.
125. Whalen MJ, Carlos TM, Kochanek PM, Wisniewski SR, Bell MJ, Clark RS, et al. Interleukin-8 is increased in cerebrospinal fluid of children with severe head injury. *Crit Care Med.* 2000;28:929–34.



Tesis Doctoral: Laura González García

126. Stein DM, Lindel AL, Murdock KR, Kufera JA, Menaker J, Scalea TM. Use of Serum Biomarkers to Predict Secondary Insults Following Severe Traumatic Brain Injury. Shock. 2012;37:563–8.
127. Ziebell JM, Morganti-Kossmann MC. Involvement of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines in the pathophysiology of traumatic brain injury. Neurotherapeutics. 2010;7:22.
128. Brough D, Tyrrell PJ, Allan SM. Regulation of interleukin-1 in acute brain injury. Trends Pharmacol Sci. 2011;32:617–22.
129. Lucas S-M, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. Br J Pharmacol. 2006;147:232–40.
130. Chiaretti A, Genovese O, Aloe L, Antonelli A, Piastra M, Polidori G, et al. Interleukin 1 β and interleukin 6 relationship with paediatric head trauma severity and outcome. Child's Nerv Syst. 2005;21:185–93.
131. Kamm K, VanderKolk W, Lawrence C, Jonker M, Davis AT. The Effect of Traumatic Brain Injury Upon the Concentration and Expression of Interleukin-1B and Interleukin-10 in the Rat. J Trauma Inj Infect Crit Care. 2006;60:152–7.
132. Zhu T, Yao Z, Yuan H, Lu B, Yang S. Changes of interleukin-1 beta, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 in brain and plasma after brain injury in rats. Chinese J Traumatol. 2004;7:32–5.
133. Hasturk AE, Yilmaz ER, Turkoglu E, Kertmen H, Horasanli B, Hayirli N, et al. Therapeutic evaluation of interleukin 1-beta antagonist Anakinra against traumatic brain injury in rats. Turkish J Trauma Emerg Surg. 2015;21:1–8.
134. Lu K-T, Wang Y-W, Yang J-T, Yang Y-L, Chen H-I. Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons. J Neurotrauma. 2005;22:885–95.



Tesis Doctoral: Laura González García

135. Li T, Li Y, Song D. The expression of IL-1 β can deteriorate the prognosis of nervous system after spinal cord injury. *Int J Neurosci*. 2018;128:778–82.
136. Marini H, Altavilla D, Bellomo M, Adamo EB, Marini R, Laureanti F, et al. Modulation of IL-1 beta gene expression by lipid peroxidation inhibition after kainic acid-induced rat brain injury. *Exp Neurol*. 2004;188:178–86.
137. Ferreira LCB, Regner A, Miotto KDL, Moura S de, Ikuta N, Vargas AE, et al. Increased levels of interleukin-6, -8 and -10 are associated with fatal outcome following severe traumatic brain injury. *Brain Inj*. 2014;28:1311–6.
138. Gopcevic A, Mazul-Sunko B, Marout J, Sekulic A, Antoljak N, Siranovic M, et al. Plasma Interleukin-8 as a Potential Predictor of Mortality in Adult Patients with Severe Traumatic Brain Injury. *Tohoku J Exp Med*. 2007;211:387–93.
139. Kossmann T, Stahel PF, Lenzlinger PM, Redl H, Dubs RW, Trentz O, et al. Interleukin-8 released into the cerebrospinal fluid after brain Injury is associated with blood–brain barrier dysfunction and nerve growth factor production. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997;17:280–9.
140. Mussack T, Biberthaler P, Kanz K-G, Wiedemann E, Gippner-Steppert C, Mutschler W, et al. Serum S-100B and interleukin-8 as predictive markers for comparative neurologic outcome analysis of patients after cardiac arrest and severe traumatic brain injury. *Crit Care Med*. 2002;30:2669–74.
141. Seekamp A, van Griensven M, Lehmann U, Molituris U, Hildebrandt F, Pohlemann T. Serum IL-6, IL-8 and IL-10 Levels in Multiple Trauma Compared to Traumatic Brain Injury and Combined Trauma. *Eur J Trauma*. 2002;28:183–9.
142. Strle K, Zhou JH, Shen WH, Broussard SR, Johnson RW, Freund GG, et al. Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol*. 2001;21:427–49.
143. Schneider Soares FM, Menezes de Souza N, Libório Schwarzbold M, Paim Diaz A,



Tesis Doctoral: Laura González García

- Costa Nunes J, Hohl A, et al. Interleukin-10 Is an Independent Biomarker of Severe Traumatic Brain Injury Prognosis. *Neuroimmunomodulation*. 2012;19:377–85.
144. Shiozaki T, Hayakata T, Tasaki O, Hosotubo H, Fujita K, Mouri T, et al. Cerebrospinal fluid concentrations of anti-inflammatory mediators in early-phase severe traumatic brain injury. *Shock*. 2005;23:406–10.
145. Uddin MS, Kabir MT, Al Mamun A, Abdel-Daim MM, Barreto GE, Ashraf GM. APOE and Alzheimer’s Disease: Evidence Mounts that Targeting APOE4 may Combat Alzheimer’s Pathogenesis. *Mol Neurobiol*. 2019;56:2450–65.
146. Liu C-C, Kanekiyo T, Xu H, Bu G, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol*. 2013;9:106–18.
147. Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley RW. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim Biophys Acta*. 1987;917:148–61.
148. Mahley RW. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science*. 1988;240:622–30.
149. Mahley RW, Nathan BP, Pitas RE. Apolipoprotein E. Structure, function, and possible roles in Alzheimer’s disease. *Ann N Y Acad Sci*. 1996;777:139–45.
150. Zeng S, Jiang J-X, Xu M-H, Xu L-S, Shen G-J, Zhang A-Q, et al. Prognostic Value of Apolipoprotein E Epsilon4 Allele in Patients with Traumatic Brain Injury: A Meta-Analysis and Meta-Regression. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2014;18:202–10.
151. Lawrence DW, Comper P, Hutchison MG, Sharma B. The role of apolipoprotein E epsilon (ϵ)-4 allele on outcome following traumatic brain injury: A systematic review. *Brain Inj*. 2015;29:1018–31.
152. Mayeux R, Ottman R, Maestre G, Ngai C, Tang MX, Ginsberg H, et al. Synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein-epsilon 4 in patients with Alzheimer’s disease. *Neurology*. 1995;45:555–7.



Tesis Doctoral: Laura González García

153. Jofre-Monseny L, Minihane A-M, Rimbach G. Impact of apoE genotype on oxidative stress, inflammation and disease risk. *Mol Nutr Food Res*. 2008;52:131–45.
154. Li L, Bao Y, He S, Wang G, Guan Y, Ma D, et al. The Association Between Apolipoprotein E and Functional Outcome After Traumatic Brain Injury. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94:2028.
155. Hanafy KA, Selim MH. Antioxidant Strategies in Neurocritical Care. *Neurotherapeutics*. 2012;9:44–55.
156. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J Pineal Res*. 2004;36:1–9.
157. Allegra M, Reiter RJ, Tan D-X, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res*. 2003;34:1–10.
158. Tan D-X, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res*. 2007;42:28–42.
159. Leon J, Acuna-Castroviejo D, Escames G, Tan D-X, Reiter RJ. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J Pineal Res*. 2005;38:1–9.
160. Kerman M, Cirak B, Ozguner MF, Dagtekin A, Sutcu R, Altuntas I, et al. Does melatonin protect or treat brain damage from traumatic oxidative stress? *Exp Brain Res*. 2005;163:406–10.
161. Paula-Lima AC, Louzada PR, De Mello FG, Ferreira ST. Neuroprotection against Abeta and glutamate toxicity by melatonin: are GABA receptors involved? *Neurotox Res*. 2003;5:323–7.
162. Carrillo-Vico A, Calvo JR, Abreu P, Lardone PJ, García-Mauriño S, Reiter RJ, et al. Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB J*. 2004;18:537–9.



Tesis Doctoral: Laura González García

163. Dehghan F, Shahrokhi N, Khaksari M, Soltani Z, Asadikorom G, Najafi A, et al. Does the administration of melatonin during post-traumatic brain injury affect cytokine levels? *Inflammopharmacology*. 2018;26:1017–23.
164. Das A, McDowell M, Pava MJ, Smith JA, Reiter RJ, Woodward JJ, et al. The inhibition of apoptosis by melatonin in VSC4.1 motoneurons exposed to oxidative stress, glutamate excitotoxicity, or TNF- α toxicity involves membrane melatonin receptors. *J Pineal Res*. 2010;48:157–69.
165. Hu Y, Wang Z, Liu Y, Pan S, Zhang H, Fang M, et al. Melatonin reduces hypoxic-ischaemic (HI) induced autophagy and apoptosis: An in vivo and in vitro investigation in experimental models of neonatal HI brain injury. *Neurosci Lett*. 2017;653:105–12.
166. Ding K, Wang H, Xu J, Lu X, Zhang L, Zhu L. Melatonin reduced microglial activation and alleviated neuroinflammation induced neuron degeneration in experimental traumatic brain injury: Possible involvement of mTOR pathway. *Neurochem Int*. 2014;76:23–31.
167. Ma Y, Feng Q, Ma J, Feng Z, Zhan M, Ouyang L, et al. Melatonin ameliorates injury and specific responses of ischemic striatal neurons in rats. *J Histochem Cytochem*. 2013;61:591–605.
168. Koh P-O. Melatonin prevents down-regulation of astrocytic phosphoprotein PEA-15 in ischemic brain injury. *J Pineal Res*. 2011;51:381–6.
169. Barlow KM, Esser MJ, Veidt M, Boyd R. Melatonin as a Treatment after Traumatic Brain Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis of the Pre-Clinical and Clinical Literature. *J Neurotrauma*. 2019;36:523–37.
170. Marín-Caballós AJ, Murillo-Cabezas F, Cayuela-Domínguez A, Domínguez-Roldán JM, Rincón-Ferrari MD, Valencia-Anguita J, et al. Cerebral perfusion pressure and risk of brain hypoxia in severe head injury: a prospective observational study. *Crit Care Med*. 2005;9:670–6.



Tesis Doctoral: Laura González García

171. Marín-Caballós AJ, Murillo-Cabezas F, Domínguez-Roldán JM, Leal-Noval SR, Rincón-Ferrari MD, Muñoz-Sánchez MA. Monitoring of tissue oxygen pressure (PtiO₂) in cerebral hypoxia: diagnostic and therapeutic approach. *Med Intensiva*. 2008;32:81–90.
172. Goyal A, Failla MD, Niyonkuru C, Amin K, Fabio A, Berger RP, et al. S100B as a Prognostic Biomarker in Outcome Prediction for Patients with Severe Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma*. 2013;30:946–57.
173. Petzold A, Green AJE, Keir G, Fairley S, Kitchen N, Smith M, et al. Role of serum S100B as an early predictor of high intracranial pressure and mortality in brain injury: A pilot study. *Crit Care Med*. 2002;30:2705–10.
174. Korfiatis S, Stranjalis G, Boviatisis E, Psachoulia C, Jullien G, Gregson B, et al. Serum S-100B protein monitoring in patients with severe traumatic brain injury. *Intensive Care Med*. 2007;33:255–60.
175. Pelinka LE, Kroepfl A, Leixnering M, Buchinger W, Raabe A, Redl H. GFAP versus S100B in verum after Traumatic Brain Injury: Relationship to brain damage and outcome. *J Neurotrauma*. 2004;21:1553–61.
176. Anada RP, Wong KT, Jayapalan JJ, Hashim OH, Ganesan D. Panel of serum protein biomarkers to grade the severity of traumatic brain injury. *Electrophoresis*. 2018;39:2308–15.
177. Gradisek P, Osredkar J, Korsic M, Kremzar B. Multiple indicators model of long-term mortality in traumatic brain injury. *Brain Inj*. 2012;26:1472–81.
178. Forde CT, Karri SK, Young AMH, Ogilvy CS. Predictive markers in traumatic brain injury: Opportunities for a serum biosignature. *Br J Neurosurg*. 2014;28:8–15.
179. Gao L, Wu X. Prediction of clinical outcome in severe traumatic brain injury. *Front Biosci*. 2015;20:763–71.



Tesis Doctoral: Laura González García

180. Gao J, Zheng Z. Development of prognostic models for patients with traumatic brain injury: a systematic review. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8:19881–5.
181. Kühlwein E, Irwin M. Melatonin modulation of lymphocyte proliferation and Th1/Th2 cytokine expression. *J Neuroimmunol*. 2001;117:51–7.
182. Sutherland ER, Martin RJ, Ellison MC, Kraft M. Immunomodulatory Effects of Melatonin in Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;166:1055–61.
183. Lorente L, Martín MM, Abreu-González P, Pérez-Cejas A, Ramos L, Argueso M, et al. Serum melatonin levels in survivor and non-survivor patients with traumatic brain injury. *BMC Neurol*. 2017;17:1–7.
184. Padgett CR, Summers MJ, Skilbeck CE. Is APOE ϵ 4 associated with poorer cognitive outcome following traumatic brain injury? A meta-analysis. *Neuropsychology*. 2016;30:775–90.
185. Hayek T, Oiknine J, Brook JG, Aviram M. Increased Plasma and Lipoprotein Lipid Peroxidation in apo E-Deficient Mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;201:1567–74.
186. Rodríguez-Rodríguez A, Egea-Guerrero JJ, Gordillo-Escobar E, Enamorado-Enamorado J, Hernández-García C, Ruiz de Azúa-López Z, et al. S100B and Neuron-Specific Enolase as mortality predictors in patients with severe traumatic brain injury. *Neurol Res*. 2016;38:130–7.
187. Iaccarino C, Carretta A, Nicolosi F, Morselli C. Epidemiology of severe traumatic brain injury. *J Neurosurg Sci*. 2018;62:535–41.
188. Murray GD, Teasdale GM, Braakman R, Cohadon F, Dearden M, Iannotti F, et al. The European Brain Injury Consortium survey of head injuries. *Acta Neurochir*. 1999;141:223–36.
189. Berger RP, Adelson PD, Pierce MC, Dulani T, Cassidy LD, Kochanek PM. Serum neuron-specific enolase, S100B, and myelin basic protein concentrations after inflicted and



Tesis Doctoral: Laura González García

- noninflicted traumatic brain injury in children. *J Neurosurg Pediatr.* 2005;103:61–8.
190. Rodríguez-Rodríguez A, Egea-Guerrero JJ, Vilches-Arenas A, Gordillo-Escobar E, Ruiz De Azúa-López Z, Murillo-Cabezas F. Prognostic value of total antioxidant capacity to predict functional outcome in traumatic brain injury patients. *Clin Chem Lab Med.* 2017;55:15–7.
191. Raabe A, Seifert V. Fatal secondary increase in serum S-100B protein after severe head injury. *J Neurosurg.* 1999;91:875–7.
192. Rainey T, Lesko M, Sacho R, Lecky F, Childs C. Predicting outcome after severe traumatic brain injury using the serum S100B biomarker: Results using a single (24h) time-point. *Resuscitation.* 2009;80:341–5.
193. Olivecrona Z, Bobinski L, Koskinen L-OD. Association of ICP, CPP, CT findings and S-100B and NSE in severe traumatic head injury. Prognostic value of the biomarkers. *Brain Inj.* 2015;29:446–54.
194. Chabok SY, Moghadam AD, Saneei Z, Amlashi FG, Leili EK, Amiri ZM. Neuron-specific enolase and S100BB as outcome predictors in severe diffuse axonal injury. *J Trauma Acute Care Surg.* 2012;72:1654–7.
195. Di Battista AP, Buonora JE, Rhind SG, Hutchison MG, Baker AJ, Rizoli SB, et al. Blood Biomarkers in Moderate-To-Severe Traumatic Brain Injury: Potential Utility of a Multi-Marker Approach in Characterizing Outcome. *Front Neurol.* 2015;6:110.

