



Universitat Autònoma de Barcelona

Departamento de Cirugía
Facultad de Medicina

TESIS DOCTORAL

**APLICACIÓN DE LA MICRODIÁLISIS EN LA DEFINICIÓN DEL
PERFIL IÓNICO DEL EDEMA CEREBRAL POSTRAUMÁTICO E
ISQUÉMICO. ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DEL CANAL
SUR1-TRPM4 EN SU FORMACIÓN**

Dotoranda: Tamara Martínez Valverde

Directores: Juan Sahuquillo Barris y Maria Antònia Poca Pastor

Septiembre 2015

TESIS DOCTORAL

Aplicación de la microdiálisis en la definición del perfil iónico del edema cerebral postraumático e isquémico. Estudio de la contribución del canal SUR1-TRPM4 en su formación

Memoria presentada por **Tamara Martínez Valverde** para optar al grado de Doctor por la *Universitat Autònoma de Barcelona*, Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina

Esta tesis ha sido realizada en la Unidad de Investigación de Neurotraumatología y Neurocirugía (UNINN) del Institut de *Recerca del Hospital Universitari Vall d'Hebron*

Directores

Doctoranda

Juan Sahuquillo Barris

Profesor Titular
Departamento de Cirugía
Facultad de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona

Tamara Martínez Valverde

Maria Antònia Poca Pastor

Profesora Asociada Clínica
Departamento de Cirugía
Facultad de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona



AYUDAS RECIBIDAS Y CONFLICTOS DE INTERÉS

Esta Tesis Doctoral ha sido financiada por el Instituto de Salud Carlos III de Madrid con la concesión de una beca para la formación de personal de investigación (PFIS), beca F11/00195, desde noviembre de 2011 hasta octubre de 2015. Los artículos y trabajos que forma el cuerpo de esta Tesis han sido financiados por el Fondo de Investigación Sanitaria (Instituto de Salud Carlos III) becas PI10/00302 y PI11/00700, cofinanciadas a su vez por el *European Regional Development Fund* (ERDF) otorgadas a la Dra. Poca y al Dr. Sahuquillo respectivamente.

El Profesor JM Simard tiene la patente de Estados Unidos número 7285574, " *A novel non-selective cation channel in neural cells and methods for treating brain swelling*". Además es miembro del consejo asesor científico y posee acciones de *Remedy Pharmaceuticals*. Sin embargo no se recibió soporte, ni directo ni indirecto, para el desarrollo de los trabajos presentados por parte de *Remedy Pharmaceuticals*. El resto de autores de los estudios presentados no presentan ningún conflicto de interés en relación con los materiales y métodos utilizados en estos trabajos y ni en los resultados mostrados.

AGRADECIMIENTOS

Llegado a este punto me gustaría dar las gracias a todos aquellos que, de un modo u otro, han contribuido a la realización de este Trabajo, que no son pocos.

Aunque parezca difícil de creer, esta parte la tesis que es la que más me ha costado escribir, aun sabiendo que no requiere correcciones... Quizás porque es la única que todos leen al abrir una tesis. Espero estar a la altura ;)

Primero me gustaría agradecer al Dr. Sahuquillo y a Dra. Poca, directores de esta tesis, la oportunidad que me brindaron al escogermme para formar parte de la UNINN donde he podido conocer la importancia de la investigación traslacional. Al Dr. Sahuquillo, por su apoyo y asesoramiento científico durante el desarrollo de los estudios que conforman esta tesis doctoral. A la Dra. Poca, por su ayuda a lo largo de estos años y en especial por las meticulosas correcciones de esta Tesis. A ambos por su dedicación y profesionalidad tanto en la práctica clínica como en la investigación, dando siempre lo mejor. Gracias por contagiarme vuestro sentido de la perfección.

Al Dr. Simard, al Dr. Gerzanich y a todo su equipo por acogerme en su laboratorio, hacerme sentir como una más y sobre todo por enseñarme todo lo que estuvo en su mano, sin esa estancia esta tesis no hubiese sido posible. En especial me gustaría agradecer a Sveta, la gran experta en inmunohistoquímica, por su paciencia y dedicación a la hora de enseñarme y por despertar en mí el interés por la microscopia. Al Dr. Woo por compartir conmigo sus conocimientos sobre biología molecular y por esas charlas sobre el mundo durante las comidas.

A mis compañeras de batallas en la UNINN, a aquellas con las que empecé esta aventura Natalia, Aida, M. Àngels, Eli y Joana por acogerme y enseñarme las tareas de la Unidad. A quienes empezaron algo más tarde pero que ya no están Carmen, Alba, Víctor y Pili. Y sobre todo a las actuales, quienes habéis vivido conmigo estos últimos meses de estrés, Noelia, Andreea, Àngela, Marian, Victoria, Gemma, Lidia, Mónica y Joana. A Andreea por sus preguntas ingeniosas, a Àngela por su espontaneidad, a Victoria por su espíritu crítico, a Marian por su entrega (arribaràs lluny!, ho se) a Gemma por su frescura, a Lidia por ser buena alumna, a Mónica por añadir creatividad a grupo y a Joana por ser el punto constante de la Unidad. Y en especial a Noelia porque siempre ha sido

mi punto de apoyo y quien me ha animado a continuar en los momentos más difíciles, gracias! Porque 5 años y medio dan para mucho... cenas de traje, de navidad, comidas bajo el sol,... y sobretodo porque espero que no acaben!

A los adjuntos y residentes del servicio de Neurocirugía, con quienes he compartido noches de guardia, días de quirófano y alguna que otra charla, gracias por avisar para cada muestra y cada paciente, esta Tesis es uno de los frutos de todos esos esfuerzos. Y en especial a Fran por su ayuda en los ensayos clínicos, a Dario por ser tan servicial, a Ramón por darme la oportunidad de saber algo más sobre las MAVs y a Fuat por todo lo que estoy aprendiendo de los modelos experimentales.

A los médicos y enfermeras del la UCI de trauma por su ayuda tanto en ensayos clínicos con en estudios propios de nuestra Unidad, porque a pesar de que no siempre agrada tener más faena la han llevado a cabo lo mejor posible. Sin su trabajo esta Tesis no hubiese sido posible. Y en especial a Marylin por ser la persona que siempre tiene un momento para ayudar.

A Merche y Lourdes porque además de ser unas grandes profesionales son mejores personas. Porque siempre es un placer trabajar a vuestro lado!

A la Dra. Pelegrí por los análisis de los iones, a las Dras Manrique y Serrano por las muestras de LCR control, a Dra. Munar por sus interpretaciones sobre la formación del edema cerebral y a Elena por todas las valoraciones de las muestras de tejido. Gracias, sin vuestra ayuda el camino hubiese sido más difícil.

Y ya pasando a un campo menos profesional y más personal, agradecer a la *Beautiful people*, mis amigos, por darme esos buenos momentos de desconexión y por entender siempre mi gran excusa... Estoy de guardia, jeje.

Raquel, gracias por estar ahí desde el principio de esta andadura. Desde nuestro primer día de clase en Universidad en que me preguntaste si estaba libre el asiento y hasta ahora. Porque desde 2004 hemos compartido muchos buenos momentos y por los que vendrán! Porque ahora sí, las dos seremos doctoras!

A mi Familia, esas hormiguitas trabajadoras y luchadoras, porque a pesar de estar lejos físicamente desde hace ya 11 años yo os siento a mi lado cada día. A mi padre por su educación y disciplina y por inculcarme que siempre se puede hacer mejor, papá quizás yo antes no era capaz de entender lo importante que

era pero ahora sólo puedo agradeceréte, ya que gracias a ello son quién soy. A mi madre por cuidar siempre de nosotros y ayudarnos a reblandecer a papá. A mis hermanos, Juanito y Santi, porque sois mis tesoros, porque no importa cuando riñamos siempre me vais a tener a vuestro lado.

A familia política, que decir de vosotros... que tan bien me habéis acogido. Gracias por hacer que Barcelona sea como mi casa.

Y por último, como en las buenas comidas en la que dejamos lo mejor para el final, a Albert por comprender este "trabajo" mío, por apoyarme y animarme día a día y en especial en estos últimos meses de redacción. Porque no es fácil soportarme cuando me atrapa el estrés. Sobre todo, gracias, porque a tu lado la vida es más bonita!

*La diferencia entre la estupidez y la genialidad es que la genialidad tiene
sus límites*

Albert Einstein

ÍNDICE

AYUDAS RECIBIDAS Y CONFLICTOS DE INTERÉS	I
AGRADECIMIENTOS	II
ÍNDICE	1
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	5
INTRODUCCIÓN	7
1. Traumatismos craneoencefálicos: epidemiología y concepto	9
1.2 Las contusiones cerebrales.....	10
2. Infarto cerebral maligno	11
3. Los compartimentos cerebrales y su mantenimiento	12
3.1 La barrera Hematoencefálica	13
4. Edema cerebral	15
4.1 Clasificación clásica del edema cerebral.....	16
4.1.1 Edema citotóxico.....	16
4.1.2 Edema vasogénico.....	16
4.2 Nueva clasificación del edema cerebral: la clasificación de Simard... 17	
4.2.1 Edema citotóxico.....	18
4.2.2 Edema iónico	20
4.2.3 Edema vasogénico.....	20
4.2.4 Transformación hemorrágica	21
5. El receptor de la sulfonilurea 1 y el canal SUR1-TRPM4	22
6. Monitorización del paciente neurocrítico	24
6.1 Monitorización sistémica	25
6.2 Monitorización cerebral	25
6.2.1 Monitorización cerebral no invasiva	25

6.2.2 Monitorización cerebral invasiva	26
7. La microdiálisis cerebral	27
7.1 El catéter de microdiálisis cerebral	29
7.2 El concepto de recuperación relativa	31
7.2.1 Factores que afectan a la recuperación relativa <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	32
8. Marcadores de disrupción de la barrera hematoencefálica	35
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	37
ESTUDIOS REALIZADOS	39
1. Sulfonylurea receptor 1 in humans with post-traumatic brain contusions.....	43
2. Brain microdialysis as a tool to explore the ionic profile of the brain extracellular space in neurocritical patients: a methodological approach and feasibility study	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
1. Expresión del SUR1 en las contusiones cerebrales humanas	67
1.1 Grupo de estudio	67
1.2 Grupo control.....	69
1.3 Definición de la zona de estudio.....	69
1.4 Resultados del análisis cuantitativo.....	70
1.5 Resultados del análisis semicuantitativo	72
1.6 Discusión	76
2. Modelo <i>in vitro</i> para estimar la concentración iónica del espacio extracelular cerebral	83
2.1 Diseño experimental	83
2.2 Estimación de la recuperación relativa de los iones de estudio	85
2.2.1 Recuperación relativa mediante la ecuación de Bungay	86
2.2.2 Recuperación relativa mediante un modelo de regresión lineal.....	87
2.3 Discusión	88
3. Aplicación del modelo <i>in vivo</i>	91

3.1 Rango de referencia para la concentración iónica del espacio extracelular cerebral	91
3.2 Aplicabilidad del modelo en muestras almacenadas.....	93
3.2.1 Descripción de los casos.....	94
3.3 Discusión	96
CONCLUSIONES	99
ANEXO	101
1. Determinación de albúmina y cistatina C en el espacio extracelular del encéfalo como marcadores de la disrupción de la barrera hematoencefálica .	101
1.1 Recuperación relativa de macromoléculas.....	101
1.2 Estudio ultraestructural de las membranas CMA71	103
1.3 Resultados de las observaciones morfológicas	103
1.4 Discusión	105
2. Estudio del perfil iónico del espacio extracelular postraumático e isquémico	127
2.1 La ICP-MS versus el electrodo selectivo.....	127
2.2 Grupo de estudio.....	128
2.3 Grupo control.....	128
2.4 Contenido iónico por patología cerebral y zona de inserción del catéter de microdiálisis	129
2.5 Discusión	131
BIBLIOGRAFÍA	140

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ATP	adenosin trifosfato
ACM	arteria cerebral media
BHE	barrera hematoencefálica
BTF	<i>Brain Trauma Foundation</i>
CD68	cúmulo de diferenciación 68
C_{in}	concentración de la molécula de estudio en el líquido de perfusión
C_{matriz}	concentración de la molécula de estudio en el medio externo o solución problema
C_{md}	concentración de la molécula de estudio en el microdializado
ECG	Escala de Coma de Glasgow
EEC	espacio extracelular
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FLAIR	secuencia de resonancia magnética de fluido de recuperación de inversión atenuada
GFAP	proteína ácida fibrilar glial
HIF1α	factor inducible por hipoxia
ICP-MS	espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
IMACM	infarto maligno de la arteria cerebral media
JAMs	moléculas de adhesión estrecha
K_{ATP}	canal de potasio regulado por ATP
LCR	líquido cefalorraquídeo
LP	líquido de perfusión
MD	microdiálisis
MMP	metaloproteinasas
MPO	mieloperoxidasa
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
NF-κB	factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NIH	National Institute of Health
PET	tomografía computarizada por emisión de positrones
PIC	presión intracraneal
PM	peso molecular
PtiO₂	presión tisular de oxígeno
Q_A	cociente albúmina LCR- albúmina suero
RM	resonancia magnética
RR	recuperación relativa
rtPA	activador del plasminógeno
SEM	microscopia electrónica de barrido
SjO₂	saturación de oxígeno en el bulbo de la yugular
SNC	sistema nervioso central
Sp1	proteína específica 1
SUR1	receptor de la sulfonilurea 1
TC	tomografía computarizada
TCE	traumatismo craneoencefálico
TJ	<i>tight junction</i>
TNF-α	factor de necrosis tumoral alfa
TRP	receptores de potencial transitorio
TRPM4	receptor de potencial transitorio de la melastatina 4
UCI	unidades de cuidados intensivos
UNINN	Unidad de Investigación de Neurotraumatología y Neurocirugía
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
ZO	zona occludens

INTRODUCCIÓN

El traumatismo craneoencefálico (TCE) constituye un importante problema sanitario y socioeconómico en todo el mundo (Maas *et al.*, 2008) y es la principal causa de mortalidad y discapacidad entre las personas jóvenes, como consecuencia, principalmente, de las lesiones secundarias que provoca. Dentro de este tipo de lesiones cabe destacar el edema cerebral secundario que generan las contusiones cerebrales, una de las lesiones primarias más frecuentes tras un TCE. El infarto maligno de la arteria cerebral media (IMACM) es una entidad con una elevada mortalidad que afecta a personas jóvenes y en los que el deterioro neurológico y la muerte están directamente relacionados con el importante edema cerebral que estos infartos provocan. Las contusiones cerebrales y el infarto cerebral maligno provocan considerables desequilibrios iónicos, generando una entrada masiva de iones en las neuronas y en las células gliales, con el consecuente arrastre osmótico de agua y la formación de edema cerebral citotóxico. En estadios posteriores, tanto las contusiones -que inducen isquemia perilesional- como los infartos alteran la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE), facilitando la progresión hacia el edema iónico y, en fases más tardías, la disrupción estructural de la BHE y el denominado edema vasogénico. Por este motivo, tradicionalmente, el tratamiento de este tipo de lesiones ha estado dirigido a modular y revertir el edema cerebral y el consiguiente aumento de la presión intracraneal (PIC). La aplicación de soluciones hiperosmóticas, en forma de manitol (Wise and Chater, 1961) y de suero salino hipertónico (Munar *et al.*, 2000; Qureshi and Suarez, 2000) son la base del tratamiento farmacológico habitual. Su administración induce el paso de fluido del espacio intracelular al intravascular gracias al gradiente osmótico que generan cuando la BHE está intacta. Sin embargo, estos tratamientos tienen una baja eficacia y algunos efectos secundarios sistémicos, como las alteraciones hidroelectrolíticas, las renales y las pulmonares (Grande and Romner, 2012). Por ello, es necesaria la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas así como de herramientas que permitan la monitorización del perfil iónico del espacio extracelular en las distintas fases del edema cerebral.

En la última década el grupo liderado por el Prof. J.M Simard ha introducido una nueva clasificación del edema cerebral. La importancia de esta nueva

clasificación radica en su contribución a la mejor comprensión de los mecanismos moleculares implicados en el edema cerebral y en la identificación de un nuevo canal iónico involucrado en su progresión, formado por el receptor de la sulfonilurea 1 (SUR1) y el receptor de potencial transitorio de la melastatina 4 (TRPM4) conocido como SUR1-TRPM4 (Simard *et al.*, 2007). Además de la importancia fisiopatológica del canal SUR1-TRPM4, estudios en modelos animales con distintas patologías del sistema nervioso central (SNC) han demostrado que el tratamiento con glibenclamida (inhibidor de la actividad del SUR1, unidad reguladora del canal) reduce la mortalidad y el volumen del edema cerebral y mejora el resultado neurológico (Simard *et al.*, 2012b). La verificación de estos resultados en estudios experimentales en humanos podría mejorar el tratamiento de los pacientes que han sufrido un TCE o un infarto maligno.

Las técnicas actuales de neuromonitorización permiten el estudio de los procesos que tienen lugar tras una lesión cerebral aguda. Entre ellos, la microdiálisis (MD) cerebral es una técnica de neuromonitorización avanzada que permite el muestreo continuo del parénquima cerebral. La utilización de esta herramienta en los pacientes con lesiones cerebrales agudas permite la detección de los trastornos iónicos del espacio intersticial, la monitorización del perfil iónico y los efectos de posibles tratamientos en el contenido iónico del área monitorizada.

La presente tesis, pretende profundizar en los mecanismos moleculares del edema cerebral isquémico y en las lesiones cerebrales traumáticas. Para ello, en primer lugar se ha estudiado el potencial papel del SUR1 (unidad reguladora del canal SUR1-TRPM4) en la formación del edema cerebral en el tejido pericontusional. En segundo lugar se aporta una nueva aplicación de la MD cerebral en el estudio del perfil iónico del parénquima cerebral tras una lesión cerebral aguda.

1. Traumatismos craneoencefálicos: epidemiología y concepto

Los TCEs constituyen un grave problema de salud y socioeconómico en todo el mundo, siendo la primera causa de muerte y discapacidad en adultos menores de 40 años (Roozenbeek *et al.*, 2013). Estimar la incidencia de los TCEs es complejo debido a las diferencias entre países y centros en su clasificación, así como en su forma de registro (Roozenbeek *et al.*, 2013). A pesar de estas dificultades, un metaanálisis llevado a cabo a partir de registros de 23 países europeos revela una incidencia media de 2.350 casos por cada millón habitantes (Tagliaferri *et al.*, 2006). En España, los últimos datos publicados correspondientes al periodo de 2000 a 2008, sitúan la incidencia en 477,8 casos por millón de habitantes (Sanidad, 2011).

El TCE genera un conjunto de lesiones físicas con alteraciones del contenido craneal debido a un intercambio brusco de energía provocado por mecanismos físicos. Tradicionalmente, los TCEs se han clasificado en base a: 1) el mecanismo que los provoca en: cerrados o abiertos/penetrantes; 2) su severidad clínica, medida por la Escala de Coma de Glasgow (ECG) (Teasdale and Jennett, 1976) y que diferencia entre: leve (puntuación: 14 - 15), moderado (puntuación: 9 - 13) o grave (puntuación: ≤ 8) y 3) la evaluación del daño estructural mediante los estudios de neuroimagen. Para este último apartado una de las clasificaciones más utilizadas es la clasificación de Marshall (Marshall, 2001), que diferencia las lesiones encefálicas entre difusas (4 tipos: lesión difusa tipo I, lesión difusa tipo II, lesión difusa tipo III, lesión difusa tipo IV) y focales (masa no evacuada y masa evacuada).

Desde un punto de vista fisiopatológico, tras un TCE se generan 2 tipos de lesiones cerebrales, las lesiones primarias y las lesiones secundarias. Clásicamente, las **lesiones primarias** (fracturas, lesión axonal difusa o contusiones cerebrales, entre otras) se han descrito como aquellas lesiones que tienen lugar de forma inmediata al traumatismo y que provocan daño cerebral instantáneo. Este tipo de lesiones se producen por 2 mecanismos: 1) contacto directo entre el cráneo y otra superficie y 2) fenómenos de aceleración/desaceleración. Las lesiones primarias son consideradas no evitables en contraposición con las lesiones secundarias que son potencialmente evitables y tratables. Las **lesiones secundarias**, también denominadas complicaciones, se

inician minutos, horas o incluso días después de la lesión primaria y desencadenan una serie de procesos bioquímicos anómalos (fenómenos de excitotoxicidad, hipercalcemia intracelular, formación de radicales libres de oxígeno, etc) que, en último término, activan una cascada inflamatoria iniciada por la liberación de citocinas proinflamatorias que favorecen el desarrollo de edema e hipoxia cerebral, procesos que contribuyen al aumento de la PIC (Lucas *et al.*, 2006).

Actualmente, y a pesar de los avances en monitorización cerebral y el gran número de líneas de investigación dirigidas a impedir y/o contrarrestar los efectos de las cascadas neurotóxicas que se producen en estos pacientes, no existen terapias neuroprotectoras que sean eficaces contra este tipo de lesiones. Por ello, el tratamiento de los TCEs sigue basado en medidas dirigidas a contrarrestar los efectos de las lesiones existentes y, fundamentalmente, en evitar y tratar los aumentos de la PIC.

1.2 Las contusiones cerebrales

Las contusiones cerebrales son las lesiones primarias más frecuentes tras un TCE moderado o grave. Son consideradas lesiones primarias dado que se producen debido a la energía mecánica originada por los fenómenos de aceleración/desaceleración e impacto durante el traumatismo, que favorecen el contacto y la fricción entre el parénquima cerebral y las estructuras óseas de la base del cráneo o de la bóveda craneal. Además, son lesiones evolutivas y dinámicas, dado que pueden aumentar su tamaño pasadas horas e incluso días después del traumatismo debido al aumento de la hemorragia, la necrosis y la aparición de edema cerebral circundante. Estos cambios hacen que las contusiones cerebrales se comporten en su evolución como lesiones secundarias y puedan provocar efecto de masa, edema perilesional, transformación hemorrágica de la contusión, deterioro neurológico e incluso puedan conducir a la muerte del paciente (Kurland *et al.*, 2012). El edema pericontusional y la transformación hemorrágica son las principales causas de muerte y de discapacidad en este tipo de pacientes. Las consecuencias deletéreas del edema cerebral son debidas a la isquemia regional o global secundaria que induce, a los aumentos de la PIC y/o a los desplazamientos secundarios de las estructuras

encefálicas (herniaciones cerebrales), que comprimen y lesionan áreas vitales como el tronco del encéfalo.

Estructuralmente, estas lesiones suelen tener un componente hemorrágico como resultado de la destrucción de los vasos de la zona dañada y una región de tejido necrosado o isquémico. El tejido que rodea a la lesión propiamente dicha, a pesar de mantener su estructura, presenta también algunos cambios estructurales y/o funcionales. Esta zona perilesional es conocida como penumbra traumática, dada su semejanza funcional con la penumbra isquémica definida en los infartos cerebrales.

2. Infarto cerebral maligno

El accidente cerebrovascular isquémico es un grave problema de salud en todo el mundo. A pesar de ser más frecuente en los adultos mayores, también ocurre en neonatos, lactantes, niños y adultos jóvenes, lo que resulta en una tasa de morbilidad y mortalidad significativas a cualquier edad (Mozaffarian *et al.*, 2015).

El término de “infarto cerebral maligno” descrito por Hake y colaboradores (Hacke *et al.*, 1996) en 1996 hace referencia a un tipo muy específico de ictus isquémico que afecta, inicialmente, el territorio completo de la arteria cerebral media (ACM), aunque suele extenderse a otros territorios vasculares. El infarto cerebral maligno está causado, generalmente, por la oclusión embólica o trombótica de la ACM o de la arteria carótida interna. Esta patología se asocia con edema vasogénico que causa tumefacción cerebral, efecto de masa y aumento de la PIC. Además, puede inducir herniación de las estructuras cerebrales con el consiguiente deterioro neurológico que incluso podría producir la muerte (Huttner and Schwab, 2009; Treadwell and Thanvi, 2010).

Al igual que para el TCE, para el infarto cerebral maligno, los tratamientos actuales son, en nuestros días, todavía muy limitados. La administración intravenosa del activador del plasminógeno (rtPA) dentro las 3 horas posteriores al inicio de los síntomas es el único tratamiento aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) para este tipo de pacientes (Jauch *et al.*, 2013). El tratamiento fibrinolítico tiene el objetivo de disolver el coágulo que obstruye la

arteria, recanalizar el vaso ocluido y restaurar el flujo sanguíneo cerebral. Existen otros fármacos neuroprotectores dirigidos a “proteger” a las neuronas y células gliales que han demostrado su eficacia en modelos experimentales. Sin embargo no han revelado ninguna eficacia en ensayos clínicos multicéntricos aleatorizados de fase III, evidenciando que la neuroprotección sigue siendo un objetivo difícil de alcanzar en el ictus isquémico.

3. Los compartimentos cerebrales y su mantenimiento

En el SNC se pueden distinguir cuatro compartimentos con contenido “líquido”: 1) el contenido hemático del sistema vascular, 2) el líquido cefalorraquídeo (LCR), 3) el fluido intersticial del parénquima y 4) el fluido intracelular de las neuronas y las células gliales (Kahle *et al.*, 2009). Estos compartimentos se encuentran separados por tres barreras con una permeabilidad variable al paso de fluidos y electrolitos: la barrera hematoencefálica (BHE), la barrera hemato-LCR y la membrana plasmática de las neuronas y de las células gliales. Estas barreras permiten que se mantengan diferentes volúmenes y una composición de solutos específica para cada compartimento. Las características físicas del contenido intracraneal hacen que el SNC sea incompresible como materia, por ello, cuando se han agotado los mecanismos de compensación que rigen la curva presión-volumen, pequeñas variaciones de volumen provocan importantes aumentos de la PIC.

Aproximadamente el 70% del agua en el SNC se localiza en el espacio intracelular. En condiciones fisiológicas, el fluido intracelular tiene una concentración elevada de K^+ y una concentración reducida de Ca^{2+} y Na^+ en comparación con el LCR y el líquido intersticial. El gradiente electroquímico que existe entre el líquido intracelular y extracelular se mantiene gracias a las bombas Na^+/K^+ -ATPasa y Ca^{2+} -ATPasa que requieren energía, en forma de adenosin trifosfato (ATP), para su funcionamiento, además de otros transportadores iónicos como el intercambiador Na^+/H^+ . La bomba Na^+/K^+ -ATPasa previene la acumulación de Na^+ en el espacio intracelular, además de la entrada de otros solutos y agua a la célula que podrían provocar la pérdida de integridad del citoesqueleto y la muerte celular. Asimismo, esta bomba genera los gradientes

electroquímicos necesarios para el transporte secundario activo y pasivo de iones (Kahle *et al.*, 2009).

Como en la mayoría de tejidos, en el cerebro el agua está en equilibrio entre las membranas de todas sus células. Dado que el agua puede atravesar las membranas celulares, cambios en el contenido de solutos de los diferentes compartimientos cerebrales provocan un flujo de agua hacia el interior del compartimento con mayor concentración, con el objeto de compensar el gradiente osmótico, hecho que se traduce en un aumento de volumen del mismo (Kahle *et al.*, 2009).

3.1 La barrera Hematoencefálica

Como se ha comentado en el apartado anterior, el mantenimiento de las funciones fisiológicas normales de cerebro requiere un control homeostático estricto del ambiente neural, esto conlleva una fina regulación del de transporte celular, molecular y de iones entre el torrente sanguíneo y el cerebro (Serlin *et al.*, 2015). Este mantenimiento es posible gracias a la presencia de la BHE, una barrera anatómica y funcional que separa el SNC de la circulación sistémica, regulando, además, el intercambio de iones y moléculas orgánicas entre ambos (Sandoval and Witt, 2008). El primer estudio que evidenció la existencia de esta barrera tuvo lugar en 1885 cuando Paul Ehrlich describió que la inyección intravenosa de colorantes vitales solubles en el sistema circulatorio de animales adultos teñía todos los órganos a excepción del cerebro y la médula espinal. Ehrlich llegó a la conclusión errónea de que este fenómeno era debido a la falta de afinidad del SNC para los colorantes vitales (Ribatti *et al.*, 2006). Goldman, su discípulo, continuó sus estudios y observó que, tras la inyección de azul de tripano en el LCR se teñían las células del SNC y no las de los órganos sistémicos, lo cual sugería que debía existir una barrera que impedía el paso del colorante desde el SNC al sistema circulatorio. Pero no fue hasta el 1900 que Lewandowsky introdujo el término “barrera hematoencefálica” para justificar el hecho de que las inyecciones intravenosas de ácidos cólicos y ferrocianuro de sodio no producían ningún efecto sobre el cerebro, mientras que la inyección intraventricular de los mismos compuestos provocaba alteraciones neurológicas inducidas (Ribatti *et al.*, 2006). Fue en la época de la microscopía electrónica cuando se hace evidente la ultraestructura de los capilares en los diferentes

órganos y la existencia específica de uniones estrechas en el SNC. Reese y Karnowsky en 1967, mediante el uso de peroxidasa de rábano, demostraron que la BHE se encontraba en el propio endotelio vascular (Reese and Karnovsky, 1967).

Anatómicamente, la BHE está formada por células endoteliales, la membrana basal, astrocitos y pericitos. Estudios recientes incluyen, además, las proyecciones neuronales, en contacto con los elementos anteriores, y la matriz extracelular, dentro de sus componentes, constituyendo así la “unidad neurovascular” (Hawkins and Davis, 2005; Wong *et al.*, 2013) (**Figura 1**).

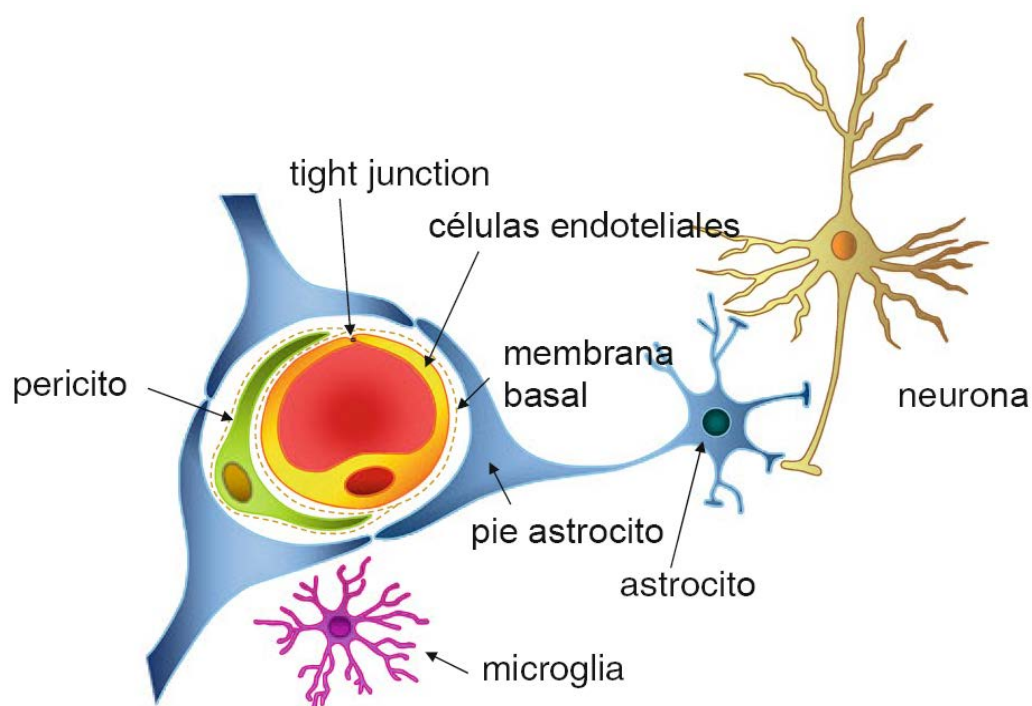


Figura 1. Esquema de los componentes de la unidad neurovascular. Imagen modificada de Abbott y colaboradores (Abbott *et al.*)

Las **células endoteliales** que forman la BHE se diferencian de las del resto del organismo por: 1) su falta de fenestraciones, 2) su mínima actividad pinocitótica y 3) la formación de uniones estrechas, llevadas a cabo por proteínas transmembrana (*tight junction* -TJ-): ocludina, claudina, moléculas de adhesión estrecha -JAMs- y proteínas citoplasmáticas accesorias: zona ocludens-1 y 2

(ZO-1 y ZO-2) y cingulina (Bazzoni, 2006; Sandoval and Witt, 2008; Abbott *et al.*, 2010; Chen and Liu, 2012). Estas proteínas actúan como una primera línea de defensa del sistema nervioso frente a los elementos que existen en la circulación sanguínea.

La **membrana basal** es una lámina de 30-40nm con función estructural, compuesta de colágeno tipo IV, proteoglicanos, laminina, fibrinonectina y otras proteínas de matriz. Se encuentra alrededor de las células endoteliales y los pericitos y es contigua a la membrana plasmática de los pies de los astrocitos (Hawkins and Davis, 2005).

Los **astrocitos** interactúan con las células endoteliales a través de sus pies, contribuyendo así a la formación de la BHE y a la funcionalidad de la unidad neurovascular (Persidsky *et al.*, 2006). Este tipo celular actúa tanto en la regulación de la permeabilidad de la BHE como en el ensamblaje de las proteínas TJs (Sandoval and Witt, 2008; Serlin *et al.*, 2015).

Los **pericitos**, en la BHE, son responsables de establecer uniones *gap* y uniones estrechas con las células endoteliales, así como de promover la expresión de las proteínas TJs, ocludina y claudina (Hori *et al.*, 2004; Hurtado-Alvarado *et al.*, 2014); además, se ha observado que los pericitos son capaces de migrar de los capilares en respuesta a la hipoxia (Gonul *et al.*, 2002) o al traumatismo (Dore-Duffy *et al.*, 2000), condiciones que se asocian con el incremento de la permeabilidad de la BHE.

4. Edema cerebral

El término edema cerebral fue definido por Igor Klatzo en el 1967 (Klatzo, 1967) como un incremento en el volumen cerebral, resultado de la acumulación anómala (localizada o difusa) de agua, más o menos rica en proteínas, en el parénquima cerebral. Tal alteración se asocia a una amplia variedad de condiciones patológicas como son: los tumores cerebrales, las infecciones, los TCEs y los procesos cerebrales isquémicos, entre otros (Nag *et al.*, 2009).

4.1 Clasificación clásica del edema cerebral

Para entender las recientes modificaciones en la clasificación del edema cerebral es útil revisar la evolución de los conceptos introducidos en la década de 1960 por Klatzo que, todavía hoy, constituyen el marco en el que se basan otras clasificaciones. Previamente a Klatzo, algunos autores definieron diferentes tipos de edema cerebral. La primera clasificación, basada en características de las superficies del cerebro tras su corte, fue presentada por Reichardt en 1905. Este autor diferenció entre dos tipos de edema cerebral: *Hirnödem* (edema cerebral) descrito como húmedo y blando, y *Hirnschwellung* (inflamación del cerebro) definido como seco y duro al corte (Klatzo, 1967). En 1967, Klatzo estableció dos tipos principales de edema, el citotóxico y el vasogénico, basándose en la localización del aumento de agua en el cerebro y en la integridad de la BHE (intacta en el edema citotóxico y alterada en el edema vasogénico) (Klatzo, 1967).

4.1.1 Edema citotóxico

Originalmente, este tipo de edema se estudió en condiciones experimentales producidas por: 1) intoxicación mediante trietiltilin (un compuesto tóxico utilizado en la industria del plástico y un potente inhibidor metabólico, capaz de bloquear la respiración mitocondrial), 2) intoxicación por agua y 3) condiciones de anoxia (Klatzo, 1967, 1994). Todas estas condiciones provocan una “hinchazón” de todos los elementos celulares, que resulta del aumento del contenido de Na^+ intracelular y la consiguiente entrada de agua al interior de la célula para compensar la diferencia de concentración intra y extracelular de Na^+ . En el edema citotóxico la permeabilidad vascular sigue estando relativamente intacta, por ello no se produce una extravasación de biomarcadores de integridad de BHE convencionales como la albúmina. Además, durante el edema citotóxico el espacio extracelular (EEC) puede verse reducido debido a la hinchazón celular, reduciendo la distancia entre las neuronas y las células gliales.

4.1.2 Edema vasogénico

El edema vasogénico se produce por alteraciones de la BHE y se caracteriza por un aumento neto de fluido intersticial. Este tipo de edema se inicia tras una lesión estructural de las paredes de los vasos sanguíneos cerebrales, que causa un

paso de agua y de componentes del torrente sanguíneo al parénquima. Esta lesión puede ser consecuencia de un TCE, un tumor cerebral o enfermedades inflamatorias, entre otros. Dependiendo de la gravedad y las características del daño vascular las consecuencias pueden variar entre una alteración de la permeabilidad de la BHE en las lesiones leves, a la extravasación de macromoléculas e incluso de las células hemáticas en las lesiones con daño estructural grave de la BHE (Klatzo, 1967). Como señalaba Klatzo, la ecuación de Starling regula el flujo de fluido desde la sangre hacia el intersticio y explica la dinámica de formación del edema vasogénico (Klatzo, 1994).

A pesar de esta diferenciación entre ambos tipos de edema, Klatzo enfatizó que ambos coexisten con frecuencia, por ejemplo, en la isquemia cerebral, donde existe inicialmente edema citotóxico, con una subsiguiente etapa de formación de edema vasogénico (Klatzo, 1987).

4.2 Nueva clasificación del edema cerebral: la clasificación de Simard

Desde la clasificación propuesta por Klatzo en 1967 no se había avanzado de forma significativa en la definición de los diferentes tipos de edema cerebral. Sin embargo, durante la última década un grupo de Baltimore liderado por Simard ha dado un nuevo enfoque al tema y ha redefinido los conceptos básicos de edema, proponiendo una nueva clasificación publicada en 2007 (Aarabi and Simard, 2009). En este trabajo se introducen los siguientes nuevos conceptos: 1) existencia del edema iónico, como una etapa intermedia entre el edema citotóxico y el vasogénico, 2) la transformación hemorrágica, como la fase final en la evolución del edema cerebral cuando la BHE se altera estructuralmente, 3) la modificación de la ecuación de Starling aplicada a la dinámica de fluidos de la BHE y 4) una integración de las teorías acerca de la permeabilidad de la BHE y de las bases moleculares de los movimientos de agua y partículas osmóticamente activas del plasma a las células, así como el papel que ejercen los canales y transportadores específicos de agua.

Simard y colaboradores distinguen, en su clasificación, los siguientes tipos de edema: citotóxico, iónico y vasogénico, además de una fase final de conversión hemorrágica. Todos estos tipos de edema pueden aparecer en situaciones de isquemia cerebral y en el contexto de las lesiones cerebrales traumáticas, ya que

en muchos casos se comportan como la isquemia, especialmente como ocurre en las contusiones cerebrales (Simard *et al.*, 2006; Aarabi and Simard, 2009; Kahle *et al.*, 2009; Simard *et al.*, 2009b; Patel *et al.*, 2010) (**Figura 2**). La importancia de esta nueva clasificación radica en su contribución a la mejor comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la formación del edema cerebral y en la identificación de un nuevo canal iónico involucrado en su progresión, formado por el SUR1 y el TRPM4, previamente conocido como canal catiónico no selectivo (NC_{Ca-ATP}) regulado por el SUR1.

4.2.1 Edema citotóxico

Según la definición de Simard, el edema citotóxico se considera un proceso *pre-mórbido* que se explica por el movimiento anómalo de moléculas osmóticamente activas, principalmente Na^+ , Cl^- y agua, del compartimento extracelular al intracelular (Klatzo, 1987; Kimelberg, 1995; Go, 1997; Kempinski, 2001). El movimiento de iones provoca una entrada pasiva de agua a la célula, de lo que deriva una “hinchazón” celular. Sin embargo, estos fenómenos no conllevan la entrada neta de ningún nuevo constituyente desde el espacio intravascular al encéfalo, sino únicamente una redistribución de los componentes entre los espacios extra e intracelular. Según Simard, esta situación es el *primus movens* para la formación de edema iónico y vasogénico, en los que si se produce un paso de elementos desde el compartimento intravascular al tejido cerebral, produciéndose un aumento neto en el volumen total del cerebro (Aarabi and Simard, 2009).

El edema citotóxico se inicia por la acumulación intracelular de Na^+ (Aarabi and Simard, 2009). En condiciones fisiológicas normales, como se ha comentado en apartados previos, la impermeabilidad selectiva de la membrana al Na^+ y la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa mantienen la concentración de Na^+ más elevada en el EEC que en el intracelular (**Figura 2A**). Sin embargo, en condiciones patológicas, como por ejemplo tras un proceso isquémico, se inicia una entrada anormal de las moléculas osmóticamente activas, que son transportadas al interior de las neuronas y las células gliales mediante: 1) transporte pasivo, a través de canales iónicos, 2) transporte activo primario, a través de bombas de iones y 3) transporte activo secundario, a través de cotransportadores. Estos sistemas de transporte pueden ser constitutivos, como los canales de Na^+ y los

canales sensibles a la tetrodotoxina, o de nueva síntesis, como es el caso de canal catiónico no selectivo SUR1-TRPM4, que se sobreexpresa tras diversas patologías del SNC y facilita la entrada de Na^+ al interior de la célula (Chen and Simard, 2001; Iadecola *et al.*, 2006; Aarabi *et al.*, 2009; Afinowi *et al.*, 2009; Aarabi *et al.*, 2012) (**Figura 2B**). La consecuencia inmediata de la sobreexpresión del canal SUR1-TRPM4 es una entrada masiva de Na^+ en las células, seguida de un movimiento pasivo de agua y una hinchazón osmótica que puede conducir a la muerte oncótica de las células (Aarabi and Simard, 2009; Aarabi *et al.*, 2012).

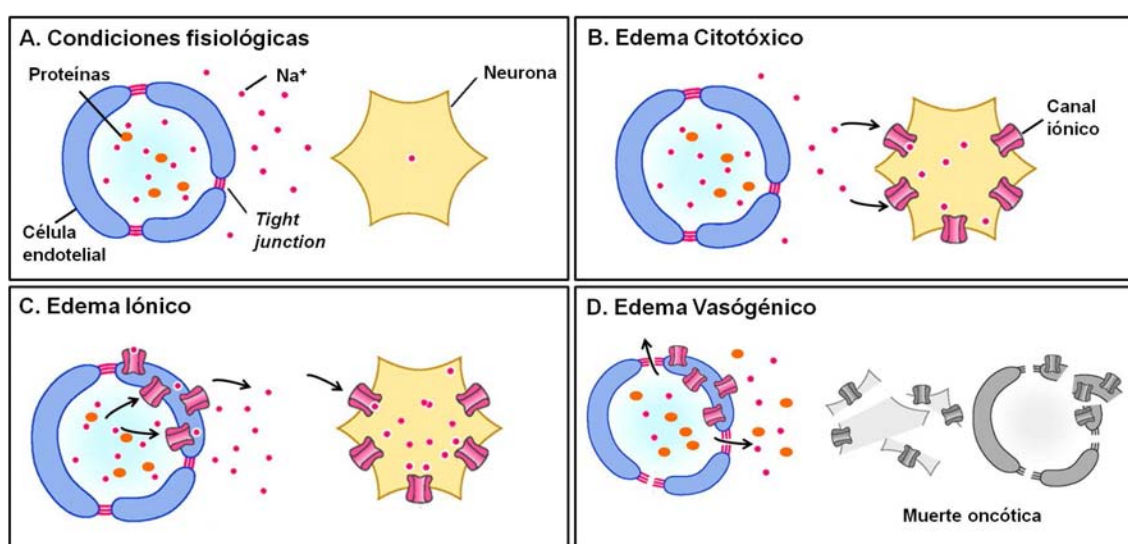


Figura 2. Esquema de la formación y la progresión del edema cerebral según la clasificación de Simard. **A. Condiciones fisiológicas:** La concentración de Na^+ se encuentra en equilibrio entre el espacio extracelular (EEC) y el contenido plasmático, siendo en ambos casos superior al que existe en el interior de la neurona. **B. Edema citotóxico:** Se produce la sobreexpresión de canales iónicos que permiten el paso de Na^+ al interior de la neurona, lo que provoca una disminución en la concentración de Na^+ en el EEC, creando un gradiente entre el contenido intravascular y el EEC. **C. Edema iónico:** Tiene lugar la sobreexpresión de canales iónicos en ambos lados del endotelio vascular que provoca la entrada masiva de Na^+ . Sin embargo, las uniones interendoteliales se mantienen intactas. **D. Edema vasogénico:** Degradación de las *tight junctions* de las células endoteliales que permite el paso de proteínas y otros componentes del torrente sanguíneo. La muerte oncótica es la última consecuencia de una fase de edema iónico mantenido. En el caso de las células endoteliales, la pérdida de integridad y la extravasación sanguínea son los factores responsables de la conversión hemorrágica (Simard *et al.*, 2007). Modificado a partir del esquema de Kahle *et al.* (Kahle *et al.*, 2009).

4.2.2 Edema iónico

La reducción de la concentración extracelular de Na^+ que tiene lugar durante la fase de edema citotóxico crea un gradiente que provoca el paso de iones desde el espacio vascular hasta el extracelular del encéfalo. Este transporte Na^+ es llevado a cabo principalmente por: 1) el co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ situado principalmente en la cara luminal de las células endoteliales (Russell, 2000), 2) la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, localizada en la cara abluminal y 3) el canal de nueva síntesis SUR1-TRPM4 (Chen *et al.*, 2003; Simard *et al.*, 2006). La contribución de estos canales no constitutivos en la formación del edema iónico ha sido demostrada en modelos animales de diversas patologías del SNC (Simard *et al.*, 2012b). El movimiento de Na^+ se acompaña de un movimiento de agua y Cl^- para compensar el desequilibrio osmótico y la neutralidad celular por medio de sus propios canales (Nilius and Droogmans, 2001) (**Figura 2C**).

A pesar de que la permeabilidad de la BHE se encuentra funcionalmente alterada, estructuralmente permanece intacta, las uniones estrechas de las células endoteliales se preservan, y no existe paso de macromoléculas al parénquima cerebral (Simard *et al.*, 2007; Nag *et al.*, 2009).

4.2.3 Edema vasogénico

El edema vasogénico es consecuencia de la desestructuración de las TJs y/o de la membrana de las células endoteliales (disrupción de la BHE), que permite el paso de macromoléculas del contenido vascular al EEC cerebral (**Figura 2D**). Se han propuesto distintos mecanismos para explicar los cambios en la permeabilidad de la BHE que causa el edema vasogénico, entre los que destacan: la hinchazón y la retracción celular, la formación de espacios interendoteliales, la desestructuración de las uniones estrechas, la degradación enzimática de la membrana basal de las células endoteliales, la pinocitosis reversa y la interrupción de la vía de señalización de Ca^{2+} (Castejon, 1984), así como procesos de isquemia que activan otras vías. Los procesos isquémicos incluyen la retracción celular inducida por la trombina (Lee *et al.*, 1996), la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y de las metaloproteinasas (MMP) que participan en la disrupción de la BHE. En este proceso, el VEGF actúa fosforilando residuos de tirosina en las proteínas de las

TJs. Este cambio induce la pérdida de las uniones célula-célula, la reducción del contacto intercelular y el aumento de la permeabilidad paracelular (Esser *et al.*, 1998; Chodobski *et al.*, 2011). Además, el VEGF promueve la actividad de la MMP-9 que contribuye en la degradación de la membrana basal comprometiendo la integridad estructural de los capilares cerebrales (Fukuda *et al.*, 2004; Valable *et al.*, 2005). Una vez que se pierde la integridad de la BHE, los capilares cerebrales se comportan como capilares fenestrados y, por lo tanto, la presión arterial y la PIC actúan como determinantes en la formación de edema tisular debido a cambios secundarios a la presión hidrostática capilar.

4.2.4 Transformación hemorrágica

La transformación hemorrágica constituye la etapa final de cualquier tipo de edema isquémico en el que se restablece el flujo sanguíneo (Wang and Lo, 2003) o en aquellos casos de edema postraumático en que existe una disrupción anatómica de la BHE y un aumento de la presión hidrostática capilar. Las principales causas de conversión hemorrágica son la pérdida de la integridad microvascular (Wang and Lo, 2003) y la extravasación de los constituyentes de la sangre, incluyendo los eritrocitos, en el parénquima cerebral. La gravedad de la hemorragia varía desde la aparición de pequeñas petequias a un gran hematoma con efecto ocupante de espacio (Thanvi *et al.*, 2008) y, en el caso del infarto cerebral, su frecuencia y gravedad está influenciada por el uso de anticoagulantes, trombolíticos y manipulaciones endovasculares (Alvarez-Sabin *et al.*, 2013). La transformación hemorrágica es un problema multifactorial causado principalmente por la reperfusión tisular y el estrés oxidativo (Simard *et al.*, 2007). Los mecanismos causantes incluyen la activación de las células endoteliales, la degradación de la laminina por plasmina, la transmigración de los leucocitos a través de las paredes de los vasos (Balami *et al.*, 2011), además de procesos implicados en la fase de edema vasogénico. De los implicados en la fase anterior cabe destacar los que contribuyen a la disrupción de la BHE: VEGF (Abumiya *et al.*, 2005), MMP-9 (Heo *et al.*, 1999; Wang and Lo, 2003; Fukuda *et al.*, 2004) y el canal SUR1-TRMP4, responsable de la muerte oncótica de las células endoteliales (**Figura 2D**). En esta situación, se añade la llegada de componentes hemáticos al tejido, que provocan una fuerte respuesta

neuroinflamatoria que contribuye al aumento de la PIC (Rosenberg, 2002; Price *et al.*, 2003; Zheng and Yenari, 2004).

5. El receptor de la sulfonilurea 1 y el canal SUR1-TRPM4

El SUR1 es una proteína de membrana de la familia de las *ATP-binding cassette* codificada por el gen *Abcc8*. La mayoría de las proteínas de esta familia acoplan la hidrólisis de ATP al transporte de solutos a través de las membranas biológicas (Schneider and Hunke, 1998). Esta proteína, a pesar de pertenecer a esta familia, no es transportadora y por sí misma no tiene ninguna función conocida. Para llevar a cabo su función necesita unirse a una unidad formadora de poro. La asociación más estudiada del SUR1 es la que establece con Kir6.2 para formar el canal de potasio regulado por ATP (K_{ATP}), descrito inicialmente en miocitos (Noma, 1983) y posteriormente en las células β del páncreas, el músculo esquelético y liso, el cerebro y la hipófisis (Seino, 1999). El cierre del canal K_{ATP} induce la despolarización de la membrana celular, lo que aumenta el Ca^{2+} intracelular y provoca la liberación de insulina en las células β de páncreas (Seino, 1999). Esta proteína contiene dos dominios de unión de alta afinidad a sulfonilureas terapéuticas y componentes relacionados (Simard *et al.*, 2012a), fármacos utilizados para tratar la diabetes mellitus tipo 2, diabetes neonatal y algunas formas de hiperinsulinismo. El SUR1, en el cerebro, se expresa constitutivamente únicamente en algunas neuronas, donde forma exclusivamente el canal K_{ATP} (Liss and Roeper, 2001) e induce hiperpolarización, protegiendo a la célula de la sobrecarga de Ca^{2+} (Yamada and Inagaki, 2005). A pesar de esta expresión constitutiva, el SUR1 se ha detectado sobreexpresado en neuronas, células endoteliales, astrocitos y oligodendrocitos tras diversos tipos de patologías del SNC como el infarto cerebral, la hemorragia subaracnoidea, el TCE, la lesión traumática de la médula espinal y la hemorragia de matriz germinal (Simard *et al.*, 2012b). Recientemente, Woo y colaboradores han demostrado que el SUR1 también se asocia a otra unidad formadora de poro (TRPM4) (Woo *et al.*, 2013) para formar el canal SUR1-TRPM4 (previamente descrito como canal SUR1- NC_{ATP} (Chen *et al.*, 2003; Simard and Chen, 2004; Simard *et al.*, 2006)). Esta asociación explica por qué fármacos como la glibenclamida y repaglinida actúan, también, como potentes inhibidores de la actividad de los canales SUR1-

TRPM4 (Simard *et al.*, 2012b). TRPM4 es un miembro de la familia de canales de cationes no selectivos activados por Ca^{2+} que forman parte de la familia de los receptores de potencial transitorio (TRP) (Vennekens and Nilius, 2007). El primer miembro (TRPM4a) fue clonado en 2001 (Xu *et al.*, 2001) y el segundo miembro y, probablemente, el canal más representativo de esta familia (TRPM4b) se clonó y se caracterizó por Launay y colaboradores en el año 2002 como un canal específico de cationes monovalentes, activado por Ca^{2+} y expresado tanto en las células excitables y como no excitables (Launay *et al.*, 2002). El canal TRPM4 forma parte de los principales mecanismos de regulación del flujo de Ca^{2+} (Vennekens and Nilius, 2007; Guinamard *et al.*, 2011) a la célula a través de otras vías permeables al Ca^{2+} , protegiendo así al SNC ante un aumento patológico de calcio intracelular, una de las señas de identidad de la lesión del SNC (Arundine and Tymianski, 2003; Bano and Nicotera, 2007).

El canal catiónico no selectivo regulado por el SUR1 (SUR1-TRPM4) fue identificado por primera vez en 2001, mediante experimentos de *patch-clamp*, en cultivo de astrocitos reactivos (Chen and Simard, 2001), a pesar de que había sido identificado anteriormente en otros tipos celulares (Sturgess *et al.*, 1986; Gray and Argent, 1990; Champigny *et al.*, 1991; Popp and Gogelein, 1992; Ono *et al.*, 1994). Este canal es permeable a cationes monovalentes inorgánicos (Na^+ , K^+ , Cs^+ , Li^+ , Rb^+), pero es impermeable a cationes divalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} (Chen and Simard, 2001). La permeabilidad de este canal al Cs^+ hace que sea fácilmente diferenciable de K_{ATP} y otros canales de potasio. La apertura del canal requiere concentraciones nanomolares de Ca^{2+} intracelular y una depleción de ATP intracelular (Chen and Simard, 2001).

La transcripción del *Abcc8/SUR1*, unidad reguladora del canal, está regulada por diversos factores de transcripción que dependen del mecanismo de inicio del daño cerebral (Simard *et al.*, 2012b). Es conocido que el promotor del gen *Abcc8* contiene sitios de unión para la proteína específica 1 (Sp1) y para el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) (Simard *et al.*, 2006). Así, tras una situación de isquemia/hipoxia, como por ejemplo tras un infarto cerebral, la expresión de *Abcc8/SUR1* depende de una activación secuencial de genes que inicia el factor inducible por hipoxia (HIF1 α), quien se une a su sitio de unión el promotor del gen de la Sp1, estimulando así su transcripción (Woo *et al.*, 2012). Seguidamente, Sp1 se une en su sitio de unión

en el promotor de *Abcc8* para activar su transcripción. En cambio, en un contexto de neuroinflamación, como por ejemplo después de una hemorragia subaracnoidea, la expresión del *Abcc8* está regulada positivamente por medio de NF- κ B, activado por la vía del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Simard *et al.*, 2009a). Es conocido que después de un TCE tanto la Sp1 como el NF- κ B están involucrados (Patel *et al.*, 2010), aunque el mecanismo de activación está todavía por confirmar. Todo apunta a que ambas proteínas se activan por acción mecánica, ya que tanto Sp1 como NF- κ B han sido caracterizados como factores de transcripción mecanosensibles (Korenaga *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2004; Verstraeten *et al.*, 2010).

Aunque los canales SUR1-K_{ATP} y SUR1-TRPM4 están regulados por la misma unidad reguladora, el SUR1, ambos tienen efectos funcionales opuestos en las lesiones del SNC. La apertura del canal de K_{ATP} hiperpolariza la célula provocando un efecto neuroprotector (Yamada and Inagaki, 2005), mientras que la apertura del canal SUR1-TRPM4 despolariza la célula, hecho que se asocia con la muerte celular oncótica (Simard *et al.*, 2012a; Simard *et al.*, 2012b).

6. Monitorización del paciente neurocrítico

Como se ha comentado en apartados anteriores, a la lesión cerebral aguda a menudo le sucede una cascada de procesos patológicos a nivel molecular, que pueden tener lugar minutos, horas e incluso días después de la lesión inicial, y que incrementan el efecto de las lesiones primarias existentes produciendo un peor resultado neurológico. Las lesiones secundarias son potencialmente evitables o tratables, por lo que constituyen posibles dianas de actuación terapéutica. En el paciente neurocrítico, estas lesiones secundarias o complicaciones pueden tener un origen sistémico o cerebral, por ello es importante monitorizar en estos pacientes toda una serie de parámetros cerebrales y sistémicos, así como identificar y controlar posibles biomarcadores de las distintas lesiones.

Se entiende por biomarcador cualquier hecho observable o cuantificable que pueda ser utilizado para facilitar el diagnóstico, prever el pronóstico o monitorizar

la evolución o la recuperación de una patología, así como para evaluar la respuesta a un tratamiento (Maas *et al.*, 2012). Los distintos sistemas de neuromonitorización disponibles en el momento actual pueden ser útiles para la identificación y cuantificación de estos biomarcadores. Sin embargo, para este objetivo, adquiere una especial relevancia la posibilidad de utilizar la MD cerebral, que permite identificar cambios moleculares en el contenido del EEC del parénquima encefálico.

El edema cerebral es una de las lesiones secundarias más frecuentes y se caracteriza por cambios en el contenido iónico del EEC. La monitorización de estos cambios a partir de la MD cerebral podría ayudar a: 1) conocer mejor la evolución del edema cerebral, 2) optimizar el uso de las maniobras terapéuticas y 3) controlar el efecto de los tratamientos aplicados. Sin embargo, además de la MD, existen distintos tipos o sistemas de monitorización adicionales, invasivos y no invasivos, continuos o puntuales que aportan información regional o global adicional del cerebro.

6.1 Monitorización sistémica

La monitorización sistémica de cualquier paciente neurocrítico consiste fundamentalmente en el registro de los siguientes parámetros: 1) morfología del electrocardiograma, 2) saturación de oxígeno arterial, 3) presión arterial, 4) presión venosa central, 5) temperatura central, 6) presión parcial de oxígeno y CO₂ en sangre arterial y 7) niveles de electrolitos plasmáticos (Cremer *et al.*, 2005).

6.2 Monitorización cerebral

Dentro del capítulo de la monitorización cerebral, la información a obtener puede proceder de sistemas no invasivos y/o invasivos.

6.2.1 Monitorización cerebral no invasiva

Cada vez se hace más hincapié en la aplicación de sistemas de monitorización no invasiva, a pesar de que la información que proporcionan, en nuestros días, es algo limitada. Como ejemplos de monitorización no invasivos están: la

espectroscopia por rayos cercanos a los infrarrojos, que permite la medir la oxigenación de la hemoglobina y estimar de forma indirecta el flujo sanguíneo cerebral, el doppler transcraneal, que permite detectar cambios en el flujo sanguíneo cerebral por medio de ondas de ultrasonidos y distintas técnicas de neuroimagen, como la tomografía computarizada (TC), tomografía computarizada por emisión de positrones (PET) y la resonancia magnética (RM), entre otras.

6.2.2 Monitorización cerebral invasiva

Dentro de este apartado se incluyen una serie de herramientas que permiten medir la PIC y obtener información directa de ciertos parámetros del tejido cerebral, como la disponibilidad de oxígeno y la producción de determinados metabolitos celulares. Esta información es indispensable en un contexto en el que el paciente está conectado a un ventilador, sedado y relajado, y en el que perdemos la posibilidad de realizar un adecuado seguimiento clínico.

Presión intracraneal: La PIC es la fuerza que el contenido intracraneal (tejido cerebral, sangre y LCR) ejerce sobre el cráneo. A pesar de que se ha descrito que en determinados casos existen distintos compartimentos intracraneales con valores de PIC que pueden ser dispares, se considera que se trata de un sistema de monitorización global. Se consideran normales los valores inferiores o iguales a 15 mmHg, aunque en los pacientes neurocríticos se establece un umbral de 20 mmHg para el inicio de medidas terapéuticas específicas para el tratamiento de la hipertensión intracraneal. La monitorización continua de este parámetro constituye una maniobra básica en el manejo de los pacientes con un TCE grave y se utiliza para diagnosticar la hipertensión intracraneal y como guía terapéutica durante el tratamiento del paciente. Según las guías de práctica clínica de la *Brain Trauma Foundation* (BTF), la PIC debe monitorizarse en todos los pacientes con un TCE grave con lesiones en la TC craneal (2007).

Saturación de oxígeno en el bulbo de la yugular (SjO_2): la SjO_2 permite estimar el balance entre el aporte y el consumo cerebral de O_2 (Tisdall and Smith, 2007) y realizar estimaciones del flujo sanguíneo cerebral global. Este sistema de monitorización requiere la colocación de un catéter cuyo extremo se sitúa en el bulbo de la vena yugular interna dominante y puede ser continuo, mediante la colocación de un catéter de fibra óptica conectado a un monitor específico, o

discontinuo, extrayendo muestras de sangre a través del catéter para analizarlas con la frecuencia deseada. Se consideran normales los valores de saturación de oxígeno que oscilan entre el 55 y 75%.

Presión tisular de oxígeno (PtiO₂): A partir de un fino catéter colocado en el EEC del cerebro, la PtiO₂ mide la tensión de oxígeno disuelto en el parénquima cerebral y refleja un balance entre el aporte y la demanda tisular de O₂. Se trata de un sistema de monitorización local que permite obtener información continua y directa de los niveles de oxigenación del cerebro. En general, se considera que los valores normales de la PtiO₂ se sitúan entre los 15 y 40 mmHg. Las lecturas inferiores a 15 mmHg se traducen como indicadoras de hipoxia tisular, siendo ésta grave cuando los valores se encuentran por debajo de los 10 mmHg.

La microdiálisis cerebral: La MD constituye un sistema de monitorización local que permite el estudio del contenido molecular del EEC de cualquier órgano *in vivo* y, en nuestro caso, permite el muestreo neuroquímico *cuasi* continuo del EEC cerebral en pacientes neurocríticos (Lieutaud, 2007; Kitagawa *et al.*, 2013). Dada la relevancia de este sistema de monitorización en nuestros estudios, en los siguientes apartados se describen con mayor detalle las características de este sofisticado sistema de monitorización cerebral.

7. La microdiálisis cerebral

La primera aplicación de la diálisis a nivel cerebral fue descrita en animales por Bito y colaboradores (Bito *et al.*, 1966) en 1966 en un estudio que pretendía demostrar que el EEC cerebral mantenía una composición distinta al LCR y al plasma. Años después, en 1972, Delgado y colaboradores desarrollaron el concepto de MD continua aplicada a en animales (Delgado *et al.*, 1972). Sin embargo, no fue hasta 1974 cuando se perfeccionó el sistema para la obtención de muestras de microdializado cerebral fiables y adecuadas para su análisis (Ungerstedt and Pycock, 1974). A pesar de que los primeros trabajos de Ungerstedt y colaboradores en humanos, cuyo objetivo era el estudio del patrón bioquímico en el cerebro sano y tras ciertas patologías cerebrales, datan del 1982 (Ungerstedt *et al.*, 1982), no fue hasta el 1992 que la MD se introdujo en el ámbito clínico como un nuevo elemento de neuromonitorización a cabecera del paciente

en las unidades de cuidados intensivos (UCI) (Persson and Hillered, 1992). Actualmente, este sistema se ha implantado en determinados centros como una nueva herramienta complementaria para la neuromonitorización de pacientes con lesiones cerebrales agudas tales como el TCE, el infarto cerebral o la hemorragia subaracnoidea. No obstante, Kitagawa y colaboradores reportaron que en 2012 tan sólo 42 centros en mundo utilizaban la MD para la toma decisiones clínicas en el manejo de este tipo de pacientes (Kitagawa *et al.*, 2013). A día de hoy la MD cerebral constituye fundamentalmente una herramienta de investigación, utilizada en centros con amplia experiencia en el manejo del paciente neurocrítico cuyo uso continuado, no obstante, permitirá disponer de una información bioquímica esencial para avanzar en el conocimiento fisiopatológico de las lesiones cerebrales y, en último término, puede contribuir a mejorar el resultado final de estos pacientes.

La MD cerebral consiste en la inserción de un fino catéter semirrígido (**Figura 3A**) en el EEC del encéfalo dotado de una membrana semipermeable porosa en uno de sus extremos, que permite la difusión de moléculas en ambas direcciones hasta que la composición fluido del ECC se equilibra con el líquido de perfusión (LP). Su funcionamiento se asemeja al de un capilar sanguíneo, donde las moléculas con un peso molecular (PM) inferior al *cut-off* de la membrana de diálisis pasan a su través a favor de gradiente de concentración (Afinowi *et al.*, 2009). Dado que el LP, en general, únicamente contiene iones, para el resto de moléculas el gradiente de concentración se establecerá desde el líquido intersticial hacia el interior de la membrana dializante. El intercambio de solutos que tiene lugar durante el proceso de diálisis se rige por procesos de transporte pasivo, que regulan la difusión entre dos compartimentos separados por una membrana. Este intercambio se expresa matemáticamente mediante la Ley de Fick (Benveniste, 1989):

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

Donde J es el flujo neto, D es el coeficiente de difusión acuosa, δC es la diferencia de concentración de la molécula a ambos lados de la membrana y δX es la distancia que tiene que atravesar la molécula.

El otro extremo del catéter se conecta a una microbomba de perfusión acoplada a una jeringa que infunde un fluido de composición isotónica para el tejido en el que

se inserta, en nuestro caso el parénquima cerebral, a una velocidad que puede variar según el estudio, siendo $0,3\mu\text{L}/\text{min}$ la más comúnmente utilizada en la monitorización del metabolismo cerebral en pacientes neurocríticos. El dializado resultante se recoge en un microvial para su posterior análisis.

Las UCIs que utilizan la MD como método de monitorización del metabolismo cerebral, disponen de analizadores que se utilizan a la cabecera del paciente (**Figura 3B**) (CMA600, CMA Microdialysis, Solna, Suecia o ISCUS^{Flex}, M Dialysis AB, Solna, Suecia), que permiten determinar de manera periódica la concentración de metabolitos como la glucosa, el lactato o el piruvato, entre otros.

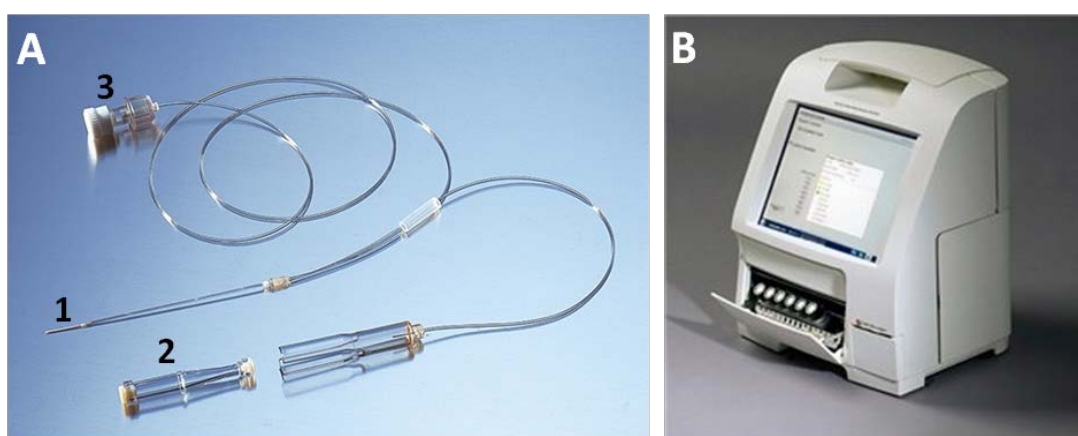


Figura 3. Sistema de microdiálisis cerebral. A: Catéter cerebral. 1. membrana semipermeable dializante. **2.** microvial de recogida de muestra. **3.** extremo del catéter donde se conecta a la microbomba de perfusión. **B. Analizador Iscus^{flex}** (M Dialysis AB, Solna, Suecia). *Imágenes cedidas por cortesía de M Dialysis AB.*

7.1 El catéter de microdiálisis cerebral

Actualmente, se comercializan dos tipos de catéteres de MD para la monitorización cerebral, el CMA70 y el CMA71 (M Dialysis AB). La diferencia entre ambos radica en el material de fabricación de la membrana semipermeable, que permite que el tamaño del poro sea distinto. El CMA70 está fabricado a partir de poliamida que permite un poro de 20 kDa, mientras que el CMA71 es de polietersulfona con la que se consigue un tamaño de poro de 100 kDa. El tamaño de poro de membrana o *molecular weight cut-off* (MWCO) hace referencia al PM,

en kDa, a partir del cual el 80% de las moléculas de ese PM no pueden atravesar los poros de la membrana dializante. Las moléculas con un PM inferior al MWCO de la membrana podrán difundir hacia el interior del catéter y ser transportadas hacia el microvial de recogida. Mientras, que aquellas moléculas de mayor tamaño no pasarán por los poros de la membrana, o bien su difusión a través de los poros será tan lenta que su recuperación en el microdializado será casi indetectable (Ao and Stenken, 2006; Wang and Stenken, 2006). Ambos catéteres presentan una punta de oro en el extremo distal de la membrana (**Figura 4**) que permite localizar exactamente la posición del catéter en el tejido cerebral mediante la realización de una imagen radiográfica, que habitualmente es una TC cerebral.

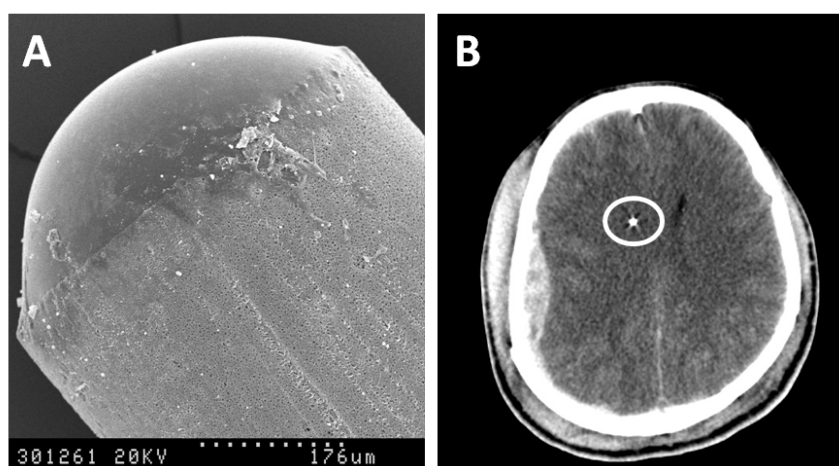


Figura 4. Punta del catéter de microdiálisis. A: Visualización de la punta de oro de catéter CMA71 al microscopio electrónico de barrido. B: Visualización de la punta de oro de catéter CMA71 en una tomografía computerizada. Catéter CMA71, M Dialysis AB

Para el presente estudio únicamente se han utilizado catéteres CMA71, también conocidos como catéteres de alta resolución. Estos catéteres están aprobados para su uso clínico en Europa (CE de aprobación de acuerdo con la Directiva de Dispositivos Médicos 93/42/CEE). El CMA71 está compuesto por: la membrana de diálisis, realizada a partir de polietersulfona, de 10 mm de longitud y 0,6 mm de diámetro; un eje de poliuretano de 60 mm de longitud y 0,9 mm de diámetro y los tubos externo y interno de 1 mm de diámetro y 220 y 600 mm de longitud respectivamente, fabricados también en poliuretano. Tal y como describen Helmy y colaboradores, mediante un estudio al microscopio electrónico de barrido, la

membrana dializante consta de dos caras fácilmente diferenciables, la cara externa formada por poros de gran tamaño y la cara interna más fina y con poros de menor tamaño. Entre ambas caras de la membrana de diálisis existe una estructura esponjosa que presenta cavidades vacías e irregulares, más grandes que los poros (Helmy *et al.*, 2009). Esta estructura de la membrana de diálisis puede ofrecer obstáculos, todavía no bien determinados, al paso de moléculas que deberían difundir libremente, al menos desde un punto de vista teórico.

7.2 El concepto de recuperación relativa

A pesar de que las moléculas a estudiar mediante MD tengan un PM inferior al MWCO de la membrana dializante, es bien conocido que la eficiencia de paso a través de la misma nunca es del 100%. Por ello, la concentración de una molécula en el microdializado será únicamente una estimación de la concentración real del EEC. La recuperación relativa (RR) se define como la proporción entre la concentración obtenida en el microdializado con respecto a la concentración real de tejido (estudios *in vivo*) o de la solución a estudiar (estudios *in vitro*) (Stahle *et al.*, 1991; Helmy *et al.*, 2007) y está condicionada por el PM de la molécula de estudio y otras propiedades de la membrana. La RR debe calcularse para cada molécula de interés, ya que moléculas con un PM similar pueden tener una RR muy diferente. Existen varios métodos para calcular la RR (Chefer *et al.*, 2009), pero el más utilizado es el descrito por Bungay (Bungay *et al.*, 1990) mediante la siguiente ecuación:

$$RR = \frac{C_{md} - C_{in}}{C_{matriz} - C_{in}}$$

Donde C_{md} hace referencia a la concentración de la molécula de estudio en el microdializado, C_{in} es la concentración de la misma molécula en el LP y C_{matriz} corresponde con la concentración de la molécula de estudio en el medio externo.

En la mayoría de estudios a nivel cerebral, el LP utilizado es un fluido comercial de concentraciones similares al LCR y que no contiene la molécula de interés, por lo que la ecuación se simplifica del siguiente modo:

$$RR = \frac{C_{md}}{C_{matriz}}$$

En cambio, para poder aplicar la ecuación simplificada de Bungay en el estudio de la RR de los iones presentes en el LP utilizado en la práctica clínica (contiene: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Cl^-), sería necesario sustituirlo por agua desionizada, lo que impediría aplicar del modelo experimental a los estudios *in vivo*. La perfusión con agua desionizada provocaría la dilución del EEC y una recuperación de fluido inestable debido a la hipotonía del perfundido. Además, la infusión continua de un fluido hipoosmótico puede causar lesiones cerebrales y no está aprobado para uso humano. Por ello, es necesario aplicar otro método para conocer la RR cuando interesa estudiar la composición iónica de un tejido.

7.2.1 Factores que afectan a la recuperación relativa *in vitro* e *in vivo*

Existen factores específicos que afectarán a la RR tanto en los estudios *in vitro* como *in vivo*. Estos factores pueden dividirse en: 1) características de la membrana de MD, como son el tamaño del poro, longitud y área de la membrana de diálisis, 2) condiciones de perfusión, como por ejemplo la velocidad y composición del LP y la temperatura y 3) características de la molécula de estudio, como el PM. Otros factores únicamente influirán cuando la recuperación sea *in vivo* debido al efecto de la interacción tisular con la membrana de diálisis y al metabolismo celular.

De forma óptima, para determinar la fiabilidad de los estudios *in vivo* de una determinada molécula mediante MD cerebral deberían realizarse estudios previos *in vitro*. La forma más sencilla y utilizada de validar la información que se obtiene de las técnicas de MD cerebral consiste en determinar *in vitro* si la molécula de interés es capaz de difundir a través de los poros de la membrana y calcular el porcentaje de RR a partir de un medio de concentración conocida para el analito de interés. *In vitro* es posible controlar casi todos los factores que puedan influir en la RR. Sin embargo, se ha observado que la recuperación *in vitro* no se puede extrapolar de manera directa a los resultados obtenidos *in vivo*, debido a que al implantar un catéter de MD cerebral en el tejido existen otros factores que pueden influir en la RR y que no son reproducibles en el laboratorio, como es el fenómeno de *biofouling*, la tortuosidad del tejido, el metabolismo de las moléculas o los fenómenos de intercambio intra y extracelular (Ao and Stenken, 2006). A

continuación se detallan los fenómenos que pueden influir en la RR de las técnicas de MD:

El tamaño del poro de la membrana: este factor condiciona el tipo de moléculas que podrán ser detectadas en el microdializado obtenido. Así, las membranas con un MWCO de 20 kDa permiten el paso de moléculas de bajo PM, como metabolitos energéticos (glucosa, lactato y piruvato). Mientras que las membranas de alta resolución (MWCO de 100 kDa) permiten el paso de macromoléculas de PM superior. Sin embargo, el aumento en el tamaño de poro de la membrana puede conllevar la aparición de un problema adicional, el fenómeno de la ultrafiltración. Este fenómeno hace referencia a la pérdida de LP hacia la matriz o solución problema en los sistemas *in vitro* o hacia el tejido en los estudios *in vivo*. Este fenómeno es más común cuando el catéter se perfunde a una velocidad elevada. En los estudios *in vitro*, esta pérdida de líquido puede diluir la concentración de la matriz, alterando la estimación de la concentración del analito de interés. En cambio, *in vivo* el fenómeno de ultrafiltración podría modificar el contenido bioquímico del tejido, afectar la función de las células y provocar cambios en los niveles de las moléculas de estudio (Clough, 2005). Algunos autores han demostrado que la adición de agentes osmóticos en el LP, como albúmina sérica o dextrano, reduce la pérdida de líquido hacia el medio externo o espacio intersticial cerebral, ya que los agentes osmóticos compensan la diferencia de presiones osmóticas entre el medio externo y el dializado (Ao *et al.*, 2004; Clough, 2005).

Longitud y área de la membrana de MD: la RR y recuperación absoluta del analito de estudio aumenta en proporción al área de la membrana dializante (Benveniste, 1989). Así, una mayor longitud de la membrana de MD implica un incremento en su superficie de diálisis y, por tanto, una mayor RR de las moléculas.

Composición del líquido de perfusión: como se ha indicado en apartados anteriores, para que el cálculo de la RR sea más sencillo, el LP no debe contener la molécula de interés (Benveniste, 1989). Además, la adición de un agente osmótico (albúmina o dextrano) provoca un aumento de la RR. A fin de no perturbar la composición iónica del tejido de estudio se utilizan líquidos de perfusión específicos para cada tejido, con distintas concentraciones iónicas.

Velocidad del líquido de perfusión: este parámetro está inversamente relacionado con la RR de los solutos. Cuanto más elevada es la velocidad de perfusión, más comprometida se ve la difusión de los solutos, ya que se crea un gradiente de presiones hidrostáticas positivas a través de la membrana de dializado que causa una disminución en el transporte de los analitos (Benveniste, 1989).

Temperatura: El coeficiente de difusión de una sustancia aumenta un 1-2% por cada °C. Por lo tanto, teóricamente, la recuperación de una molécula será mayor a temperatura corporal (37°C) que a la temperatura ambiente de un laboratorio (25°C) (Benveniste, 1989).

Propiedades del soluto de estudio: la RR difiere para cada analito y se ve influida por su PM, que afecta a su coeficiente de difusión acuosa. Este coeficiente de difusión también depende otras propiedades como la estructura tridimensional de la molécula, el radio de giración, el punto isoeléctrico, la carga neta, etc (Wang and Stenken, 2006). En los estudios *in vivo*, además, este coeficiente también está afectado por la tortuosidad del tejido (Benveniste, 1989).

Concentración de la molécula en el medio externo: la recuperación de una molécula depende de su concentración medio externo o matriz (Benveniste, 1989). Hecho que debe tenerse en consideración en los estudios *in vivo*, en los que el analito de interés se encuentre en bajas concentraciones, para aplicar métodos de detección más sensibles (Ao *et al.*, 2004).

Interacción de la molécula con la membrana dializante: el material de fabricación de la membrana de MD puede interactuar con las moléculas que pasan a través de los poros por diversos mecanismos (por ejemplo la carga), afectando a su transporte y en consecuencia a la RR (Benveniste, 1989). En el caso de moléculas de alto PM estas propiedades pueden contribuir incluso a que se produzca la obstrucción de alguno de los poros.

Biofouling: se trata de un factor que únicamente está presente cuando los catéteres se implantan en un tejido. Consiste en la acumulación de material biológico en la superficie de la membrana de MD secundaria a fenómenos de inflamación y reacción a un cuerpo extraño que genera el catéter de MD en el tejido. Estos fenómenos pueden afectar a la recuperación de los analitos, ya que los poros de la membrana de MD se ocluyen impidiendo su paso a través de la

membrana. Este problema se agrava cuanto más tiempo permanece implantado un catéter.

Tortuosidad tisular: la difusión de cualquier molécula en el tejido es menor que en solución acuosa. Esto es debido, en gran parte, al reducido volumen líquido del espacio intersticial y al complejo entramado celular del tejido que puede dificultar el desplazamiento de las moléculas (Nicholson and Rice, 1986; Benveniste and Huttemeier, 1990). Además, en el tejido, la difusión puede verse afectada por la unión de analito a las proteínas de superficie de las células (Rice *et al.*, 1985) dificultando así su recuperación. Esto significa que *in vivo* la RR de un analito debería ser inferior a la que se determina *in vitro*.

8. Marcadores de disrupción de la barrera hematoencefálica

Uno de los problemas clínicos más importantes, con relevancia en el manejo terapéutico los pacientes que han sufrido un TCE o un infarto cerebral, es la determinación de la integridad de la BHE así como la detección de la transición de edema iónico a edema vasogénico (Simard *et al.*, 2007). La BHE evita la difusión de la mayoría de moléculas solubles en agua más de 500 Da. El estado funcional de la BHE juega un papel importante en la aplicación cualquier tratamiento farmacológico en pacientes neurocríticos. Las alteraciones de la BHE y, por consiguiente, su disrupción también pueden facilitar el diagnóstico lesión cerebral. La disrupción estructural de la BHE puede detectarse por el paso de macromoléculas desde el espacio intravascular al intersticio cerebral y viceversa. Cuando la BHE está abierta, proteínas específicas del tejido cerebral pueden entrar a la circulación periférica, donde pueden ser cuantificadas y ayudar al diagnóstico de la lesión cerebral. Por otra parte, proteínas procedentes del torrente sanguíneo pueden penetrar en el encéfalo y ser detectadas en el LCR o en el intersticio cerebral mediante técnicas de MD a partir de estudios directos del propio tejido.

Las alteraciones de la BHE también pueden influir en la acción de determinados fármacos. Si tras una lesión aguda la BHE se “abre”, los tratamientos farmacológicos administrados por vía intravenosa tendrían la oportunidad de llegar con mayor facilidad al cerebro. Por ello, el efecto de las soluciones

hiperosmolares es distinto en función del grado de integridad de la BHE. Por otra parte, el estado de la BHE es un elemento clave en los fenómenos de transición del edema iónico al edema vasogénico. Saber en qué paciente y en qué momento la BHE ha perdido su integridad abriría posibles vías de éxito de los futuros estudios farmacológicos (Blyth *et al.*, 2009).

El *gold standard* para evaluar el estado funcional de la BHE es el cálculo del cociente albúmina LCR-albúmina suero (Q_A) (Reiber and Peter, 2001). La albúmina es un candidato óptimo, debido a que se sintetiza periféricamente, no se cataboliza en el SNC y no difunde fácilmente a través de una BHE intacta (Reiber and Peter, 2001). Sin embargo, la necesidad de obtener muestra de LCR mediante la colocación de un drenaje para determinar el Q_A limita su uso tanto en la práctica clínica como en proyectos de investigación. Por ello, sería necesario encontrar un método menos invasivo o bien aprovechar alguno de los métodos de monitorización utilizados de forma rutinaria en los pacientes neurocríticos. Ese método podría ser la MD cerebral.

En los estudios de MD cerebral, el marcador ideal de integridad de la BHE debería ser una molécula endógena que no se secretara en el tejido neural, con muy bajo contenido en el LCR y en el espacio intersticial cerebral y que tuviera un PM que permitiera su recuperación por membranas de 100 kDa. El marcador aparentemente ideal en este caso también sería la albúmina (PM: 69 kDa). Sin embargo, la falta de estudios de RR *in vitro* hace que su valor en muestras de microdializado cerebral pueda ser cuestionable. Una alternativa a la albúmina podría ser la cistatina C.

La cistatina C es una proteína plasmática de 15,8 kDa que ha sido introducida recientemente como una alternativa más fiable que la creatinina para valorar la filtración glomerular (Hojs *et al.*, 2006). La cistatina C es un inhibidor de las proteasas que se produce de forma constante en casi todas las células nucleadas y sus niveles plasmáticos son independientes de la edad, sexo y de la masa muscular del paciente (Hojs *et al.*, 2006). Al igual que la albúmina, la cistatina C se detecta a niveles muy bajos en el proteoma del espacio intersticial cerebral (Zhang *et al.*, 2005). Este hecho y su bajo PM hacen que esta molécula también sea atractiva como proteína diana para ser detectada mediante MD cerebral.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las lesiones cerebrales agudas, como las que se producen en un TCE o un infarto maligno, provocan importantes desequilibrios iónicos, generando una entrada masiva de iones en las células, con el consecuente arrastre osmótico de agua y la formación de edema cerebral. La alteración de las concentraciones iónicas induce la acumulación de agua en el espacio intra y extracelular, causando hinchazón del tejido cerebral lesionado (Lang *et al.*, 2014). Estos fenómenos pueden ser especialmente importantes en la evolución de las contusiones cerebrales y los infartos cerebrales, explicando el aumento volumétrico de los mismos y el deterioro clínico de los pacientes. Además, estos trastornos iónicos pueden estar directamente relacionados con la sobreexpresión de distintos canales iónicos, constitutivos o de nueva expresión como el canal SUR1-TRPM4, que tiene lugar tras lesiones cerebrales como las neurotraumáticas o el IMACM.

Las **hipótesis** específicas que en esta Tesis Doctoral se pretendían verificar o refutar fueron:

1. El tejido cerebral pericontusional presenta una sobreexpresión del SUR1, unidad reguladora del canal catiónico no selectivo SUR1-TRPM4, involucrado en el incremento de la permeabilidad de la BHE y la formación y progresión del edema cerebral en humanos.
2. El diseño de un modelo *in vitro* que simule las condiciones en las que se encuentra *in vivo* un catéter de MD cuando se implanta en el parénquima cerebral permitirá a establecer la RR real de Na^+ , K^+ , Cl^- , albúmina y cistatina C obtenidos a partir de microdializados cerebrales.
3. La MD cerebral permite el estudio del contenido iónico y macromolecular del EEC de pacientes con lesiones cerebrales agudas secundarias a un TCE o un infarto maligno.
4. El edema vasogénico se caracteriza por la disrupción anatómica de la BHE permitiendo el paso de macromoléculas desde el compartimento sistémico al espacio intersticial cerebral. La albúmina y la cistatina C son excelentes

marcadores de disrupción estructural de la BHE y el cociente entre las concentraciones de albúmina o cistatina C plasmáticas versus las obtenidas en los microdializados cerebrales son un buen índice para definir este estadio.

A partir de las hipótesis anteriores, los **objetivos** específicos planteados fueron:

1. Estudiar la expresión del SUR1 en distintos tipos celulares (neuronas, células endoteliales, astrocitos, microglia reactiva/macrófagos y neutrófilos) en especímenes de tejido cerebral pericontusional obtenido de pacientes que con un TCE requirieron tratamiento neuroquirúrgico.
2. Determinar si el grado de expresión del SUR1 estaba relacionado con el tiempo transcurrido entre el TCE y el momento de obtención de las muestras tisulares.
3. Estudiar la RR *in vitro* de Na⁺, K⁺, Cl⁻, albúmina y cistatina C con membranas de MD de 100 kDa (CMA71) a una velocidad de perfusión de 0,30 µL/min, con el fin de obtener un factor de corrección que permitiera estimar las concentraciones tisulares reales en el microdializado de pacientes con lesiones cerebrales agudas.
4. Averiguar la aplicabilidad *in vivo* del modelo descrito *in vitro* y estimar el perfil iónico y molecular del espacio intersticial cerebral en las distintas áreas cerebrales en las que se inserte el catéter de MD en pacientes con lesiones cerebrales agudas.
5. Definir la aparición de edema vasogénico a partir de la detección de albúmina y cistatina C en el espacio extracelular del encéfalo.

ESTUDIOS REALIZADOS

La presente Tesis Doctoral incluye dos artículos originales que ya han sido aceptados y/o publicados dirigidos al estudio de:

1. La detección y cuantificación de la expresión del SUR1 en las contusiones cerebrales de pacientes adultos que habían presentado un TCE (**Martínez-Valverde T , Vidal-Jorge M, Martínez-Saez E, Castro L , Arikán F, Cordero E, Rădoi A, Poca MA, Simard JM, Sahuquillo J. Sulfonylurea receptor 1 in humans with post-traumatic brain contusions. J Neurotrauma. [Ahead of print]**)

Las contusiones cerebrales son las lesiones focales más frecuentes que aparecen después de un TCE. Actualmente el tratamiento de las contusiones cerebrales es limitado. En estos pacientes se administran las medidas habituales de prevención y tratamiento de la hipertensión intracraneal, al que algunos autores añaden la administración de dexametasona en determinados casos. Esta última medida es controvertida y no se contempla en las guías de práctica clínica sobre el manejo de las lesiones neurotraumáticas. El tratamiento específico de las contusiones cerebrales es la evacuación quirúrgica, dado hasta la fecha no se ha demostrado la eficacia de ningún fármaco en la reducción de su volumen. Las indicaciones quirúrgicas se establecen en función del volumen de la lesión, la desviación de la línea media que generan o cuando son las responsables del aumento de la PIC, entre otros factores. Su localización más habitual es las bases y los polos de los lóbulos frontales y temporales.

Otra de las principales características de este tipo de lesión es su carácter evolutivo, en el que el aumento de volumen se debe al incremento de las áreas de necrosis y/o hemorragia que favorece la aparición de edema tisular. En estos pacientes, el mejor conocimiento de los canales iónicos involucrados en la formación y progresión del edema cerebral postraumático permitiría la detección de nuevas dianas terapéuticas. La nueva clasificación del edema cerebral propuesta por J.M Simard, junto con la identificación del papel de canal SUR1-TRPM4 en diferentes patologías del SNC en modelos animales, abren varias vías de investigación en la fisiopatología del edema cerebral (Simard *et al.*, 2007). En esta línea, nuestro grupo diseñó un estudio con muestras de tejido cerebral de

pacientes que habían sufrido un TCE que habían requerido tratamiento quirúrgico para la evacuación de tejido contusionado. En las muestras obtenidas, se determinó la expresión del SUR1 en distintos tipos celulares así como su perfil temporal de expresión. Los resultados obtenidos abren la oportunidad de actuar terapéuticamente contra los mecanismos de progresión de las contusiones cerebrales postraumáticas, y así reducir el número de pacientes con deterioro neurológico y malos resultados funcionales.

2. El estudio metodológico sobre la utilización de la MD cerebral como herramienta para el estudio del perfil iónico del edema cerebral **(Martínez-Valverde T, Vidal-Jorge M, Montoya N, Sánchez-Guerrero A, Manrique S, Munar F, Pellegrini MD, Poca MA, Sahuquillo J. Brain microdialysis as a tool to explore the ionic profile of the brain extracellular space in neurocritical patients: a methodological approach and feasibility study. J Neurotrauma. 2015 Jan 1;32(1):7-16)**

Conocer los cambios en las concentraciones extracelulares de Na^+ , K^+ y Cl^- en el parénquima encefálico (perfil iónico) permite identificar las diferentes fases del edema cerebral y, de forma indirecta, puede constituir un indicador de la integridad o disfunción de la permeabilidad de la BHE. La MD cerebral es la única herramienta que permite el muestreo continuo de las características del EEC. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para el estudio de estado metabólico del cerebro, aunque rara vez se ha aplicado al estudio del perfil iónico cerebral. La determinación secuencial de las concentraciones iónicas puede ayudar a la detección de cambios tisulares que permitan un tratamiento precoz y más personalizado del paciente. Los trabajos publicados con iones hasta la fecha (Valadka *et al.*, 1998; Doppenberg *et al.*, 1999; Goodman *et al.*, 1999; Reinert *et al.*, 2000) se han centrado en el K^+ , dado que se ha observado que el incremento del K^+ cerebral es un biomarcador de severidad del daño tisular, isquemia y muerte celular (Mori *et al.*, 2002), así como un indicador de deterioro y malos resultados neurológicos en los TCEs (Goodman *et al.*, 1999; Reinert *et al.*, 2000). No obstante, para aplicar la MD a las determinaciones de iones en el tejido cerebral debe conocerse la RR para cada ion, aplicando las condiciones clínicas habituales de monitorización (membranas CMA71, CNS comercial como LP y velocidad de perfusión de 0,3 $\mu\text{L}/\text{min}$). Esto es especialmente importante si se

considera que el LP contiene los propios iones de interés. Por ello, el primer paso en nuestro estudio fue diseñar un modelo *in vitro* que simulase distintos escenarios *in vivo*. Este modelo debía permitir la utilización de catéteres de MD CMA71 y determinar la concentración iónica obtenida a partir de una solución de composición conocida y establecer el cálculo real de la RR de cada ion (Martínez-Valverde *et al.*, 2015). Diseñado el modelo y realizados los cálculos, el siguiente paso fue comprobar si el modelo *in vitro* era aplicable en un entorno clínico *in vivo*. Para ello se analizaron las muestras obtenidas de 2 pacientes monitorizados en nuestro centro mediante MD cerebral.

Además de los artículos detallados, en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral se han llevado a cabo estudios que formaban parte de proyecto inicial, los cuales se detallan en el anexo de esta memoria. En el documento anexo se exponen, por una parte una serie de experimentos que permitieron rechazar la hipótesis preliminar sobre el valor de las determinaciones de albúmina y cistatina C obtenidas a partir de microdializados cerebrales. Por otra parte, se incluye un tercer artículo, actualmente en revisión, en el que se estudia el perfil iónico del EEC en distintas regiones cerebrales de pacientes que presentaron un TCE moderado o grave o un IMACM que requirieron la monitorización de la PIC y la colocación de un catéter de MD.

1. Sulfonylurea receptor 1 in humans with post-traumatic brain contusions

Martínez-Valverde T, Vidal-Jorge M, Martínez-Saez E, Castro L, Arikán F, Cordero E, Rădoi A, Poca MA, Simard JM, Sahuquillo J.

J Neurotrauma. [Ahead of print]

Sulfonylurea Receptor 1 in Humans with Post-Traumatic Brain Contusions

Tamara Martínez-Valverde,¹ Marian Vidal-Jorge,¹ Elena Martínez-Saez,² Lidia Castro,¹ Fuat Arikan,^{1,3} Esteban Cordero,³ Andreea Rădoi,¹ Maria-Antonia Poca,^{1,3} J. Marc Simard,⁴ and Juan Sahuquillo^{1,3}

Abstract

Post-traumatic brain contusions (PTBCs) are traditionally considered primary injuries and can increase in size, generate perilesional edema, cause mass effect, induce neurological deterioration, and cause death. Most patients experience a progressive increase in pericontusional edema, and nearly half, an increase in the hemorrhagic component itself. The underlying molecular pathophysiology of contusion-induced brain edema and hemorrhagic progression remains poorly understood. The aim of this study was to investigate sulfonylurea 1/transient receptor potential melastatin 4 (SUR1-TRPM4) ion channel SUR1 expression in various cell types (neurons, astrocytes, endothelial cells, microglia, macrophages, and neutrophils) of human brain contusions and whether SUR1 up-regulation was related to time postinjury. Double immunolabeling of SUR1 and cell-type–specific proteins was performed in 26 specimens from traumatic brain injury patients whose lesions were surgically evacuated. Three samples from limited brain resections performed for accessing extra-axial skull-base tumors or intraventricular lesions were controls. We found SUR1 was significantly overexpressed in all cell types and was especially prominent in neurons and endothelial cells (ECs). The temporal pattern depended on cell type: 1) In neurons, SUR1 increased within 48 h of injury and stabilized thereafter; 2) in ECs, there was no trend; 3) in glial cells and microglia/macrophages, a moderate increase was observed over time; and 4) in neutrophils, it decreased with time. Our results suggest that up-regulation of SUR1 in humans point to this channel as one of the important molecular players in the pathophysiology of PTBCs. Our findings reveal opportunities to act therapeutically on the mechanisms of growth of traumatic contusions and therefore reduce the number of patients with neurological deterioration and poor neurological outcomes.

Key words: brain contusion; brain edema; human; immunofluorescence; sulfonylurea receptor 1

Introduction

POST-TRAUMATIC BRAIN CONTUSIONS (PTBCs) are one of the most frequent lesions in patients with moderate or severe traumatic brain injury (TBI). PTBCs are traditionally considered primary injuries, but they have an inherent capacity to increase in size, generate perilesional edema, cause mass effect, induce neurological deterioration, and, in some patients, cause death. PTBCs are very dynamic lesions with a pathophysiology that is still challenging, and there are significant controversies in their clinical management. Contusions are frequently associated with volumetric expansion during the first 48 h post-trauma.^{1,2} In most patients, there is a progressive increase in pericontusional edema (edema progression), and in nearly half of patients, there is an increase in the hemorrhagic component itself (secondary hemorrhage or hemorrhagic progression).^{1,2}

Until recently, the underlying molecular pathophysiology of contusion-induced brain edema and hemorrhagic progression was poorly understood. However, new evidence has accumulated in the last decade that has shed light on the complex cellular and molecular mechanisms underlying volumetric increases resulting from edema and secondary hemorrhage in PTBCs. Simard and colleagues identified the crucial role of the sulfonylurea 1 (SUR1)/transient receptor potential melastatin 4 (TRPM4) ion channel in formation of brain edema in experimental models of ischemic lesions, spinal cord injuries (SCIs), and PTBCs.^{3–5} In addition, the landmark articles from Katayama and colleagues showed that the increased osmolarity in the core of contusions is a powerful attractor of water from pericontusional tissues. In pericontusional tissues, changes in the permeability of the blood–brain barrier (BBB) occur, which allow for rapid passage of ions and water into the contusion core.^{6,7}

¹Neurotraumatology and Neurosurgery Research Unit (UNINN), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

²Department of Pathology, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

³Department of Neurosurgery, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

⁴Departments of Neurosurgery, Physiology and Pathology, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland.

The traditional mechanism put forward for secondary hemorrhage (hemorrhagic progression) in PTBCs has been the existence of an overt or latent coagulopathy in patients with moderate and severe TBI. An alternative view proposed recently by Kurland and colleagues is that mechanical injury induces alterations in the microcirculation induced by the kinetic energy delivered to the brain tissue at the time of injury.⁸ In pericontusional endothelial cells (ECs), molecular mechanisms are set in motion that result in a significant increase in the permeability of the BBB to ions and water and, in some cases, result in its structural disruption with the passage of macromolecules and blood cells into the brain interstitium.^{8,9} Among these molecular mechanisms, up-regulation of SUR1-TPRM4 channels in the injured brain is emerging as one of great importance.^{3,5,8,10} In animal models, it has been shown that SUR1 is up-regulated in all cellular components of the neurovascular unit, mainly in ECs of the pericontusional brain.⁴ Blockade of SUR1 by glibenclamide or by antisense nucleotides significantly reduced progression of brain contusions in treated animals, compared to those treated with vehicle.^{4,11}

SUR1 is a protein of the family of adenosine triphosphate (ATP) binding cassette (ABC) transporters encoded by *Abcc* genes. Most ABC proteins couple ATP hydrolysis with translocation of molecules across biological membranes. SUR proteins are not transporters and they perform no recognized function by themselves.¹² To carry out its function, SUR requires an association with pore-forming subunits. The most studied association for SUR1 is with the pore-forming subunit, Kir6.2, to form the ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channel, which was discovered initially in cardiac myocytes¹³ and subsequently in other tissues, such as pancreatic β -cells, skeletal and smooth muscle, the brain, and the pituitary.¹⁴ SUR1 also associates with an ATP- and calcium-sensitive nonselective cationic channel recently identified as TRPM4 to form SUR1-TRPM4 channels (previously named SUR1-regulated NC_{Ca-ATP} channels).¹⁵ SUR1-TRPM4 channels transport all inorganic monovalent cations (Na^+ , K^+ , Cs^+ , Li^+ , and Rb^+), but are impermeable to Ca^{2+} and Mg^{2+} .¹⁶

SUR1 is constitutively expressed in some, but not in all, neurons of the central nervous system (CNS), where it forms K_{ATP} channels exclusively. However, SUR1 is constitutively absent in oligodendrocytes, astrocytes, and endothelium.^{17,18} SUR1 is transcriptionally overexpressed in neurons, astrocytes, oligodendrocytes, and ECs after different types of CNS injuries, including cerebral ischemia, TBI, SCI, subarachnoid hemorrhage (SAH), and in experimental models of germinal matrix hemorrhage.¹⁹ Expression of SUR1 has been investigated in many experimental models,^{4,10,16,19–23} but only four studies have been published for humans thus far, all of which were conducted with postmortem specimens and none with PTBCs.^{24–26}

Our aim in this study was to investigate the expression of SUR1 in human contusion specimens obtained at surgery from a cohort of TBI patients whose lesions were surgically evacuated. The main objectives were to investigate the expression of SUR1 in different cell types (neurons, astrocytes, ECs, microglia, macrophages, and neutrophils) and determine whether the abundance of SUR1 is related to the time that elapsed between the injury and the time of surgery. In this report, we present evidence that SUR1 is up-regulated in PTBCs in all brain cell types, consistent with the hypothesis that volumetric increases in PTBCs—both edema and hemorrhagic progression—are facilitated by SUR1 overexpression.

Methods

Clinical material and methods

This prospective study included all TBI patients who had an initial computed tomography scan and underwent surgical evacu-

ation of their brain contusions at our institution between January 2006 and July 2013. Brain specimens were obtained from surgically resected areas of the contusions and stored in a biobank collection of TBI samples at our institution (registration no.: C0002524 at the Carlos III Institute). Mean contusion volume at the time of evacuation was determined using the ABC/2 method.²⁷ As suggested by Iaccarino and colleagues, in patients with more than one lesion, the volume of each contusion was calculated and then added to get a total contusional volume.¹ Using the Extended Glasgow Outcome Scale, clinical outcome for each patient was assessed 6 months postinjury by an independent neuropsychologist (A.R.) blinded to the immunolabeling data.

The control group included tissue samples obtained from limited brain resections performed to access extra-axial skull base tumors or intraventricular lesions. These samples were included if the magnetic resonance imaging (MRI) scans did not show any abnormalities in T1-weighted, T2-weighted, or fluid attenuated inversion recovery images. Our research was carried out in accord with the Declaration of Helsinki of the World Medical Association.²⁸ This study and the tissue collection protocol were approved by the institutional ethics committee of Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona, Spain; protocols PR-ATR-68/2007 and PR-ATR-286/2013), and written informed consent was obtained from all of the patients (including the controls) or the patient's next of kin.

Criteria for surgical evacuation of brain contusions

Surgical indications for evacuation of PTBCs are still controversial, and no evidence-based guidelines are available as yet. The only published guidelines regarding PTBCs, published by the Brain Trauma Foundation in 2006, include other focal or diffuse traumatic parenchymal lesions and thus are too general.²⁹ At our institution, patients must fulfill at least one of the following criteria to be considered for surgical evacuation: 1) For patients with intracranial pressure (ICP) monitoring, the ICP exceeds 20 mm Hg, and the total volume of a single contusion or multiple contusions exceeds the 25-mL threshold; 2) for patients without ICP monitoring (mostly moderate TBI), the total contusion volume (hemorrhagic and edematous components) is above the 25-mL threshold; 3) any temporal contusion that produces a significant mass effect and/or compresses the basal cisterns; and 4) contusions that induce a significant mid-line shift (greater than 5 mm) despite having an ICP <20 mm Hg. The surgical approach is usually excision of necrotic tissue without external bone decompression.

Brain tissue collection

After surgical resection, all specimens were transported to the laboratory on ice. Cauterized tissue and excess blood were eliminated by dissection in phosphate buffer. Specimens of a minimum size of $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ mm were fixed with 4% paraformaldehyde for 48 h. Specimens were selected from areas of resected brain with preserved anatomical structure, corresponding to penumbral zones or the interface of penumbra/core using the terminology described by Kurland and colleagues.⁸ Tissues were cryoprotected using 30% sucrose and embedded in Tissue-Tek optimal cutting temperature compound (4583; Sakura Finetek Europe B.V, Alphen aan den Rijn, The Netherlands). From these blocks, 10- μ m sections were obtained using a cryostat (Leica CM3050 S; Leica Biosystems, Heidelberg, Germany), mounted on glass slides, and stored at -20°C until further analysis.

Controls

The control group included an initial cohort of 8 patients. MRIs of controls were independently assessed by two of the authors (J.S. and J.M.S.) blinded to immunolabeling data. Tissue quality was evaluated in hematoxylin-eosin staining sections by a

SUR1 IN BRAIN CONTUSIONS

neuropathologist (E.M.S.) blinded to immunolabeling data using one scale for edema and another for signs of tissue hypoxia/ischemia (0: absent; 1: mild; 2: moderate; and 3: severe). Patients with edema and/or ischemia scores greater than 2 were excluded as controls. An important point to remark on is that because our controls were from patients surgically treated for extra-axial skull base tumors or intraventricular lesions, they should not be considered comparable to the controls used in animal models or those extracted from fresh human cadavers. We think it could be more appropriate to treat them equivalent to “sham” animals in experimental models. In addition, the extraction process, even under meticulous microsurgery, adds some degree of unpredictable damage and minimal inflammatory reaction to brain tissue.

Immunohistochemistry

Before immunolabeling, a pretreatment to reduce autofluorescence was performed by immersing the cryosections for 7 min in 0.1% sodium borohydride (NaBH₄) in 0.1 M of phosphate-buffered saline (PBS).^{30,31} Sections were incubated in a blocking solution containing 2% donkey serum (D9663; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and 0.1% Triton-X (T8787; Sigma-Aldrich) in PBS 0.1 M for 1 h. Next, cryosections were incubated for 1 h at room temperature and then for 48 h at 4°C with the following primary antibodies: rabbit/goat anti-SUR1 (1:500; custom anti-SUR1 antibodies described by Woo and colleagues¹⁵), mouse anti-NeuN (1:200; MAB377; Millipore Corporation, Billerica, MA), mouse anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP; 1:1000; CY3 conjugated; C-9205; Sigma-Aldrich), mouse anti-CD31 (1:100; M082329; Dako, Carpinteria, CA), mouse anti-CD68 (1:100; M081401; Dako), or rabbit anti-myeloperoxidase (MPO; 1:200; A039829; Dako). Fluorescent-labeled, species-appropriate secondary antibodies (Invitrogen, Eugene, OR) were used for visualization. Omission of primary antibodies served as a negative control. Sections were cover-slipped with polar mounting medium containing antifade reagent and the nuclear dye, 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI); (P36935; Invitrogen). Fluorescent signals were visualized using an epifluorescence microscope (FX100 Olympus or BX61 Olympus; Olympus Corporation, Tokyo, Japan), depending on analysis requirements.

Analysis of immunohistochemical findings

Quantitative immunohistochemistry: neurons and endothelial cells. To quantify SUR1-positive neurons and vessels, depending on section size, between 4 and 9 fields were captured for each specimen by using FSX-BSW software with an epifluorescence microscope (FX100 Olympus). For neurons, 600×450 μm² images were randomly captured from the cortex area of the sample. For vessels, 1200×900 μm² images were randomly captured from the whole sample. All of the obtained images were exported to ImageJ 1.47v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Neurons (NeuN-positive cells) and SUR1-positive neurons (NeuN- and SUR1-positive cells) in each image were counted using the Image Cell Counter plugin (Kurt De Vos; <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/cell-counter.html>), and the percentage of SUR1-positive neurons was calculated. For ECs, all of the CD31-positive structures and SUR1-positive vessels (CD31 and SUR1 positive structures) in each image were counted using the same plugin, and the percentage of SUR1-positive ECs was calculated. Percentages of SUR1-positive neurons and blood vessels in the different captured images for each specimen were calculated, and all of the analyzed fields were included in the final statistical analysis for each case.

Semiquantitative immunohistochemistry. Semiquantitative analyses were performed for GFAP, CD68, and MPO immunolabeling results. For these measurements, all of the sections were immunolabeled as a single batch for each cell-type-specific

marker and observed using an epifluorescence microscope. For this analysis, the presence or the amount of the different cell-type-specific markers was quantified in the whole section by the same observer (T.M.V.) using the following scale: -: absent; +: scanty; ++: moderate; and +++: numerous. Specific SUR1 immunoreactivity also was evaluated using the similar scale: -: none; +: in a few cells; ++: in many cells; and +++: in all or almost all cells. Median interobserver agreement of these scales for two independent observers was 0.83, with a minimum of 0.71 and a maximum of 0.88 depending on the cell analyzed.

Statistical analysis

Descriptive statistics were obtained for each variable. For continuous variables, the mean, median, range, and standard deviation were used for normally distributed data, and the median, minimum, and maximum values were used for non-Gaussian distributions. The Shapiro-Wilk's test and the inverse probability plot were used to test whether the data followed a normal distribution. Percentages and sample sizes were used to summarize categorical variables. To correlate two continuous variables, the Pearson's correlation test was used for data following a normal distribution, and the more conservative Spearman's rho was used if the data did not follow a normal distribution. For each marker, scatter plots were constructed with time as the abscissa and the percentage/score of positive immunolabeling as the ordinate. A simple linear regression and the ordinary least squares method were used. Adjusted R² values were calculated for all of the models to test whether linear or nonlinear models adequately explained the relationships between both variables. Statistical analyses were performed using R software (version 3.0.2)³² and the integrated development environment R Studio (v0.98.945).³³ The car package was used for regression analysis.³⁴ To calculate interobserver agreement between two independent observers using the immunolabeling ordinal scales, we used weighted kappa with the routine implemented in MedCalc (version 12.2; MedCalc Software, Mariakerke, Belgium). Statistical significance was considered when $p \leq 0.05$. Data are presented graphically using box-and-whisker plots.

Results

Control group

Of the 8 initial controls, 5 were excluded because of pathological evidence of edema and/or ischemia that could have been caused by manipulation of tissues during surgery, suboptimal conditions during transport of samples to the laboratory, or pathology not detectable by MRI. Demographics of the 3 controls are summarized in Table 1.

Descriptive data of patients with contusions

A total of 26 contusion specimens were obtained from a cohort of 25 TBI patients (21 males and 4 females) ages 14–75 years

TABLE 1. DESCRIPTIVE DATA FOR CONTROL PATIENTS

Case	Age	Sex	Primary pathology	Tissue quality	
				Edema	Ischemia
1	57	F	Sphenopetroclival meningioma	0	1
2	32	F	Facial schwannoma	0	1
3	2	M	Rhabdoid tumor	1	2

Tissue quality scores (edema and ischemia): 0: absent; 1: mild; 2: moderate; and 3: severe.

F, female; M, male.

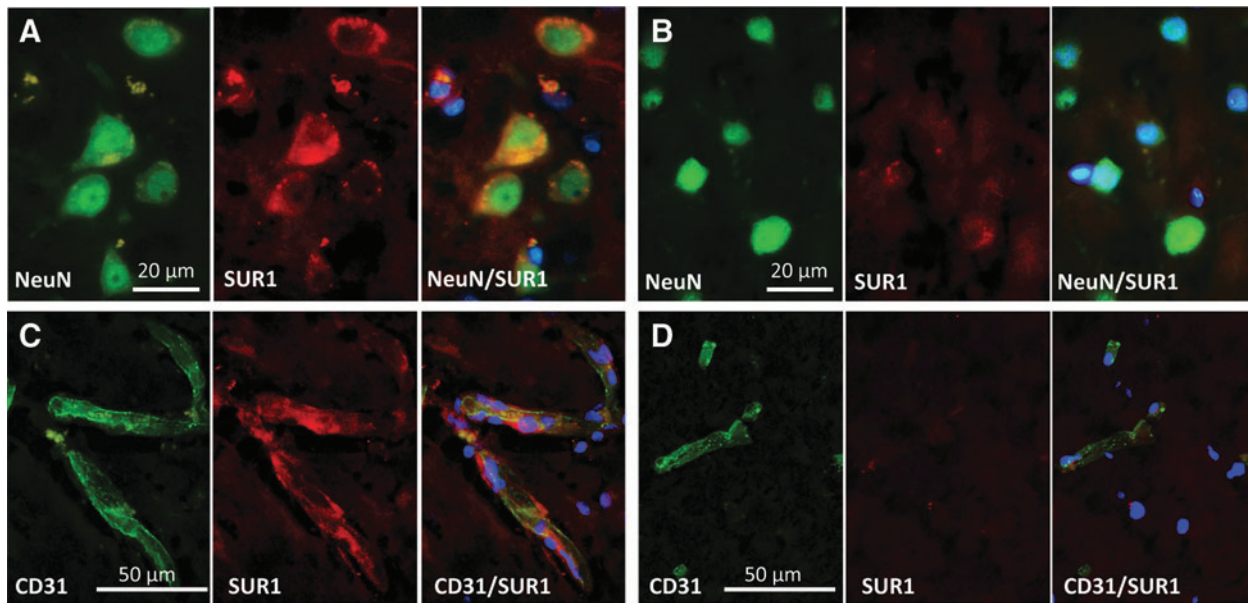


FIG. 1. Sulfonylurea receptor 1 (SUR1) was overexpressed in neurons and capillary endothelial cells in pericontusional tissue. (A and C) Fluorescent double labeling for NeuN/CD31 (green) and SUR1 (red); merged images (NeuN/SUR1 or CD31/SUR1) in the right column in pericontusional tissue resected 36 h after trauma. (B and D) Double labeling with anti-NeuN antibody (green; B) or anti-CD31 antibody (green; D) and anti-SUR1 (red); merged images (NeuN/SUR1 or CD31/SUR1) in the right column, corresponding to case 2 in Table 1. Original magnification (A) and (B)=60×; (C) and (D)=40×. Nuclei were counterstained with DAPI. DAPI, 4',6-diamino-2-phenylindole.

(median, 52). Tissue samples were obtained at various times postinjury (median, 27 h; range, 5–99). Median contusion volume was 54 mL (range, 15–105). On admission, 16 (64%) patients scored above 9 on the Glasgow Coma Score scale and were thus included in the mild/moderate TBI category. Median clinical outcome assessed 6 months postinjury was heterogeneous (median, 4; range, 1–8). The small sample size was underpowered for conducting a robust statistical analysis to study the possible relationship between contusion volume or neurological outcome of patients and SUR1 expression.

Sulfonylurea receptor 1-positive cells in the contusion and control groups

Neurons. Expression of SUR1 was analyzed in cortex samples of all patients. Median percentage of SUR1-positive neurons in

the analyzed fields was 23.2% (range, 11.0–30.4%) in controls and 71% (range, 17–97%) in contusions (Mann-Whitney's test, $p < 0.001$; Figs. 1 and 2). When the percentage of SUR1-positive neurons was plotted against time postinjury, a nonlinear trend of SUR1 positivity as a function of time was found; there was an increase in the number of SUR1-positive neurons in the first 24 h postinjury and stabilization of expression thereafter (Fig. 2).

Endothelial cells. CD31-positive cells were analyzed both in the gray and white matter of contusion and control tissues. Median percentage of CD31-positive SUR1-positive ECs in analyzed fields was 12% (range, 0–38.1%) for controls and 43% (range, 9.1–100%) for contusions (Mann-Whitney's test, $p < 0.001$; Figs. 1 and 3). Expression of SUR1 in ECs was higher in the white matter than in gray matter (Mann-Whitney's test, $p < 0.001$; Table 2) in both

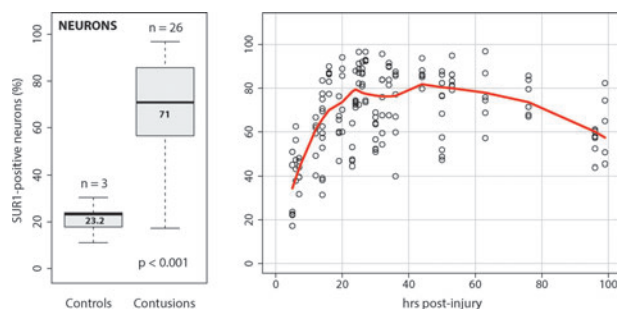


FIG. 2. (Left) Box plots of the percentage of sulfonylurea receptor 1 (SUR1)-positive neurons in contusions and controls. (Right) Scatter plot of SUR1-positive neurons (all the counts in analyzed images) versus time (hours) between injury and surgery. An increase in SUR1-positive neurons in the first 48 h was found, followed by stabilization. The solid curved line is a nonparametric regression smoother produced by the LOWESS function in R.

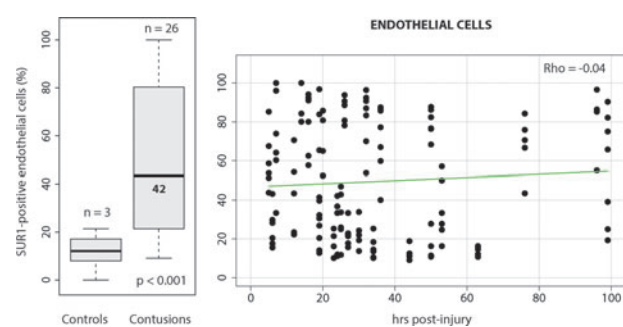


FIG. 3. (Left) Box plots of the percentage of sulfonylurea receptor 1 (SUR1) CD31-positive cells in contusions and controls. Median percentage of CD31-positive SUR1-positive endothelial cells in the analyzed fields was 12% for controls and 42% for contusions (Mann-Whitney's test, $p < 0.001$). (Right) Time versus percentage of positive endothelial cells did not show a significant trend.

SUR1 IN BRAIN CONTUSIONS

TABLE 2. EXPRESSION OF SUR1 IN ENDOTHELIAL CELLS FROM GRAY AND WHITE MATTER

Sample type	White matter+ gray matter	White matter	Gray matter
Control	15.8 (2.3–21.4)	17.9 (9.1–21.4)	12.5 (2.3–19.2)
Contusion	43.4 (9.1–100)	63.8 (12.1–100)	33.5 (9.1–93.8)

Results are shown as median (min–max) of the percentage of SUR1-positive vessels versus total vessels in the sample, white matter, or gray matter. SUR1, sulfonylurea receptor 1;

control and contusion samples. Plot of time versus percentage of positive ECs did not show a significant trend (Fig. 3).

Glial cells. Expression of SUR1 was not detected in GFAP-positive cells in controls (Table 3). Of the contusion specimens, only 4 (15.4%) did not have SUR1-positive cells. Of the remaining 22 specimens, 9 had mild-to-moderate and 13 had strong positivity for SUR1 (Fig. 4). The plot of time versus percentage of SUR1-positive glial cells showed a moderate increase in the number of SUR1-positive cells with time (Spearman's $\rho=0.54$; $p=0.002$; Fig. 5).

Macrophages and activated microglial cells. Occasional CD68-positive cells were found in 2 of the 3 controls, but none were SUR1 positive (Table 3). All contusion specimens contained a variable number of activated microglial cells/macrophages. Tissues from 4 contusions (16%) showed mild increases in the number of CD68-positive cells, relative to controls, whereas in most of them (84%), there was a moderate/high increase in the number of cells with the phenotype of activated microglial cells or macrophages. Many CD68-positive cells were also SUR1-positive (Fig. 4). The number of CD68/SUR1-positive cells increased with time post-injury (Spearman's $\rho=0.62$; $p<0.001$).

Neutrophils. In 2 of the 3 controls, neutrophils were identified, and 1 showed moderate SUR1-positive MPO cells. All contusion samples contained a variable amount of neutrophils. Approximately half of the contusion specimens (12 of 26) contained a significant number of MPO-positive cells. We did not find a relationship between time postinjury and the number of neutrophils observed in the specimens. Most neutrophils were SUR1 positive (Fig. 4). The number of MPO/SUR1-positive cells decreased as time between injury and surgery increased (Spearman's $\rho=-0.49$; $p=0.011$; Fig. 5). We observed that most circulating

neutrophils were SUR1 negative, whereas those found in brain parenchyma were SUR1 positive (Fig. 6).

Discussion

In experimental models of brain contusions, a consistent, well-known fact is that the necrotic area suffers secondary growth in the first 24 h postinjury.³⁵ However, whether this phenomenon represents the inevitable expansion of a delayed primary injury or potentially avoidable secondary brain damage is a matter of clinical interest because it opens the opportunity to act on the mechanisms of growth and therefore of neurological deterioration and poor neurological outcome. A useful, biologically plausible model of PTBCs differentiates between the core of the contusion—that part of the brain that suffers irreversible damage immediately on impact—and the pericontusional tissue (or traumatic penumbra), similar to what was described in the classical neuropathological description of traumatic contusions by Lindenberg and Freytag in 1957 and by Astrup and colleagues in ischemic stroke.^{36,37} Lindenberg and Freytag observed that necrosis in the core can be found in postmortem examinations in patients who survived at least 3 h postinjury.³⁷ One of the compelling reasons to use this model is that it allows neuroscientists a better understanding of the complex physiopathology of post-traumatic focal lesions. An increase in brain edema is related to alterations of the permeability of the BBB, both in the core, where the BBB is rapidly destroyed, and in the pericontusional brain, where alterations in BBB permeability take place at an early stage with formation of ionic edema. In later stages, the BBB is structurally damaged and vasogenic edema, the passage of macromolecules, and blood cells to the extracellular space, and, finally, hemorrhagic progression occur.^{8,38,39}

The contusional core is characterized by rapid pannecrosis, disintegration, and homogenization of brain tissue.^{37,40} This tissue homogenate creates a powerful osmotic sink that can attract water to the contusion's core.^{6,7,41} Katayama and colleagues showed, in both experimental and clinical studies, that the core of the contusion acts as a powerful magnet for water because of high osmolality, which can reach 350–400 mOsm/kg.^{6,40,41} The increase in osmolality occurs very early after injury, and its main etiopathogenic mechanism is the increase in colloid osmotic pressure from the release of intracellular proteins and the production and liberation of idiogenic osmoles. They also showed that changes in inorganic ion concentrations are not relevant enough to justify the increase in water volume.^{40,42} The high osmolality in the core, which behaves as a single huge extracellular space,⁴¹ and the increase in the BBB's permeability to water in the pericontusional tissue, sets the pathophysiological scenario for volumetric increase in the PTBC.

The tissue around the core is vulnerable brain that has low flow and low oxygen availability and has important metabolic rearrangements, but preserves its structural integrity.^{43,44} In the pericontusional tissue, some researchers differentiate between penumbra, parapenumbra, and normal brain with the goal of separating the molecular mechanism involved in each zone.^{4,8} Pericontusional tissue absorbs part of the kinetic energy delivered at the time of injury, activating mechanoreceptors and downstream molecular pathways. In addition, pericontusional tissue continuously receives strong inflammatory signals from the core. Activation of free radicals of nitrogen and oxygen, cytokines, hypoxia-inducible factor-1 α , cyclo-oxygenases, and matrix metalloproteinases (MMPs) are the most important mediators of the inflammatory-induced response activated in perilesional tissue.⁴⁵

TABLE 3. SEMIQUANTITATIVE IMMUNOHISTOCHEMISTRY ANALYSIS

Cell type	Amount		SUR1	
	Controls	Contusion	Control	Contusion
Glial cells	+	++	–	++
Activated microglia cells/macrophages	+	++	–	+
Neutrophils	+	++	–	++

Amount: median count for the number of cells found; scale: –, absent; +, scanty; ++, moderate; +++, numerous. SUR1: average number of the total cells observed showing SUR1 immunoreactivity; scale: –, none; +, in a few cells; ++, in many cells; +++, in all or almost all cells.

SUR1, sulfonylurea receptor 1.

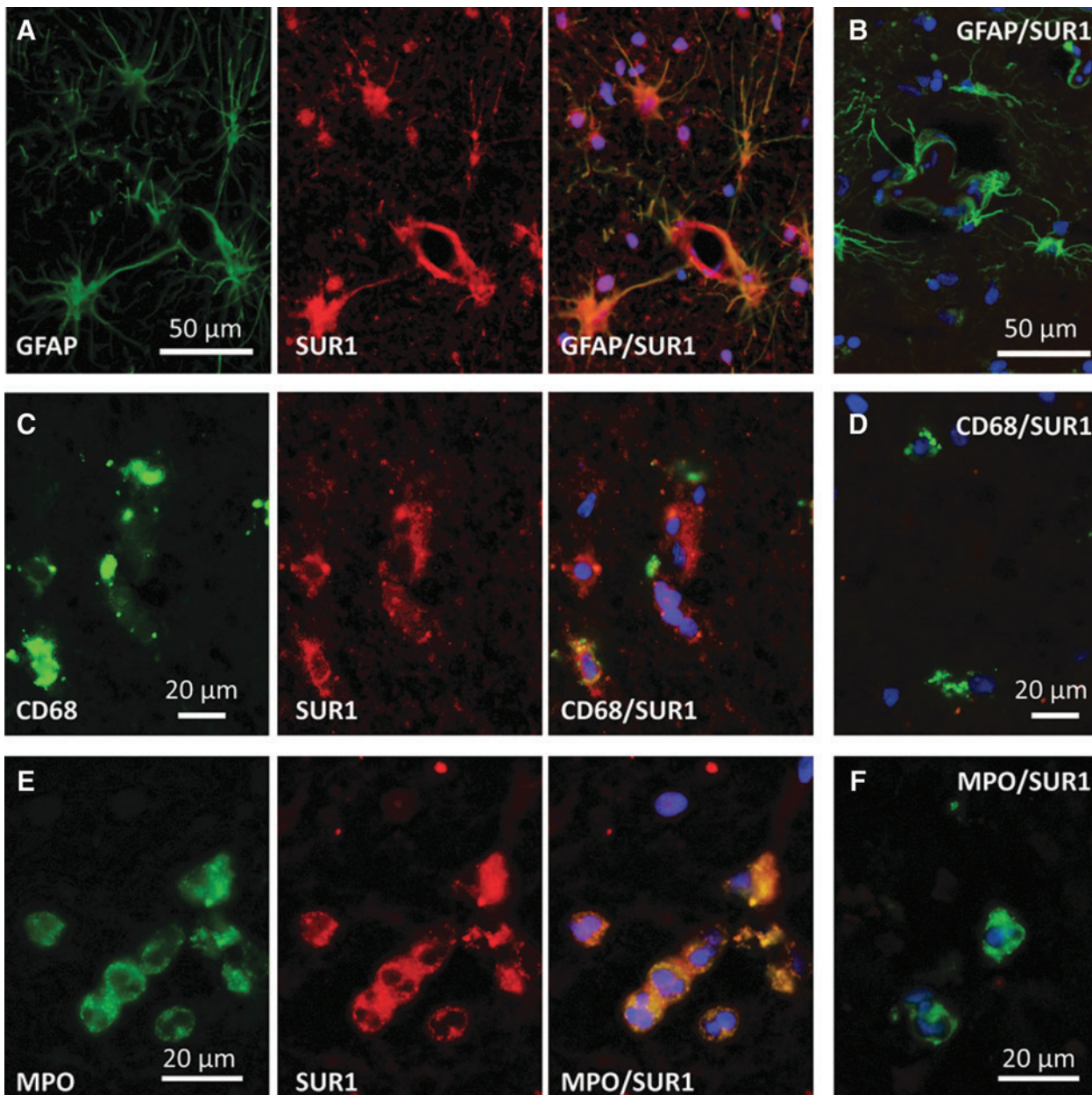


FIG. 4. Sulfonylurea receptor 1 (SUR1) was upregulated in glial cells, activated microglia/macrophages, and neutrophils in pericontusional tissue. (A and B) Fluorescent double labeling for GFAP (green) and SUR1 (red). (A) SUR1-positive glial cells in pericontusional tissue resected 32 h post-trauma. (B) Merged image for SUR1-negative glial cells in a control, corresponding to case 1 in Table 1. (C and D) Fluorescent double labeling for CD68 (green) and SUR1 (red). (C) High expression of SUR1 receptor in activated microglia/macrophages in pericontusional tissue resected 32 h post-trauma. (D) Merged image shows no expression of SUR1 receptor in activated microglia/macrophages in a control, corresponding to case 2 in Table 1. (E and F). Fluorescent double labeling for MPO (green) and SUR1 (red). (E) SUR1-positive neutrophils in pericontusional tissue resected 26 h post-trauma. (F) Merged image for SUR1-negative neutrophils in a control, corresponding to case 3 in Table 1. Original magnification, 40 \times . Original magnification (A) and (B)=40 \times ; (C) and (D)=60 \times ; (E) and (F)=100 \times . Nuclei were counterstained with DAPI. GFAP, glial fibrillary acidic protein; MPO, myeloperoxidase; DAPI, 4',6-diamino-2-phenylindole.

The molecular mechanisms of volume increase in contusions

Both brain edema and hemorrhagic progression share a molecular substrate that involves either functional or structural dysfunction of the BBB and of the neurovascular unit. This is the first report evaluating SUR1 expression in humans with PTBCs. We

found that SUR1 was significantly up-regulated in all types of brain cells with especially prominent increases in neurons, glia, and ECs. Microglia/macrophages and neutrophils also expressed SUR1. The temporal pattern of SUR1 expression was different in specific cells. In neurons, a significant increase was found within 24 h postinjury, after which expression reached a plateau. However, because of the pathophysiological importance of this trend,

SUR1 IN BRAIN CONTUSIONS

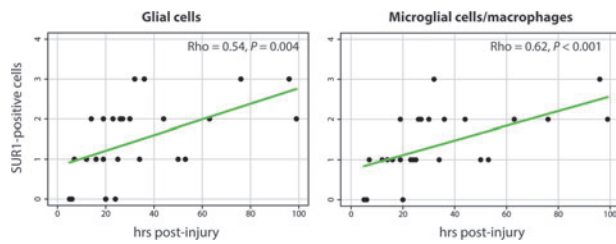


FIG. 5. Scatter plot of the time course of sulfonylurea receptor 1 (SUR1) immunoreactivity in contused tissue. (Left) Plot of SUR1-positive glial cells versus time (hours) elapsed between injury and surgery. (Right) Scatter plot of SUR1-positive microglia cells/macrophages versus time (hours) elapsed between injury and surgery.

further studies with larger sample sizes are needed to replicate and confirm this temporal profile in neurons.

A significant increase in CD68-positive cells (activated microglia/macrophages) was found, and their overexpression correlated positively with time. In all contusion samples, we observed neutrophils (MPO-positive cells), meaning that the BBB was structurally disrupted and allowed the passage of blood cells to the extracellular space. Most neutrophils were SUR1 positive and the number of positive cells decreased as time between injury and surgery increased. We observed that most circulating neutrophils were SUR1 negative, whereas those found in brain parenchyma were SUR1 positive. Our preliminary findings are in agreement with the experimental model of brain contusion in rats developed by Simard and colleagues, in which it was shown that SUR1 was up-regulated in neurons and ECs of the penumbra.⁴ In this model of focal cortical contusion, it was shown that there was no expression of SUR1 immediately postinjury, but that expression was robust in ECs and neurons 24 h postinjury.⁴ These findings need further verification, but if confirmed, indicate that the strongest inflammatory reaction occurs very early postinjury and is not delayed, as has been traditionally thought. Trauma, specifically PTBCs, causes brain tissue and cell damage and triggers very powerful inflammatory reactions that are mediated by what are known as “alarmins,” a series of endogenous molecules that are a subfamily of the larger family of damage-associated molecular patterns that signal tissue and cell damage.⁴⁶

Although we cannot rule out that our small sample size, cohort characteristics, and most important, variable elapsed time from injury to surgery might have influenced these temporal profiles, these trends, if verified in further studies, can help elucidate the pathophysiology of PTBCs.

The SUR1-TRMP4 channel is initially inactive, but when activated by ATP depletion in brain cells, leads to cell depolarization,

cytotoxic edema, and oncotic cell death.^{4,16} Activation of the channel in ECs increases the permeability of the BBB to ions, thus facilitating the formation of ionic and vasogenic edema in the first stage and the evolution to hemorrhagic progression when ECs suffer oncotic death and the BBB is structurally damaged.⁴ Therefore, up-regulation of SUR1, both in experimental models of brain contusions and in our study, points to SUR1 as one of the major molecular players in the pathophysiology of PTBCs. Blocking SUR1 in experimental models of contusions by glibenclamide or by antisense nucleotides largely reduced hemorrhagic progression and the final contusion volume and improved neuro-behavioral functions of treated animals.^{4,11}

Sulfonylurea receptor 1 implication in the volume increase of contusions. Most research post-TBI has focused on excitotoxicity, oxygen free radicals, ischemic and nonischemic forms of tissue hypoxia, metabolic disturbances, and neuroinflammation. However, despite its obvious importance in TBI, the mechanical stress of brain tissues has been relatively neglected as the initiator of many molecular pathways, probably because of the lack of understanding of how mechanical forces, by themselves, activate molecular cascades. There is increasing evidence that alterations in cell shape, induced by mechanical forces, activate several signaling pathways in most cells.^{19,47–49} Mechanical absorption of kinetic energy by the endothelium of pericontusional tissue, and the hypoxic environment created in that tissue by reduced cerebral blood flow and microvascular dysfunction, triggers a set of molecular mechanisms that increase the permeability pore of the BBB in the traumatic penumbra, promoting ionic and water flux through it.⁴⁸ In the case of SUR1-TRPM4, it is likely that both hypoxia and mechanical stress cause up-regulation of this channel that predisposes to edema and hemorrhagic progression.¹⁹

An increase in the permeability pore facilitates brain edema (cytotoxic, ionic, and vasogenic) and, in Simard’s concept, progression to end-stage edema: hemorrhagic conversion. It has been shown that hemorrhagic progression recruits viable tissue from the penumbra into the necrotic core of the contusion, increasing the size of irreversibly damaged brain.

In brain ischemia, it has been shown that edema and hemorrhagic conversion share molecular mechanisms that, if understood, would allow interference of the natural evolution of PTBCs by blocking these molecular targets.²⁴ Hemorrhagic progression in PTBCs is related to microvascular dysfunction of the penumbra.⁸ SUR1 has been associated with both edema formation and catastrophic microvascular dysfunction, indicating that it has a crucial role in the pathophysiology of PTBCs and that it can be an important therapeutic target.^{4,11} It is also associated with K_{ATP} channels in

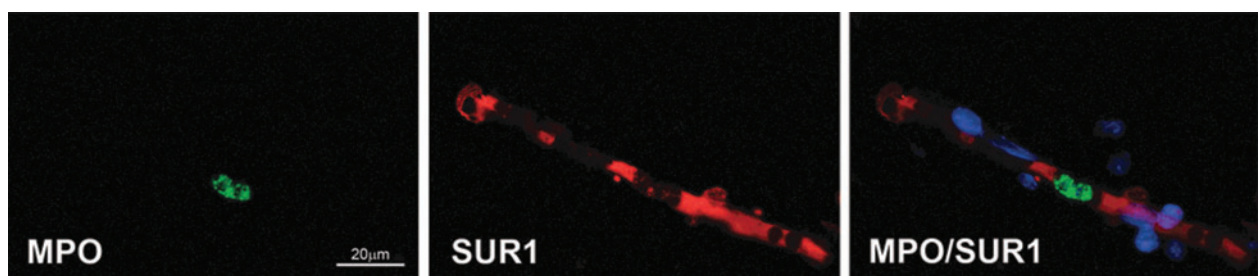


FIG. 6. Sulfonylurea receptor 1 (SUR1)-negative circulating neutrophils. Fluorescent double labeling for MPO (green) and SUR1 (red) in a pericontusional tissue resected 26 h post-trauma, corresponding to the same case shown in Figure 4E. Original magnification, 40 \times . Nuclei were counterstained with DAPI. MPO, myeloperoxidase; DAPI, 4’,6-diamino-2-phenylindole.

pancreatic β -cells that are considered ATP/adenosine monophosphate sensors, coupling glucose metabolism to electrical activity and insulin secretion.¹⁴ Sulfonylureas stimulate insulin secretion by closing these channels.⁵⁰ In addition, SUR1 is the regulatory subunit of the SUR1-TRMP4 channel. Its overexpression is regulated by specific mechanisms that are crucial in the physiopathology of PTBCs: 1) mechanical stress of the tissue; 2) early and delayed hypoxic events that contusions induce, both in the core and perilesional tissue; and 3) the strong power of the hyperosmolar core to attract water from the perilesional brain through a BBB that has increased ionic and water permeability. Whereas the last mechanism is a passive one, both mechanical injury and contusion-induced hypoxia activate a powerful transcriptional program in the pericontusional tissue with selective transcription factors that bind to specific DNA-binding domains, up- or down-regulating specific genes.⁵¹ As shown in the pivotal study by Vertraeten and colleagues conducted in Jurkat T cells, sublethal mechanical stress that does not disrupt the plasma membrane promotes alterations in its physical properties, modifies cytoskeleton structure, increases intracellular Ca^{2+} content, and activates several transcription factors.⁴⁷

In previous studies, we showed that, in PTBCs, a significant early increase in plasma levels in MMPs, specifically gelatinases (MMP-2 and MMP-9) is observed.⁵² Both gelatinases specifically degrade type IV collagen, laminin, and fibronectin, which are the major components of the basal membrane of cerebral blood vessels, and they therefore damage the BBB. Disruption of the basal membrane is probably the end stage of many common pathways that irreversibly damage the BBB.⁵³ Gelatinase levels decreased during the first 24 h postinjury, suggesting a burst of early systemic inflammatory responses, induced by the traumatic event.^{52,54} Therefore, the case for an early inflammatory response in brain contusions seems quite consistent. A better understanding of the role of the SUR1-TRMP4 channel in this early inflammatory response, and why SUR1 is overexpressed in cells that are immunological effectors (activated microglia and neurophils) and why it participates in the early inflammatory response, opens new lines of research with significant translational value.

Sulfonylurea receptor 1 as a therapeutic target in post-traumatic contusions

The therapeutic management of PTBCs has been very limited to date. Though surgical evacuation is performed when lesions are volumetrically relevant or cause a significant shift or increase in ICP, no drug has been shown effective in improving the natural evolution of these lesions. The fact that SUR1 is up-regulated in these lesions opens new opportunities to modulate the molecular cascades generated by these focal injuries. Experimental evidence in rats shows that blocking SUR1 with low-dose glibenclamide or an antisense oligodeoxy nucleotide against *Abcc8* reduces SUR1 expression and hemorrhagic progression of the contusions.^{4,11} In animal models of ischemic stroke, SAH, and SCO, blocking the SUR1-TRMP4 channels, also resulted in significant reduction of final lesion size and significant improvement in neurological outcome.⁴ Whether or not blocking the same channel in human PTBCs will translate to improved clinical results in TBI remains to be shown in randomized, clinical trials.

Limitations of the study

The main limitations of our study were small sample size, nonhomogeneous time in which brain specimens were studied, and specimens used as controls. Most contusions blossom during the

first 72 h postinjury, and thus surgery is conducted at this early stage. Because of this, late human contusion specimens are difficult to obtain. This fact limits the interpretation of the temporal profile we found in up-regulation of SUR1 in PTBCs. A last, but important, limitation is the difficulty in obtaining optimal control specimens. Although we thought the type of control patients we selected for this study were the best we could get, the histological sections of most specimens explanted in the operating room by experienced neurosurgeons showed hypoxia and edema. That was the case even in those rapidly resected and manipulated in a much-reduced time frame. Although these early findings are difficult to explain, we had to exclude most of the controls because different amounts of edema and/or hypoxia were found in histological preparations of controls. In our opinion, this shows the exquisite sensitivity of the brain to any mechanical manipulation, to the isolation of the pial circulation needed for specimen extraction, and to the hostile environment of the manipulation and transport to the laboratory. Which of these factors is the most important one requires further studies that are also relevant for researchers using organotypic slices or primary cultures derived from the mature brain.

In the selected controls, we found a moderate increase in SUR1, specifically in ECs. In the experimental model of mild-to-moderate TBI conducted by Patel and colleagues in Long-Evans rats, sham animals (receiving craniotomy without cortical impact injury) presented some expression of SUR1 in ECs.⁴⁸ In the same article, the ipsilateral hippocampus of the moderately injured rats without macroscopic injury presented time-dependent up-regulation of the SUR1 protein,⁴⁸ confirming that any intervention (including surgery and brain tissue resection) can induce some up-regulation of SUR1 in the mammalian brain. Despite these limitations, mentioned in the Discussion section, we believe our control specimens were adequate “sham controls” and were probably better than specimens from cadavers. Our specimens underwent manipulations similar to those that were conducted in TBI patients, and therefore the 12% expression may have also been found in TBI patients. Despite these limitations, the increase of SUR1 in contusions was very significant and well above the threshold of the control sham group. Moreover, in the human brain, Mehta and colleagues found some expression of SUR1 in certain capillaries, venules, and arterioles in “normal controls” (brain specimens obtained from 4 men and 2 women who died from non-neurological diseases).²⁴ Four of the 6 controls expressed SUR1 in some capillaries.²⁴

The apparently better-quality specimens obtained in previous studies from controls who died of non-neurological disease is probably a reflection of the inability of dead brain tissue to initiate any response to tissue manipulation. Despite these limitations, we believe that the response found in our controls, with mild-to-moderate amounts of positive SUR1-positive cells, is similar to that which will occur in the resected specimens of contusions that were explanted at surgery under similar conditions. Therefore, we believe these controls are more representative of the manipulated brain than brain tissue explanted after death. We think that the significant differences in the SUR1 overexpression found between controls and specimens in our study increases the robustness of our findings.

Future research

Our study has focused on the study of SUR1, a receptor that is associated with an increase in permeability of the BBB by increasing the transcellular crossing of ions through the specialized transport systems (SUR1-TRMP4 channel) or by disrupting tight junctions as a consequence of early osmotic swelling and late necrosis of ECs.

SUR1 IN BRAIN CONTUSIONS

Current evidence supports that TBI, and especially focal lesions such as PTBCs, induces an early and strong sterile inflammatory response, which is one of the driving forces in the pathophysiology of focal lesions and in disruption of the BBB. MMPs are increased early postinjury, and they are specific mediators of basal membrane disruption and are among the late effectors of BBB disruption.⁵² According to our data, SUR1 is up-regulated in activated microglia and in neutrophils that cross the BBB and reach the brain. What the exact role of SUR1 is in the neuroinflammatory cascade and relationship with other molecular pathways requires further research. There is need for a deeper understanding of the molecular pathways involved in the early leakiness of the BBB in PTBCs not only through transcellular channels, but also through the paracellular pathways and therefore the tight junctions. Both transcellular and paracellular zones of leakiness need to be studied to make sense of the puzzle that is the pathophysiology of PTBCs. We need to clarify how and when the abnormalities in function are accompanied by abnormalities in structure of the different proteins of the tight junctions, including claudins, occludin, and junctional proteins. This is crucial to understanding which molecular players are the main ones and which are bystanders of the increase in permeability and late structural disruption of the BBB. This, in turn, will help us understand the pathophysiology and therapeutic opportunities that alter the natural evolution of one of the most frequent, but neglected, lesions after human TBI. The main challenge in these patients, many with mild and moderate TBI, is to reduce the secondary damage and thus the number of patients who “talk and die” as well as the neurological sequelae in survivors.

Acknowledgments

This work was supported, in part, by the Fondo de Investigación Sanitaria (Instituto de Salud Carlos III) with grants PI10/00302 and PI11/00700, which were cofinanced by the European Regional Development and awarded to Dr. Poca and Dr. Sahuquillo, respectively. T. Martínez-Valverde and A. Ráloi are recipients of a predoctoral grant from the Instituto de Salud Carlos III (grant no.: FI11/00195) and from Fundació Institut de Recerca HUVH (grant no.: PRED-VHIR-2012-26), respectively.

Author Disclosure Statement

J.M.S. holds a U.S. patent (#7,285,574), “A novel non-selective cation channel in neural cells and methods for treating brain swelling.” J.M.S. is a member of the scientific advisory board and holds shares in Remedy Pharmaceuticals. No support, direct or indirect, was provided to J.M.S., or for this project, by Remedy Pharmaceuticals.

References

- Iaccarino, C., Schiavi, P., Picetti, E., Goldoni, M., Cerasti, D., Caspani, M., and Servadei, F. (2014). Patients with brain contusions: predictors of outcome and relationship between radiological and clinical evolution. *J. Neurosurg.* 120, 908–918.
- Alahmadi, H., Vachhrajani, S., and Cusimano, M.D. (2010). The natural history of brain contusion: an analysis of radiological and clinical progression. *J. Neurosurg.* 112, 1139–1145.
- Simard, J.M., Kent, T.A., Chen, M., Tarasov, K.V., and Gerzanich, V. (2007). Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet. Neurol.* 6, 258–268.
- Simard, J.M., Kilbourne, M., Tsymbalyuk, O., Tosun, C., Caridi, J., Ivanova, S., Keledjian, K., Bochicchio, G., and Gerzanich, V. (2009). Key role of sulfonylurea receptor 1 in progressive secondary hemorrhage after brain contusion. *J. Neurotrauma* 26, 2257–2267.
- Simard, J.M., Kahle, K.T., and Gerzanich, V. (2010). Molecular mechanisms of microvascular failure in central nervous system injury: synergistic roles of NKCC1 and SUR1/TRPM4. *J. Neurosurg.* 113, 622–629.
- Katayama, Y., and Kawamata, T. (2003). Edema fluid accumulation within necrotic brain tissue as a cause of the mass effect of cerebral contusion in head trauma patients. *Acta Neurochir. (Wien) Suppl.* 86, 323–327.
- Maeda, T., Katayama, Y., Kawamata, T., Koyama, S., and Sasaki, J. (2003). Ultra-early study of edema formation in cerebral contusion using diffusion MRI and ADC mapping. *Acta Neurochir. (Wien) Suppl.* 86, 329–331.
- Kurland, D., Hong, C., Aarabi, B., Gerzanich, V., and Simard, J.M. (2012). Hemorrhagic progression of a contusion after traumatic brain injury: a review. *J. Neurotrauma* 29, 19–31.
- Yokota, H. (2007). Cerebral endothelial damage after severe head injury. *Nippon Med. Sch.* 74, 332–337.
- Tosun, C., Kurland, D.B., Mehta, R., Castellani, R.J., deJong, J.L., Kwon, M.S., Woo, S.K., Gerzanich, V., and Simard, J.M. (2013). Inhibition of the Sur1-Trpm4 channel reduces neuroinflammation and cognitive impairment in subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 44, 3522–3528.
- Zweckberger, K., Hackenberg, K., Jung, C.S., Hertle, D.N., Kiening, K.L., Unterberg, A.W., and Sakowitz, O.W. (2014). Glibenclamide reduces secondary brain damage after experimental traumatic brain injury. *Neuroscience* 272c, 199–206.
- Aittoniemi, J., Fotinou, C., Craig, T.J., de Wet, H., Proks, P., and Ashcroft, F.M. (2009). SUR1: a unique ATP-binding cassette protein that functions as an ion channel regulator. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 364, 257–267.
- Noma, A. (1983). ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 305, 147–148.
- Seino, S. (1999). ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu. Rev. Physiol.* 61, 337–362.
- Woo, S.K., Kwon, M.S., Ivanov, A., Gerzanich, V., and Simard, J.M. (2013). The sulfonylurea receptor 1 (Sur1)-transient receptor potential melastatin 4 (Trpm4) channel. *J. Biol. Chem.* 288, 3655–3667.
- Chen, M., and Simard, J.M. (2001). Cell swelling and a nonselective cation channel regulated by internal Ca²⁺ and ATP in native reactive astrocytes from adult rat brain. *J. Neurosci.* 21, 6512–6521.
- Liss, B., and Roeper, J. (2001). ATP-sensitive potassium channels in dopaminergic neurons: transducers of mitochondrial dysfunction. *News Physiol. Sci.* 16, 214–217.
- Sullivan, H.C., and Harik, S.I. (1993). ATP-sensitive potassium channels are not expressed in brain microvessels. *Brain Res.* 612, 336–338.
- Simard, J.M., Woo, S.K., Schwartzbauer, G.T., and Gerzanich, V. (2012). Sulfonylurea receptor 1 in central nervous system injury: a focused review. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1699–1717.
- Simard, J.M., Geng, Z., Kyoong Woo, S., Ivanova, S., Tosun, C., Melnichenko, L., and Gerzanich, V. (2009). Glibenclamide reduces inflammation, vasogenic edema, and caspase-3 activation after subarachnoid hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 317–330.
- Gerzanich, V., Woo, S.K., Vennekens, R., Tsymbalyuk, O., Ivanova, S., Ivanov, A., Geng, Z., Chen, Z., Nilius, B., Flockerzi, V., Freichel, M., and Simard, J.M. (2009). De novo expression of Trpm4 initiates secondary hemorrhage in spinal cord injury. *Nat. Med.* 15, 185–191.
- Simard, J.M., Tsymbalyuk, N., Tsymbalyuk, O., Ivanova, S., Yurovsky, V., and Gerzanich, V. (2010). Glibenclamide is superior to decompressive craniectomy in a rat model of malignant stroke. *Stroke* 41, 531–537.
- Simard, P.F., Tosun, C., Melnichenko, L., Ivanova, S., Gerzanich, V., and Simard, J.M. (2011). Inflammation of the choroid plexus and ependymal layer of the ventricle following intraventricular hemorrhage. *Transl. Stroke Res.* 2, 227–231.
- Mehta, R.I., Ivanova, S., Tosun, C., Castellani, R.J., Gerzanich, V., and Simard, J.M. (2013). Sulfonylurea receptor 1 expression in human cerebral infarcts. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 72, 871–883.
- Kunte, H., Busch, M.A., Trostdorf, K., Vollnberg, B., Harms, L., Mehta, R.I., Castellani, R.J., Mandava, P., Kent, T.A., and Simard, J.M. (2012). Hemorrhagic transformation of ischemic stroke in diabetics on sulfonylureas. *Ann. Neurol.* 72, 799–806.
- Simard, J.M., Castellani, R.J., Ivanova, S., Koltz, M.T., and Gerzanich, V. (2008). Sulfonylurea receptor 1 in the germinal matrix of premature infants. *Pediatr. Res.* 64, 648–652.

27. Kothari, R.U., Brott, T., Broderick, J.P., Barsan, W.G., Sauerbeck, L.R., Zuccarello, M., and Khoury, J. (1996). The ABCs of measuring intracerebral hemorrhage volumes. *Stroke* 27, 1304–1305.
28. World Medical Association. (2013). World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA* 310, 2191–2194.
29. Bullock, M.R., Chesnut, R., Ghajar, J., Gordon, D., Hartl, R., Newell, D.W., Servadei, F., Walters, B.C., and Wilberger, J. (2006). Surgical management of traumatic parenchymal lesions. *Neurosurgery* 58, S25–S46.
30. Spitzer, N., Sammons, G.S., and Price, E.M. (2011). Autofluorescent cells in rat brain can be convincing impostors in green fluorescent reporter studies. *J. Neurosci. Methods* 197, 48–55.
31. Clancy, B., and Cauller, L.J. (1998). Reduction of background autofluorescence in brain sections following immersion in sodium borohydride. *J. Neurosci. Methods* 83, 97–102.
32. R Development Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.
33. RStudio. (2013). RStudio: integrated development environment for R (version 0.97.551). RStudio: Boston, MA.
34. Fox, J., and Weisberg, S. (2011). *An R Companion to Applied Regression*. Sage: Thousand Oaks, CA.
35. Eriskat, J., Kempfski, O., Schurer, L., Berger, S., Staub, F., and Baethmann, A. (1994). Secondary growth of a primary brain tissue necrosis from focal trauma. In: *Intracranial Pressure IX*. H Nagai, K. Kamiya, and S. Ishii (eds). Springer-Verlag: Tokyo, pps. 339–342.
36. Astrup, J., Siesjo, B.K., and Symon, L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia—the ischemic penumbra. *Stroke* 12, 723–725.
37. Lindenberg, R., and Freytag, E. (1957). Morphology of cortical contusions. *AMA Arch. Pathol.* 63, 23–42.
38. Vajtr, D., Benada, O., Kukacka, J., Prusa, R., Houstava, L., Toupalik, P., and Kizek, R. (2009). Correlation of ultrastructural changes of endothelial cells and astrocytes occurring during blood brain barrier damage after traumatic brain injury with biochemical markers of BBB leakage and inflammatory response. *Physiol. Res.* 58, 263–268.
39. Baldwin, S.A., Fugaccia, I., Brown, D.R., Brown, L.V., and Scheff, S.W. (1996). Blood-brain barrier breach following cortical contusion in the rat. *J. Neurosurg.* 85, 476–481.
40. Kawamata, T., and Katayama, Y. (2007). Cerebral contusion: a role model for lesion progression. *Prog. Brain Res.* 161, 235–241.
41. Katayama, Y., Mori, T., Maeda, T., and Kawamata, T. (1998). Pathogenesis of the mass effect of cerebral contusions: rapid increase in osmolality within the contusion necrosis. *Acta Neurochir. (Wien) Suppl.*, 71, 289–292.
42. Katayama, Y., Becker, D.P., Tamura, T., and Hovda, D.A. (1990). Massive increases in intracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury. *J. Neurosurg.* 73, 889–900.
43. Villapol, S., Byrnes, K.R., and Symes, A.J. (2014). Temporal dynamics of cerebral blood flow, cortical damage, apoptosis, astrocyte-vasculature interaction and astrogliosis in the pericontusional region after traumatic brain injury. *Front. Neurol.* 5, 82.
44. Wu, H.M., Huang, S.C., Vespa, P., Hovda, D.A., and Bergsneider, M. (2013). Redefining the pericontusional penumbra following traumatic brain injury: evidence of deteriorating metabolic derangements based on positron emission tomography. *J. Neurotrauma* 30, 352–360.
45. Abdul-Muneer, P.M., Chandra, N., and Haorah, J. (2014). Interactions of oxidative stress and neurovascular inflammation in the pathogenesis of traumatic brain injury. *Mol. Neurobiol.* May 28. doi: 10.1007/s12035-014-8752-3. [Epub ahead of print]
46. Bianchi, M.E. (2007). DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* 81, 1–5.
47. Verstraeten, S.V., Mackenzie, G.G., and Oteiza, P.I. (2010). The plasma membrane plays a central role in cells response to mechanical stress. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 1739–1749.
48. Patel, A.D., Gerzanich, V., Geng, Z., and Simard, J.M. (2010). Glibenclamide reduces hippocampal injury and preserves rapid spatial learning in a model of traumatic brain injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 69, 1177–1190.
49. Davis, M.E., Grumbach, I.M., Fukai, T., Cutchins, A., and Harrison, D.G. (2004). Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J. Biol. Chem.* 279, 163–168.
50. Ashcroft, S.J., and Ashcroft, F.M. (1992). The sulfonylurea receptor. *Biochim. Biophys. Acta* 1175, 45–59.
51. Latchman, D.S. (1997). Transcription factors: an overview. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29, 1305–1312.
52. Vilalta, A., Sahuquillo, J., Rosell, A., Poca, M.A., Riveiro, M., and Montaner, J. (2008). Moderate and severe traumatic brain injury induce early overexpression of systemic and brain gelatinases. *Intensive Care Med.* 34, 1384–1392.
53. Rosenberg, G.A. (2012). Neurological diseases in relation to the blood-brain barrier. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 1139–1151.
54. Vilalta, A., Rosell, A., Poca, M.A., Sahuquillo, J., Montaner, J., De Los Rios, J., and Riveriro, M. (2006). Increased levels of matrix metalloproteinase-9 in plasma and brain extracellular fluid in the early phase of traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 23, 772–773.

Address correspondence to:

Juan Sahuquillo, MD, PhD

Department of Neurosurgery and Neurotraumatology
and Neurosurgery Research Unit (UNINN)

Vall d'Hebron University Hospital

Universitat Autònoma de Barcelona

Paseo Vall d'Hebron 119-129

08035 Barcelona

Spain

E-mail: sahuquillo@neurotrauma.net

2. Brain microdialysis as a tool to explore the ionic profile of the brain extracellular space in neurocritical patients: a methodological approach and feasibility study

Martínez-Valverde T, Vidal-Jorge M, Montoya N, Sánchez-Guerrero A, Manrique S, Munar F, Pellegrini MD, Poca MA, Sahuquillo J.

J Neurotrauma. 2015 Jan 1;32(1):7-16)

Brain Microdialysis as a Tool To Explore the Ionic Profile of the Brain Extracellular Space in Neurocritical Patients: A Methodological Approach and Feasibility Study

Tamara Martínez-Valverde,¹ Marian Vidal-Jorge,¹ Noelia Montoya,¹ Angela Sánchez-Guerrero,¹ Susana Manrique,² Francisca Munar,² Maria-Dolors Pellegri,³ Maria-Antonia Poca,^{1,4} and Juan Sahuquillo^{1,4}

Abstract

Our aim is to determine whether the ionic concentration in brain microdialysate enables calculations of the actual Na^+ , K^+ , and Cl^- concentrations *in vitro* and whether this method can be applied to determine the ionic concentrations in the brain extracellular fluid. We designed an experiment using CMA-71 probes (M Dialysis, Stockholm, Sweden) and the standard conditions used in a clinical setting. Nine CMA-71 probes were inserted in different matrices and perfused with mock cerebrospinal fluid containing 3% albumin at the standard infusion rate used in the clinical setting ($0.3 \mu\text{L}/\text{min}$). Microvials were replaced every 12 h, and the ionic concentrations, both in the dialysate and the matrix, were analyzed. For each ion, scatter plots were built, with $[\text{Na}^+]$, $[\text{K}^+]$, and $[\text{Cl}^-]$ in the dialysate as the predictor variables and the matrix concentrations as the outcome variables. A linear regression model allowed us to calculate the true ionic concentrations in the matrix. To demonstrate the feasibility of the method, we present the calculated ionic profile of one patient with a malignant infarction and a second with a severe traumatic brain injury. Our results confirm that the ionic concentration in microdialysate can be used to calculate the true concentrations of ions in a matrix and the actual concentrations in the extracellular fluid. Microdialysis offers the unique possibility of monitoring the dynamic changes of ions in the brain over time and opens a new avenue to explore the brain's ionic profile, its changes in brain edema, and how this profile can be modified with different therapies.

Key words: brain edema; brain microdialysis; ionic profile; potassium; relative recovery

Introduction

ACUTE INJURY TO THE BRAIN causes a variable disruption of ionic homeostasis and massive ionic fluxes with subsequent osmotic water movement across the cells and brain edema. Brain edema and the resulting increase in intracranial pressure (ICP) is a major cause of death and disability in patients with traumatic brain injury (TBI). Despite a much better understanding of its pathophysiology and molecular mechanisms, and an explosion in potential therapeutic targets, the translation of experimental findings into the clinical setting has not yet been successful, and the therapeutic options for managing brain edema are very limited thus far. The lack of translation is a result, in part, of the scarce availability of tools with which to monitor ionic shifts in the brain in the clinical setting, and this has restricted most of the relevant experiments of brain edema to animal models.

Microdialysis (MD) is a powerful tool that can monitor the composition of the interstitial spaces of any organ *in vivo* and al-

lows for the quasi-continuous neurochemical sampling of the brain extracellular fluid (ECF) in neurocritical patients.^{1,2} The tip of the MD probe is a porous semipermeable membrane that permits the diffusion of molecules in both directions until the ECF composition of the organ into which the probe is implanted equilibrates with the perfusate.³ Brain MD has been primarily used to study brain-energy metabolism, but it has rarely been used to study the ionic profile of the human brain.^{4–7} Reinert and colleagues showed that 20% of patients with a severe TBI had increased K^+ in the dialysate and that high levels of extracellular K^+ ($[\text{K}^+]_{\text{ECF}}$) were associated with increased ICP and poor outcomes.⁶ In different animal species, MD has also been used to study the ionic profile of uterine and nasal fluids.^{8–11}

A general principle in MD is that the dialysate does not reflect the actual concentration of the analyte of interest, but is only an estimate of the actual concentrations in the ECF.^{10,12–15} Recovery is defined to be the proportion of compounds extracted *in vitro* from the medium surrounding the probe.¹⁶ The relative recovery (RR) is

¹Neurotraumatology and Neurosurgery Research Unit (UNINN), ²Department of Anesthesiology, ³Department of Biochemistry, and ⁴Department of Neurosurgery, Vall d'Hebron University Hospital, Universidad Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

the efficiency of the probe in recovering a specific molecule and is primarily determined by the molecular weight cutoff and other properties of the MD probe. The recovery of an MD membrane is defined—and can be different—for each solute of interest, because despite their similar molecular weight and similar sizes of the pores in the membrane, the RR of different molecules can differ dramatically.¹⁷ In order to use MD to study the ionic profile of the brain ECF in a clinical setting, it is necessary to know the RRs of the ions of interest. To our knowledge, this information is not yet available, although it has been extrapolated from experimental studies, which have used various methods of calculation. Most frequently, the method of Bungay has been used to calculate the RR of the molecules of interest and correct the dialysate concentration.^{3,18–20} Bungay's method uses a perfusate that does not contain the solute of interest, and thus in order to study ionic recovery, distilled and deionized water must be used. The main disadvantages of this method are that the ECF is diluted and that the fluid recovery is unstable as a result of the hypotonicity of the perfusate. Further, the continuous infusion of a hyposmotic fluid may cause brain lesions and is not approved for human use. In neurocritical patients, the commercial perfusate routinely used is mock cerebrospinal fluid (CSF) with variable concentrations of Na^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+} , and Mg^{2+} .

The aim of our study was to investigate the feasibility of using brain MD as a method to study the dynamic changes in the concentration of ions in patients with an acute brain injury.²¹ We aimed to 1) analyze in an *in vitro* model whether the recovered microdialysate (using commercially available 100-kDa membranes perfused with mock CSF at 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$) accurately reflects the Na^+ , K^+ , and Cl^- concentrations in a medium with a known predefined ionic concentration (matrix) and 2) study the ionic profile of the brain ECF in 2 patients, one with a severe traumatic brain injury and a second with a malignant stroke.

The results of this study showed that the *in vitro* ionic concentration can be reliably calculated from the dialysate concentrations by using an ordinary least-squares linear regression model. Implementing this method at the bedside of patients with acute brain injuries is feasible and allows clinical monitoring of the ionic concentrations of the brain ECF and the changes in these concentrations over time.

Methods

The present study was conducted in three stages: 1) calibration of the *in vitro* experimental setting; 2) calculation of the true *in vitro* concentrations of Na^+ , K^+ , and Cl^- by using the conventional method of calculating the RR and by applying a linear regression model; and 3) study of the feasibility of the methodology in 2 patients in whom the probe was placed in different areas of the brain (injured/core, penumbra, or macroscopically normal brain).

Calibration of the *in vitro* experimental setting

The microdialysis probe. In the *in vitro* experiments, 9 sterile CMA-71 probes with a 10-mm dialyzing membrane were used (manufacturer reference #8010320; M Dialysis AB, Solna, Sweden). These probes are approved for clinical use in Europe (CE marking approval according to the Medical Device Directive 93/42/EEC). To avoid systematic errors in the manufacturing process, we used catheters from 4 different lots. According to the manufacturer's specifications, this probe has a nominal cutoff of "around 100 kDa."²² The 60-mm shaft is made of polyurethane and has an outer diameter of 0.9 mm. The dialyzing membrane is 10 mm long, has an outer diameter of 0.6 mm, and is made from polyarylethersulphone. The inlet and outlet tubes are also made from

polyurethane and have a 1-mm outer diameter. The catheter contains a gold tip, making it visible on a computed tomography (CT) scan and thus allowing for the determination of the exact position of the probe.

The infusion pump and the perfusate. The *in vitro* experiments were conducted with a compact, flexible, dual-syringe pump designed for low pulse-free flow rates and suitable for MD (CMA-402 pump; CMA Microdialysis AB, Kista, Sweden). The pump allows for each of the two syringes to be controlled independently and is precalibrated for 1-, 2.5-, and 5-mL syringes and for flow rates between 0.1 and 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. The experiments for this study were conducted with a 1-mL syringe connected to the catheter. For all of the experiments, the flow rate was set to infuse commercially available isotonic sterile perfusate that is specially developed for brain MD (perfusion fluid CNS, ref. no.: P000151; M Dialysis AB) at a constant rate of 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$. This artificial solution has a composition similar to human brain interstitial fluid, an osmolality of 305 mOsm/kg, and the following composition: NaCl 147 mmol/L; KCl 2.7 mmol/L; CaCl_2 1.2 mmol/L; and MgCl_2 0.85 mmol/L. The total Cl^- content for this solution is 153.8 mmol/L. To facilitate the *in vitro* calibration of the high cut-off membranes, 3% albumin (3 g/dL) was added to the perfusate. The addition of 3% albumin to the perfusate provokes minor changes in the final concentration of ions. The new obtained concentrations were: NaCl 143.5 mmol/L; KCl 2.6 mmol/L; CaCl_2 1.02 mmol/L; MgCl_2 0.72 mmol/L; and 144.9 mmol/L as a total content of Cl^- .

Experimental design and calibration of the system to zero fluid loss. The objective of the laboratory setting was to design an *in vitro* system that simulates the conditions found *in vivo* when CMA-71 probes are implanted. The glass tubes—without additives—containing the test solution (BD Vacutainer[®]; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) were placed on a dry bath (Labnet International, Edison, NJ), and the relative vertical positions of the pump, the tip of the probe inside the tube, and the top of the microvial were controlled, as was the temperature. Controlling the difference in height between the different components of the pump and the probe is crucial for controlling the small changes in hydrostatic pressures inside and outside the probe that can significantly affect fluid recovery. The CMA-71 catheter tip was placed inside the solution through a channel made by a 14G safety IV catheter (Introcan Safety[®] 14G, 2.2 \times 50 mm; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Germany) inserted into the center of the rubber closure to establish a channel to introduce the MD probe and prevent fluid evaporation and bacterial contamination (Fig. 1). The other end of the catheter was connected to the CMA-402 pump that infused the perfusion fluid at 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$.

In each experiment, the first step was to equilibrate the inflow and outflow volumes to make certain that no fluid was lost into the matrix (i.e., to obtain 100% volume recovery) and, consequently, to verify that both hydrostatic and osmotic pressures across the membrane were in equilibrium. To do so, the same isotonic perfusion fluid CNS was used both in the perfusate and in the matrix. In our experiments, the osmotic pressure was equal on both sides of the membrane; thus, according to the Starling equation, the probe's internal hydrostatic pressure and matrix hydrostatic pressure were considered to be in equilibrium when there was no net fluid movement across the dialyzing membrane, and fluid recovery was thus close to 100% (18 $\mu\text{L}/\text{h}$). The hydrostatic pressure inside the probe at the level of the tip is the pressure that the pump generates in the circuit—this was determined to be approximately 1 mm Hg—plus the hydrostatic difference between the pump and the tip of the MD probe (in most experiments, this was set at 0 mmH₂O). The hydrostatic pressure inside the probe at the level of the tip depends on the pressure that the pump generates in the circuit. This was determined in an *in vitro* experiment in which the pump was

BRAIN MICRODIALYSIS AND IONS

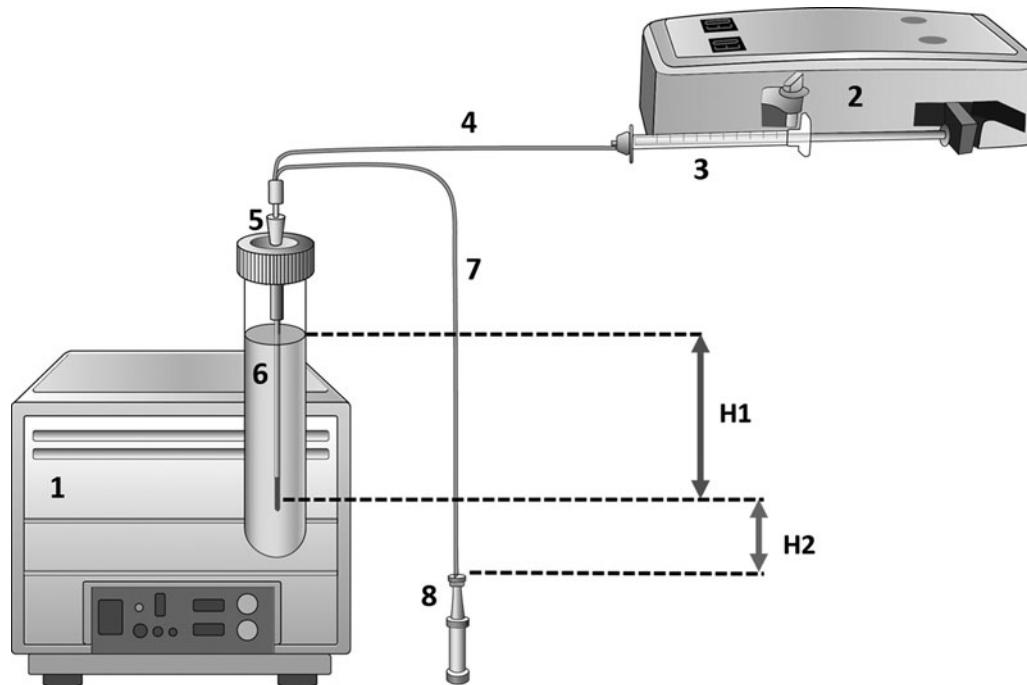


FIG. 1. Diagram of the general setup for the *in vitro* experiments. For the sake of clarity, sizes have been altered and are not proportional to the reality. 1) Dry or wet bath, where the tube containing the matrix is placed to control the temperature of the experiment constant. For this particular experiment, a dry bath without agitation was used. 2) CMA 402 dual-syringe pump designed for low pulse-free flow rates. 3) Syringe. 4) Inlet tubing of the CMA-71 probe. 5) 14G safety IV catheter. 6) Matrix solution (for exact composition, see the text). 7) Outlet tubing of the CMA-71 probe. 8) Microvial. H1. Height from the surface of the solution to the mid-point of the dialyzing membrane (10 mm in length); H2. Height from the mid-point of the MD membrane to the top of the microvial. In the real setup and for this particular experiment, the syringe (3) and the microvial tip (8) were in line with the mid-point of the 10-mm MD membrane and therefore H2 was equal to 0 mm.

connected to a CMA71 probe through a three-way stopcock, and the circuit pressure was continuously monitored for 24 h with a minute-by-minute recording—by a computer and LabChart Software—through the lateral channel by using a conventional solid-state Camino probe. For 1444 readings, the mean circuit pressure was 0.98 ± 0.53 mm Hg. Therefore, for *in vitro* calculations, we assumed a 1-mm Hg hydrostatic pressure equivalent to $13.6 \text{ mmHg}_2\text{O}$. The hydrostatic pressure that the matrix exerts on the external side of the MD membrane depends on the fluid density, the gravitational constant, and the vertical height of the matrix column. After various adjustments in the experimental design, it was observed that when the mid-point of the 10-mm membrane was placed 13.6 mm under the matrix surface (H1), a steady state was easily achieved. Thus, the CMA-71 probe was introduced vertically into the tube containing the matrix, with the tip of the dialyzing 18.6 mm below the surface of the solution (Fig. 1). The top of the microvial was aligned with the mid-point of the membrane (H2=0 mm). This setup allowed us to recover approximately 100% ($18 \mu\text{L/h}$) of the volume, without the need to add any colloid to the perfusate when the matrix and the perfusion fluid were isotonic and did not contain any macromolecules. However, because we used different ionic concentrations in our experiments, it was easier to increase the osmotic pressure by adding albumin to the perfusate to facilitate steady fluid recovery. Different albumin concentrations (2.0–3.5%) were tested, and fluid recoveries close to the expected volumes were achieved when 3% albumin was added.

In vitro determination of relative recovery for the ions of interest

A total of 9 different catheters were used in these experiments. In seven catheters, the experiments were conducted at room

temperature (22–23 °C) and in 2 probes at 37 °C. For the sake of simplicity and because the obtained data were not significantly different at both temperatures, most experiments were conducted at room temperature. Different matrix solutions with different ionic concentrations were prepared under sterile conditions and sampled by each catheter. Study matrices were prepared with 1) Milli-Q water, 2) different amount of sodium chloride and potassium chloride salts (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), and 3) a constant concentration of 200 mg/L of serum human albumin (Grifols, Barcelona, Spain). This external concentration of albumin was chosen because it is within the reference range for normal human CSF.^{23,24} The whole preparation process of the matrices was carried out inside a laminar flow hood to avoid bacterial contamination. The range of ionic concentrations for the different matrices are summarized in Table 1.

The matrices were placed in 5-mL tubes (BD Vacutainer; Becton Dickinson), and the CMA-71 probes were inserted as shown in Figure 1. Minor adjustments to H2 were made before each experiment to correct for small differences in hydrostatic pressures and obtain a zero-fluid loss and a fluid recovery close to the expected theoretical volume ($18 \mu\text{L/h}$). In each experiment, the dialysate of the first hour was always discarded. Once a steady state was achieved, each catheter was perfused for a median of 5 days (120 h; min-max, 48–180 h). The microvials were changed every 12 h, and both the container and the matrix were replaced every 24 h to avoid volume loss by evaporation and the consequent variations in hydrostatic pressure and ionic concentration. Every time the microvials were replaced, a small volume of the matrix was sampled to verify that no significant changes had occurred in the solution as a result of evaporation or other uncontrolled factors. The microvials were stored at 4 °C in the same conditions as the matrix solution until analysis.

TABLE 1. IONIC CONCENTRATION OF MD PERFUSATES, REFERENCE RANGE FOR CSF IONIC CONCENTRATIONS AND RANGE OF *IN VITRO* TESTED CONCENTRATIONS

	Ionic concentration of MD perfusates					Control group (lower-upper)	In vitro tested concentrations
	CNS perfusion fluid	CNS perfusion fluid + 3% albumin	Ringer ^a	Ringer lactated ^b	Normal saline		
Na ⁺ (mmol/L)	147	143.5	145.3	130	154	130–164	115–195
K ⁺ (mmol/L)	2.7	2.6	5.4	5.4	—	2.8–3.6	2.0–7.5
Cl ⁻ (mmol/L)	153.8	144.9	155.3	111.8	145	115–144	120–192
Ca ²⁺ (mmol/L)	1.2	1.02	4.6	2.7	—	—	—
Mg ²⁺ (mmol/L)	0.85	0.72	—	—	—	—	—
Osmolarity (mOsm/L)	305	286	308.6	273	308	—	—

Lower-upper indicates lower upper thresholds calculated by the robust method described in the National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS) and Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines C28-A2 and C28-A3 ($n=22$).

^aComposition from Fresenius Kabi (Bad Homburg, Germany).

^bComposition from B. Braun Melsungen AG (Melsungen, Germany).

MD, microdialysis; CSF, cerebrospinal fluid.

For ion determination, dialysates and matrix samples were analyzed by the AU5400™ analyzer (Diagnostic Systems Group, Melville, NY). This system uses selective ion electrodes with the following detection ranges: 10–400 mmol/L for Na⁺; 2–200 mmol/L for K⁺; and 15–400 mmol/L for Cl⁻. The coefficient of variation for the analyzer in the study period was approximately 1% for all the three ions (0.7% for Na⁺, 1.1% for K⁺, and 0.9% for Cl⁻).

To calculate the true concentration in the matrix, two mathematical models were used: 1) the calculation of RR to correct the concentration obtained in the dialysate. RR was calculated by the equation proposed by Bungay and colleagues^{18–20} for the situation when the perfusate contains the solute of interest: $RR = (C_{md} - C_{in} / C_{matrix} - C_{in}) \times 100$, where C_{md} , C_{in} , and C_{matrix} are the analyte concentrations in the microdialysate, inflow perfusate, and the matrix, respectively, and 2) a simple linear regression and the ordinary least squares (OLS) method in which the independent or predictor variable was C_{md} and the outcome (dependent variable) was C_{matrix} . The only previous assumption was that both variables were linearly correlated and therefore C_{md} could be used as a reliable estimator of the true ionic concentration in the medium (C_{matrix}).

Feasibility study

A prospective study was conducted in 2 patients, one with an severe TBI and the second with a malignant stroke who received ICP and MD monitoring (PR-ATR-286/2013). In summary, brain MD catheters are usually inserted into noninjured brain tissue and/or in regions of interest according to a previously described methodology.²⁵ A CMA-71 brain microdialysis catheter with a 100-kDa cut-off membrane (M Dialysis AB) was used in the 2 patients included in this study, and the position of the probe was confirmed by a control CT scan. Cerebral catheters were perfused with same sterile isotonic CNS fluid at a fixed flow rate of 0.3 μ L/min using a CMA-106 pump (M Dialysis AB). The dialysates were collected hourly by the nurse in charge of the patient, using capped microvials—specially designed to collect microvolumetric samples and minimize evaporation—and lactate, pyruvate, glucose, glycerol, and glutamate levels were routinely monitored at the bedside using an Iscus Flex analyzer (M Dialysis AB). After the hourly measurements were completed, the microvials were placed in a rack designed to seal the microvials and prevent evaporation (M Dialysis AB). All racks were stored at -86°C until analysis. In an experimental study we conducted previously, it was established that under these storage conditions, evaporation does not occur and therefore the ionic concentration for Na⁺, K⁺, and Cl⁻ does not

change significantly for at least 36 months of storage (unpublished results). Data from the first two microvials were always excluded.

For ion determination, dialysates were analyzed with the same AU5400 analyzer used in the *in vitro* study. The microvials corresponding to the first 24 h were defrosted on ice. When the Iscus Flex analyzer analyzes metabolites, a volume of 8 μ L is used and therefore it is necessary to pool the content of 12 microvials in order to obtain the minimum volume of 85 μ L needed to perform the analysis in the AU5400 analyzer. Therefore, two samples for each patient are usually obtained for a 24-h period.

Reference range

For the best approximation to the reference range for extracellular ionic concentration, we used the CSF concentrations measured with the same analyzer in a cohort of 22 normal volunteers having no neurological or psychiatric history. These also had normal neurological examination results and Mini-Mental State Examination scores of >25 . CSF was obtained during spinal anesthesia for urological, general, or vascular surgery after informed consent was obtained from all patients and approval was given by the ethical committee of our center (PRAG-75/2005).

Statistical analysis

Descriptive statistics were obtained for each variable. For continuous variables, the summary statistics used were the mean, median, range, and the standard deviation. Percentages and sample sizes were used to summarize categorical variables. The Shapiro-Wilk's test and inverse probability plot were used to test whether the data followed a normal distribution. To correlate two continuous variables, the most conservative Kendall's tau (when data did not follow a normal distribution) or Pearson's correlation test (for data following a normal distribution) was used. For each ion, scatter plots were built, with $[\text{Na}^+]_{md}$, $[\text{K}^+]_{md}$, and $[\text{Cl}^-]_{md}$ in the dialysate as the predictor variables and the true matrix concentrations as the outcome variables. A simple linear regression and the OLS method were used. Adjusted R^2 values were calculated for all models to test whether linear or nonlinear models adequately explained the relationships between both variables. Statistical analyses were carried out with R software (version 3.0.2; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)²⁶ and the integrated development environment RStudio (v0.98.501; RStudio, Boston, MA).²⁷ The car package was used for regression analysis.²⁸

To calculate the reference interval and the upper and lower thresholds for the ions, we used the distribution-free “robust method” described in the National Committee on Clinical

BRAIN MICRODIALYSIS AND IONS

Laboratory Standards (NCCLS) and Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines C28-A2 and C28-A3 for estimating percentiles and their 90% confidence intervals (CIs).^{29–31} To calculate reference intervals with this method, we used the routine implemented in MedCalc (version 12.2; MedCalc Software, Mariakerke, Belgium).

Results

Relative recovery obtained in the *in vitro* experiments

The *in vitro* experiments yielded 95 pairs of samples (matrix-dialysate) for Na^+ and 94 for K^+ and Cl^- (71 from room temperature experiments and 24 from 37°C experiments). The median RR calculated from Bungay's equation ranged from 103 to 123%. However, the min and max values were very extreme (-212 for Cl^- and -400 for Na^+) because of the fact that Bungay's equation does not take into consideration that C_{in} can be higher than C_{matrix} , as was the case in our experiments in which hypertonic and hypotonic matrices were tested. Therefore, we considered this method unreliable for calculating the true concentration of ions *in vivo* when the MD perfusate used contains ions.

Ionic concentration calculated by the ordinary least squares method

The second approach of using the OLS method to estimate the true ionic concentrations in the matrix from the ionic concentration in the dialysate is summarized in Figures 2, 3, and 4. The goodness of fit for the linear model and the parameter estimates were excellent for all the tested ions. The adjusted R^2 for the linear models was 0.95 for Na^+ , 0.99 for K^+ , and 0.95 for Cl^- . In summary, the ionic concentration *in vitro* could be reliably estimated at any of the two tested temperatures from the ionic concentration in the microdialysate. The best estimate was for K^+ , with a slope of 0.95 (95% CI, 0.93–0.98), an intercept of almost zero, and a $R^2 = 0.99$.

Reference range

This cohort was composed of 22 controls, 7 (32%) men and 15 (68%) women, with a mean age of 65 ± 13 years (min, 41; max, 88). The range of normality for ions in the CSF for this control group is shown in Table 1. The upper threshold using the robust method was 164 mmol/L for Na^+ , 144 mmol/L for Cl^- , and 3.6 mmol/L for K^+ .

Analysis of ionic profile of the brain extracellular space in 2 patients

To show the feasibility of the method in the clinical setting, we present the calculated ionic profile of 2 patients in Figures 5 and 6.

Patient 1. A 24-year-old man was admitted to our hospital after a fall from a height of 6 m. The first recorded preadmission Glasgow Coma Score was 6. A brain CT scan performed on admission to our center showed a moderate subarachnoid hemorrhage with mild intraventricular hemorrhage and diffuse subcortical petechia, suggesting diffuse axonal injury. A small right subdural hematoma (SDH) was also observed. The patient was transferred to the neurointensive care unit (NICU), and ICP and MD probes were placed and maintained for 114 h. The MD probe was located 41 mm below the nonevacuated acute SDH in what it could be considered an area of structurally normal brain (Fig. 5). The estimated ionic profile 25 h after injury showed a moderate increase in the $[\text{Cl}^-]_{\text{brain}}$ with a normal $[\text{Na}^+]_{\text{brain}}$ and $[\text{K}^+]_{\text{brain}}$. The plasmatic levels of Na^+ and K^+ were both within the normal range.

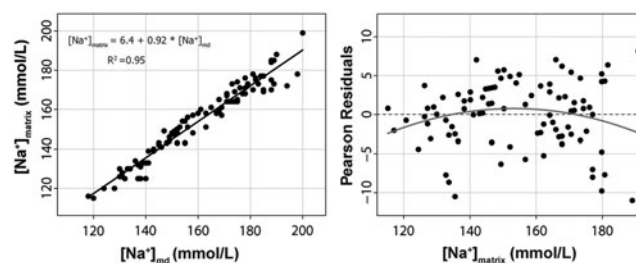


FIG. 2. On the left, we show the scatter plot matrix for Na^+ in the dialysate $[\text{Na}^+]_{\text{md}}$ and the predefined Na^+ concentration in the matrix $[\text{Na}^+]_{\text{matrix}}$. The equation to calculate the $[\text{Na}^+]_{\text{matrix}}$ from the assayed concentration in the dialysate is also shown. $R^2 =$ adjusted r-squared for the model. The right plot shows the Pearson's residuals (expected minus predicted values).

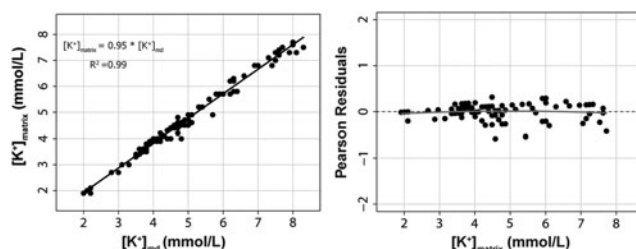


FIG. 3. On the left, we represent the scatter plot matrix for K^+ in the dialysate $[\text{K}^+]_{\text{md}}$ and the predefined K^+ concentration in the matrix $[\text{K}^+]_{\text{matrix}}$. The equation to calculate the $[\text{K}^+]_{\text{matrix}}$ from the assayed concentration in the dialysate is also shown. $R^2 =$ adjusted r-squared for the model. The right plot shows the Pearson's residuals (expected minus predicted values).

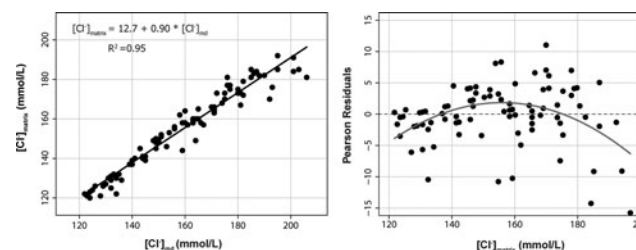


FIG. 4. On the left, we represent the scatter plot matrix for Cl^- in the dialysate $[\text{Cl}^-]_{\text{md}}$ and the predefined Cl^- concentration in the matrix $[\text{Cl}^-]_{\text{matrix}}$. The equation to calculate the $[\text{Cl}^-]_{\text{matrix}}$ from the assayed concentration in the dialysate is also shown. $R^2 =$ adjusted r-squared for the model. The right plot shows the Pearson's residuals (expected minus predicted values).

Patient 2. A 52-year-old right-handed man was brought to the emergency department 90 min after the sudden onset of severe right-sided weakness and difficulty speaking. His past medical history was notable for having been treated for tuberculosis. On admission to our center, the patient presented with dense right hemiplegia and expression dysphasia and a score on the National Institutes of Health stroke scale of 22. A noncontrast head CT showed an ischemic stroke of the left middle cerebral artery (MCA)—of possibly embolic etiology—without mid-line shift. Treatment with tissue plasminogen activator was disregarded because of the infarction size. Given that the diagnosis was of potential malignant infarction, he was admitted to the NICU. On the

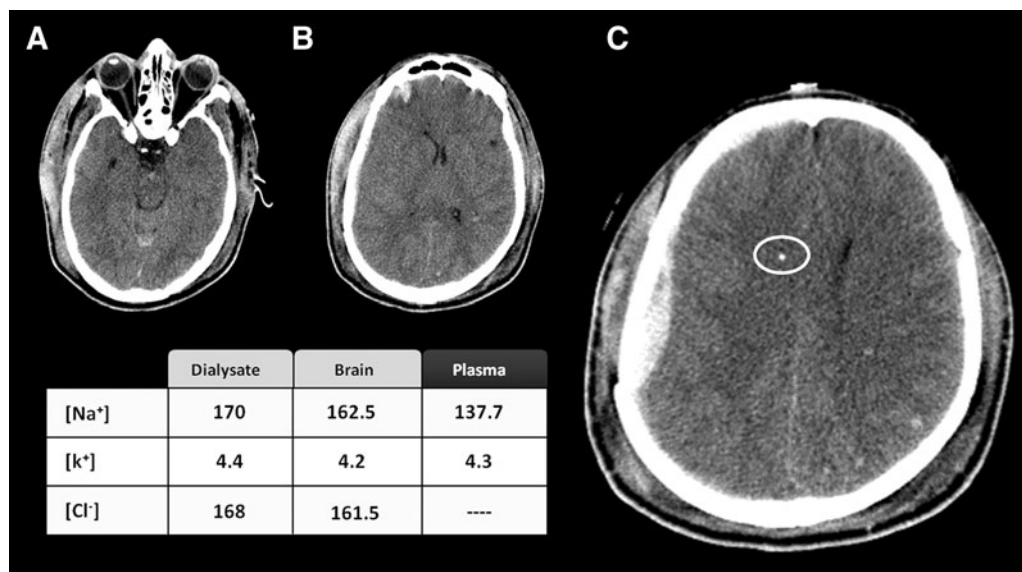


FIG. 5. A 24-year-old man was admitted to our hospital after a severe traumatic brain injury with a prehospital Glasgow Coma Score of 6. The computed tomography (CT) scan was classified as a diffuse brain injury type II of the Marshall's classification. In the three CT scan slices shown here (A, B, and C), a small right frontal contusion together with a small subdural hematoma and subarachnoid blood in the interpeduncular cistern are observed. The white circle in (C) indicates the MD probe that was located at a distance of 41 mm from the subdural hematoma. The table summarizes the ionic concentration in the plasma, the dialysate, and the estimated concentration in the brain calculated according to the equations described in the text.

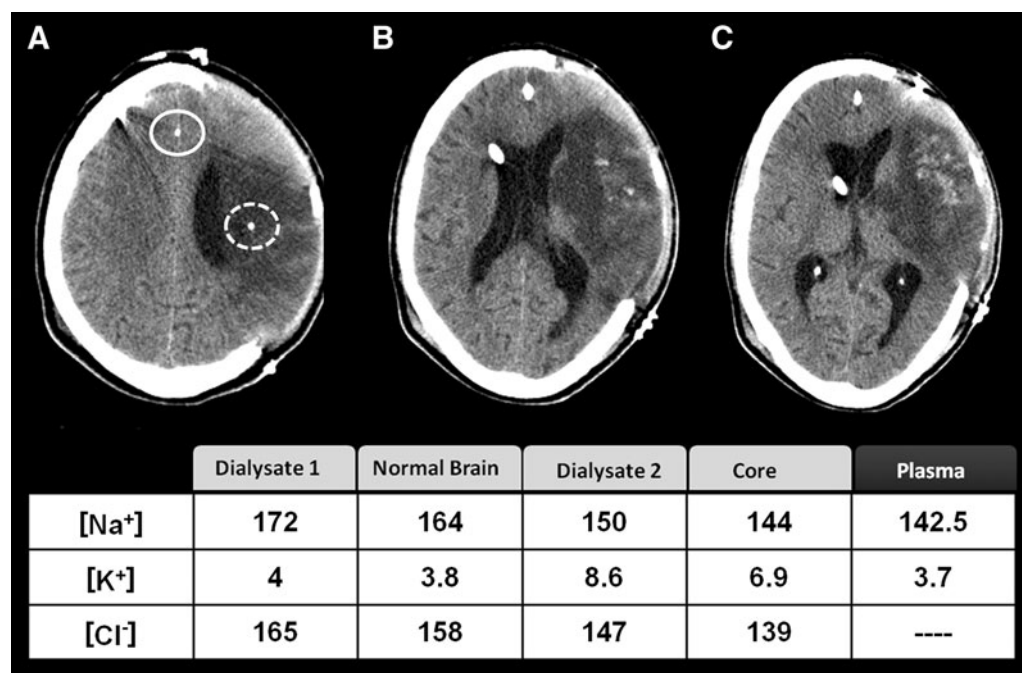


FIG. 6. This 52-year-old man was brought to the emergency department following the sudden onset of severe right-sided weakness and difficulty speaking. On admission to our center, the patient showed dense right hemiplegia and expression dysphasia and a score on the National Institutes of Health stroke scale of 22. In the computed tomography scan after decompressive craniectomy was conducted, we observed a massive infarction occupying more than 75% of the territory of the middle cerebral artery with some hemorrhagic component inside the infarction. The continuous and discontinuous white circles indicate the MD probes located in normal brain and in the infarction core, respectively. The table summarizes the ionic concentration in the plasma, the dialysate in normal brain (dialysate 1) and core (dialysate 2), and the estimated concentration in the extracellular fluid according to the equations described in the text. The main finding was that $[K^+]_{\text{brain}}$ was high in the core.

BRAIN MICRODIALYSIS AND IONS

third day of hospitalization, the patient presented mental confusion and a moderate headache associated with increasing difficulty to arouse. New CT imaging showed a large infarct in the right MCA territory associated with brain swelling and a left-to-right 5-mm mid-line shift. Decompressive hemicraniectomy was conducted 67 h after the stroke. During decompressive surgery, two MD probes were placed, one in the infarction core and the second in the contralateral brain (Fig. 6). Monitoring of brain metabolism (glucose, lactate, and pyruvate) was initiated 6 h after surgery (73 h after stroke onset). The control CT scan performed after surgery showed one MD catheter inside the core and the second in the contralateral hemisphere, close to the mid-line. The ionic profile in the normal brain showed a mild increase in $[Cl^-]_{\text{normal brain}}$ (upper normal threshold, 144 mmol/L) as the only abnormality. The ionic profile in the core showed a significant increase in $[K^+]_{\text{core}}$. The obtained values in the dialysate and the calculated concentrations in the brain are shown in Figure 6. The patient presented sudden neurological deterioration 10 days after the stroke. In the CT scan, there was an increase in the hemorrhagic transformation of the left infarction and a significant bulging of the infarcted brain throughout the decompressive area, together with new hypodense lesions in the right hemisphere. The patient died on the tenth day after the stroke.

Discussion

Brain MD is a tool that is still rarely used in the routine management of neurocritical patients. Kitagawa and colleagues showed that only 42 centers worldwide used MD for clinical decision making in the management of patients with TBI, stroke, and aneurysmal subarachnoid hemorrhage in 2012.² However, brain MD is a unique research tool for an in-depth analysis of the complex physiological derangements that occur in acute brain injuries. Brain MD can promote a better understanding of the pathophysiology of ionic disturbances and therefore of brain edema. Ions are the most active osmotic particles of the mammalian brain, and the osmolarity of the intracellular compartment must be in equilibrium with the ECF. Under normal conditions, any disturbance of this equilibrium is rapidly restored to the steady state with the participation of ionic channels, transporters, and ionic pumps.³²

Acute injuries to the brain cause a variable disruption of ionic homeostasis and massive ionic fluxes with subsequent osmotic water movement across the cells. Major contributors to the ionic disturbances of the brain ECF include traumatic depolarization, various types of brain edema (cytotoxic, ionic, and vasogenic), ischemic or nonischemic brain hypoxia, excitotoxicity, cortical spreading depression or seizures, and the direct effects of osmotic drugs used in the management of neurocritical patients. In addition, the ionic profile of the brain ECF is an accurate indicator of the integrity or disturbances in the permeability of the blood-brain barrier.

MD has been extensively used to study the neurochemistry of the brain, but the study of ionic profiles of the brain ECF has been rarely reported in either experimental models or humans. The few clinical studies have concentrated on K^{+4-7} because the increase in the $[K^+]_{\text{brain}}$ is a biomarker of the severity of the brain tissue injury, brain ischemia, and necrotic death.³³ Further, some clinical studies in TBI have shown that an increased $[K^+]_{\text{brain}}$ is a strong predictor of severe physiological deterioration and of a poor outcome.^{6,7}

In vitro relative recovery: a requirement to calculate in vivo concentrations

In MD, the perfusate typically does not contain the analyte of

interest and operates under nonequilibrium conditions.¹⁰ Under these conditions, the concentration of the solute in the dialysate is only a variable fraction of the true concentration in the ECF.¹⁰ The efficiency in the recovery of any solute is defined by the *in vitro* RR, the ratio between the concentration in a solution and the concentration in the dialysate. The mathematical model used for this calculation was introduced by Bungay and colleagues in 1990 and is defined—when the perfusate contains the analyte of interest ($C_{in} > 0$)—by the equation defined in the *Methods* section of this article.¹⁸ When the solute of interest is not in the perfusate ($C_{in} = 0$), as occurs in most cases, a simplified equation is used ($RR = C_{md}/C_{matrix}$). Despite the caveats about this mathematical model already described by Bungay and colleagues,³ determining the RR of any analyte is an indispensable requirement to interpret the results *in vivo*. RR studies are typically conducted by immersing the probes in an inert solution to assess their performance in recovering the target analyte. Once the RR is known, the actual concentration of the analyte in the tissue can be calculated. This theoretical framework has been used both in experimental and clinical studies of the low-molecular-weight metabolites involved in the brain energy metabolism.^{1,10,12,18,20,34}

Methodological problems with ions

The diffusion of ions through the large pores of the high molecular cut-off of the CMA-71 probe should be theoretically fast and therefore their recovery high and only conditioned by the infusion rate and by the potential loss of fluid that can occur with 100-kDa membranes. In brain MD, the probe implanted in the tissue is usually perfused with a fluid that has a variable ionic composition, as shown in Table 1. Normal saline, Ringer, lactated Ringer's, and commercial or custom-made perfusion fluid—with or without colloids (albumine or dextrane)—have been used as perfusates.^{6,15,34} Adding colloids to the perfusate facilitates the equilibration of the osmotic pressures in both sides of the probe, thereby avoiding fluid loss into the tissue and making fluid recovery more stable. In our clinical experience with the CMA-71 probes, there is no need to add colloids to maintain a stable volume of dialysate recovery. This steady state can be also achieved *in vitro*—without colloids—by modifying the hydrostatic pressures inside and outside the probe by changing the heights between the tip's probe, the microvial, and the pump outlet.³⁵

Our study showed that ionic concentrations *in vitro*—and thus *in vivo*—cannot be reliably estimated by Bungay's method because this model gives extreme values when $C_{in} > C_{matrix}$. Therefore, this model is less useful when the actual concentrations in the tissue or in the *in vitro* solution are below the concentrations in the perfusate, as is the case in many of our experiments and in actual patients. Nordenvall and colleagues found a similar problem in a study of rat uterine fluid and used the “inverse relative recovery” to calculate recovery when the perfusate contained a higher ionic concentration than the matrix.⁸ Using this method, these investigators found an RR of 75% for Na^+ and 96% for K^+ when using a flow rate of 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$.⁸ However, it is not feasible to apply this method in patients, because the actual ionic concentration is unknown and can be below or above the perfusate's ionic concentration. The alternative of using deionized water as a perfusate is not accepted in humans; if it was, it could modify significantly the ionic concentration of the brain ECF when applied continuously over many hours.

In the *in vitro* study, the linear regression method was found to be very reliable and robust in estimating the true concentration of the three ions of interest at different temperatures when using the

CNS perfusate at a 0.3- $\mu\text{L}/\text{min}$ infusion rate and an MD membrane 10 mm long. On average, the slopes showed that the RRs were somewhat above 100% and higher than those reported by other investigators.^{6,8} This discrepancy can be explained by the different perfusion speeds: 0.5 $\mu\text{L}/\text{min}$ in the study of Nordenvall and colleagues and 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ in the study of Reinert and colleagues.^{6,8} As shown by many studies, infusion speed is inversely related to recovery on any solute in MD.^{12,34,36} In order to translate this model to the clinical setting, the basic requirement is that fluid recovery is in a steady state. This fact is not a unique problem for ions, but is a shared problem with the detection of any molecule where the *in vitro* RR is used to calculate the actual concentrations of the tissue. Ionic analyzers do not take into account changes in dialysate recovery, and therefore significant deviations from the expected recovery can alter the true values. In future clinical studies, the volume of the recovered dialysate should be reported and those microvials that deviate significantly from the expected recovery should be discarded.

We believe that MD used with harmonized clinical settings—perfusate, catheter length, and infusion rate—is an excellent tool for conducting studies of the ionic profile in the brain ECF. This technique opens up an exciting avenue to explore the potential response of the ECF to drugs and different hyperosmolar solutions routinely used in the management of neurocritical patients. It is also possible to study the ionic changes associated with cortical spreading depression or seizures, and this method can be used to investigate the ionic profile associated with different classes of brain edema and how this profile might change with different therapies.^{37,38}

In our case 2, the core of the infarction showed a high $[\text{K}^+]_{\text{brain}}$ that, if confirmed in more cases, may be an indicator of nonviable tissue. In rat fluid-percussion injury, Katayama and colleagues showed that an increase in the K^+ dialysate was proportional to the severity of the injury.³⁹ Necrosis behaves as a tissue homogenate and represents a weighted average of the ionic concentration of the intracellular space, the extracellular compartment, and the intravascular components. In addition, necrotic tissue is a powerful magnet for water. As a result, some dilution of the core can occur when the infarction evolves with time. That necrotic tissue attracts water has been shown by Katayama and colleagues in the core of post-traumatic brain contusions^{40,41} and might explain the paradoxical normality in $[\text{Cl}^-]_{\text{brain}}$ and $[\text{Na}^+]_{\text{brain}}$ found in the core in our case 2 (Fig. 6). However, additional studies with higher temporal resolution are needed to verify or refute such a hypothesis. An additional issue that necessitates further studies is whether changes in the ionic composition of the perfusate might influence the ionic profile of the brain ECF; normal saline contains no K^+ , and other perfusates contain high Cl^- concentrations (normal saline, 148 mmol/L; CNS fluid, 158 mmol/L). Further experimental studies need to be conducted to determine the optimal infusion fluid for monitoring both energy metabolism and ionic concentration.

Limitations of the study and future directions

Our study presents some limitations that merit discussion. It was conducted at only two fixed temperatures and at a constant atmospheric pressure in the matrix. Both temperature and pressure may affect ionic recovery. It is well known that diffusion is temperature dependent, because when temperature increases, the speeds of molecules increase and therefore diffusion occurs more quickly (as defined by the Einstein-Smoluchowski diffusion equation). However, the data at both temperatures did not differ and the differences

among individual catheters were negligible. Brain temperature is above 37°C in many patients, and the ICP can be above 25 mm Hg in some patients with acute brain injuries. The effect in recovery of these two variables, if any, should be further analyzed and incorporated in any mathematical model to fine tune the calculation of the true ionic concentration in the brain ECF. We believe that temperature and pressure are not issues in the recovery of small molecules, but additional studies at different temperatures and pressures should be conducted to confirm or refute this hypothesis. In a recently published *in vitro* study, Galea and colleagues evaluated the efficiency at recovering a 22-kDa protein (interleukin-1 receptor antagonist; ILRa) with CMA71 probes.⁴² They observed an insignificant effect in the RR of ILRa by changing temperature in the 20–37°C range and the pressure of the matrix in the 0–15-mm Hg range.⁴² However, the RR found for this cytokine was very low and showed a wide variability among catheters, an issue already described by others that can be attributed to the limitation of the CMA71 catheter at recovering macromolecules despite their theoretical cutoff.^{14,43}

The limitation of low spatial resolution—the limited brain tissue sampled by the MD probe—is an intrinsic limitation of the MD technique and cannot be overcome in the study of ionic profiles *in vivo*. However, placing the probe in the area of interest is a simple solution for studying brain edema. The different ionic profile in the different areas of our case 2 highlights the importance of placing the probes in the areas of interest. The methodology used in this study has a low temporal resolution if applied *in vivo* (4–12 h) owing to the fact that the assay we used needs a minimum volume of 85 μL for the ionic assay. With standard MD protocols used in neurocritical care (infusion speed of 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$), this requirement necessitates the pooling of at least 8–10 microvials than can be reduced to 4 if dilution of the dialysate is conducted before the assay. With any method of low temporal resolution, the dialysate is only a time-averaged concentration and therefore a snapshot of the average ionic profile. This limitation is not easy to overcome because it depends on both the methodology of MD and the sensitivity of the analytical methods used. Increasing the infusion speed from 0.3 to 0.5–1.0 $\mu\text{L}/\text{h}$ will reduce the recovery of the ions and therefore decrease the lower limit of detection for K^+ (2 mmol/L in our analyzer), which is probably the most relevant cation and a potential surrogate for tissue viability.³³ In addition, the recovery of the energy metabolites used at the bedside (lactate, pyruvate, and glucose) will also be significantly reduced with increasing infusion rate.^{1,2,10,12,20,34} Modifying the range of normality of energy metabolites—depending on the infusion speed—would add extra complexity to a monitoring system that is already quite cumbersome, significantly increasing the workload of nurses and NICU personnel.

For research applications and to explore many issues that are clinically relevant, probably the best analytical method to improve the temporal resolution for ionic determination is inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). This technique is unfortunately unavailable in most hospitals because the equipment is still very expensive. However, this resource is available in many research institutes that conduct environmental, geological, or biomedical research.⁴⁴ ICP-MS offers extremely low detection limits—in the subparts per million (ppm) levels—and needs less than a 20- μL volume.⁴⁴ This is an excellent method that our group is currently exploring. It would allow an improvement in the time resolution to 1 h or less if the perfusion is increased to 0.50 $\mu\text{L}/\text{min}$.

For clinical applications, as far as we know, there are no current alternatives for real-time, online measurements of ions in brain-injured patients. However, a potential option would be to use ion-

Selective microelectrodes adapted for human use. Ion-selective microelectrodes have a significant lower range of detection, need very small sample volumes, and have a much higher time resolution. However, these electrodes are not as yet available for clinical use. A second alternative is to adapt the outlet of the clinical MD probes to an in-line, solid-state, ion-selective microelectrode that allows real-time assays of the recovered dialysate. The only alternative to improve the time resolution of our method would be to dilute samples before assay with deionized water in order to increase the volume needed by the analyzer. This technique would enable a temporal resolution of approximately 4–6 h. In our opinion, this alternative is feasible and acceptable because the changes observed in ionic profile every 4 h, without altering the monitoring of energy metabolism, is a reasonable trade-off between the accepted indications for clinical use of MD and its added value for conducting clinical research.

Conclusions

Our study shows that, at a standard infusion rate of 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$ and with standard commercially available perfusate, the *in vitro* concentrations of a problem solution can be reliably estimated by using a simple linear regression and the OLS method. In this model, the ionic concentration in the dialysate is used as the predictor to estimate the true concentration in the solution (the outcome variable). The model was excellent for all the ions studies, particularly K^+ . The ionic analyzer used in the present study was a conventional analyzer used in the clinical setting that has the advantage of being easily available and subject to frequent recalibrations and quality-control checks. The use of MD to study the ionic profile of different regions of the injured brain opens up an exciting avenue to explore the complexities of the ionic disturbances and, specifically, the classification of the different types of brain edema.

Acknowledgments

This work has been supported, in part, by the Fondo de Investigación Sanitaria (Instituto de Salud Carlos III) with grants PI10/00302 and FIS PI11/00700, which were cofinanced by the European Regional Development and awarded to M.A. Poca and J. Sahuquillo, respectively. T. Martínez-Valverde and A. Sánchez-Guerrero are the recipients of personal predoctoral grants from the Instituto de Salud Carlos III (grant nos. FI11/00195 and FI12/00074, respectively).

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Lieutaud, T., Dailier, F., Artru, F., and Renaud, B. (2007). Neurochemical monitoring in neurointensive care using intracerebral microdialysis, in: *Handbook of Microdialysis: Methods, Applications and Perspectives*. B.H.C. Westerink and T.I.F.H. Cremers (eds). Elsevier Academic: Amsterdam; Boston, MA, p. xiv.
- Kitagawa, R., Yokobori, S., Mazzeo, A.T., and Bullock, R. (2013). Microdialysis in the neurocritical care unit. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 24, 417–426.
- Bungay, P.M., Sumbria, R.K., and Bickel, U. (2011). Unifying the mathematical modeling of *in vivo* and *in vitro* microdialysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55, 54–63.
- Valadka, A.B., Goodman, J.C., Gopinath, S.P., Uzura, M., and Robertson, C.S. (1998). Comparison of brain tissue oxygen tension to microdialysis-based measures of cerebral ischemia in fatally head-injured humans. *J. Neurotrauma* 15, 509–519.
- Doppenberg, E.M., Reinert, M., Zauner, A., Massie, T.S., and Bullock, R. (1999). Determinants of cerebral extracellular potassium after severe human head injury. *Acta Neurochir. (Wien). Suppl.* 75, 31–34.
- Reinert, M., Khaldi, A., Zauner, A., Doppenberg, E., Choi, S., and Bullock, R. (2000). High level of extracellular potassium and its correlates after severe head injury: relationship to high intracranial pressure. *J. Neurosurg.* 93, 800–807.
- Goodman, J.C., Valadka, A.B., Gopinath, S.P., Uzura, M., Grossman, R.G., and Robertson, C.S. (1999). Simultaneous measurement of cortical potassium, calcium, and magnesium levels measured in head injured patients using microdialysis with ion chromatography. *Acta Neurochir. Suppl.* 75, 35–37.
- Nordenvall, M., Ulmsten, U., and Ungerstedt, U. (1989). Influence of progesterone on the sodium and potassium concentrations of rat uterine fluid investigated by microdialysis. *Gynecol. Obstet. Invest.* 28, 73–77.
- Grubb, B.R., Chadburn, J.L., and Boucher, R.C. (2002). *In vivo* microdialysis for determination of nasal liquid ion composition. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 282, C1423–C1431.
- Elmqvist, W.F., and Sawchuk, R.J. (1997). Application of microdialysis in pharmacokinetic studies. *Pharm. Res.* 14, 267–288.
- Waelchli, R.O., Jaworski, T., Ruddock, W.D., and Betteridge, K.J. (2000). Estimation of sodium and potassium concentrations in the uterine fluid of mares by microdialysis and ion chromatography. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 327–332.
- Benveniste, H. (1989). Brain microdialysis. *J. Neurochem.* 52, 1667–1679.
- Helmy, A., Carpenter, K.L., Menon, D.K., Pickard, J.D., and Hutchinson, P.J. (2011). The cytokine response to human traumatic brain injury: temporal profiles and evidence for cerebral parenchymal production. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 31, 658–670.
- Helmy, A., Carpenter, K.L., Skepper, J.N., Kirkpatrick, P.J., Pickard, J.D., and Hutchinson, P.J. (2009). Microdialysis of cytokines: methodological considerations, scanning electron microscopy, and determination of relative recovery. *J. Neurotrauma* 26, 549–561.
- Helmy, A., Carpenter, K.L., and Hutchinson, P.J. (2007). Microdialysis in the human brain and its potential role in the development and clinical assessment of drugs. *Curr. Med. Chem.* 14, 1525–1537.
- Stähle, L., Segersvärd, S., and Ungerstedt, U. (1991). A comparison between three methods for estimation of extracellular concentrations of exogenous and endogenous compounds by microdialysis. *J. Pharmacol. Methods* 25, 41–52.
- Li, Z., and Cui, Z. (2008). Application of microdialysis in tissue engineering monitoring. *Progr. Nat. Sci.* 18, 503–512.
- Bungay, P.M., Morrison, P.F., and Dedrick, R.L. (1990). Steady-state theory for quantitative microdialysis of solutes and water *in vivo* and *in vitro*. *Life Sci.* 46, 105–119.
- Hsiao, J.K., Ball, B.A., Morrison, P.F., Mefford, I.N., and Bungay, P.M. (1990). Effects of different semipermeable membranes on *in vitro* and *in vivo* performance of microdialysis probes. *J. Neurochem.* 54, 1449–1452.
- Torto, N. (2009). A review of microdialysis sampling systems. *Chromatographia* 70, 1305–1309.
- Bellander, B.M., Cantais, E., Enblad, P., Hutchinson, P., Nordström, C.H., Robertson, C., Sahuquillo, J., Smith, M., Stocchetti, N., Ungerstedt, U., Unterberg, A., and Olsen, N.V. (2004). Consensus meeting on microdialysis in neurointensive care. *Intensive Care Med.* 30, 2166–2169.
- Dipylon Medical. (2011). CMA 71 High Cut-Off Brain Microdialysis Catheter. Dipylon Medical: Solna, Sweden.
- Reiber, H., Thompson, E.J., Grimsley, G., Bernardi, G., Adam, P., Monteiro de Almeida, S., Fredman, P., Keir, G., Lammers, M., Liblau, R., Menna-Barreto, M., Sa, M.J., Seres, E., Sindic, C.J., Teelken, A., Trendelenburg, C., Trojano, M.J., van Antwerpen, M.P., and Verbeek, M.M. (2003). Quality assurance for cerebrospinal fluid protein analysis: international consensus by an Internet-based group discussion. *Clin. Chem. Lab. Med.* 41, 331–337.
- Seehusen, D.A., Reeves, M.M., and Fomin, D.A. (2003). Cerebrospinal fluid analysis. *Am. Fam. Physician* 68, 1103–1108.
- Poca, M.A., Sahuquillo, J., Vilalta, A., de los Rios, J., Robles, A., and Exposito, L. (2006). Percutaneous implantation of cerebral microdialysis catheters by twist-drill craniostomy in neurocritical patients:

- description of the technique and results of a feasibility study in 97 patients. *J. Neurotrauma* 23, 1510–1517.
26. R Core Team. (2013). R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria.
 27. RStudio (2013). RStudio: integrated development environment for R (version 0.97.551). RStudio: Boston, MA.
 28. Fox, J., and Weisberg, S. (2011). *An R Companion to Applied Regression*. Sage: Thousand Oaks, CA.
 29. Horn, P.S., and Pesce, A.J. (2003). Reference intervals: an update. *Clin. Chim. Acta* 334, 5–23.
 30. Horn, P.S., Pesce, A.J., and Copeland, B.E. (1998). A robust approach to reference interval estimation and evaluation. *Clin. Chem.* 44, 622–631.
 31. Horn, P.S., Pesce, A.J., and Copeland, B.E. (1999). Reference interval computation using robust vs parametric and nonparametric analyses. *Clin. Chem.* 45, 2284–2285.
 32. Somjen, G.G. (2004). *Ions in the Brain: Normal Function, Seizures, and Stroke*. Oxford University Press: Oxford, UK; New York.
 33. Mori, K., Miyazaki, M., Iwase, H., and Maeda, M. (2002). Temporal profile of changes in brain tissue extracellular space and extracellular ion (Na(+), K(+)) concentrations after cerebral ischemia and the effects of mild cerebral hypothermia. *J. Neurotrauma* 19, 1261–1270.
 34. Hutchinson, P.J., Oconnell, M.T., AlRawi, P.G., Maskell, L.B., KettWhite, R., Gupta, A.K., Richards, H.K., Hutchinson, D.B., Kirkpatrick, P.J., and Pickard, J.D. (2000). Clinical cerebral microdialysis: a methodological study. *J. Neurosurg.* 93, 37–43.
 35. De Los Rios, J.A., Sahuquillo, J., Merino, M.A., Poca, M.A., and Exposito, L. (2009). High resolution microdialysis. Methodological issues and application to the study of inflammatory brain response. *Neurocirugía (Astur)* 20, 433–447.
 36. Landolt, H., and Langemann, H. (1996). Cerebral microdialysis as a diagnostic tool in acute brain injury. *Eur. J. Anaesthesiol.* 13, 269–278.
 37. Simard, J.M., Kent, T.A., Chen, M., Tarasov, K.V., and Gerzanich, V. (2007). Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol.* 6, 258–268.
 38. Simard, J.M., Tsybalyuk, N., Tsybalyuk, O., Ivanova, S., Yurovsky, V., and Gerzanich, V. (2010). Glibenclamide is superior to decompressive craniectomy in a rat model of malignant stroke. *Stroke* 41, 531–537.
 39. Katayama, Y., Becker, D.P., Tamura, T., and Hovda, D.A. (1990). Massive increases in intracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury. *J. Neurosurg.* 73, 889–900.
 40. Katayama, Y., and Kawamata, T. (2003). Edema fluid accumulation within necrotic brain tissue as a cause of the mass effect of cerebral contusion in head trauma patients. *Acta Neurochir. (Wien) Suppl.* 86, 323–327.
 41. Katayama, Y., Yoshino, A., Kano, T., Kushi, H., and Tsubokawa, T. (1994). Role of necrosis area in development of the mass effect of cerebral contusion and elevated intracranial pressure, in: *Intracranial Pressure IX*. H Nagai, K. Kamiya, and S. Ishii, S. (eds). Springer-Verlag: Tokyo, pps. 324–327.
 42. Galea, J.P., Tyrrell, P.J., Patel, H.P., Vail, A., King, A.T., and Hopkins, S.J. (2014). Pitfalls in microdialysis methodology: an in vitro analysis of temperature, pressure and catheter use. *Physiol. Meas.* 35, N21–N28.
 43. Perez-Barcena, J., Ibañez, J., Brell, M., Crespi, C., Frontera, G., Llompert-Pou, J.A., Homar, J., and Abadal, J.M. (2011). Lack of correlation among intracerebral cytokines, intracranial pressure, and brain tissue oxygenation in patients with traumatic brain injury and diffuse lesions. *Crit. Care Med.* 39, 533–540.
 44. Thomas, R. (2008). *Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners*, 2nd ed. CRC: Boca Raton, FL.

Address correspondence to:

Juan Sahuquillo, MD, PhD

Department of Neurosurgery and Neurotraumatology
and Neurosurgery Research Unit (UNINN)

Vall d'Hebron University Hospital

Universitat Autònoma de Barcelona

Paseo Vall d'Hebron 119-129

08035 Barcelona

Spain

E-mail: sahuquillo@neurotrauma.net

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Expresión del SUR1 en las contusiones cerebrales humanas

La expresión del SUR1 ha sido objetivada en muestras tisulares humanas procedentes de especímenes *post mortem* de individuos afectados de diversas patologías del SNC (infarto cerebral (Mehta *et al.*, 2013), hemorragia subaracnoidea (Tosun *et al.*, 2013) o hemorragia de matriz germinal (Simard *et al.*, 2008)). Sin embargo, hasta la publicación de nuestro trabajo (Martínez-Valverde T, ahead of print), la expresión del SUR1 en las contusiones cerebrales sólo había sido demostrada en modelos animales (Simard *et al.*, 2009b; Patel *et al.*, 2010). En nuestro estudio, se analizó la expresión del SUR1 en distintos tipos celulares (neuronas, células endoteliales, astrocitos, microglía/macrófagos y neutrófilos) en muestras de tejido procedentes de contusiones cerebrales de origen traumático. También se determinó el perfil temporal de expresión de esta proteína.

1.1 Grupo de estudio

Para este estudio, se incluyeron muestras de contusiones cerebrales intervenidas en nuestro centro entre enero de 2006 y julio de 2013 con estructura tisular y antigenicidad preservada. Bajo estos criterios, se obtuvieron 26 muestras de contusiones procedentes de una cohorte de 25 de pacientes que habían sufrido un TCE y habían requerido tratamiento quirúrgico. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado firmado por un familiar (proyecto: PR-ATR- 68/2007). Esta cohorte estaba formada por 21 hombres (84%) y 4 mujeres (16%) con edades comprendidas entre los 14 y los 75 años (mediana: 52). Las muestras se obtuvieron a distintos tiempos tras el TCE, dado que los pacientes fueron intervenidos en distintos momentos de su curso evolutivo de acuerdo con los protocolos terapéuticos de nuestro centro para el tratamiento y evacuación de este tipo de lesiones (mediana: 27 horas, mín: 5 – máx: 99). En todos los casos se calculó el volumen de la contusión y cuando existían múltiples focos contusivos el volumen final se expresó como la suma de volúmenes de las distintas lesiones (cálculo de la carga lesional). Así, para este grupo de pacientes el volumen de las contusiones intervenidas osciló entre 15 y 105 mL (mediana: 54 mL). Al ingreso, únicamente 9 pacientes tenían una puntuación igual o inferior a 8

en la ECG, siendo catalogados como TCE graves. El resto (64%), a su ingreso fueron catalogados como TCEs moderados o leves en base a su puntuación en la ECG. La **Tabla 1** muestra los datos demográficos y clínicos de los pacientes incluidos.

Tabla 1. Datos demográficos y clínicos de los pacientes con contusiones cerebrales que fueron intervenidos quirúrgicamente

Caso	Sexo	Edad	ECG ^a	Tiempo TCE-cirugía ^b	Causa del TCE	Clasificación Marshall	Volumen ^c	GOSE ^d
1	M	42	3	16	Caída	6	105	3
2	M	52	13	26	Atropello	6	90	3
3	M	55	15	25	Caída	6	89	3
4	M	43	14	20	Caída	4	15	6
5	M	31	15	63	Agresión	6	75	3
6	M	39	15	19	Agresión	6	31	5
7	M	54	15	44	Caída doméstica	6	61	7
8	M	59	3	27	Caída doméstica	6	69	3
9	M	48	3	24	Accidente laboral	4	80	3
10	F	67	14	6	Atropello	4	39	3
11	M	51	13	7	Caída	6	68	5
12	F	61	11	34	Caída doméstica	4	13	6
13	M	27	15	50	Accidente laboral	6	43	7
14	M	26	8	19	Intento de suicidio	6	95	1
15	M	57	12	53	Caída doméstica	6	37	3
16	M	54	3	12	Caída doméstica	6	45	1
17*	M	14	7	5/99 [*]	Atropello	2/5	15/55	5
18	M	46	3	30	Accidente laboral	6	98	3
19	F	75	14	76	Caída doméstica	6	48	4
20	M	63	7	96	Accidente laboral	6	36	6
21	M	39	3	14	Caída doméstica	4	36	2
22	M	68	14	23	Caída doméstica	6	34	7
23	F	68	14	32	Atropello	6	28	6
24	M	62	15	36	Caída	6	63	8
25	M	39	15	50	Caída doméstica	6	26	7

ECG: escala de coma de Glasgow, **GOSE:** escala de resultados de Glasgow ampliada, **M:** masculino, **F:** femenino, ^a: evaluado en el momento del ingreso, ^b: horas, ^c: en cc³, ^d: evaluado a los 6 meses tras la lesión, *: paciente que requirió dos cirugías. **Clasificación de Marshall:** 1: lesión difusa tipo I, 2: lesión difusa tipo II, 3: lesión difusa tipo III, 4: lesión difusa tipo IV, 5: lesión de masa evacuada, 6: lesión de masa no evacuada. **GOSE:** 1: muerto/-a, 2: estado vegetativo, 3: discapacidad grave de grado inferior, 4: discapacidad grave de grado superior, 5: discapacidad moderada de grado inferior, 6: discapacidad moderada de grado superior, 7: buena recuperación de grado inferior, 8: buena recuperación de grado superior.

1.2 Grupo control

Para constituir el grupo control, se recogieron muestras de resecciones de tejido cerebral obtenido de zonas macroscópicamente sanas, sin anomalías anatómicas visibles en las secuencias de resonancia magnética T1-T2 y de fluido de recuperación de inversión atenuada (FLAIR). Estas muestras se obtuvieron como paso previo y necesario para acceder a tumores de la base del cráneo extra-axiales o a lesiones intraventriculares, previa autorización por parte del CEIC de nuestro centro (proyecto: PR-ATR-286/2013) y en todos los casos después de la obtención del consentimiento informado. Las muestras incluidas en este estudio se recogieron entre abril de 2011 y julio de 2013. Tras el examen de los estudios histológicos para evaluar la calidad del tejido, de las 8 muestras recogidas se eliminaron 5, debido a que presentaban puntuaciones superiores a 2 para la escala de edema y/o isquemia (0: ausente, 1: leve, 2: moderado; 3: severo.), lo que no las hacía válidas para formar parte del grupo control. La **Tabla 2** resume los datos demográficos y clínicos de estos pacientes.

Tabla 2. Datos demográficos y clínicos del grupo control

Caso	Edad	Sexo	Patología primaria	Calidad del tejido	
				Edema	Isquemia
1	57	F	Meningioma esfenopetroclival	0	1
2	32	F	Schwannoma facial	0	1
3	2	M	Tumor Rabdoide	1	2

Puntuaciones de calidad del tejido (edema e isquemia): **0**: ausente, **1**: leve, **2**: moderado; **3**: severo.

1.3 Definición de la zona de estudio

Del tejido resecado en cada cirugía, se seleccionaron muestras procedentes de regiones cerebrales que mantenían una estructura anatómica conservada. Estas muestras procedían de regiones de penumbra traumática o de la interfaz de penumbra/core, según la terminología descrita por Kurland y colaboradores (Kurland *et al.*, 2012). Las áreas correspondientes a la contusión propiamente dicha (core) están formadas por tejido estructuralmente desorganizado, con áreas

hemorrágicas y/o de necrosis con un comportamiento similar al del core de los infartos cerebrales. En este tejido necrótico, Simard y colaboradores demostraron que no había expresión del SUR1 (Simard *et al.*, 2009b). Por esta razón, para nuestro estudio se excluyeron las regiones tisulares muy contundidas o necróticas, en las que no existían estructuras anatómicas reconocibles. Sin embargo, algunas de las muestras contenían pequeñas áreas hemorrágicas o necróticas (petequias). Estas áreas hemorrágico-necróticas se observaron en los estudios histológicos de 20 de los 26 especímenes analizados. La **Figura 5** muestra una de las muestras analizadas mediante una tinción de hematoxilina-eosina.

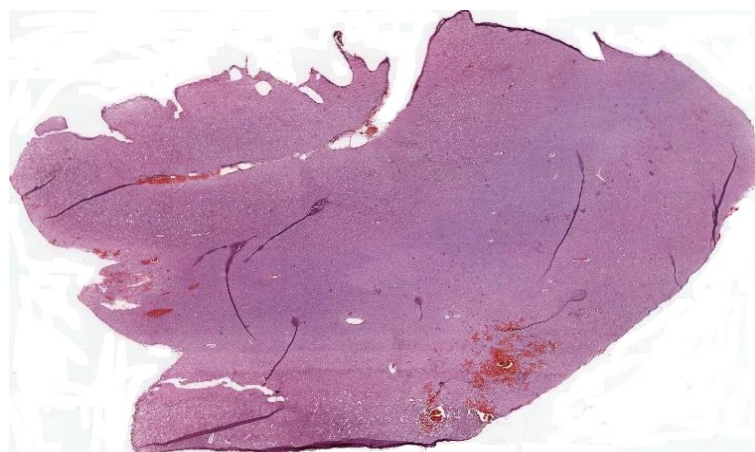


Figura 5. Tinción hematoxilina-eosina (H-E) de una muestra representativa de tejido pericontusional. Muestra correspondiente al caso 18 de la Tabla 2. Imagen a bajo aumento de la tinción de H-E de uno de los especímenes. En la zona cortical (parte inferior de la imagen) existen cambios edematosos e isquémicos, junto con pequeñas lesiones hemorrágicas aisladas (petequias). Estos cambios son típicos de áreas de tejido pericontusional (penumbra traumática).

1.4 Resultados del análisis cuantitativo

Neuronas: La expresión del SUR1 en neuronas fue evaluada en el córtex de todas las muestras obtenidas, ya fueran contusiones o tejido control. Utilizando todos los campos cuantificados (entre 4 y 9 según el tamaño de la muestra, total: 193) para el análisis, se obtuvo una expresión mediana del 71% (mín: 17 – máx: 97) en el tejido pericontusional y del 23,2% en el tejido control (mín: 11 – máx:

30,4). En el análisis comparativo, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Test de Mann-Whitney $p < 0.001$; **Figura 6A**). Para el estudio del perfil temporal, se llevó a cabo un gráfico de dispersión que relacionaba el tiempo transcurrido entre el TCE y la intervención quirúrgica (en horas) y la expresión del SUR1. La relación obtenida no fue lineal. Sin embargo, se observó que la expresión del SUR1 en neuronas aumentaba durante las primeras 24 horas tras el TCE y que posteriormente se estabilizaba (**Figura 6B**).

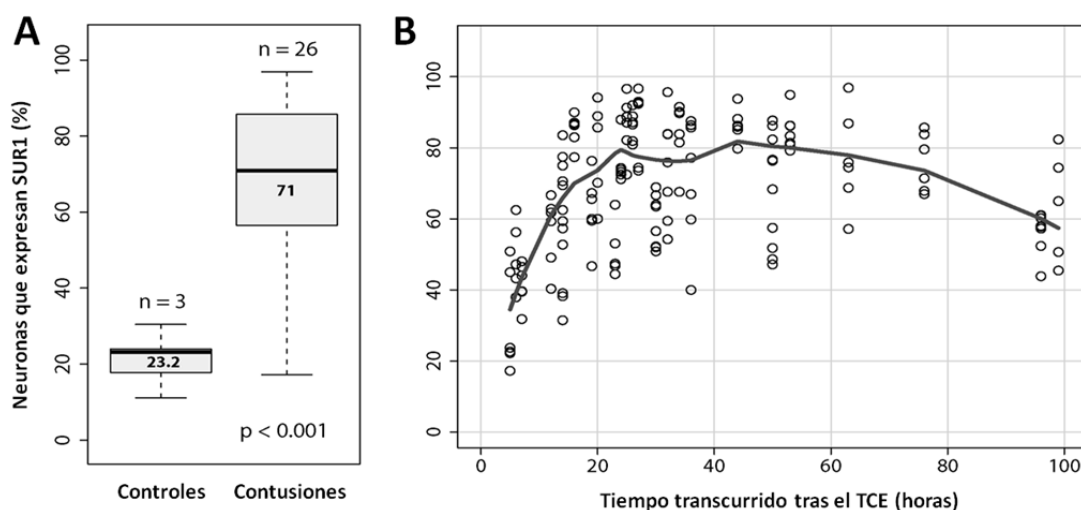


Figura 6. A: Diagrama de cajas del porcentaje de neuronas que expresaban el SUR1 en tejido control y pericontusional. **B:** Gráfica de dispersión; porcentaje de neuronas que expresaban el SUR1 en el tejido de la región pericontusional versus tiempo transcurrido, en horas, entre el TCE y la intervención quirúrgica.

Células endoteliales: El porcentaje de expresión del SUR1 en las células endoteliales fue evaluado en distintos campos de la muestra (entre 4 y 9 según el tamaño de la muestra, con un análisis total de 177 campos), incluyendo tanto sustancia blanca como sustancia gris. La mediana del porcentaje de expresión del SUR1 en este tipo celular fue del 12% en los controles (mín: 0 – máx: 38,1) y del 43% (mín: 9,1 – máx: 100) en las muestras procedentes de los pacientes con un TCE. Al igual que para las neuronas, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el análisis de los tejidos procedentes de contusiones y el grupo control (Test de Mann-Whitney, $p < 0,001$; **Figura 7A**). A pesar de que existió expresión del SUR1 en las células endoteliales de la sustancia gris y de la sustancia blanca, se observó ésta era mayor en los vasos

de la sustancia blanca que en los de la sustancia gris (**Tabla 3**). Sin embargo, en este caso no pudo establecerse ninguna relación temporal (**Figura 7B**).

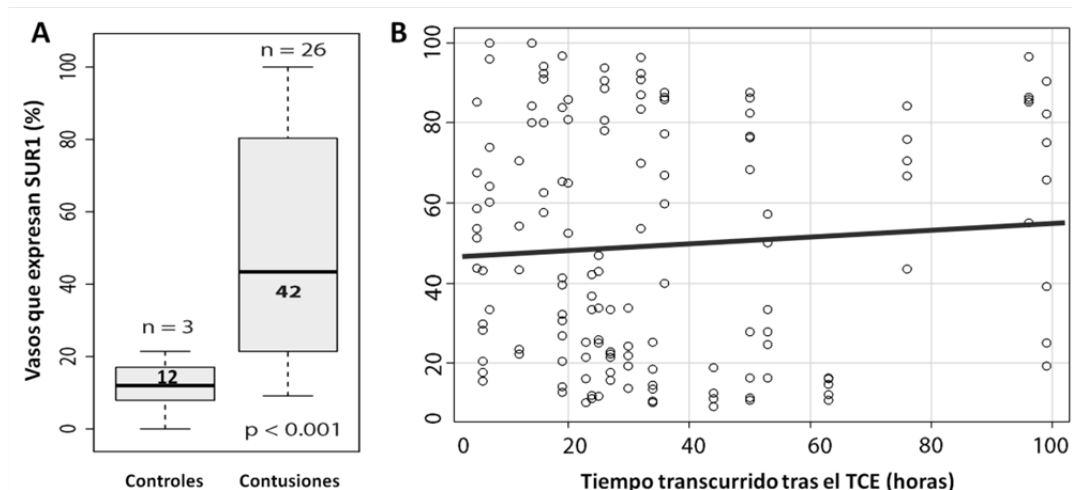


Figura 7. A: Diagrama de cajas del porcentaje de vasos sanguíneos que expresaban el SUR1 en controles y contusiones cerebrales. **B:** Gráfica de dispersión; porcentaje de vasos sanguíneos que expresaban el SUR1 en las contusiones versus tiempo en horas transcurrido entre el TCE y la intervención quirúrgica.

Tabla 3: Expresión del receptor de la sulfonilurea 1 (SUR1) en los vasos de la sustancia blanca y de la sustancia gris

Tipo de muestra	Muestra completa	Sustancia blanca	Sustancia gris
Control	15,8 (2,3 – 21,4)	17,9 (9,1 - 21,4)	12,5 (2,3 – 19,2)
Contusión	43,4 (9,1 – 100)	63,8 (12,1 – 100)	33,5 (9,1 – 93,8)

Los resultados se muestran la mediana y los valores mínimo y máximo del porcentaje de vasos SUR1 positivos respecto al total de vasos de la muestra, tanto en la sustancia blanca como en la sustancia gris.

1.5 Resultados del análisis semicuantitativo

La cantidad de astrocitos, microglía reactiva/macrófagos y neutrófilos se valoró a través de los marcajes contra la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), el cúmulo de diferenciación 68 (CD68) y la mieloperoxidasa (MPO), respectivamente, aplicando una escala semicuantitativa (**Tabla 4**). Además, se determinó cuántas de estas

células expresaban el SUR1. La **Tabla 4** muestra un resumen de los resultados obtenidos.

4. Resumen de los resultados del análisis semicuantitativo

Tipo celular	Cantidad		Expresión de SUR1	
	Controles	Contusiones	Controles	Contusiones
Astrocitos	+	++	-	++
Microglía/macrófagos	+	++	-	+
Neutrófilos	+	++	-	++

Los resultados se expresan como mediana de: A) **Cantidad de astrocitos, microglía reactiva/macrófagos o neutrófilos**, según la siguiente escala, -: ausente, +: escasa, ++: moderada, +++: numerosa. B) **Expresión del SUR1** en cada tipo celular, según la siguiente escala, -: sin expresión, +: en pocas células, ++: en bastantes células, +++: todas o casi todas las células. **SUR1**: receptor de la sulfonilurea 1

Astrocitos, células GFAP positivas: En comparación al grupo control, la cantidad de astrocitos presentes en las muestras de contusión fue más elevado (**Tabla 4**). Además, se observó que este aumento estaba directamente relacionado con el tiempo transcurrido entre el momento del TCE y la intervención quirúrgica (Sperman, Rho: 0,54; **Figura 8A**). En los astrocitos de las muestras procedentes de los controles no se observó expresión del SUR1. Mientras que los astrocitos de aproximadamente el 85% (22 de 26) de las muestras procedentes de pacientes intervenidos tras el TCE expresaban en menor o mayor medida esta proteína (**Tabla 4**). En el 50% de las muestras procedentes de pacientes traumáticos se observó una expresión del SUR1 en todos o casi todos los astrocitos de la muestra (**Tabla 4**). El gráfico de dispersión que relacionaba la expresión del SUR1 en las células GFAP positivas con el tiempo entre el TCE y la intervención quirúrgica mostró una relación temporal directa moderada entre ambas variables (Sperman; Rho: 0,54; **Figura 9A**).

Microglía reactiva/macrófagos, células CD68 positivas: De mismo modo que los astrocitos, en las muestras de tejido pericontusional se observó una mayor cantidad de microglía reactiva/macrófagos que en las muestras control. En todas las muestras procedentes del tejido control se observó ausencia o baja cantidad

de estas células, mientras que en el 84% de las muestras traumáticas la cantidad fue moderada o elevada. También se demostró una relación temporal moderada entre dicha expresión y el momento de obtención de las muestras (Sperman Rho: 0,55; **Figura 8 B**).

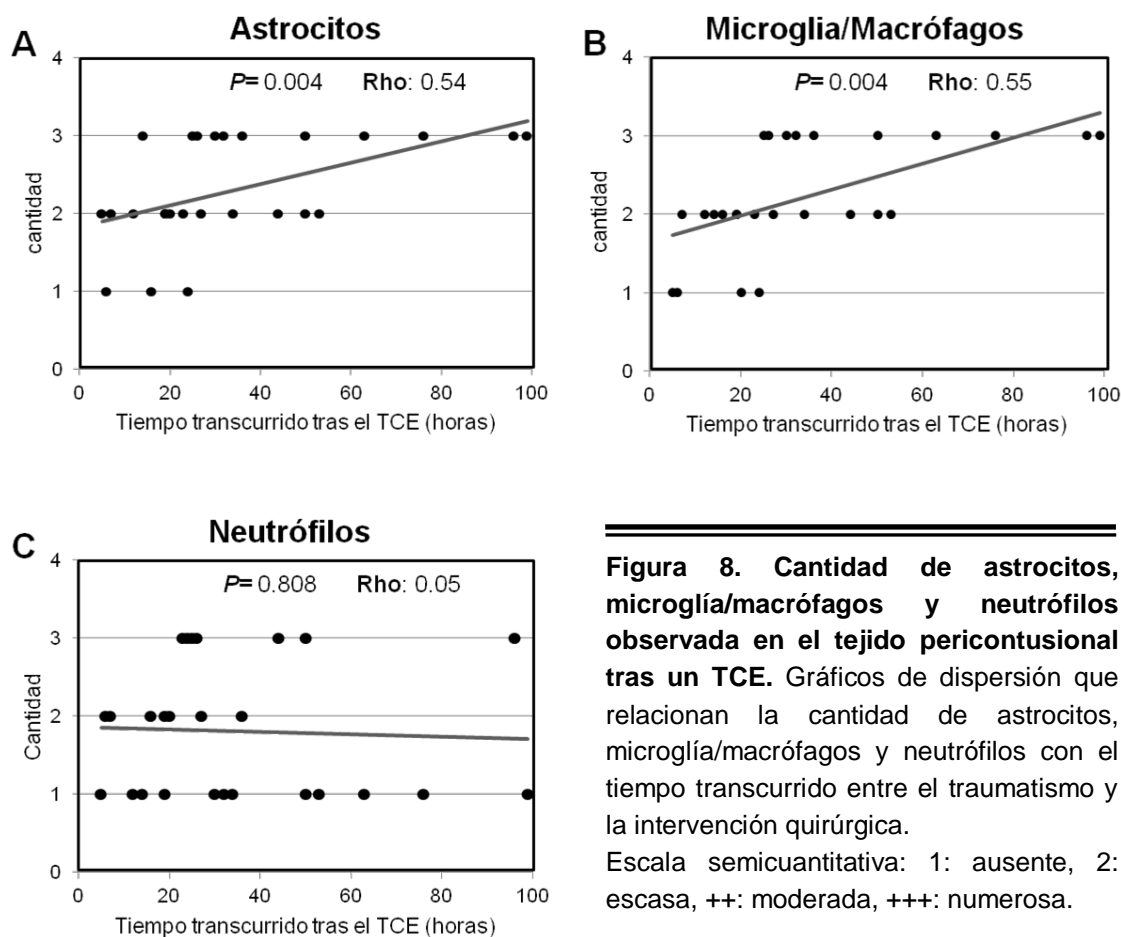


Figura 8. Cantidad de astrocitos, microglía/macrófagos y neutrófilos observada en el tejido pericontusional tras un TCE. Gráficos de dispersión que relacionan la cantidad de astrocitos, microglía/macrófagos y neutrófilos con el tiempo transcurrido entre el traumatismo y la intervención quirúrgica.

Escala semicuantitativa: 1: ausente, 2: escasa, ++: moderada, +++: numerosa.

Respecto a la expresión del SUR1 en este tipo celular, se evidenció que ninguno de los controles expresaba la proteína de estudio. En cambio, en las muestras procedentes de los pacientes que habían sufrido un TCE: 1) únicamente se detectó ausencia del SUR1 en células CD68 positivas en 3 especímenes (12%), recogidos antes de 24 horas post lesión y 2) las muestras con mayor cantidad de microglía reactiva/macrófagos procedían de pacientes intervenidos después de al menos 24 horas del traumatismo. La **Figura 9B** muestra la relación temporal observada.

Neutrófilos, células MPO positivas: Dos de las 3 muestras de tejido control presentaban neutrófilos en el parénquima cerebral. Además, en uno de los casos bastantes neutrófilos expresaban el SUR1. Todas las muestras de tejido pericontusional presentaron una cantidad variable de neutrófilos. Sin embargo, no se encontró ninguna relación temporal entre el número de neutrófilos y el tiempo de adquisición de las muestras (Sperman, Rho: 0,808; **Figura 8C**). En las muestras procedentes de los pacientes con TCE, la mayoría de los neutrófilos eran SUR1 positivos. A diferencia de lo que pasa en astrocitos y microglía reactiva/macrófagos, se observó que el número de neutrófilos SUR1 positivo tendía a decrecer con respecto al tiempo transcurrido entre el TCE y la intervención quirúrgica (Sperman, Rho: -0,49; **Figura 9C**). Además, se observó que la mayoría de neutrófilos circulantes (observados en las preparaciones dentro de los vasos) no expresaban el SUR1, mientras que aquellos que se encontraban en el parénquima cerebral sí.

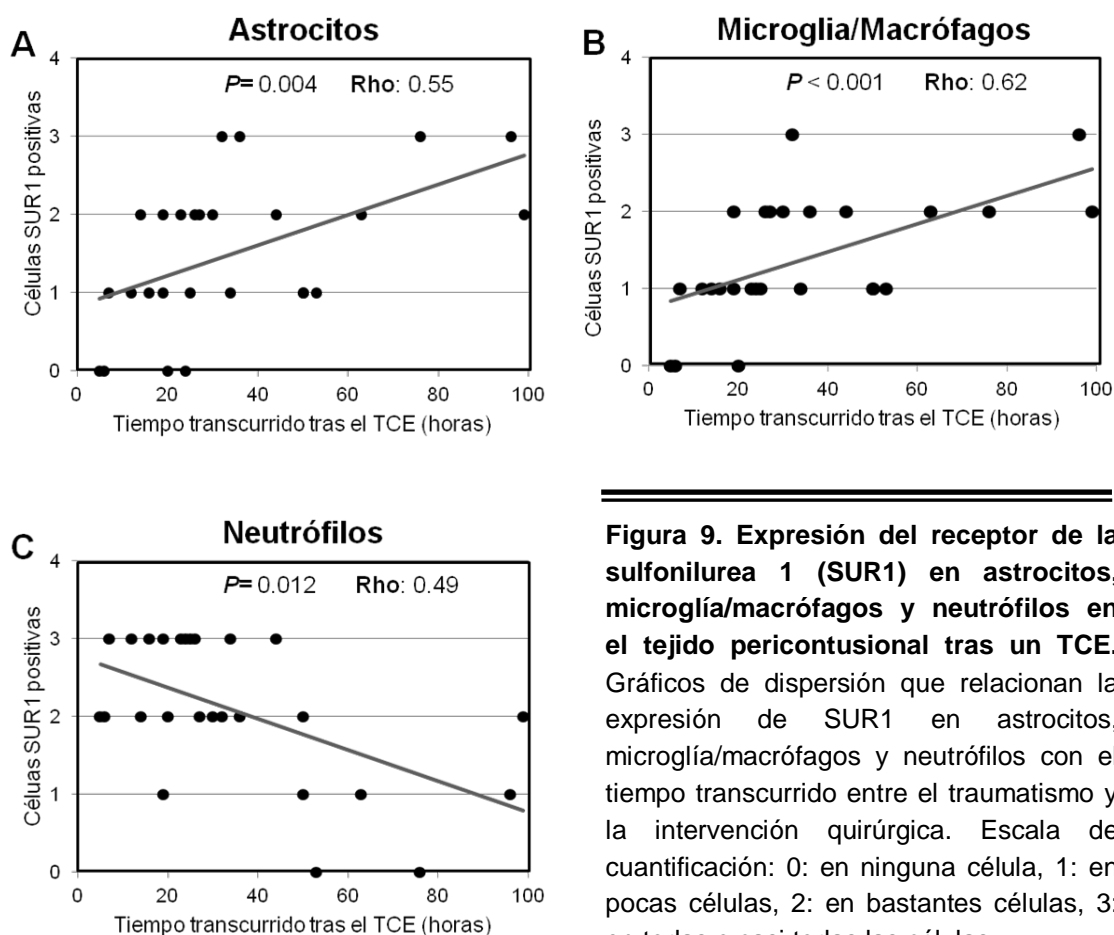


Figura 9. Expresión del receptor de la sulfonilurea 1 (SUR1) en astrocitos, microglía/macrófagos y neutrófilos en el tejido pericontusional tras un TCE. Gráficos de dispersión que relacionan la expresión de SUR1 en astrocitos, microglía/macrófagos y neutrófilos con el tiempo transcurrido entre el traumatismo y la intervención quirúrgica. Escala de cuantificación: 0: en ninguna célula, 1: en pocas células, 2: en bastantes células, 3: en todas o casi todas las células.

1.6 Discusión

El SUR1 en la formación del edema post traumático

El edema cerebral y la conversión hemorrágica comparten parte de los mecanismos moleculares para su formación y progresión, los cuales implican daños estructurales y funcionales de la BHE así como de la unidad neurovascular. Nuestro trabajo constituye el primer estudio que analiza la expresión del SUR1 en contusiones humanas. En él, se observó que esta proteína se sobreexpresaba en todos los tipos celulares estudiados, aunque de forma más importante en neuronas, astrocitos y células endoteliales. Sin embargo, su patrón de expresión fue distinto en cada tipo celular. En neuronas se observó que la expresión del SUR1 aumentaba durante las primeras 24 horas post lesión y después se estabilizaba. En la microglía reactiva/macrófagos y astrocitos la expresión del SUR1 tendía a aumentar con respecto al tiempo transcurrido entre la lesión y la intervención quirúrgica. Sin embargo, en los neutrófilos se observó una relación inversa, es decir que la expresión disminuía en las muestras extraídas a medida que aumentaba el tiempo tras el traumatismo. Finalmente, en las células endoteliales de los vasos no pudo establecerse ninguna relación temporal.

Las neuronas son las células más sensibles a cualquier tipo de daño que se produzca en el cerebro, posiblemente por este motivo son las más afectadas de modo casi independiente al tipo de lesión. En cambio, el grado de lesión de las células endoteliales de los vasos cerebrales depende de distintos factores, como son el mecanismo y la intensidad de la lesión, lo que podría explicar la ausencia de relación temporal encontrada en nuestro estudio. Estos resultados están en consonancia con los hallazgos reportados por el grupo del J.M Simard en modelos experimentales de contusión cerebral en rata (Simard *et al.*, 2009b; Patel *et al.*, 2010), en los cuales se observó una sobreexpresión del SUR1 en neuronas y células endoteliales en la zona perilesional (Simard *et al.*, 2009b) así como una relación temporal entre la expresión del SUR1 y el tiempo post lesión (Patel *et al.*, 2010). Es importante recordar que, como se indica en la **Tabla 4**, las muestras tisulares analizadas en nuestro estudio proceden de pacientes muy heterogéneos (edad, sexo, tipo de lesión, localización de la lesión), a diferencia de lo que ocurre en modelos animales.

Como se ha indicado en apartados previos de esta memoria, el canal SUR1-TRPM4 se encuentra inicialmente inactivo en el SNC, pero se activa cuando se produce una disminución en los niveles de ATP. El descenso en la concentración de ATP (fallo energético) provoca la despolarización de la célula, la formación de edema citotóxico así como, en estadios más avanzados, la muerte oncótica de la célula (Chen and Simard, 2001; Simard *et al.*, 2009b). La activación del canal SUR1-TRPM4 en las células endoteliales incrementa la permeabilidad de la BHE al paso de iones y agua. Este incremento de la permeabilidad facilita la formación del edema cerebral (citotóxico, iónico y vasogénico) y, consecuentemente, la progresión al último estadio: la conversión hemorrágica. Se ha demostrado que durante la progresión hemorrágica se recluta tejido viable desde la zona de penumbra a la zona necrótica del core de la contusión, incrementado el volumen de tejido dañado de forma irreversible. Por lo tanto, la sobreexpresión del SUR1, tanto en modelos experimentales de contusiones cerebrales como en nuestro estudio, parece indicar que esta proteína tiene un papel importante en la fisiopatología de las contusiones post traumáticas. Además, como se ha demostrado en modelos experimentales de contusiones cerebrales, el bloqueo del SUR1 mediante glibenclamida o nucleótidos antisentido reduce en gran medida la conversión hemorrágica y el volumen final de la contusión y mejora las funciones neurológicas de los animales tratados (Simard *et al.*, 2009b; Patel *et al.*, 2010). Estos hallazgos abren nuevas expectativas de tratamiento para patologías en las que en el momento actual no existen medidas terapéuticas específicas ni efectivas.

La respuesta neuroinflamatoria tras el TCE

Nuestro estudio muestra que tras un TCE se produce una respuesta inflamatoria en el cerebro, caracterizada por el aumento de la cantidad de microglía reactiva/macrófagos y de astrocitos y la aparición de neutrófilos en el parénquima cerebral. En contraposición a los conceptos clásicos, hoy sabemos que la neuroinflamación es una respuesta común tras el daño cerebral agudo (Povlishock and Katz, 2005). Otros autores ya habían objetivado que en las lesiones traumáticas esta respuesta tiene lugar rápidamente y que los neutrófilos, linfocitos y monocitos circulantes pasan al tejido dañado, produciéndose la activación de la microglía local y de los astrocitos (Smith, 2013).

En el SNC, la microglía constituye el 15% de la población glial (Mittelbronn *et al.*, 2001), actúa a modo de macrófagos residentes y su acción es clave en la respuesta inmune (Thomas, 1992; Kreutzberg, 1996). Estas células responden rápidamente a las lesiones que tienen lugar después de un infarto cerebral o de un TCE (Kim *et al.*, 2015). Además, la microglía está implicada en la fagocitosis de restos celulares y sustancias tóxicas, preservando así la homeostasis cerebral (Hanisch and Kettenmann, 2007). En cambio, en condiciones normales, existe una baja actividad de la microglía en el SNC, lo que explicaría los bajos niveles de estas células detectados en las muestras control.

Después de un TCE o de un infarto cerebral, la activación microglial y la neuroinflamación han sido implicadas como mediadores importantes del daño secundario por la liberación de citocinas proinflamatorias, radicales libres y proteasas, tales como MMP-9 (Kim *et al.*, 2015), así como por su papel en el reclutamiento de células inmunes circulantes, procesos que agravan la lesión inicial (Kim *et al.*, 2015). En cambio, el papel de los astrocitos en las lesiones neurotraumáticas depende del mecanismo de la lesión, del grado o severidad de la lesión y así como de la localización de la misma (Burda *et al.*, 2015). En el caso de los TCEs graves y/o lesiones focales, se ha observado que tanto la microglía reactiva y como los astrocitos reactivos migran rápidamente al tejido lesionado (Burda *et al.*, 2015). En respuesta al daño focal o a procesos de inflamación, los astrocitos reactivos forman una barrera entre el tejido dañado y el tejido sano (Burda and Sofroniew, 2014). Esto podría explicar porqué en nuestro estudio en tejido pericontusional se detectaron niveles elevados de microglía y astrocitos, así como un aumento de los mismos en función del tiempo transcurrido tras la lesión (Davalos *et al.*, 2005). Su activación y migración es temprana y aunque inicialmente puede empeorar el daño cerebral secundario, la acción de estas células es esencial para la recuperación y reparación tisular (Lalancette-Hebert *et al.*, 2007; Burda *et al.*, 2015). En modelos de animales transgénicos, en los que se ha alterado la expresión de los astrocitos o la microglía, se ha demostrado que: el daño cerebral se intensifica, aumenta el número de células en apoptosis y se prolonga el efecto de la respuesta inflamatoria (Bush *et al.*, 1999; Lalancette-Hebert *et al.*, 2007). En relación al perfil temporal de la respuesta inflamatoria en el cerebro, al igual que en nuestro estudio, Gentleman y colaboradores, en su estudio con especímenes *post mortem* de tejido humano obtenido después de un

periodo post lesión de entre 11 y 334 horas, demostraron que la cantidad de marcaje para CD68 aumentaba en función del tiempo de supervivencia (Gentleman *et al.*, 2004). Además, diversos modelos animales de TCE han demostrado una acumulación de neutrófilos en el parénquima cerebral durante las primeras 24 horas después del traumatismo, evaluado mediante el marcaje de MPO (Clark *et al.*, 1994). Estos hallazgos también se confirman en nuestra serie de tejido pericontusional humano, lo que indica que la BHE está alterada permitiendo el paso de células del torrente sanguíneo al parénquima cerebral.

Grupo sham en muestras humanas

En nuestro estudio en las muestras de controles también se detectaron signos de inflamación (presencia de microglía reactiva/macrófagos y neutrófilos), aunque en menor medida que en las de pacientes que habían presentado un TCE. Esto podría deberse al proceso de extracción de las muestras, ya que incluso bajo microcirugía meticulosa la manipulación del tejido puede añadir algún grado de daño impredecible y cierto grado de reacción inflamatoria en el tejido. Este hecho ha sido también indicado por otros autores (Cole *et al.*, 2011). Cole y colaboradores demostraron, en un modelo animal, que la craneotomía por sí misma (incluso sin apertura de la duramadre) inducía la activación de una cascada proinflamatoria en tejido cerebral adyacente a la craniotomía (Cole *et al.*, 2011). En muestras humanas, esto ha sido detectado en otros estudios de nuestra unidad (resultados no publicados), en los que se observó que el cerebro macroscópicamente sano (sin anomalías en las secuencias de RM, T1, T2 y FLAIR) era extremadamente vulnerable a los daños mecánicos producidos por las maniobras neuroquirúrgicas de resección. Este estudio reveló que los procedimientos neuroquirúrgicos generan fenómenos hipóxicos y edema cerebral no controlados durante la cirugía, demostrados por la detección de neuronas oscuras o *dark neurons* en los tejidos estudiados. Los hallazgos patológicos en los tejidos “control” también podrían deberse a la presencia de lesiones no detectables mediante RM o al tiempo de transporte. Por todo lo anterior, y para minimizar el impacto de la manipulación, las muestras del grupo control con un grado significativo de lesión (muestras con puntuaciones de edema y/o isquemia superiores a 2) fueron excluidas del estudio.

Debido a las consideraciones anteriores, a pesar de esta “preselección”, las muestras del grupo control utilizadas de nuestro trabajo no pueden considerarse como muestras de tejido totalmente sano, ya que para su consecución fueron sometidas a un procedimiento quirúrgico. Por ello, fueron tratadas del mismo modo que los controles *sham* de los modelos animales (individuos sin lesión a los que se les práctica el procedimiento quirúrgico).

A pesar de que el SUR1 no se expresa constitutivamente en las células endoteliales de grupos control en modelos animales, Mehta y colaboradores también observaron expresión del SUR1 en algunos capilares de 4 de los 6 “controles normales” utilizados en su trabajo (especímenes *post mortem* sin patologías neurológicas) (Mehta *et al.*, 2013). Además, Patel y colaboradores en su estudio en un modelo experimental de TCE en rata, reportaron que el SUR1 se expresaba en el grupo de animales *sham* (aquellos a los que se practicó la craniectomía pero no el impacto cortical) (Patel *et al.*, 2010), confirmando que cualquier intervención a nivel craneal puede inducir la expresión del SUR1 en el cerebro de los mamíferos. Por lo tanto, el grado de expresión del SUR1 detectada en nuestro grupo control (equivalente al grupo *sham* en modelos animales) está dentro de los límites esperables en este tipo de muestras.

Las muestras de los pacientes que habían sufrido un TCE fueron extraídas bajo condiciones similares a las del grupo control, por lo que una expresión basal del SUR1 (detectada en especímenes a pocas horas tras el TCE) puede ser atribuida al propio procedimiento quirúrgico, pero el incremento sucesivo es significativo para todo el conjunto de muestras estudiadas en los distintos tipos celulares y, por lo tanto, la sobreexpresión del SUR1 debe ser atribuible a la patología producida por el propio TCE.

SUR1 e inflamación

Nuestros hallazgos indican que el SUR1 puede estar involucrado en procesos de inflamación tras el TCE, explicando así su expresión en células responsables de la respuesta inflamatoria (astrocitos, microglía reactiva y neutrófilos). Simard y colaboradores demostraron en un modelo animal de hemorragia subaracnoidea esta relación (Simard *et al.*, 2009a). En este trabajo demostraron que el TNF- α , una citocina proinflamatoria, era responsable de la activación de la transcripción del SUR1 a través de NF- κ B en esta patología. Además, concluyeron que el

tratamiento con glibenclamida reducía tanto la expresión del SUR1 como la respuesta infamatoria y la astrogliosis asociada (Simard *et al.*, 2009a).

En las muestras de tejido pericontusional de nuestro estudio se ha observado expresión del SUR1 únicamente en los neutrófilos localizados en el parénquima cerebral y no en los circulantes (células visibles en el interior de los vasos). El SUR1 no se expresa de forma constitutiva en neutrófilos y su expresión está regulada por diversos factores de transcripción (Sp1, HIF1 y NF- κ B), los cuales se activan y/o sobreexpresan en el tejido dañado tras un proceso de isquemia, inflamación o un TCE (Simard *et al.*, 2009a; Patel *et al.*, 2010; Woo *et al.*, 2012). El mecanismo molecular responsable de la expresión diferencial está siendo estudiado, pero nuestra hipótesis es que los neutrófilos circulantes no expresan el SUR1 debido a que no han estado en contacto con los factores de transcripción que lo activan, al contrario de lo que ocurre en aquellos que se encuentran en el parénquima dañado. Esta misma hipótesis sería aplicable al hecho de haber observado neutrófilos SUR1 positivos en una de las muestras de tejido control.

SUR1 como nueva diana terapéutica para las contusiones postraumáticas

En el momento actual, el tratamiento de los pacientes que sufren un TCE se limita al uso de medidas que intentan evitar o pretenden descender la PIC, sin que exista un tratamiento específico para las distintas lesiones cerebrales que pueden generarse después de un traumatismo. Las contusiones cerebrales son lesiones focales evolutivas que ocupan un espacio y ejercen efecto de masa, estando indicada su evacuación cuando son volumétricamente relevantes (habitualmente > 25 mL), causan desviación de la línea media o aumentan la PIC. Sin embargo, no existe en el momento actual ningún fármaco que administrado de forma precoz consiga controlar el crecimiento de estas lesiones y reducir los fenómenos de edema que generan. El hecho de que el SUR1 este sobreexpresado en el tejido perilesional abre nuevas oportunidades para modular la respuesta secundaria de este tipo de lesiones. En modelos animales se ha demostrado que la administración de bajas dosis de antagonistas de la sulfonilurea, como la glibenclamida, reduce la expresión del SUR1, así como sus efectos en la formación de le edema cerebral y la conversión hemorrágica, al tiempo limita los procesos inflamatorios y que mejora el comportamiento neurológico de los

animales tratados (Simard *et al.*, 2009a; Simard *et al.*, 2009b; Patel *et al.*, 2010). Además, en un estudio piloto en pacientes que habían sufrido un infarto cerebral se observó que la administración de gliburida endovenosa (un antidiabético que también actúa como un antagonista de la sulfonilurea) reducía el contenido acuoso del cerebro dañado y los niveles plasmáticos de MMP-9 (Kimberly *et al.*, 2014). Así mismo se demostró que los pacientes tratados tuvieron un mejor resultado neurológico que los del grupo control (Sheth *et al.*, 2014b) y que la dosis aplicada no afectaba de forma significativa los niveles de glucemia de los pacientes tratados (Sheth *et al.*, 2014a). Estos hallazgos abren nuevas perspectivas en el tratamiento de las contusiones cerebrales y de las lesiones que generan isquemia y la formación de edema cerebral.

Limitaciones del estudio

La limitación más importante de este trabajo es el tamaño muestral, junto con la heterogeneidad de las muestras estudiadas. Por ello, y debido a la heterogeneidad de los resultados, ha sido imposible establecer relaciones estadísticamente significativas entre la expresión del SUR1 y la puntuación obtenida en el GOSE o el volumen de la contusión. Esta heterogeneidad puede ser resultado de distintos factores como presencia de posibles patologías concomitantes (7 de los 25 [28%] pacientes tenían más de 60 años), las distintas características de las regiones cerebrales estudiadas y la existencia de otras lesiones extracraneales asociadas al traumatismo. Es importante recordar que, a diferencia de lo que ocurre en modelos animales (donde se crea siempre el mismo tipo de lesión cerebral) muchos de los pacientes intervenidos neuroquirúrgicamente presentan un politraumatismo, con las potenciales repercusiones que las lesiones sistémicas puedan generar a nivel cerebral. Además, en nuestro centro la mayoría de las contusiones cerebrales se operan de forma precoz (dentro de las primeras 48 horas del traumatismo). Por ello, es difícil obtener especímenes humanos después de 72 horas del traumatismo. Este hecho limita interpretación del perfil temporal del SUR1 en las contusiones cerebrales humanas.

La última limitación que cabe destacar es el tipo de controles utilizados. Sin embargo, y a pesar de las controversias que puedan existir, a nuestro juicio los controles seleccionados son las muestras más similares a las contusiones

cerebrales que podrían haberse utilizado, puesto que la alternativa es el uso de muestras *post mortem*, con limitaciones inherentes que también puede influir en los resultados obtenidos (Stan *et al.*, 2006).

2. Modelo *in vitro* para estimar la concentración iónica del espacio extracelular cerebral

Para utilizar la MD como herramienta en el estudio del perfil iónico del EEC cerebral en un entorno clínico, es necesario conocer las RR de los iones de interés. A pesar de que esta información había sido calculada en modelos animales (Nordenvall *et al.*, 1989) o en humanos utilizando LPs que no contenían los iones de estudio (Valadka *et al.*, 1998; Doppenberg *et al.*, 1999; Goodman *et al.*, 1999; Reinert *et al.*, 2000), nuestro trabajo ha sido el primero en determinar la RR del Na⁺, K⁺ y Cl⁻ utilizando catéteres de MD de 100 KDa y reproduciendo las características rutinarias de la MD aplicada al cerebro humano (Martínez-Valverde *et al.*, 2015).

2.1 Diseño experimental

El objetivo del modelo experimental era diseñar un sistema *in vitro* que simulase las condiciones en las que se encuentra *in vivo* un catéter cuando se implanta en el parénquima cerebral. Para ello, nuestro grupo diseñó un modelo *in vitro* que reproducía distintos escenarios iónicos del EEC cerebral, pero que permitía el control de todos los factores externos (concentración iónica conocida en la solución que emulaba el EEC, temperatura, presión hidrostática, etc.). Para estos experimentos se utilizó el mismo catéter de MD CMA71 (M Dialysis AB) que se usa de forma rutinaria en nuestro centro durante la monitorización del metabolismo cerebral en pacientes que han sufrido un TCE o un infarto cerebral maligno.

La primera fase para la obtención del modelo experimental incluyó los siguientes pasos: 1) equilibrar los volúmenes de entrada y salida, para asegurar que el sistema no perdía fluido hacia la solución problema o matriz o que no se producían fenómenos de ultrafiltración y 2) verificar que tanto la presión hidrostática como la osmótica se encontraban en equilibrio entre ambos lados de

la membrana. Para ello, se utilizó el mismo LP isotónico comercial (CNS, P000151; M Dialysis AB), tanto en el perfundido como en la matriz. De acuerdo con la ecuación de Starling, la presión hidrostática interna del catéter y la presión hidrostática de la matriz se encuentran en equilibrio cuando no hay ningún movimiento de fluido neto a través de la membrana de MD. En este contexto la recuperación del fluido es aproximadamente del 100% (18 μ L/hora a una velocidad de perfusión de 0,3 μ L/min). Experimentalmente, se determinó que la presión hidrostática que genera la bomba en la punta del catéter es aproximadamente de 1 mmHg. En cambio, la presión hidrostática que la matriz ejerce sobre el lado externo de la membrana MD depende de la densidad del fluido, la constante gravitacional y la altura vertical de la columna de la matriz. Después de varios ajustes en el diseño experimental, se observó que cuando el punto medio de la membrana de 10 mm se colocaba a 13,6 mm bajo la superficie de la solución problema (H1 en la **Figura 10**), no se producían pérdidas de fluido en el sistema. Por lo tanto, para llevar a cabo los experimentos de RR del Na⁺, K⁺ y Cl⁻ el catéter de MD CMA-71 fue introducido verticalmente en los tubos que contenían las distintas matrices a testar, dejando la punta de la membrana 18,6 mm por debajo de la superficie de la solución (**Figura 10**), mientras que la parte superior del microvial se alineaba con el punto medio de la membrana (H2 = 0 mm).

Este diseño permitía recuperar el volumen esperado sin la necesidad de añadir ningún coloide al LP, como ya había demostrado previamente nuestro grupo con un diseño similar (De Los Rios *et al.*, 2009), cuando la matriz y el LP eran isotónicos. Sin embargo, dado que el objetivo era estudiar la RR de los iones en diferentes matrices (hiper e hipotónicas), fue necesario aumentar la presión osmótica en el LP para facilitar una recuperación de fluido constante. Así, tras testar distintas concentraciones de albúmina, utilizadas por otros investigadores (Trickler and Miller, 2003; Helmy *et al.*, 2009), se estableció que la adición de albúmina al 3% era la que permitía una recuperación volumétrica más cercana a la esperada en todas las condiciones experimentales.

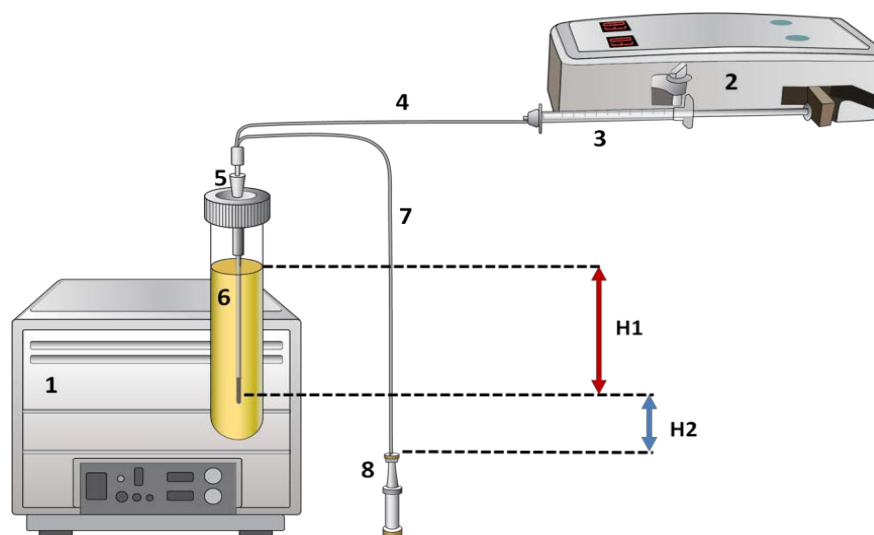


Figura 10. Esquema del diseño general para los experimentos in vitro de recuperación relativa. Los tamaños han sido modificados con fines didácticos, y no son proporcionales a la realidad. **1:** baño seco o húmedo, donde se coloca el tubo que contiene la matriz para mantener constante la temperatura del experimento. Para este experimento en particular se utilizó un baño seco sin agitación. **2:** bomba CMA 402 de precisión; **3:** jeringa; **4:** tubo de entrada del catéter CMA-71, **5:** catéter de seguridad 14G IV; **6:** solución problema o matriz; **7:** tubo de salida del catéter de microdiálisis (MD), **8:** microvial. **H1:** distancia entre la superficie de la solución y el punto medio de la membrana de diálisis; **H2:** distancia desde el punto medio de la membrana MD a la parte superior del microvial. En el diseño real, y para este experimento en particular, la jeringa (3) y la punta del microvial (8) se colocaron en línea con el punto medio de la membrana de MD de 10 mm, por lo que H2 era igual a 0 mm.

2.2 Estimación de la recuperación relativa de los iones de estudio

Los experimentos realizados generaron 95 pares de muestras (matriz-microdializado) para el Na^+ y 94 para el K^+ y el Cl^- (71 y 70 pares de muestras respectivamente, se obtuvieron en los experimentos llevados a cabo a temperatura ambiente; los 24 pares de muestras restantes se obtuvieron de los experimentos realizados a 37°C). Para el cálculo de la concentración real de los distintos iones en la solución problema o matriz se aplicaron 2 métodos. En primer lugar se calculó la RR para cada ion mediante la ecuación descrita por Bungay (Bungay *et al.*, 1990), aplicando la expresión en la que la molécula de interés se encuentra también en el LP ($\text{RR} = [\text{C}_{\text{md}} - \text{C}_{\text{in}} / \text{C}_{\text{matriz}} - \text{C}_{\text{in}}] \times 100$, donde C_{md} , C_{in} y C_{matriz} corresponde con la concentración de la molécula de estudio en el microdializado, el LP y la solución problema o matriz, respectivamente). En el

segundo lugar se aplicó un modelo de regresión lineal simple, donde la variable independiente fue la C_{md} , y el resultado (variable dependiente) fue la C_{matriz} . Para este modelo se presupuso que ambas variables estaban relacionadas de forma lineal, de modo que la concentración detectada en C_{md} podía ser utilizada como un estimador fiable de la verdadera concentración iónica en la solución problema (C_{matriz}).

2.2.1 Recuperación relativa mediante la ecuación de Bungay

La mediana de la RR obtenida a partir de la ecuación de Bungay se encontraba entre 103 y 123%, dependiendo del ion. Sin embargo, los valores mínimos y máximos fueron muy extremos (**Tabla 5**).

Tabla 5. Recuperación relativa (RR) obtenida tras la aplicación del método de Bungay

Ion	Recuperación relativa	Mín - Máx
Na ⁺	123	-400; 1100
K ⁺	103	-700; 200
Cl ⁻	110	-212; 412

La tabla muestra la mediana y los valores mínimos (mín) y máximos (máx) de la RR obtenida para cada ion.

La ecuación de Bungay resultó ser no aplicable cuando la concentración del analito de estudio era mayor en el LP que en la solución problema o matriz, como ocurre cuando se testan matrices hipotónicas. Además, durante la aplicación de este modelo se detectaron otros problemas:

1. La RR no pudo ser calculada en 3 casos en los que la concentración del ion de interés era la misma en el LP que en la matriz.
2. Se obtuvieron valores de RR negativos, fenómeno de compleja interpretación puesto que en todos los casos la concentración iónica en el microdializado era superior a la detectada en la matriz.
3. En 5 pares de lecturas (matriz-microdializado), en las que la concentración de analito en el LP y en microdializado eran iguales, el valor de RR obtenido fue de cero. Por todo ello, se consideró que este método

resultaba poco fiable para el cálculo de la concentración real de iones *in vivo* mediante MD cuando el LP utilizado contiene iones.

Estos resultados motivaron la búsqueda de un método alternativo, cuyos resultados obtenidos se detallan a continuación.

2.2.2 Recuperación relativa mediante un modelo de regresión lineal

El modelo lineal fue aplicable para todos los iones. Los coeficientes de determinación obtenidos fueron de 0,95 para el Na^+ , 0,99 para el K^+ y 0,95 para Cl^- . A la vista de estos resultados es posible afirmar que la concentración iónica *in vitro* podría ser estimada con fiabilidad, a cualquiera de las 2 temperaturas testadas, a partir de la concentración iónica determinada en el microdializado.

La **Figura 11** muestra los gráficos de dispersión y las ecuaciones obtenidas mediante este método para cada ion.

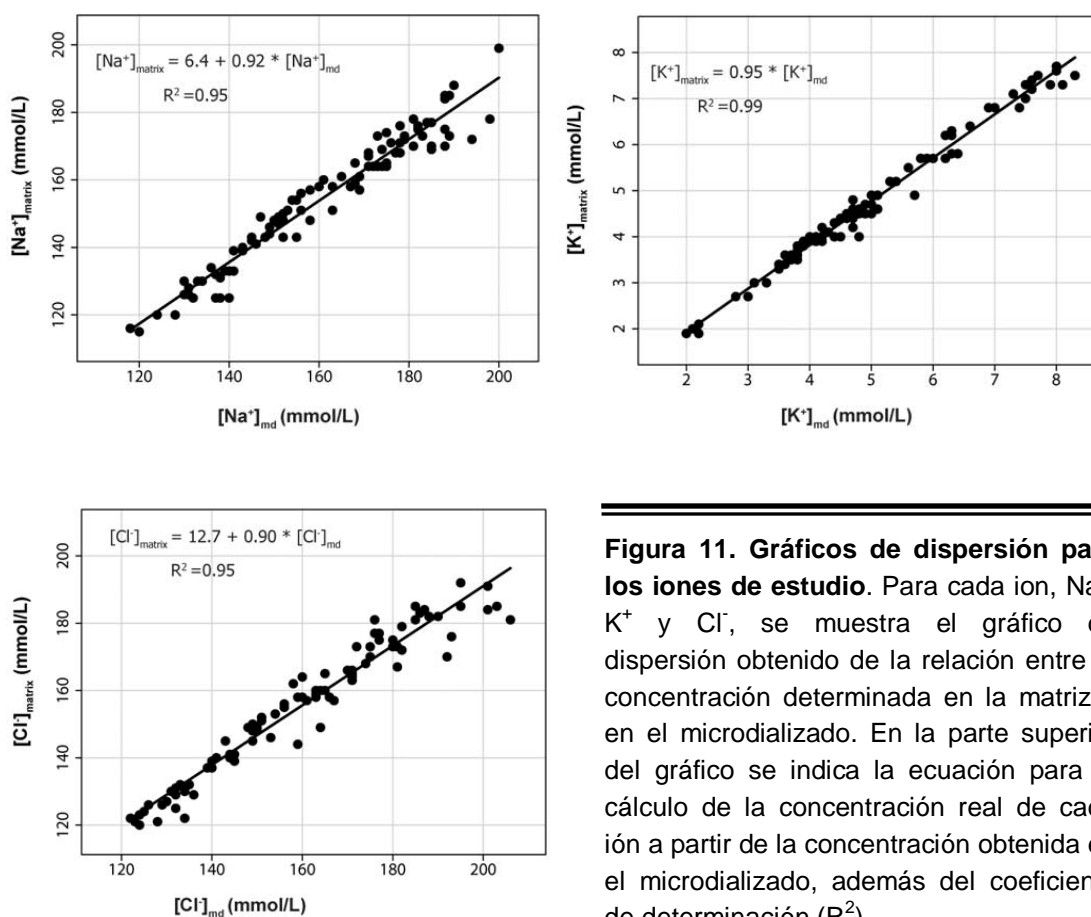


Figura 11. Gráficos de dispersión para los iones de estudio. Para cada ion, Na^+ , K^+ y Cl^- , se muestra el gráfico de dispersión obtenido de la relación entre la concentración determinada en la matriz y en el microdializado. En la parte superior del gráfico se indica la ecuación para el cálculo de la concentración real de cada ion a partir de la concentración obtenida en el microdializado, además del coeficiente de determinación (R^2).

2.3 Discusión

Modelo in vitro con membranas CMA71

Diversos autores han llevado a cabo experimentos *in vitro* para el cálculo de la RR de diferentes moléculas (Helmy *et al.*, 2009; Hillered *et al.*, 2014). En este tipo de experimentos, la concentración iónica en la matriz y el LP es la misma y, por lo tanto, el control de las presiones hidrostática y oncótica es sencillo, dado que ambas se mantienen constantes a lo largo del experimento. En cambio, en nuestro trabajo el objetivo era estudiar la RR en matrices con distintas concentraciones iónicas, de modo que las presiones hidrostáticas y osmóticas variaban a cada cambio de matriz. Por ello, fue necesario diseñar un modelo *in vitro* que nos permitiese un control más preciso de las presiones.

Teóricamente, la difusión de moléculas de muy bajo PM, como son los iones, a través de los poros de los catéteres de alta resolución (CMA71) debe ser rápida, por lo que su RR también debería ser elevada, estando únicamente condicionada por la velocidad de infusión y la posible pérdida de fluido a través de la membrana. En nuestro estudio, la posible pérdida de fluido estaba descartada gracias a la adición de albúmina como coloide en el LP y a la compensación de presiones llevada a cabo durante la obtención del modelo *in vitro*. La albúmina facilita el equilibrio de las presiones osmóticas a ambos lados de la membrana, evitando la pérdida de fluido y haciendo que la recuperación volumétrica sea estable (Trickler and Miller, 2003; Helmy *et al.*, 2009).

Cálculo de la recuperación relativa

Nuestro estudio demuestra que el método de Bungay no es aplicable para el cálculo de las concentraciones iónicas *in vitro* o *in vivo*, cuando el LP contiene los iones de interés, dado que: 1) se obtienen valores muy extremos cuando la concentración de $C_{in} > C_{matriz}$, siendo en algunos casos incluso negativos, a pesar de que en todos los casos la concentración detectada en el microdializado es superior a la obtenida en la matriz, 2) no es matemáticamente posible calcular la RR cuando $C_{in} = C_{matriz}$ y 3) la RR obtenida cuando cuando $C_{in} = C_{md}$ es cero. Algunos de estos problemas ya habían sido objetivados por Nordenvall y colaboradores en su estudio en fluido uterino en ratas (Nordenvall *et al.*, 1989).

Este grupo utilizó el método de “recuperación relativa inversa” para calcular la RR de Na^+ y K^+ , cuando la concentración en el LP era superior que en la matriz (Nordenvall *et al.*, 1989). Mediante este método obtuvieron una RR del 75% para el Na^+ y del 96% para el K^+ , utilizando una velocidad de perfusión de 0,5 $\mu\text{L}/\text{min}$. Dado que no es posible conocer *a priori* la concentración real de los iones en el tejido cerebral humano, este método no es aplicable en un entorno clínico. La alternativa de utilizar un LP sin las moléculas de estudio pasaría por utilizar agua desionizada, que no puede ser administrada en humanos. Además de Nordenvall y colaboradores, la RR de Na^+ y K^+ había sido estimada por otros grupos en condiciones diferentes a las aplicadas en la monitorización clínica de rutina, excepto uno en el que únicamente estimó la RR de K^+ (Antunes *et al.*, 2014). La RR de K^+ calculada por este grupo oscilo entre el 91 y 100%, resultados que están en consonancia con los obtenidos en nuestro estudio. En el resto de estudios se habían utilizado membranas de MD con un MWCO de 20 kDa, perfundidas con suero salino al 0,9% como LP a una velocidad de perfusión de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$. Bajo estas condiciones, Alessandri y colaboradores objetivaron una RR de $72,5 \pm 5\%$ para el Na^+ (Alessandri *et al.*, 1998), mientras que el trabajo de Reinert y colaboradores indica que la RR de K^+ es de $65 \pm 16\%$ (Reinert *et al.*, 2000). Como han demostrado los estudios metodológicos realizados por diversos autores la velocidad de infusión está inversamente relacionada con la recuperación de cualquier analito mediante MD (Benveniste, 1989; Landolt and Langemann, 1996; Hutchinson *et al.*, 2000). Por ello, y para poder trasladar el modelo *in vitro* a la práctica clínica, en nuestro trabajo se estimaron los valores de RR *in vitro* reproduciendo las condiciones empleadas en la monitorización clínica de los pacientes (membranas CMA71 con un MWCO de 100 kDa perfundidas con CNS a una velocidad de 0,3 $\mu\text{L}/\text{min}$).

Limitaciones del modelo descrito

La MD tiene diversas limitaciones o desventajas en comparación con otras técnicas utilizadas en animales para la monitorización del perfil iónico cerebral (Mori *et al.*, 2002; Filippidis *et al.*, 2014):

1. Se trata de una técnica indirecta. Es decir, a partir de ella no se obtienen resultados directos, por lo que es necesario aplicar otros métodos de análisis para la obtención de los mismos. Este hecho provoca una

limitación temporal, ya que es imprescindible esperar un tiempo concreto para disponer del volumen de muestra suficiente para proceder al análisis de cualquier analito. Esto no ocurre cuando se utilizan electrodos selectivos en modelos animales. Además, a pesar de disponer de métodos muy sensibles de análisis, las muestras de MD no aportan la información real de los cambios que tienen lugar en el órgano de estudio, ya que los resultados dependen de la fracción de extracción o RR de cada soluto y de la membrana utilizada.

2. Dado que se trata de una técnica que implica la introducción de un catéter en el parénquima encefálico, la introducción del mismo causa un mínimo daño en el tejido de estudio.
3. Según algunos autores, el proceso de diálisis continuo puede dar lugar a un área alrededor de la membrana de baja concentración de solutos, o incluso crear un gradiente (Di Chiara *et al.*, 1996), que altere los resultados obtenidos.
4. Puesto que en la MD el paso de solutos se realiza a favor de un gradiente de concentración, los solutos presentes en el LP pueden difundir hacia el espacio intersticial, afectando al equilibrio osmótico del tejido (Westerink *et al.*, 1988; Osborne *et al.*, 1991).

Además de las limitaciones propias de la MD, es necesario remarcar que a pesar de que la estimación de la RR *in vitro* ha sido ampliamente utilizada para calcular las concentraciones reales de los analitos de interés, este método no es totalmente preciso ya que la difusión en tejido es distinta a la difusión en una solución (Nicholson and Rice, 1986).

También debe considerarse que, como se ha expuesto anteriormente, la RR depende de la temperatura y la presión. La temperatura incrementa el movimiento de los solutos y por lo tanto su difusión. En nuestro trabajo los experimentos se llevaron a cabo a presión atmosférica constante y a 2 temperaturas distintas. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las temperaturas testadas. Hecho que también había sido observado por Galea y colaboradores (Galea *et al.*, 2014) en un trabajo en el que estudiaban el efecto de la temperatura (20 - 37°C) y la presión (0 - 15 mmHg) en la RR del agonista del receptor de la

interleucina 1. Dadas estas observaciones, sería necesario comprobar el posible efecto de estas variables para que, en caso de existir, pudiese ser incluido en un modelo matemático para la mejor estimación de las concentraciones reales de los iones de estudio.

Sin embargo, y a pesar de limitaciones expuestas en el uso de la MD cerebral, es importante recordar que actualmente no existe otro método para la monitorización cuasi continua del contenido iónico cerebral aplicable en un entorno clínico.

3. Aplicación del modelo *in vivo*

3.1 Rango de referencia para la concentración iónica del espacio extracelular cerebral

En la bibliografía actual no existen valores de normalidad en microdializados obtenidos en humanos, dado que, como se ha comentado anteriormente, 1) la MD se ha aplicado en muy pocos casos para el estudio del perfil iónico cerebral y 2) la colocación de un catéter de MD en un cerebro sano no está justificada desde un punto de vista ético. Por todo ello, para conseguir la mejor aproximación a los valores de referencia para la concentración iónica extracelular del parénquima encefálico se utilizaron las concentraciones de los iones de interés obtenidas en LCR, habitualmente lumbar.

Diversos autores han incluido en sus estudios “grupos control” para compararlos con los valores iónicos detectados en las distintas patologías, aunque pocos han centrado sus objetivos en definir los valores de normalidad de los iones (Shaw and Holley, 1951) (**Tabla 6**). En los estudios publicados, las muestras procedentes de los grupos control fueron extraídas de LCR de pacientes con alguna patología durante procedimientos clínicos de rutina (Shaw and Holley, 1951; Sambrook, 1974; Pye and Aber, 1982) o a partir de voluntarios sanos (Harrington *et al.*, 2006; Harrington *et al.*, 2010). La **Tabla 6** resume las características de los grupos control, los rangos de normalidad descritos y los métodos de cuantificación aplicados en la definición del perfil iónico del LCR en los trabajos más significativos de la bibliografía.

Tabla 6. Rangos de normalidad del Na⁺, K⁺ y Cl⁻ en LCR

Estudio	Objetivo	Muestras	Metodología	[Na ⁺]	[K ⁺]	[Cl ⁻]
1. (Shaw and Holley, 1951)	Definir [Na ⁺] y [K ⁺] de referencia en LCR	N = 100 Individuos aparentemente normales	Fotometría de llama	142 (134 – 152)	2,88 (2,5 – 3,65)	-
2. (Sambrook, 1974)	Cambios iónicos en pacientes con meningitis	N = 40 Pacientes sin patología del SNC	Fotometría de llama (Na ⁺ y K ⁺) Colorimetría (Cl ⁻)	143,3 ± 2,6	2,88 ± 0,13	120,3 ± 3,3
3. (Pye and Aber, 1982)	Relación niveles glucosa y electrolitos en pacientes con fallo renal crónico	N= 34 Pacientes con dolores de cabeza o lumbares que requirieron punción lumbar	Métodos estándares	139,8 ± 2,78	3,96 ± 0,32	103 ± 3,24
4. (Harrington <i>et al.</i> , 2006)	Niveles iónicos en pacientes con migraña	N = 11 Voluntarios sanos	Electrodo selectivo	145 ± 4	2,7 ± 0,2	-
5. (Koksaldi, E <i>et al.</i> , 2008)	Electrolitos en pacientes con infarto cerebral	N = 15 Voluntarios sanos	Electrodo selectivo	148,08 ± 5,0	3,02 ± 0,47	-
6. (Harrington <i>et al.</i> , 2010)	Ritmos iónicos en pacientes con migraña	N = 6 Voluntarios sanos	Cromatografía	150,6 ± 10,9	2,96 ± 0,17	-
7. (Martínez-Valverde <i>et al.</i> , 2015)	Aplicación MD en el estudio del contenido iónico del EEC	N = 22 Pacientes sin patología del SNC	Electrodo selectivo	148 ± 9,94	3,25 ± 0,2	130 ± 8,17

LCR: líquido cefalorraquídeo; **SNC:** sistema nervioso central; **N:** número de pacientes, **MD:** microdiálisis, **EEC:** espacio extracelular.

Los métodos de detección aplicados fueron distintos en función del estudio, y en la mayoría de trabajos no se determinó la concentración de Cl^- . Además, es bien conocido que para comparar valores absolutos de cualquier analito entre diferentes grupos de estudio es recomendable que las determinaciones hayan sido llevadas a cabo con el mismo método de detección/cuantificación. Para salvar los obstáculos descritos, nuestro trabajo, recientemente publicado en *Journal of Neurotrauma* (Martínez-Valverde *et al.*, 2015), incluye la definición de los rangos de referencia para los 3 iones de interés. En este estudio, las determinaciones se llevaron a cabo con el mismo analizador utilizado para los experimentos de RR, determinándose las concentraciones de Na^+ , K^+ y Cl^- en 22 muestras de LCR lumbar procedentes de pacientes sin antecedentes neurológicos y/o psiquiátricos. Previa inclusión en el grupo control, todos los voluntarios fueron sometidos a un examen neurológico y además se les administró el *Mini-Mental State Examination*, incluyéndose únicamente a aquellos participantes que obtuvieron una puntuación superior a 25. La muestra de LCR se obtuvo durante el procedimiento de anestesia intrarraquídea para la práctica de cirugía urológica, cirugía abdominal o vascular, tras la obtención del consentimiento informado (proyecto: PRAG-75/2005). Esta cohorte consistió en 7 (32%) hombres y 15 (68%) mujeres, con una edad media de 65 años (mín: 41 - máx: 88).

La **Tabla 6** muestra el rango de normalidad para los iones del LCR obtenido en este grupo control. El umbral superior fue de: 164 mmol/L para el Na^+ , 144 mmol/L para el Cl^- y 3,6 mmol/L en el caso del K^+ (Martínez-Valverde *et al.*, 2015).

3.2 Aplicabilidad del modelo en muestras almacenadas

Para verificar si era posible determinar el contenido iónico en muestras de pacientes que habían requerido monitorización multimodal, se llevó a cabo un estudio en muestras de microdializados almacenadas a -86°C con el objeto de comprobar si se producía evaporación durante la congelación/descongelación de las mismas. Para ello, se eligieron 10 pacientes monitorizados con MD cerebral y sistémica que formaban parte de la colección de muestras recogidas por Unidad de Investigación de Neurotraumatología y Neurocirugía (UNINN). En 12 muestras procedentes del catéter subcutáneo de cada paciente se cuantificaron los niveles de glucosa, lactato y piruvato mediante el analizador ISCUS^{flex} (M Dialysis AB).

Para comprobar la validez de las muestras almacenadas, los valores derivados en este reanálisis (tiempo 2) se compararon con los obtenidos durante el periodo de monitorización clínica (tiempo 1) de cada paciente. Únicamente se observaron diferencias significativas para el piruvato ($p < 0.001$), lo que permitió afirmar que no se produce evaporación durante la congelación/descongelación de las muestras y que las diferencias observadas en los niveles de piruvato se debían a que éste se degrada con el tiempo.

Seguidamente, para comprobar la aplicabilidad del modelo descrito, se planteó un estudio clínico en 2 pacientes (el primero había sufrido un TCE y el segundo un infarto cerebral), que requirieron monitorización de la PIC y a los que también se implantó un catéter de MD cerebral. Los catéteres de MD fueron insertados según la metodología previamente descrita (Poca *et al.*, 2006) en las regiones cerebrales de interés y perfundidos con la solución comercial CNS a una velocidad fija de $0,3\mu\text{L}/\text{min}$ utilizando una microbomba CMA 160 (M Dialysis AB). Tras los análisis metabólicos de rutina, los microviales con la muestra residual se almacenaron a -86°C para futuros estudios.

3.2.1 Descripción de los casos

Caso 1: varón de 24 años que fue ingresado en nuestro hospital tras una caída desde una altura de 6 metros, con una puntuación de 6 en la ECG, evaluada en el lugar del accidente. La TC cerebral llevada a cabo al ingreso mostraba una hemorragia subaracnoidea moderada, mínima hemorragia intraventricular, pequeño hematoma subdural y petequias subcorticales difusas, todo ello compatible con una lesión axonal difusa. Tras su estabilización, el paciente fue trasladado a la UCI de Neurotraumatología donde se le colocó un sensor de PIC y un catéter de MD cerebral que se mantuvo durante 114 horas. La TC cerebral de control evidenció que el catéter de MD estaba localizado a 41 mm por debajo del hematoma subdural agudo no evacuado, una zona que podría considerarse un área de cerebro estructuralmente normal. La recogida de muestras de microdializado se inició 25 horas después del TCE.

Caso 2: Varón diestro de 52 años de edad con antecedentes de tuberculosis que ingresó en urgencias 90 minutos después de la aparición de una debilidad severa en el hemicuerpo derecho y dificultad para hablar. Al ingreso en nuestro centro, el

paciente presentaba una hemiplejía derecha y disfasia y una puntuación de 22 en la escala de ictus del NIH (*National Institute of Health*). La TC cerebral practicada evidenció la presencia de una lesión isquémica correspondiente al territorio de la ACM izquierda -de etiología posiblemente embólica- sin desplazamiento de la línea media. Se descartó la aplicación de tratamiento con rtPA endovascular debido al tamaño del territorio afectado. El paciente ingresó inicialmente en la Unidad de Ictus de nuestro centro. Al tercer día de hospitalización, se le practicó una nueva TC cerebral, dado que el paciente presentaba cefalea en el contexto de confusión mental y una mayor dificultad para despertar. Las imágenes mostraron un gran infarto en el territorio de la ACM derecha asociado a un desplazamiento de la línea media de 5 mm. El paciente fue trasladado a la UCI de Neurotraumatología y, a las 67 horas del inicio de la clínica, se le practicó una hemicraniectomía descompresiva izquierda. Durante la cirugía se colocaron 2 catéteres de MD, uno en el core del infarto y otro en el hemisferio contralateral. Seis horas después de la cirugía se inició la recogida de muestras de MD para el estudio del metabolismo cerebral (73 horas después del diagnóstico del accidente cerebrovascular).

La **Tabla 7** muestra los valores obtenidos en los *pools* de microdializados cerebrales y los valores medios de Na⁺ y K⁺ obtenidos a nivel plasmático durante el periodo de monitorización.

Tabla 7. Niveles iónicos de los casos analizados

	Tiempo	Análisis	Na ⁺	K ⁺	Cl ⁻
Caso 1	T1	MD zona sana	162,5	4,2	161,5
		Plasma	137,7	4,3	--
	T2	MD zona sana	158,2	3,3	163
		Plasma	139,2	4,2	--
Caso 2	T1	MD zona sana	164	3,8	158
		MD core	144	6,9	139
		Plasma	142,5	3,7	--
	T2	MD zona sana	156,36	3,8	159,4
		MD core	150,8	6,8	145,9
		Plasma	141,5	3,7	--

Los valores se expresan en mmol/L. **T1**: *pool* de las primeras 12 horas de monitorización; **T2**: *pool* correspondiente a las 13 - 24 horas de monitorización; **MD**: microdializado; **Plasma**: media de los valores de Na⁺ y K⁺ en determinaciones plasmáticas de rutina

Los niveles plasmáticos de los iones de estudio se encontraban dentro de los rangos de normalidad en ambos pacientes. Los valores a nivel cerebral, tomando como referencia los valores obtenidos en el LCR del grupo control: 1) en el paciente traumático, estaban ligeramente aumentados, aunque por debajo del umbral superior en el caso del Na^+ y K^+ y fuera de rango en el caso del Cl^- . 2) en el paciente que había sufrido un IMACM los valores de Na^+ detectados en la zona del core del infarto también fueron normales, mientras que el Cl^- estaba ligeramente aumentado y los niveles de K^+ fueron muy superiores (mediana: 6,8 mmol/L) a los esperados (umbral superior del rango de normalidad = 3,6 mmol/L). En cambio, en el hemisferio contralateral sano los valores obtenidos en los análisis siguieron el mismo patrón que en el paciente traumático (caso 1).

3.3 Discusión

Los valores de Na^+ y K^+ detectados en el LCR de nuestro grupo control fueron similares a aquellos detectados por otros grupos mediante electrodo selectivo (Harrington *et al.*, 2006) y ligeramente inferiores a los detectados mediante fotometría de llama (Shaw and Holley, 1951; Sambrook, 1974). En la segunda parte del trabajo publicado en *J Neurotrauma* (Martínez-Valverde *et al.*, 2015) también se verifica que es posible aplicar la MD para el estudio del contenido iónico del EEC cerebral y que esta técnica permite detectar los cambios que se producen en el contenido iónico tisular.

En los 2 pacientes estudiados, los datos correspondientes a la monitorización de las regiones cerebrales macroscópicamente sanas muestran valores ligeramente superiores de K^+ y el Cl^- si los comparamos con los valores del grupo control, mientras que el Na^+ se encuentra dentro de los límites de normalidad. En cambio, en el caso 2 en el catéter de MD implantado en la zona del core del infarto se obtuvieron valores muy elevados de K^+ junto a valores normales de Na^+ y Cl^- . De confirmarse estos hallazgos en series mayores se podría concluir que el K^+ es un indicador de necrosis tisular y, por tanto, de tejido inviable. Otros autores ya han reportado, en pacientes con un TCE, que los niveles de K^+ guardan relación con la severidad de la lesión (Valadka *et al.*, 1998; Doppenberg *et al.*, 1999; Goodman *et al.*, 1999; Reinert *et al.*, 2000). En el core de la lesión isquémica se produce necrosis y desestructuración del tejido afecto. El análisis del contenido iónico de esta zona muestra el resultado de la mezcla de componentes procedentes del

espacio intracelular, el compartimento extracelular así como del contenido vascular. Kawanata y colaboradores reportaron que en la zona central de las contusiones cerebrales se producía un aumento de la osmolaridad, sin un incremento significativo en los niveles de Na^+ , K^+ y Cl^- . Estos autores también observaron una disminución de la densidad del tejido, debido a un incremento del contenido de agua (Kawamata *et al.*, 2007), que sería atraída al centro de la contusión para compensar la diferencia de concentración entre compartimentos. Estos resultados podrían explicar en parte los hallazgos observados en nuestro paciente afecto de un infarto cerebral maligno (caso 2), en el cual los valores de Na^+ y Cl^- se encontraban dentro de la normalidad, posiblemente como consecuencia del edema presente en la zona. Sin embargo, se necesitan estudios con más pacientes y determinaciones seriadas para confirmar estas hipótesis.

Limitaciones

El método de cuantificación de Na^+ , K^+ y Cl^- utilizado en este estudio (electrodo selectivo) requiere un volumen de muestra mínimo de 85 μL . Esto hace que la resolución temporal de los estudios sea baja y que su aplicación *in vivo* requiera la mezcla de entre 8 - 10 muestras de microdializado para su análisis, hecho que limita la capacidad de detectar cambios en espacios cortos de tiempo. Existen diversas opciones para solucionar este problema: 1) diluir las muestras en agua desionizada de forma previa a la cuantificación de los iones o 2) incrementar la velocidad de infusión de 0,3 a 0,5 o 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Sin embargo, ambas opciones provocan una disminución del contenido iónico a determinar, la primera de ellas por dilución directa de la solución de estudio y la segunda como efecto secundario de incrementar la velocidad del flujo de perfusión. Estos fenómenos pueden impedir la detección de los niveles de K^+ , el ión posiblemente más relevante como biomarcador de viabilidad tisular (Mori *et al.*, 2002), dado que el límite de detección de analizador es de 2 mmol/L . Además, la modificación de la velocidad de perfusión afectaría a la RR de los metabolitos energéticos (Benveniste, 1989; Hutchinson *et al.*, 2000; Lieutaud, 2007; Kitagawa *et al.*, 2013) que se determinan de forma rutinaria en estos pacientes, modificando su rango de normalidad y dificultando su interpretación clínica. Por todo ello, para la detección de cambios temporales en los niveles de iones o debidos a maniobras

clínicas el mejor método de detección sería la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). Esta técnica se aplica para la detección de elementos en concentraciones traza o en muestras de bajo volumen por su gran límite de detección (partes por millón -ppm-). Esta técnica no está disponible en la mayoría de hospitales, debido a su elevado coste. Sin embargo, se trata de una técnica implementada en algunos centros de investigación o en los laboratorios de análisis de muestras, por lo que se perfila como la alternativa para incrementar la resolución temporal de los análisis iónicos, sin afectar al estudio del metabolismo cerebral.

CONCLUSIONES

1. En los pacientes que habían sufrido un TCE, el receptor de la sulfonilurea (SUR1) se sobreexpresa de forma precoz en los distintos tipos celulares (neuronas, astrocitos, microglia, células endoteliales y neutrófilos) del tejido pericontusional. Sin embargo, el patrón temporal de expresión de esta proteína depende del tipo celular, así: 1) en las neuronas, la expresión del SUR1 se incrementa durante las primeras 24 horas después del traumatismo, para estabilizarse de forma posterior, 2) en los astrocitos y microglia/macrófagos aumenta de forma progresiva con el tiempo tras lesión, 3) en las células endoteliales no se existe ningún patrón temporal y 4) en los neutrófilos la expresión disminuye a medida que transcurre el tiempo.
2. Las contusiones cerebrales postraumáticas provocan una intensa respuesta inflamatoria en el tejido circundante, objetivada por el aumento de la expresión de astrocitos y microglia reactiva y la aparición de neutrófilos en el parénquima cerebral, así como por la sobreexpresión del SUR1 en estas células. Estos hallazgos sugieren que en el humano, al igual que ya se había demostrado en modelos animales de hemorragia subaracnoidea, el SUR1 puede estar involucrado en los procesos neuroinflamatorios que se desencadenan después de un TCE.
3. La MD cerebral permite estimar la concentración de Na^+ , K^+ y Cl^- tanto en un modelo *in vitro*, en una solución problema, como *in vivo*, en el espacio extracelular cerebral, a partir de las concentraciones obtenidas en los microdializados aplicando un modelo de regresión lineal
4. El modelo de Bungay no es aplicable al cálculo de la RR mediante MD cerebral si el analito de estudio se encuentra en el líquido de perfusión, puesto que: 1) se obtienen valores muy extremos cuando la concentración de $C_{LP} > C_{matriz}$, 2) no es matemáticamente posible calcular la RR cuando $C_{LP} = C_{matriz}$ y 3) la RR obtenida es 0 cuando $C_{LP} = C_{md}$
5. Tanto la albúmina como la cistatina C tienen un PM que, teóricamente, permitiría su paso a través de las membranas de 100 kDa. Sin embargo, la RR de estas proteínas es siempre inferior a la esperada por su PM. Las

características ultraestructurales de catéteres CMA71 son las principales responsables de la baja RR de albúmina y cistatina C. Estos hallazgos indican que la MD cerebral no es una técnica válida para la determinación de ambas proteínas y que, por lo tanto, su determinación a partir de esta técnica no puede utilizarse como un indicador de la permeabilidad de la BHE.

6. La MD cerebral, combinada con la ICP-MS, es una herramienta útil para el estudio del perfil iónico del EEC del cerebro en las lesiones neurotraumáticas o isquémicas. El perfil iónico de EEC es distinto en función del grado de lesión del parénquima cerebral y, por tanto, los resultados deben interpretarse en función de la zona en la que se realiza la monitorización. El tejido isquémico (core isquémico) se caracteriza por presentar valores muy elevados de K^+ y concentraciones "pseudonormales" de Na^+ y Cl^- . En cambio, en el tejido lesionado después de un TCE (core traumático) los valores elevados de K^+ están acompañados de valores elevados de Na^+ y Cl^- . Por último, en las regiones circundantes a ambos tipos de lesiones (regiones de penumbra) existe un leve incremento en los valores de todos los iones estudiados. Estos hallazgos indican que la concentración de K^+ en el EEC podría ser utilizada como un biomarcador de la viabilidad del tejido cerebral y que la concentración de Na^+ podría ayudar a identificar un aumento de la permeabilidad de la BHE, responsable de la formación de edema cerebral.

ANEXO

En este apartado se presentan los resultados obtenidos al aplicar la MD cerebral a la determinación de albúmina y cistatina C y un tercer artículo que constituye una aplicación directa del estudio iónico previamente publicado por nuestro grupo en *Journal of Neurotrauma* (Martínez-Valverde *et al.*, 2015). En este nuevo artículo (actualmente en proceso de revisión) se estudia el perfil iónico del EEC en distintas regiones cerebrales de pacientes que presentaron un TCE moderado o grave o un IMACM y que requirieron la monitorización de la PIC y la colocación de un catéter de MD cerebral.

1. Determinación de albúmina y cistatina C en el espacio extracelular del encéfalo como marcadores de la disrupción de la barrera hematoencefálica

En el diseño inicial de este proyecto se seleccionaron 2 proteínas con baja expresión en el SNC (Zhang *et al.*, 2005) para ser utilizadas como biomarcadores de disrupción de la BHE, que permitieran establecer el diagnóstico de edema vasógeno. Nuestro estudio tenía como objetivo determinar estas proteínas en los microdializados de pacientes con lesiones cerebrales agudas secundarias a un TCE o a un IMACM. De forma paralela a los estudios iónicos, inicialmente se procedió a calcular la RR de ambas proteínas *in vitro*, como paso previo a realizar estimaciones de las concentraciones reales *in vivo*. Sin embargo, los resultados de los estudios *in vitro* objetivaron que los catéteres de MD actuales de 100 kDa no permiten realizar estos cálculos de forma fiable, a pesar de que el PM de ambas proteínas se encuentra por debajo del tamaño de poro de las membranas de diálisis.

1.1 Recuperación relativa de macromoléculas

Con el fin de calcular la RR de la albúmina y la cistatina C se llevaron a cabo experimentos *in vitro* con membranas CMA71, dotadas de un tamaño de poro de 100 kDa. Para ello se utilizó un baño húmedo a 37 °C y la solución CNS como líquido de perfusión (sin agentes coloidosmóticos), a una velocidad de perfusión

de 0,3 $\mu\text{L}/\text{min}$. En estos experimentos la H1 era de 22 mm y la H2 de 12mm (ver **Figura 10** página 85). Bajo estas condiciones la recuperación volumétrica era óptima para soluciones isotónicas con respecto al LP. Se utilizaron 4 catéteres distintos, 2 para cada proteína de estudio, testándose 2 concentraciones distintas de las moléculas analizadas (200 y 1.000 mg/L para la albúmina y 1.000 y 2.500 ng/mL para la cistatina C) en la solución problema o matriz. Las soluciones problema se prepararon a partir de: 1) una solución de albúmina sérica humana al 20% (Grifols®, Barcelona, España) y 2) cistatina C humana recombinante en *Escherichia coli* (RD172009025-H; BioVendor Laboratory Medicine, Inc. Heidelberg, Germany). Los experimentos se llevaron a cabo durante 3 días consecutivos, sustituyéndose los microviales y adquiriendo muestras de la matriz cada 12 horas. En todos los casos se registró el volumen recuperado, el cual se situó entre el 89 y el 112% del esperado.

Para cuantificar la albúmina en las muestras obtenidas se utilizó el analizador automático Olympus AU5400 (Olympus America INC., Diagnostic System Group, Melville, NY, USA), que determina la concentración de esta proteína mediante el método del verde de bromocresol con un rango de detección de 5 a 300 mg/L. En cambio, la concentración de cistatina C fue determinada mediante un ELISA comercial (RD191009100; C ELISA Kit, Biovendor) con un rango de detección de 0,25 a 10.000 ng/mL, siguiendo las instrucciones del fabricante.

A pesar de que ambas proteínas tienen un PM inferior al *cut-off* de la membrana de microdiálisis (albúmina: 69 kDa, cistatina C: 15,8 kDa), los resultados de RR obtenidos para ambas moléculas no fueron los esperados. En el caso de la cistatina C la RR mediana obtenida fue del 9,78% con un mínimo de 8,02% y un máximo de 10,6%. En cambio, para la albúmina la RR fue incalculable, ya que las concentraciones en el microdializado siempre fueron inferiores al límite de detección de la técnica (5 mg/L). Para intentar explicar las discrepancias entre las posibilidades teóricas de la técnica de MD y los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*, se decidió llevar a cabo un estudio de la ultraestructura de las membranas CMA71 mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Los resultados de estos estudios morfológicos proporcionaron la clave para entender la dificultad de paso de ambas moléculas a través de las membranas de diálisis utilizadas.

1.2 Estudio ultraestructural de las membranas CMA71

Para el estudio ultraestructural, los catéteres empleados para los experimentos de RR fueron fijados durante 48 horas en una solución que contenía 2% de paraformaldehído y 2,5% de glutaraldehído. Esta fijación permitió conservar las moléculas biológicas que se habían adherido a la superficie de los catéteres. Seguidamente, se realizaron cortes transversales y longitudinales que se procesaron en el Departamento de Microscopía de la *Universitat Autònoma de Barcelona*, donde se metalizaron con oro para su posterior estudio en un microscopio electrónico de barrido (Hitachi S-570, Hitachi LTD, Tokio, Japón). Las imágenes obtenidas se analizaron mediante el programa ImageJ 1.43v (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA), determinándose el grosor de la membrana y el tamaño de los poros de las caras externa e interna de las membranas de diálisis. El estudio morfológico se amplió a 2 catéteres nuevos, fabricados en 2 lotes distintos, mediante un microscopio con mayor resolución que permite observar las muestras sin necesidad de metalización, HRSE Merlin® (Carl-Zeiss, Jena, Alemania), con el objeto de descartar posibles artefactos derivados del proceso de metalización. Para este último análisis, las membranas se montaron en un soporte específico del SEM, sin ningún tratamiento adicional en la superficie. Todas las imágenes se recogieron a través del HRSE Merlin® con compensación de carga para proteger las muestras de la carga a la que se someten cuando se trabaja bajo voltajes de aceleración elevados (hasta 3 kV).

1.3 Resultados de las observaciones morfológicas

En todos los catéteres, se analizaron ambas caras de la membrana, objetivándose que existían diferencias muy marcadas entre la morfología de la cara externa e interna, resultados que coinciden con los descritos por Helmy et al. (Helmy *et al.*, 2009) al estudiar el mismo tipo de membranas de 100 kDa. Las imágenes mostraron que la cara externa (**Figura 12A** y **12C**) presentaba una alta porosidad, con poros de forma circular o elíptica de distinto tamaño distribuidos en toda la superficie. En cambio, la cara interna presentaba poros de menor tamaño distribuidos de forma irregular formando cadenas de poros que alternaban con zonas sin poros (**Figura 12B** y **12D**). Además, entre ambas caras de la membrana de diálisis se observó una estructura tortuosa, parecida a la de

una esponja, con canales que en algunos casos conformaban cavidades vacías e irregulares más grandes que los propios poros (**Figura 13**).

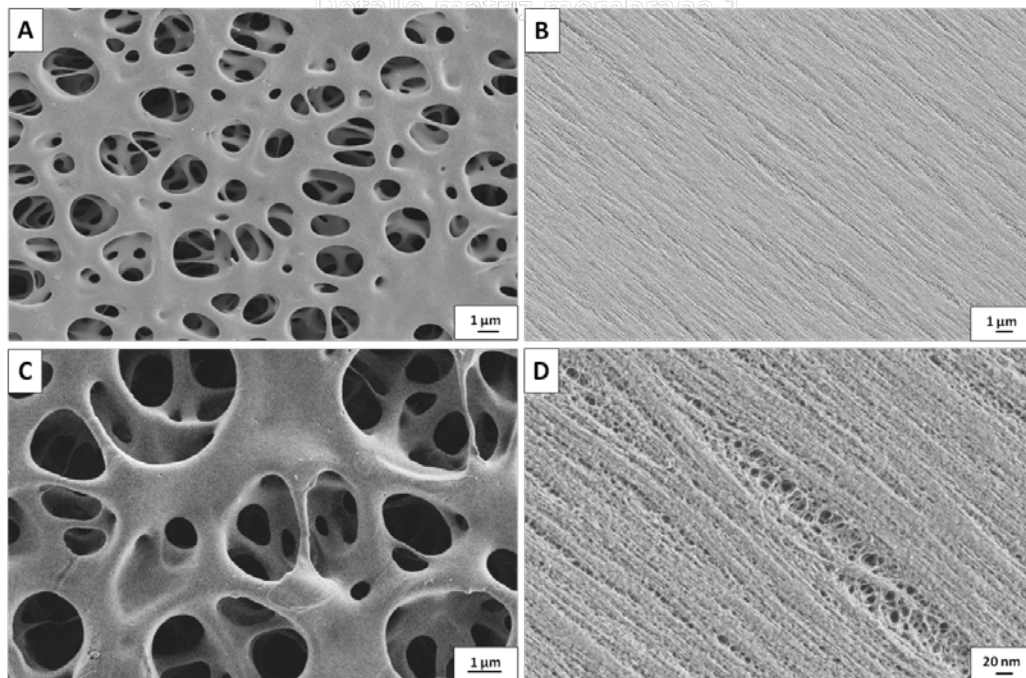


Figura 12. Membrana dializante del catéter CMA71. Imágenes captadas con el microscopio electrónico de barrido MERLIN®. **A:** cara externa. **B:** cara interna. **C:** detalle de la cara externa. **D:** detalle de la cara interna. Obsérvese la gran diferencia en el tamaño de poro que existe entre ambas caras de la membrana de diálisis.

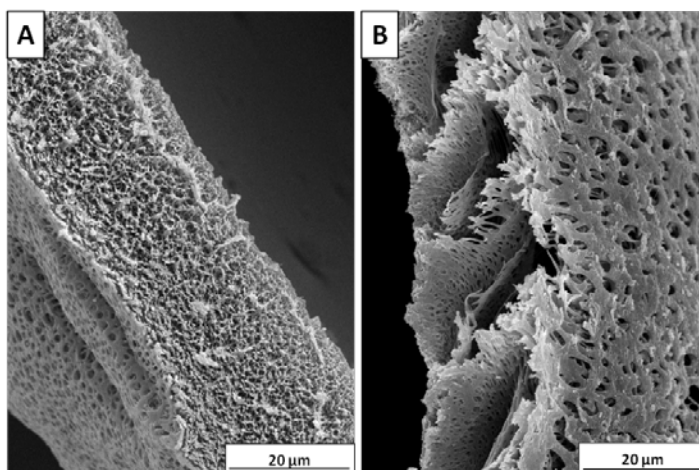


Figura 13. Cortes transversales de dos membranas de 100 kDa. **A:** Membrana sin cavidades. **B:** Membrana de 100 kDa con cavidades de gran tamaño entre las caras externa e interna de la membrana de diálisis. Imágenes obtenidas mediante microscopio electrónico de barrido Hitachi S-570 (Hitachi LTD, Tokio, Japón) de 2 catéteres de 100 kDa empleados durante los experimentos de recuperación relativa de macromoléculas.

En la cara externa de la membrana de diálisis, el diámetro de poro en algunos casos fue de varias micras con una mediana de 0,48 μm (mín: 0,03 – máx: 4,46 μm). En cambio, en la cara interna se determinó un tamaño del poro de sólo unos pocos nanómetros. La media de los valores obtenidos del grosor de la membrana fue de $30,33 \pm 1,02 \mu\text{m}$.

1.4 Discusión

La MD es uno de los pocos sistemas de neuromonitorización que permite obtener una información metabólica a tiempo cuasi real en los pacientes neurocríticos (Hillered *et al.*, 2005; Hillered *et al.*, 2006). Está bien establecido que esta técnica permite obtener una información fiable de muchos procesos neuroquímicos complejos a partir de la determinación de metabolitos de bajo peso molecular (Oddo *et al.*, 2012). Además, la reciente disponibilidad de membranas de alta resolución (con un mayor tamaño de poro) para uso clínico ha abierto nuevas posibilidades de investigación al permitir estudios proteómicos. Desde un punto de vista teórico, las membranas de alta resolución deberían permitir la obtención de biomarcadores de origen proteico indicativos de lesión cerebral (Helmy *et al.*, 2011). Sin embargo, la gran heterogeneidad de las propiedades físicas, químicas y biológicas de las proteínas plantea varios desafíos para su obtención a partir de los catéteres de MD actuales. La complejidad estructural y física de estas macromoléculas, junto con las características físicas observadas en las membranas de diálisis estudiadas explican la baja eficiencia de los catéteres para la extracción de proteínas, y los graves problemas de reproducibilidad encontrados en nuestro y otros estudios (Schutte *et al.*, 2004; Helmy *et al.*, 2009).

Tanto la albúmina como la cistatina C tienen un PM que, teóricamente, permitiría su paso a través de las membranas de 100 kDa utilizadas. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la RR de estas proteínas es siempre inferior a la esperada por su PM. Esto indica de forma clara que existen otros factores que influyen en la RR de estas macromoléculas. Los estudios realizados por Rosenbloom y colaboradores con catéteres de 100 kDa objetivaron que la RR de la albúmina, sin añadir dextrano al líquido de perfusión, fue de $14 \pm 10\%$, transcurrida 1 hora del inicio del experimento, y de $1,2 \pm 0,6\%$ 8 horas después de su inicio. Después de la adición de dextrano en el LP, la RR inicial fue de $5,6 \pm 0,9\%$ y disminuyó por debajo del 1% a las 2 horas del inicio del experimento

(Rosenbloom *et al.*, 2005). En nuestro estudio la concentración de albúmina se determinó por primera vez 12 horas después del inicio del experimento y en todos los casos (solución problema de 200 mg/L y 1000 mg/L) la concentración de albúmina en el microdializado fue inferior a 5 mg/L. Una de las posibles explicaciones de la baja RR de la albúmina es que en determinadas situaciones ésta puede dimerizar, lo que conlleva un aumento de su peso molecular hasta 133,1 kDa. Con este tamaño, la proteína ya no podría pasar a través de los poros de la membrana de 100 kDa. Para la cistatina C, no existen datos específicos en la literatura sobre su RR. Sin embargo Wetterhall y colaboradores detectaron esta molécula en el microdializado de un estudio *in vitro* con LCR y membranas CMA71 (Wetterhall *et al.*, 2014).

Un problema adicional para la obtención de proteínas a través de los catéteres de MD utilizados es la estructura de la propia membrana de diálisis. Como se pudo observar durante el estudio de la ultraestructura de las membranas CMA71, ambas caras (externa e interna) presentan una morfología muy distinta. La cara externa presenta en toda su superficie poros muy amplios, de incluso algunas micras de diámetro. En cambio, en la cara interna de la membrana el tamaño del poro disminuye dramáticamente al orden de nanómetros y su distribución es muy irregular. Estos hallazgos indican que el MWCO de los catéteres viene determinado realmente por los poros de la cara interna de la membrana, ya que es el punto de mayor resistencia a la difusión de las macromoléculas. Además, la tortuosidad de los poros externos, que se distribuyen a lo largo de toda la matriz (espacio poroso que existe entre la cara externa y la cara interna de la membrana), también puede dificultar el paso de las moléculas a través de los mismos.

Una vez finalizado el análisis de la ultraestructura, se concluyó que las características observadas eran las responsables de la baja RR de nuestras proteínas de estudio, así como de la obtenida por otros autores (Helmy *et al.*, 2009; Duo and Stenken, 2011). Estos hallazgos limitan la información que se puede extraer del estudio de proteínas a partir muestras de microdializados obtenidos utilizando los catéteres actuales. También es importante remarcar que estos resultados hacen cuestionables los estudios clínicos publicados por otros autores en los que se han determinado proteínas sin haber realizado estudios previos de RR.

A la vista de estos resultados, se desestimó continuar con esa parte del proyecto, quedando refutada la hipótesis de que la albúmina y la cistatina C son excelentes marcadores de disrupción estructural de la BHE y que el cociente entre las concentraciones de albúmina o cistatina C plasmáticas versus las obtenidas en los microdializados cerebrales son un buen índice para definir la presencia de edema vasogénico.

**Characterization of the ionic profile of the extracellular space of the
injured and ischemic brain: A microdialysis study**

Martínez-Valverde T, Vidal-Jorge M, Sánchez-Guerrero A, Torné R, Castro L,
Gandara D, Munar F, Poca M.A, Sahuquillo J

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism- Under Review

Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism

Journal of
Cerebral Blood Flow
& Metabolism

**Characterization of the ionic profile of the extracellular
space of the injured and ischemic brain: A microdialysis
study**

Journal:	<i>Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	<p>Martínez, Tamara; Vall d'Hebron University Hospital Research Institute (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Neurotraumatology and Neurosurgery Research Unit (UNINN); Vidal-Jorge, Marian; Vall d'Hebron Research Institute, Neurosurgery and Neurotraumatology Research Unit (UNINN) Sánchez-Guerrero, Angela; Vall d'Hebron University Hospital Research Institute (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Neurotraumatology and Neurosurgery Research Unit (UNINN) Torné, Ramon; Vall d'Hebron University Hospital, Department of Neurosurgery and Neurotraumatology and Neurosurgery Research Unit (UNINN) Castro, Lidia; Vall d'Hebron University Hospital Research Institute (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Neurotraumatology and Neurosurgery Research Unit (UNINN) Gándara, Dario; Vall d'Hebron University Hospital, Department of Neurosurgery Munar, Francisca; Vall d'Hebron University Hospital, Department of Anesthesiology and Neurotraumatology and Neurosurgery Research Unit (UNINN), Poca, MariaA; Vall d'Hebron University Hospital, Department of Neurosurgery and Neurotraumatology and Neurosurgery Research Unit (UNINN) Sahuquillo, Juan; Vall d'Hebron University Hospital, Neurosurgery and Neurotraumatology Research Unit</p>
Keywords:	Brain edema, Blood brain barrier, Brain Ischemia, Brain trauma, Na Channels

SCHOLARONE™
Manuscripts

ORIGINAL ARTICLE

Characterization of the ionic profile of the extracellular space of the injured and ischemic brain: A microdialysis study

Tamara Martínez-Valverde¹; Marian Vidal-Jorge¹; Angela Sánchez-Guerrero¹; Ramon Torné^{1,2}; Lidia Castro¹; Dario Gandara²; Francisca Munar³; Maria-Antonia Poca^{1,2}; Juan Sahuquillo^{1,2}.

1. Neurotraumatology and Neurosurgery Research Unit (UNINN), Barcelona, Spain

2. Department of Neurosurgery, Vall d'Hebron University Hospital, Universidad Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain.

3. Department of Anesthesiology, Vall d'Hebron University Hospital, UAB, Barcelona, Spain

Traumatic brain injury (TBI) and ischemic stroke cause a variable disruption of ionic homeostasis and massive ionic fluxes with subsequent osmotic water movement across the cells that causes edema, brain swelling and deformation of the damaged tissue. Although cerebral microdialysis (CMD) has been used to study the brain neurochemistry, the ionic profiles of brain interstitial space fluid have rarely been reported in humans. We studied the ionic profile in injured areas of the brain by using CMD. As a control group, we included 7 patients who had undergone surgical treatment of posterior fossa lesions, without abnormalities in the supratentorial compartment. Inductively-coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was used for ion determination. No significant differences were found in the $[Na^+]_o$, $[K^+]_o$ and $[Cl^-]_o$ between normal injured brain and controls. The ionic profile of the ischemic core was characterized by very high $[K^+]_o$ and an increase in $[Na^+]_o$, while $[Cl^-]_o$ was linearly related to $[Na^+]_o$. In traumatic core (TC) significantly higher levels of $[Na^+]_o$, $[Cl^-]_o$, and $[K^+]_o$ were found. The main finding in penumbra was a completely normal ionic profile for $[Na^+]_o$ and $[K^+]_o$ in 60% of the samples. ICP-MS coupled to ionic assays creates a powerful tool for a better understanding of the complex ionic disturbances that occur after severe TBI and ischemic stroke.

Key words: brain microdialysis, ischemic stroke, potassium, sodium, traumatic brain injury.

INTRODUCTION

In the mammalian central nervous system (CNS), both glial cells and neurons have a stable internal ionic composition that is not in equilibrium with the interstitial space fluid (ISF). Therefore, ionic gradients across excitable cells in the CNS must be extremely well regulated to maintain their resting membrane potential and the depolarization and repolarization capability that underlies neuronal signaling. Under steady state, the intracellular concentration of potassium ($[K^+]_i$) in the CNS is typically around 145 mmol/L, and the extracellular potassium concentration ($[K^+]_o$) is ~ 4 mmol/L.¹ Transmembrane sodium gradients have the opposite orientation, and the extracellular concentration of sodium ($[Na^+]_o$) is much higher than its intracellular concentration ($[Na^+]_i$). Water and small solutes such as ions, sugars, and amino acids are the main players in the maintenance of the cell volume via complex osmoregulatory phenomena. The neural cell membranes are usually impermeable to these

solute and thus ion channels, transporters, and a myriad of specialized proteins are needed to move ions in and out of the cell via facilitated or active transport.²

Traumatic brain injury (TBI) and ischemic stroke cause a variable disruption of ionic homeostasis and massive ionic fluxes with subsequent osmotic water movement across the cells. Changes in ionic concentrations induce water accumulation in the intracellular and ISF and cause brain edema and deformation of the damaged brain tissue.³ Brain edema is the most frequent cause of neurological worsening and death in patients with severe TBI and malignant ischemic stroke. In these patients, osmotherapy is a first line therapy for managing increased intracranial pressure (ICP). Osmotic agents (mannitol and hypertonic saline solutions) are used because they are maintained within the intravascular compartment and are excluded from the brain ISF via the blood-brain barrier (BBB). However, whether the BBB is tight or leaky can

dramatically change the effects of the osmotic solutions on the brain and its effects on ICP.

Cerebral microdialysis (CMD) is a tool increasingly embraced in neurocritical care units in the management of patients with severe TBI and aneurysmal subarachnoid hemorrhage who are comatose.⁴ In a report in the International Multidisciplinary Consensus Conference on Multimodality Monitoring in Neurocritical Care, CMD monitoring was recommended in patients with or at risk of cerebral ischemia, hypoxia, energy failure, and glucose deprivation.⁴ Our group showed that *in vitro*, the relative recovery (RR) for Na⁺, K⁺ and Cl⁻ was excellent and that the *in vivo* ionic concentration can be reliably calculated from the microdialysate concentrations in patients with acute brain injuries.⁵ CMD has been extensively used to study the neurochemistry of the brain, but the study of ionic profiles in the brain ISF has rarely been reported in experimental models or humans. Of note, a few clinical studies have concentrated on [K⁺]_o.⁶⁻⁹ because the increase in [K⁺]_o is a biomarker for the severity of the brain tissue injury, brain ischemia and necrotic death.^{7, 10} Furthermore, some clinical studies in TBI have shown that an increased [K⁺]_o is a strong predictor of severe physiological deterioration and a poor outcome.^{7, 9, 11} The ionic profile is severely disrupted in ischemic tissue and it therefore may be important to find out the fingerprints of tissue that is at risk and compare them to those that are irreversibly damaged and cannot be rescued. Furthermore, a better understanding of the ionic profile of the brain ISF is essential to understand the complex pathophysiological phenomena such as cortical spreading depolarization (CSD), brain edema as well as the effects of drugs used to treat edema such as hypertonic saline solution (HTS).

Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) is a state-of-the-art instrumental technique for the analysis of metals including ions at very low concentrations. ICP-MS is most accurate for ions in low-volume/low concentration samples.¹² However, because of the high cost of the equipment, it is rarely used in the analysis of ions.¹² Here we show, to the best of our knowledge, the first use of CMD with ICP-MS to define the human ionic profile of the ISF. We present data on the ionic fingerprints of the different regions of the injured brain in a cohort of patients with TBI and malignant infarction.

CLINICAL MATERIAL AND METHODS

Study design and sample collection

A prospective study was conducted in patients aged above 17 years admitted to the Neurotraumatology Intensive Care Unit at Vall d'Hebron University Hospital with moderate/severe TBI (Glasgow coma scale score below or equal to 13) or malignant stroke (MS). All patients received ICP and CMD monitoring during 48 hours post-injury or MS onset between February 2011 and July 2014. All provisions of the Declaration of Helsinki were followed. Briefly, a CMA-71 CMD catheter with a 100-kDa cut-off membrane (8010320, M Dialysis AB, Stockholm, Sweden) was used in all the patients; the position of the probe was confirmed with a computed tomography (CT) scan conducted within the first 12 hours after probe implantation as previously described.⁵ The CMD catheters were usually inserted in non-injured brain tissue and/or in regions of interest according to the previously described methodology.¹³

Patients who underwent surgical treatment of posterior fossa lesions, and did not present any abnormality in the supratentorial compartment were included as a control group. Patients had an Evans index ≤ 0.30 and required the implantation of an intraventricular catheter to drain cerebrospinal fluid (CSF) during surgery and at least 24 hours postoperatively. During the intraventricular catheter implantation, a CMA-71 probe was also inserted in parallel via the same burr hole in the posterior frontal region 10.5 cm from the nasion and 3 cm from the midline (**Figure 1A**). This cohort was part of a different research study to define the range of reference for energy brain metabolism. During the operating room procedure, the catheter was connected to a microinfusion pump (CMA-402, M Dialysis AB) that was perfused with the same CNS perfusion fluid used before. At the end of the surgical procedure, perfusion was interrupted and restarted approximately 16 hours after surgery when the patient was awake. At this point, the CMD catheter was connected to a portable microinfusion pump (CMA-106, M Dialysis AB) at a fixed flow rate of 0.3 μ L/min. The samples were collected hourly for 6 consecutive hours. All provisions of the Declaration of Helsinki were followed. The Internal Review Board of Vall d'Hebron University Hospital in Barcelona approved these studies (PR-ATR-286/2013 and PR-AG-140/2011) and written informed consent was obtained from all of the patients or the patient's next-of-kin.

Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Analysis

In this study, the determination of all ions was performed on an ICP-MS analyzer (Agilent 7500ce, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) with collision cell technology using He as inert gas at 5 mL/min. All assays were conducted by expert personnel at the Chemical Analysis Service of the *Universitat Autònoma de Barcelona* (UAB). For CMD samples, the minimum volume needed to perform the ion measurements is 12 μ L. The Iscus Flex analyzer consumes 5 μ L for routine bedside analysis of glucose, lactate, piruvate and glycerol and 8 μ L if glutamate is included. Because of this, it was necessary to pool the residual content of 2 microvials to obtain the minimum required volume for assaying TBI and stroke samples. In the control group—in which glutamate was not quantified—the residual volume of one microvial was sufficient for the analysis. For ICP-MS analysis, 15 μ L of the pooled or 12 μ L of the residual sample was diluted in 1% HNO₃ (v/v) to obtain a final volume of 2.5 mL or 2 mL, respectively. The lower limit of detection for the Agilent 7500ce, on diluted samples, was 5 mmol/L for Na⁺, 1 mmol/L for K⁺ and 5 mmol/L for Cl⁻; its coefficient of variation was between 0.4 and 1.4%. For TBI and MS samples, the microvials corresponding to the first 24 hours of monitoring were defrosted on ice to yield 12 determinations per patient. In the control group, the first 2 microvials collected during the waking state were used to determine the ionic profile as described above.

ICP-MS versus ion-selective electrode

To verify whether we can use our previously defined linear model to determine the ionic concentrations in the brain ISF⁵, we performed a validation study comparing the selective ion electrodes from the AU5400™ analyzer (Diagnostic Systems Group, New York, USA) used previously⁵ and the new ICP-MS analyzer described here. For this validation study, 20 CSF samples were collected during routine analysis from neurosurgical patients who needed either lumbar or ventricular drainage to treat their primary pathologies. The extracted CSF volumes were centrifuged at 4000 rpm for 5 minutes, and the supernatant was aliquoted into 2 tubes that were stored at 4°C until analysis. Ion determination was performed both with

the AU5400™ analyzer as described previously⁵ and with the ICP-MS.

Brain tissue definitions

All CT scans and magnetic resonance imaging (MRI) of stroke patients were reviewed by one of the authors (JS) that was blinded to the results. The CT scan closest to the hours of the microdialysate analysis was used to determine the position of the CMD probe. The region of the brain sampled by the CMD catheter was categorized in one of the following categories defined operatively for this study: normal brain, ischemic core, traumatic core, traumatic penumbra and ischemic penumbra. **Normal injured brain** was defined when the CMD tip was inserted in a region of the brain without any macroscopically visible abnormality (blood or hypodense lesion). To consider the brain to be “normal”, the closest hemorrhagic/hypodense lesion must be located at least 30 mm from the tip of the CMD catheter (**Figure 1B**). **Ischemic penumbra** was defined for patients with MMCAI in which the tip of the CMD probe was placed in a brain region of normal macroscopic appearance around the core with no changes in brain tissue attenuation in a non-contrast CT scan; these regions had to be at least 20 mm away from any brain region with parenchymal abnormalities (**Figure 1C**). **Traumatic penumbra** arbitrarily defines the position of the probe in the brain parenchyma without any changes in attenuation and that is at least 20 mm away from any intraparenchymal lesion (contusions, hematomas, etc.). The traumatic penumbra is also considered when the probe was located in the brain immediately below any significant extra-cerebral hematoma (**Figure 1D**). The **traumatic core (TC)** was defined in TBI patients when the CMD probe was placed in areas of brain tissue that had macroscopically obvious lesions such as contusions, hemorrhages or when the CMD probe had a small hemorrhagic lesion on the tip (**Figure 1E**). **Ischemic core (IC)** tissue was defined when the patient had a confirmed diagnosis of malignant middle cerebral artery infarction (MMCAI), and the CMD probe was located in a hypodense lesion with or without a hemorrhagic component. In most patients, the probe was inserted after completing a decompressive craniotomy (**Figure 1F**).

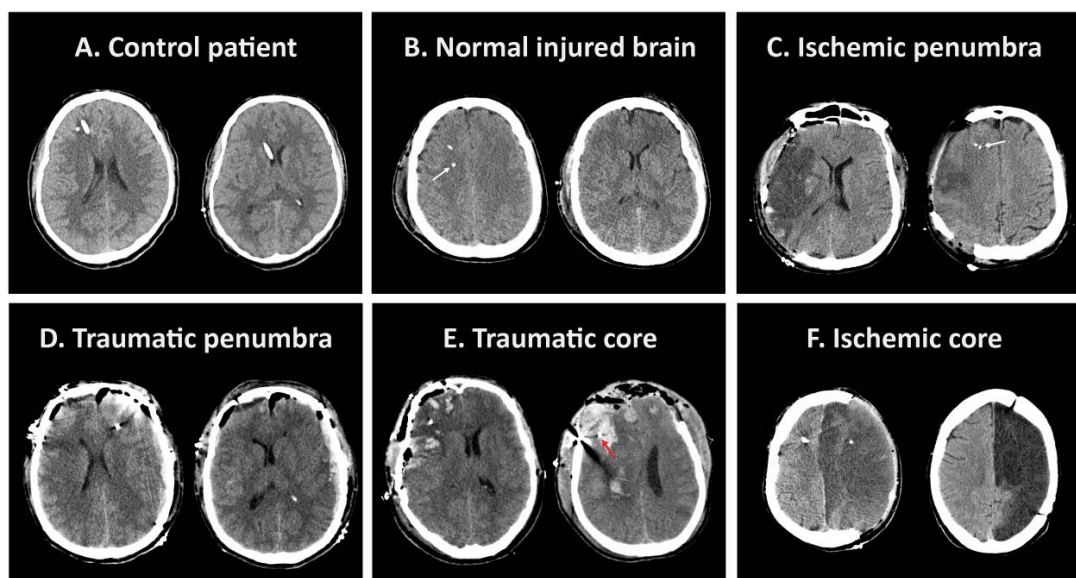


Figure 1. Examples of the different brain areas defined according to the placement of the cerebral microdialysis (CMD) catheter. For further explanation, see the Material and Methods section. **A. Control patient.** A 34-year-old male operated of a right giant vestibular shwannoma. The tip of the cerebral microdialysis probe is shown on the left of the ventricular catheter that is placed in the right frontal horn. **B. Normal injured brain.** A 46-year-old male admitted to the neurocritical care unit after severe TBI with an admission Glasgow coma scale (GCS) score of 4. The patient was included in the diffuse injury II of the Marshall's classification. The control computed tomography (CT) showed that both the CMD probe (arrow) and the PtiO₂ probe (anterior to the CMD probe) were inserted in the frontal subcortical white matter in a brain region without any observed gross abnormality. **C. Ischemic penumbra.** A 46-year-old male admitted to our institution 5 hours after an abrupt onset of left hemiparesis. The National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) score on admission was 13. Because of the clinical and neuroradiological evolution to a malignant stroke, the patient underwent decompressive hemicraniectomy 32 hours after the stroke onset. On the left CT scan, the infarction extension is seen with preservation of the anterior cerebral artery territory. On the right CT, the CMD catheter (arrow) is shown 27 mm from the hypodense lesion (ischemic core). **D. Traumatic penumbra.** A 52-year-old male was injured in a blast. His GCS score on admission was 5. The patient was operated on admission of a left-acute subdural hematoma, left frontal contusion, and a right extradural hematoma. A CMD probe was inserted at the end of surgery in the left frontal lobe (left CT scan). **E. Traumatic core.** A 48-year-old male was admitted because he suffered a head injury in his workplace. His GCS score on admission was 7. The patient was immediately operated on for evacuation of right hemorrhagic contusion and a bifrontal extradural hematoma. A bifrontal decompressive craniectomy was also conducted. In the control CT, the PtiO₂ probe is seen in the left CT, and the CMD is visible on the right slice (arrow). Some metallic artifacts are generated by a 8-electrode electrocorticography strip placed on the right frontal lobe. **F. Ischemic core.** A 52-year-old male who underwent decompressive hemicraniectomy because of a malignant stroke 14 hours after stroke onset. The control CT showed the MD probe inserted in a large area of hypo-attenuation corresponding to the core of the infarction. The control CT scan of the same patient one year after surgery (right) shows the residual hypodense necrotic brain.

Statistical Analysis

Descriptive statistics were obtained for each variable. For continuous variables, the summary statistics were the mean, median, range and the standard deviation. Percentages and sample sizes were used to summarize categorical variables. The Shapiro-Wilk's test and inverse probability plots were used to test whether the data followed a normal distribution. Descriptive statistics were obtained for

each variable. For continuous variables that followed a normal distribution, summary statistics were the mean, median, range and the standard deviation. Median, minimum and maximum values were used to summarize non-normally distributed variables. To compare the ionic profile in the different groups, a one-way ANOVA or the non-parametric Kruskal-Wallis or one-way analysis of variance by ranks was used. Multiple pairwise comparisons to identify which group or groups were significantly different were

were conducted with the Tukey's test in ANOVA and with Nemenyi's test for the non-parametric multiple comparisons of the ranked data. Statistical analyses were performed with R software v3.1.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <http://www.R-project.org>) and the integrated development environment R Studio v0.98.1103 (RStudio, Inc., Boston, MA, USA; <http://www.rstudio.com>) The *car* package was used for regression analysis. The Bland and Altman method was used to assess the agreement between the 2 analyzers¹⁴ and to calculate the limits of agreement and their 95% CI (<http://CRAN.R-project.org/package=BlandAltmanLeh>). Unless otherwise specified, differences were considered to be statistically significant for $p \leq 0.05$.

RESULTS

Comparison between the ion-selective electrode and ICP-MS analyzers

Twenty ventricular CSF samples from a cohort of 20 neurosurgical patients (7 males and 13 females) with a median age of 45 years (range: 1–74 years) were analyzed with both the ion-selective electrode and ICP-MS analyzers to assess their agreement and bias. The agreement between both methods was excellent and within $1.96 \pm$ SD of the mean

difference for all ions, despite to the fact that the AU5400 analyzer slightly overestimated $[Na^+]_{CSF}$ (Figure 2).

Descriptive data of included patients in the microdialysis study

A total of 34 patients were included; 21 patients had a severe TBI, and 13 had a nMCI. In stroke patients, CMD sampling was initiated a median of 34.5 hours after stroke onset (range: 21–47 hours); CMD sampling was initiated a median of 31 hours after injury in TBI patients (range: 9–47 hours). **Table 1** lists a summary of the demographic and clinical data. The 34-patient group yielded 374 verified samples. In **Table 2** we present a summary of $[Na^+]_o$, $[K^+]_o$ and $[Cl^-]_o$ by primary pathology (TBI or MMCAI) and the CMD catheter location (normal brain, TC, IC and penumbra).

The control group consisted of 7 patients (1 male and 6 females) with a median age of 38 years; this group yielded 14 samples (**Table 1**). The ionic profiles of the awake controls are summarized in **Table 2**. We accepted a percentile of 97.5 to define the upper reference limit, which corresponded to 161.6 mmol/L for $[Na^+]_o$, 4.1 mmol/L for $[K^+]_o$ and 157.3 mmol/L for $[Cl^-]_o$. All of the values in **Table 2** were corrected with the linear method described elsewhere.⁵

Table 1. Summary of demographic data

Group	N	Age	GCS	NIHSS	GOSE	mRS
TBI	21	34 (18 - 57)	5 (3 – 15)	NA	3 (1 – 8)	NA
MMCAI	13	52 (36 – 65)	NA	19 (23- 14)	NA	4 (3 – 6)
Control	7	38 (22 – 60)	NA	NA	NA	NA

Summary data are presented as median (min - max). TBI: Traumatic brain injury; MMCAI: malignant middle cerebral artery infarction; GCS:Glasgow coma scale score; NIHSS: National institute of health stroke scale; GOSE: Glasgow outcome scale extended; mRS: modified Rankin Scale. NA: not applicable

Ionic profile in the 'normal' injured brain

With the criteria noted above, 5 patients (all in the TBI group) had a CMD probe placed in their macroscopically normal brain. This group yielded 59 dialysates. The summary statistics for $[Na^+]_o$, $[K^+]_o$ and $[Cl^-]_o$ are listed in **Table 2**. Only 8 values (all corresponding to the same patient) had a $[Na^+]_o$ above 162 mmol/L, and a 2 observations had a $[K^+]_o$ above 4.1 mmol/L for $[K^+]_o$. The differences between the mean concentrations and the control group were not statistically significant for any of the ions. Although, the difference in mean $[Cl^-]_o$ was 12 mmol/L (141 ± 9.3 in the controls versus $153.8 \pm$

11.38 mmol/L in the normal injured brain), this difference did not reach statistical significance (t-test, $p = 0.0574$).

Ionic profile of the ischemic and traumatic core

Twelve patients had the tip of the CMD placed in the hypodense ischemic core. The probe was placed under direct vision at the surgical procedure for all patients (**Figure 1F**). This group provided 141 valid microdialysate samples for the ICP-MS assay. Summary statistics are listed in **Table 2**. Thirty-five values (24.8%) had a $[Na^+]_o$ above 162 mmol/L, and 88 observations (62.4%) had a $[K^+]_o$ above 4.1 mmol/L (Figure 3). Despite the fact higher $[Na^+]_o$

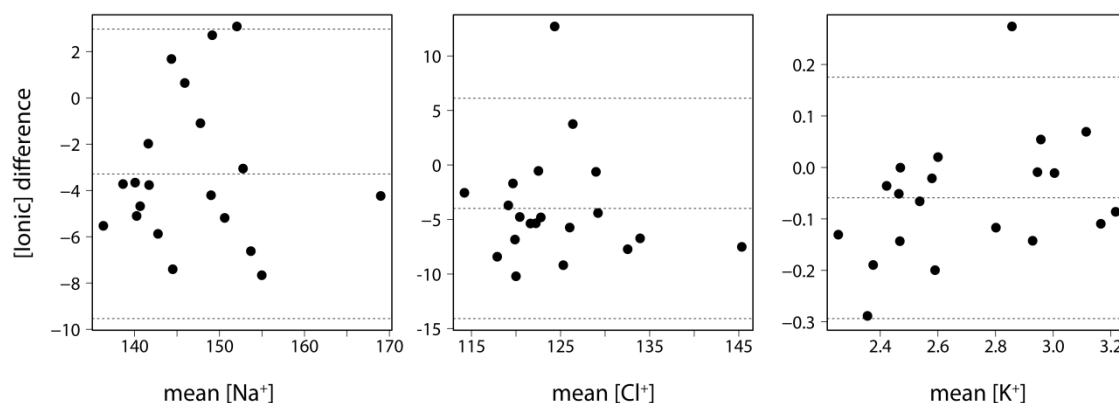


Figure 2. Bland and Altman's graph evaluating the agreement between the measurements of the ion-selective and the ICP-MS analyzer. The composite plot compares the ICP-MS with the ion-selective electrode for each ion (Na^+ , K^+ and Cl^-). The difference between the 2 measurements is on the Y axis, and the mean of the 2 measurements for each ion is shown on the X axis. The 95% limits of agreement are shown as 2 dashed lines.

values were found in the IC compared with the normal tissue in TBI and in the controls, these differences were not statistically significant. However, the $[\text{K}^+]_o$ levels were statistically significant when compared with both the controls and the probes placed in the normal brain (Kruskal-Wallis test, $p < 0.001$) (**Figure 3**). In all the samples, $[\text{Cl}^-]_o$ increased or decreased linearly with $[\text{Na}^+]_o$ (**Figure 4B**) with a Pearson product-moment correlation coefficient of 0.93 ($p < 0.001$).

According to the definitions noted before, 6 patients had the CMD probe placed in zones with gross lesions as a result of TBI. These patients yielded 61 samples, and the summary statistics are

presented in Table 2. Thirty-eight values (52%) had a $[\text{Na}^+]_o$ above 162 mmol/L, and 49 observations (80%) had a $[\text{K}^+]_o$ above 4.1 mmol/L (**Figure 3**). The differences between the mean concentration and the control group were statistically significant for all of the analyzed ions (Kruskal-Wallis test, $p < 0.001$). The samples with $[\text{Na}^+]_o$ above 162 mmol/L also had a high $[\text{Cl}^-]_o$ (median 182.9 mmol/L, min: 151.6, max: 276.2) but did not show a significantly higher $[\text{K}^+]_o$ (median 6.2 mmol/L, min: 2.69, max: 11.01), suggesting that a reduction in the volume of the extracellular space, and therefore ionic concentration, was not the main cause of the high $[\text{Na}^+]_o$ (**Figures 3 and 4**).

Table 2. Ionic concentration by probe tissue location

Group	$[\text{Na}^+]_o$ mmol/L	$[\text{K}^+]_o$ mmol/L	$[\text{Cl}^-]_o$ mmol/L
Control group	149.9 (144.4 – 161.8)	3.03 (2.78 – 4.08)	140.1 (126.1 – 158.5)
Normal brain	145.5 (115.5 – 169.1)	3.08 (2.64 – 6.47)	150.2 (119.6 – 179.9)
Penumbra	150.8 (123.9 – 219.9)	3.58 (2.32 – 6.07)	155.7 (117.3 – 224.4)
Ischemic core	149.7 (132.7 – 223.1)	5.25 (2.48 – 19.9)	152.0 (136.7 – 228.3)
Traumatic core	163.0 (143.2 – 264.3)	5.43 (2.56 – 11.0)	166.5 (136.4 – 276.2)

Values are summarized as median (min – max)

Ionic profile of the ischemic and traumatic penumbra

According to our criteria, only one patient with a malignant infarction had the CMD probe inserted in the ischemic penumbra, and 10 patients had the probe inserted in the traumatic penumbra (perilesional). As a result, the 11 patients were pooled together to yield 113 samples for analysis.

The summary statistics are presented in **Table 2**. Twenty-seven samples (23.4%) had a $[\text{Na}^+]_o$ above 162 mmol/L, and 34 samples (30%) had a $[\text{K}^+]_o$ above 4.1 mmol/L (**Figure 3**). The $[\text{Na}^+]_o$, $[\text{K}^+]_o$ differences were statistically significant when compared both with controls and the normal injured brain (**Figures 3 and 4**). $[\text{Cl}^-]_o$ differences were statistically significant between penumbra and controls ($p = 0.009$) but not when $[\text{Cl}^-]_o$ in the

penumbra was compared with the $[Cl^-]_o$ in the normal injured brain ($p=0.76$). As occurred in all the other samples, $[Cl^-]_o$ increased or decreased linearly with $[Na^+]_o$ (Figure 4B).

DISCUSSION

The feasibility of implementing a reliable method to monitor the brain ionic content in neurocritical patients was introduced by our group in a previous study in which we also showed that the ionic concentrations can be reliably calculated from the dialysate by using a least-squares linear regression model; additionally, we showed that RR was close to 100% for all ions of interest.⁵ Recently, Antunes et al. have also shown that the in vitro RR for K^+ was between 91 and 100% in the same probe we used.¹¹ The main limitation of our previous methodology was the poor temporal resolution; this is a drawback intrinsic to most ion-selective analyzers that in our case required at least 85 μL for the ionic assay and therefore pooling at least 8 microvials.⁵ A method of dealing with this shortcoming is to increase the infusion speed from the standard 0.3 $\mu L/min$ to 0.5 – 1.0 $\mu L/min$. However, this increase reduces the ionic recovery and therefore decreases the lower limit of detection for K^+ in some commercial analyzers; note also that $[K^+]_o$ is the most relevant biomarker to define brain tissue viability.^{10, 15} In addition, increasing the infusion speed also reduces the RR of the energy metabolites used at the bedside (lactate, pyruvate, and glucose)¹⁶⁻²⁰ and adds excessive complexity to a monitoring system that already increases the workload of the neurointensive care personnel significantly. ICP-MS is the best method available to improve the temporal resolution of ion assays and allows extremely low detection limits—in the parts per million (ppm) levels—in samples of less than 20 μL . When we compared ICP-MS with the ion-selective electrode analyzer used in our previous study,⁵ we observed that the correlation between both methods was excellent, and, consequently, chemistry analyzers used in most hospitals are excellent alternatives to ICP-MS, except for their low temporal resolution. To our knowledge, this is the first study to explore the ionic profile of different areas of the injured brain in patients with acute brain injuries and malignant ischemic stroke. In their seminal study, Reinert et al. presented CMD data only for $[K^+]_o$ in 85 patients with severe TBI.⁷ Here, we also incorporated a small cohort of awake patients without supratentorial disease that were used as controls.

The ionic profile of the normal brain

For ethical and methodological reasons, the ionic normal range for the human brain ISF has not been published yet. Most studies have used instead the reference levels measured in the CSF as surrogates. It is assumed that $[Na^+]$ takes about 2 hours to equilibrate between blood and CSF,²¹ but the equilibrium between brain ISF and the CSF is very fast in mammals. Harrington et al. showed that $[Na^+]_{CSF}$ was 10 mmol/L higher than $[Na^+]$ in the plasma of both migraineurs and controls, and that in the same control group, the mean $[Na^+]_{CSF}$ was 145 mmol/L with an upper reference limit of 153 mmol/L.²² These limits were very similar to the upper limits previously defined by our group in the CSF of normal volunteers: 164 mmol/L for $[Na^+]_{CSF}$, 3.6 mmol/L for $[K^+]_{CSF}$ and 144 mmol/L for $[Cl^-]_o$.⁵ In our awake controls, mean $[Na^+]_o$ was 150.6 mmol/L with an upper reference limit of 162 mmol/L (with a concentration of 138 mmol/L in plasma).

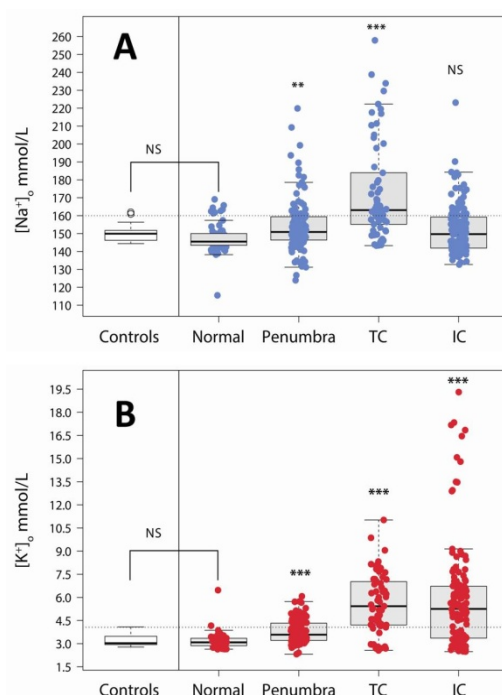


Figure 3. Box-plots showing the $[Na^+]_o$ (A) and $[K^+]_o$ (B) in the different brain tissues and also in awake controls. Penumbra, TC and IC were compared with the ionic content of the normal brain tissue by Kruskal–Wallis one-way analysis of variance. Multiple pairwise comparisons were used to identify which group or groups were significantly different using Nemenyi's test. For explanation see text. NS: statistically non-significant. ** $p \leq 0.05$, *** $p < 0.001$. Penumbra: traumatic and ischemic penumbra; TC: traumatic core; IC: ischemic core.

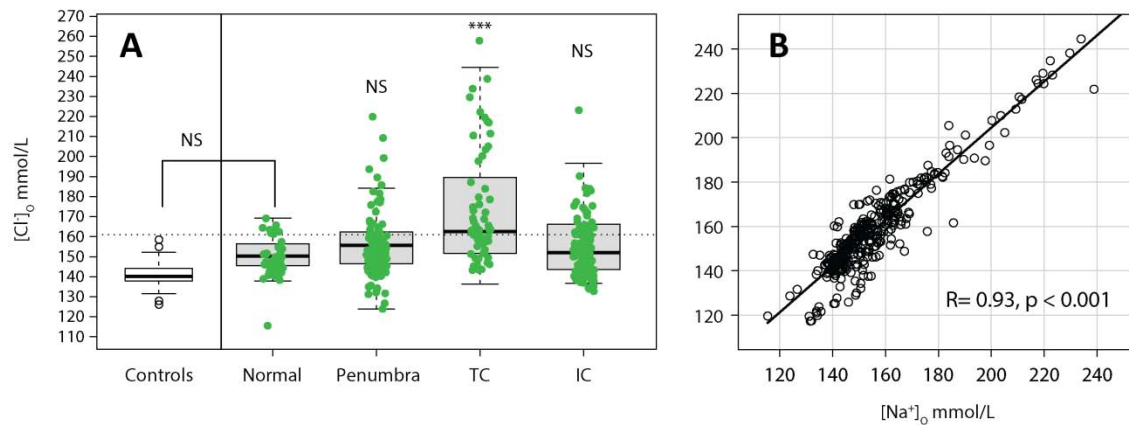


Figure 4 (A and B). **A.** Box-plots showing the $[Cl^-]_o$ in the different brain tissues and also in awake controls. Penumbra, TC, and IC were compared with the normal brain tissue by Kruskal–Wallis one-way analysis of variance. Multiple pairwise comparisons were used to identify which group or groups were significantly different using Nemenyi's test. **B.** Scatterplot in which on the horizontal axis the $[Na^+]_o$ of the whole cohort is shown. The $[Cl^-]_o$ is shown on the Y axis. Each dot on the scatterplot represents one observation from the whole data set. A linear positive relationship with a Pearson R of 0.93 was found between both variables showing that on average an increase/decrease in $[Na^+]_o$ was followed by an expected coupled increase/decrease in $[Cl^-]_o$. For explanation see text. NS: statistically non-significant. ** $p \leq 0.05$, *** $p < 0.001$. Penumbra: traumatic and ischemic penumbra; TC: traumatic core; IC: ischemic core.

However, the reason for this isolated increase in $[K^+]_o$ and its clinical relevance is only speculative. In all samples, $[Cl^-]_o$ was linearly related to $[Na^+]_o$, as shown in **Figure 4B**; this demonstrates that, as expected, anions and cations are distributed to achieve electroneutrality.

Ionic profile in the ischemic and traumatic core

To our knowledge, this is the first report that explores invasively the complete ionic profile in the human ischemic brain. Our CMD samples in malignant stroke came from infarcted tissue that was analyzed very late after stroke onset (median time 34.5 hours for the first sample). Therefore, the ionic profile corresponded to necrotic tissue that on neuroimaging studies always evolved to an encephalomalacic brain (**Figure 1F**). The ionic profile of the IC was characterized by very high $[K^+]_o$ in 62% of the samples and an increase in $[Na^+]_o$ in only 20% of the samples. The brain total Na^+ content ($[Na^+]_{brain}$) has been studied extensively in both experimental models of infarction and in human ischemic stroke. In animal models of middle cerebral artery (MCA) occlusion, it has been shown that $[Na^+]_{brain}$ rises continuously during the first 8 hours after stroke onset.²⁸ This principle is the rationale to estimate the time after stroke onset and the brain tissue viability by sodium MRI.²⁹ However, these experiments showed the increase in the total content of $[Na^+]_{brain}$ early after the stroke onset, and it needs to be emphasized that the $[Na^+]_{brain}$ does not

necessarily correlate with the $[Na^+]_o$ measured by microdialysis in the ISF. High $[K^+]_o$ is a good biomarker for the severity of brain damage both in experimental models and in patients with severe TBI (i.e., those with high ICP or brain hypoxia), aneurysmal subarachnoid hemorrhage, and ischemic or hemorrhagic stroke.^{6-9, 11, 15} Antunes et al. showed in aneurysmal subarachnoid hemorrhage that $[K^+]_o$ does not correlate with the plasmatic levels.¹¹

Infarcted brains suffer terminal depolarization at early stages and later oncotic destruction of the brain cells if ischemia persists. Oncotic cell death releases huge amounts of K^+ into the ISF from the intracellular pool. In experimental models of permanent MCA occlusion, the changes in $[K^+]_o$ are explosive in nature, and $[K^+]_o$ increases suddenly from approximately 3 mmol/L to more than 50 mmol/L in the few seconds after the onset of ischemia.¹⁵ In the same model, the ischemic core showed little $[K^+]_o$ dissipation within 3-hours after artery occlusion.¹⁵ Accumulation of $[K^+]_o$ can be extremely high if a significant brain volume becomes infarcted and if the infarcted tissue has an hemorrhagic component, because hemolysis contributes to the increase in the total K^+ content within what could be considered as a brain homogenate. Released K^+ is usually cleared by the glial cells of the penumbra and by bulk flow to the CSF; however, both mechanisms become inoperative at the ischemic core and are dysfunctional in the ischemic penumbra that may

also have an increased $[K^+]_o$. Infarcted tissue maintains high levels of K^+ that if unbuffered may affect the viability of the penumbral tissue or even the normal brain.

Paradoxically, in the IC, $[Na^+]_o$, $[Cl^-]_o$ and $[K^+]_o$ were within the reference limits in 32.6% of the analyzed samples. This was the reason why, on average, the differences between the ionic content for $[Na^+]_o$ and $[Cl^-]_o$ were not significantly different than in the non-injured brain (**Figure 3 and 4**). Our hypothesis to explain this phenomenon is that necrotic tissue at the IC is a strong magnet for water and that the initial increase in ions are apparently normalized by the massive amount of water that enters the IC and dilutes them. This phenomenon has not been reported before because of the relatively short recording time in experimental models of ischemic stroke that usually do not exceed a follow-up of 6 - 8 hours.^{15,}

²⁸ Therefore, in brain monitoring, the hallmark of irreversible-damaged tissue needs to be defined taking into consideration the temporal evolution of the ionic profile. Isolated measurements can be misleading when ionic concentrations are within the normal range if previous values are unknown.

An in-depth discussion of the mechanisms involved in the strong attraction of water by the core is beyond the aim of this study. In brief, the main characteristic in any type of severe brain damage is that cell membranes lose their integrity, and the fixed charge density (FCD) inside the cells, which are generated by proteins, DNA, and proteoglycans, are exposed to the extracellular medium.³ According to Lang et al., necrotic tissue can be modeled as a mixture of solid components with FCD, water, and ions. In this situation, the FCD is a powerful attractor for water via the Gibbs-Donnan effect. Blood is also a component, in some cases, of ischemic infarction and is almost constantly found in brain contusions; also, hemolysis and plasma increase the protein content of the necrotic brain. In addition to the exposed FCD, the damaged tissue also releases non-permeating solutes from the intracellular compartment that directly exert an osmotic pressure that is added to the FCD.³ The intense affinity of necrotic tissue by water has been studied extensively in post-traumatic brain contusions.³⁰⁻³² Similarly to ischemia, the contusional core is characterized by rapid pannecrosis, disintegration, and homogenization of the brain tissue,^{33, 34} which creates a powerful osmotic sink that attracts water to the contusion's core.^{31, 32, 35} The large amount of edema that accumulates in the contusion core is due to a significant increase in tissue osmolality that does not depend only of the changes in ionic

concentrations.³⁰ Kawamata et al. raised the hypothesis that injured tissue induces an accumulation of metabolic intermediate osmoles or the formation of idiogenic osmoles from the pathological degradation of lipids, proteins, DNA, and other catabolic processes that occur in the damaged tissue.³⁰ Our working hypothesis is that the attraction of water into the necrotic tissue dilutes the solutes in the brain homogenate and transforms the initially concentrated ISF into an apparently normal ionic profile.

The TC is an arbitrary term that in our study defined the structurally damaged brain. TC is a much more heterogeneous tissue than IC, and zones of injured but with still intact membranes may coexist with necrotic non-viable tissue. Similar to the IC, the main finding in TC was the significant higher levels of $[Na^+]_o$, $[Cl^-]_o$, and $[K^+]_o$ compared with controls and non-injured brain. As in IC, the leakage of $[K^+]_i$ from the intracellular compartment occurs because of the rupture of cellular membranes associated with mechanically-induced or ischemic cell death.^{6, 7} However, the main difference between IC and TC was the significantly higher $[Na^+]_o$ in the TC group (**Figure 3**). This finding was counterintuitive and difficult to explain. Because of thermodynamic reasons, $[Na^+]_o$ should not exceed $[Na^+]_{serum}$ except if active transport of Na^+ was involved, yet this cannot occur in dead brain tissue. Necrotic tissue can be theoretically modeled as a brain tissue homogenate containing blood and with a higher osmolality than the plasma and the perilesional brain. In addition, the core is surrounded by brain tissue with a BBB that is leaky and behaves more like a fenestrated endothelium. Under these circumstances, a set of possible speculative theoretical ideas that may explain these findings. 1) patients could be treated with HTS and have an increase in $[Na^+]_o$ as a consequence of high plasmatic Na^+ levels. This was not the case in our series where patients with $[Na^+]_o > 162$ mmol/L had $[Na^+]_{serum}$ within the normal range (min: 138.6, max: 166.6 mmol/L). 2) proteins released from dying cells and particularly DNA-histone complexes might release Na^+ . The relevance of osmotically inactive bound ions in the Gibbs-Donnan equilibrium has been recently shown by Nguyen and Kurtz.³⁶ Proteins and other organic molecules bind Na^+ that can be released in the process of cell desintegration. 3) An increase in the negatively charged protein concentration in the TC attracts positively charged Na^+ ions into the core, thereby leading to an increase in the $[Na^+]_o$. 4) The preload of cells with Na^+ in the early phases of injury due to cytotoxic edema can release a higher $[Na^+]_i$ into the necrotic tissue. 5) The

increased activity of Na^+/H^+ exchangers in the traumatic penumbra may release Na^+ to the core that will act as an inert sink. The role of Na^+/H^+ exchangers and other sodium transporters in ischemia has been discussed by O'Donnell in a recent review.³⁷ However, these hypotheses are speculative and have only the purpose to frame the issue of a significantly increased Na^+ in the TC. Any further clarification of this counterintuitive paradox requires further experimental studies in animal models in which experimental conditions can be well controlled, and the ionic profile together with the temporal evolution of the ionic profile, brain tissue osmolarity, protein content, and the total content of idiogenic osmoles should be measured.

The blood-brain barrier is highly permeable to sodium in the penumbra

The accurate identification of penumbral brain in TBI is clinically relevant because it can identify patients who could benefit from changing their management and in designing future clinical trials of potential neuroprotective drugs. Our main finding in traumatic penumbra was a completely normal ionic profile for $[\text{Na}^+]_o$ and $[\text{K}^+]_o$ in 60% of the samples. Our study confirms the findings of Wetterling et al. who showed that the ischemic penumbra may be defined as a region of reduced blood supply in which the sodium concentration gradient is still maintained.³⁸ An isolated increase in $[\text{Na}^+]_o$ accompanied with an increased $[\text{Cl}^-]_o$ to preserve electroneutrality was the most frequent abnormality found, but it was found in most cases with a $[\text{K}^+]_o$ within the normal range (22 of 27 samples). The normal or moderately increased $[\text{K}^+]_o$ was the main difference with the ionic profile found in the TC/IC, suggesting that the perilesional brain is still able to buffer $[\text{K}^+]_o$ overloading. The healthy brain has exquisite mechanisms to buffer the excess of $[\text{K}^+]_o$. Astrocytes play a critical role in brain K^+ homeostasis and are the responsible for potassium buffering by redistributing locally elevated $[\text{K}^+]_o$ through astrocyte cytoplasm and the gap junctions.³⁹ Moderate increases in $[\text{K}^+]_o$ can be observed in the presence of both CSD and epileptic seizures; this phenomena occurs both in the ischemic and traumatic penumbra. Another explanation for the increase in $[\text{K}^+]_o$ found in penumbral tissue is its diffusion from the adjacent ischemic core from focal hemorrhagic brain lesions found in TBI.¹¹ Hubschmann and Kornhauser, in experimental models of intracerebral hemorrhage in cats, showed that acute injection of blood in the brain induces an acute depolarization of the cortex with a significant increase in $[\text{K}^+]_o$ to values of 18-

28 mmol/L. However, this transient peak was rapidly buffered and returned to baseline 2-4 minutes after the injection.⁴⁰

The isolated increase of $[\text{Na}^+]_o$ in the penumbra suggests an increased permeability of the BBB to Na^+ . The fact that $[\text{Na}^+]_o$ accumulates in ISF might indicate early stages of ionic or vasogenic edema that have been described in the ischemic and injured brain.⁴¹⁻⁴³ Simard et al. have shown that the sulfonylurea receptor 1 - transient receptor potential melastatin 4 (SUR1-TRPM4) ion channel is overexpressed in the endothelial and neural cells of the ischemic and injured brain and that this channel is the main driver of the increase in $[\text{Na}^+]_o$.^{44, 45} Recently, we have shown that SUR1, the regulatory unit of this channel, is significantly overexpressed in the perilesional brain around human brain contusions and that upregulation of SUR1 is an important molecular player in the pathophysiology of these lesions.⁴⁶ In addition, as shown in ischemia, Na-K-Cl cotransporters and Na^+/H^+ exchangers in endothelial cells and also in glia and neurons are actively involved in ischemic edema and in the fluxes of Na^+ .³⁷

The increased permeability of the BBB to Na^+ found in our study raises some concerns about the use of HTS in TBI patients and malignant stroke. Boluses of HTS increase the intravascular volume, augment cardiac output, improve capillary perfusion, and decrease brain water content.⁴⁷ The rationale behind the effect of HTS is based on the idea that the reflection coefficient for Na^+ in the BBB is very high. However, Kurland et al. showed in post-traumatic contusions that the permeability of the surrounding tissue (penumbra and parapenumbra in Simard's terms) has a very low reflection coefficient for Na^+ because of the overexpression of the SUR1-TRPM4 ion channel that facilitates the movement of huge amounts of sodium to the damaged brain tissue.⁴³ Our data suggest that the use of HTS in patients with significant areas of damaged brain—in which the BBB may have an increase permeability to Na^+ —should be reconsidered. The ionic profiles, before and after HTS boluses, should be studied to have a clear understanding of Na^+ fluxes into the brain when using these solutions.

Limitations of the study and future directions

This study should be considered a pilot study conducted essentially to further elucidate pathophysiological mechanisms of secondary brain injury in patients with TBI and MS and to generate new hypotheses. Our study presents some limitations that merit discussion. The most important one is that our methodology only

calculated the ionic concentration corresponding to an average of the last 2 hours of monitoring. However, ICP-MS can measure ions hourly if the number of analyzed metabolites at the bedside are reduced to 3 (lactate, pyruvate, and glucose). Therefore, in our study, the rapid fluxes in extracellular $[K^+]_o$, $[Na]_o$, and $[Cl]_o$ could not be studied, and we missed the transient increases/decreases in ions that have been frequently observed in seizures and CSD. However, hourly trends are still very useful as a method that may accurately identify brain tissue at risk and also the abnormal permeability of the BBB. A second drawback is the limited size of our control group. From our data it would be inappropriate to infer the upper reference limits of the ionic profiles that might change if more patients were included. However, for the first time we have provided data about the ionic concentrations found in the ISF of patients without brain lesions, and these data were in agreement with the reference limits described by others in the CSF.

A third limitation is that our data in IC came from patients with massive infarctions that were monitored very late after stroke onset, because CMD probes were placed during decompressive surgery. Although these patients were excellent examples to understand and clarify the changes in the ionic profile of the necrotic tissue, they were not useful to understand the changes that occur early after the stroke onset and to define the thresholds for $[K^+]_o$ and $[Na]_o$ that mark the transition from tissue at risk to irreversibly-damaged brain. Further studies of the ionic profile integrated with information about energy metabolism (lactate, pyruvate, and glucose) and with the study of the temporal profile for each analyte are needed to define a 'viability index' for the brain tissue that might be used at the bedside in neurocritical patients. This viability index could be helpful to characterize the metabolic distressed brain and to differentiate them from areas that are irreversibly damaged. Our study could not explain the counterintuitive finding of increased $[Na]_o$ in patients in which the CMD was placed inside a traumatic lesion (TC). We could only raise some hypotheses that need verification in additional studies with a different design and in animal models with a brain size that allows conduct CMD in the same way it is monitored in neurocritical patients. There is a clearly need for a large animal model and our group is working on it.

To conclude, we believe ICP-MS coupled to ionic assays is a powerful tool for a better understanding of the complex ionic disturbances that occur after severe TBI and ischemic and hemorrhagic stroke.

Despite some of its intrinsic limitations, the main advantage of CMD is that it is the only monitoring method that allows repeated measurements of ionic concentrations together with other analytes in humans and with an acceptable risk.¹³ In addition, unlike ion-selective sensors, CMD allows for many physiological and biochemical processes to be studied simultaneously in the living brain. Thus, it is a powerful tool for to better understand the complex pathophysiology of the BBB disruption, and it is a good method to monitor brain edema and rationalize the use of HTS solutions. In addition, the routine use of CMD in the exploration of the ISF ionic profile of different regions of the injured brain opens up an exciting avenue to explore the complexities of the ionic disturbances, the classification of the different types of brain edema, and the design of a viability index that can be used to explore the effects of therapeutic strategies in the acute damaged brain.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are very grateful to Professor J. M. Simard from the Department of Neurosurgery, University of Maryland for critical reviewing the manuscript and providing relevant scientific input. The Neurotraumatology and Neurosurgery Research Unit is supported by a grant from the Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (SGR 2014-844). This work has been supported in part by the *Fondo de Investigación Sanitaria* (Instituto de Salud Carlos III) with grants PI10/00302 and FIS PI11/00700, which were co-financed by the European Regional Development and awarded to Drs. M.A. Poca and J. Sahuquillo, respectively. T. Martínez-Valverde and A. Sánchez-Guerrero are the recipients of personal predoctoral grants from the Instituto de Salud Carlos III (grants number FI11/00195 and FI12/00074, respectively).

Author contributions to the study

Author contributions to the study and manuscript preparation include the following. Conception and design: Sahuquillo, Martínez-Valverde, Poca. Acquisition of data: Martínez-Valverde, Vidal-Jorge, Sánchez-Guerrero, Torné, Castro, Gándara. Analysis and interpretation of data: Sahuquillo, Martínez-Valverde, Munar. Statistical analysis: Sahuquillo, Martínez-Valverde. Drafting the article: Sahuquillo, Martínez-Valverde. Critically revising the article: all authors. Reviewed submitted version of manuscript: all authors. Approved the final version of the manuscript on behalf of all authors: Sahuquillo. Study supervision: Sahuquillo.

Author Disclosure Statement

The authors report no conflict of interest concerning the materials or methods used in this study or the findings specified in this paper.

REFERENCES

- Somjen GG. *Ions in the brain: normal function, seizures, and stroke*, Oxford University Press: Oxford ; New York, 2004.
- Purves WK. Cellular Membranes. In: Purves WK (ed) *Life, the science of biology*, 7th edn. W.H. Freeman & Co.: Gordonsville, VA, 2004, pp 87-105.
- Lang GE, Stewart PS, Vella D, Waters SL, Goriely A. Is the Donnan effect sufficient to explain swelling in brain tissue slices? *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society* 2014; 11(96): 20140123.
- Le Roux P, Menon DK, Citerio G, Vespa P, Bader MK, Brophy G *et al.* The International Multidisciplinary Consensus Conference on Multimodality Monitoring in Neurocritical Care: evidentiary tables: a statement for healthcare professionals from the Neurocritical Care Society and the European Society of Intensive Care Medicine. *Neurocrit Care* 2014; 21 Suppl 2: S297-361.
- Martínez-Valverde T, Vidal-Jorge M, Montoya N, Sánchez-Guerrero A, Manrique S, Munar F *et al.* Brain microdialysis as a tool to explore the ionic profile of the brain extracellular space in neurocritical patients: a methodological approach and feasibility study. *J Neurotrauma* 2015; 32(1): 7-16.
- Doppenberg EM, Reinert M, Zauner A, Massie TS, Bullock R. Determinants of cerebral extracellular potassium after severe human head injury. *Acta Neurochir. (Wien). Supplement* 1999; 75: 31-34.
- Reinert M, Khaldi A, Zauner A, Doppenberg E, Choi S, Bullock R. High level of extracellular potassium and its correlates after severe head injury: relationship to high intracranial pressure. *J Neurosurgery* 2000; 93(5): 800-807.
- Valadka AB, Goodman JC, Gopinath SP, Uzura M, Robertson CS. Comparison of brain tissue oxygen tension to microdialysis-based measures of cerebral ischemia in fatally head-injured humans. *J Neurotrauma* 1998; 15(7): 509-519.
- Goodman JC, Valadka AB, Gopinath SP, Uzura M, Grossman RG, Robertson CS. Simultaneous measurement of cortical potassium, calcium, and magnesium levels measured in head injured patients using microdialysis with ion chromatography. *Acta neurochirurgica. Supplement* 1999; 75: 35-7.
- Mori K, Miyazaki M, Iwase H, Maeda M. Temporal profile of changes in brain tissue extracellular space and extracellular ion (Na(+), K(+)) concentrations after cerebral ischemia and the effects of mild cerebral hypothermia. *J Neurotrauma* 2002; 19(10): 1261-1270.
- Antunes AP, Schiefecker AJ, Beer R, Pfausler B, Sohm F, Fischer M *et al.* Higher brain extracellular potassium is associated with brain metabolic distress and poor outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Crit Care* 2014; 18(3): R119.
- Ehling S, Tefera S, Earl R, Cole S. Comparison of analytical methods to determine sodium content of low-sodium foods. *J AOAC Int* 2010; 93(2): 628-37.
- Poca MA, Sahuquillo J, Vilalta A, de los Rios J, Robles A, Exposito L. Percutaneous implantation of cerebral microdialysis catheters by twist-drill craniostomy in neurocritical patients: description of the technique and results of a feasibility study in 97 patients. *J. Neurotrauma* 2006; 23(10): 1510-1517.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1: 307-310.
- Sick TJ, Feng Z-C, Rosenthal M. Spatial Stability of Extracellular Potassium Ion and Blood Flow Distribution in Rat Cerebral Cortex After Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18(10): 1114-1120.
- Torto N. A review of microdialysis sampling systems. *Chromatographia* 2009; 70(9/10): 1305-1309.
- Lieutaud T, Dailler F, Artru F, Renaud B. Neurochemical monitoring in neurointensive care using intracerebral microdialysis. In: Westerink BHC, Cremers TIFH (eds). *Handbook of microdialysis : methods, applications and perspectives*, 1st edn. Elsevier Academic Press: Amsterdam ; Boston, 2007, pp xiv, 697 p.
- Kitagawa R, Yokobori S, Mazzeo AT, Bullock R. Microdialysis in the neurocritical care unit. *Neurosurg Clin N Am* 2013; 24(3): 417-26.
- Hutchinson PJ, Oconnell MT, AlRawi PG, Maskell LB, KettWhite R, Gupta AK *et al.* Clinical cerebral microdialysis: a methodological study. *J. Neurosurg.* 2000; 93(1): 37-43.
- Elmqvist WF, Sawchuk RJ. Application of microdialysis in pharmacokinetic studies. *Pharm Res* 1997; 14(3): 267-88.
- Davson H, Pollay M. The turnover of ²⁴Na in the cerebrospinal fluid and its bearing on the blood-brain barrier. *J Physiol* 1963; 167: 247-55.
- Harrington MG, Fonteh AN, Cowan RP, Perrine K, Pogoda JM, Biringer RG *et al.* Cerebrospinal fluid sodium increases in migraine. *Headache* 2006; 46(7): 1128-35.
- Sahuquillo J, Poca MA, Amorós S. Current aspects of pathophysiology and cell

- dysfunction after severe head injury. *Curr Pharm Des* 2001; 7(15): 1475-1503.
24. Sahuquillo J, Merino MA, Sánchez-Guerrero A, Arikan F, Vidal-Jorge M, Martínez-Valverde T *et al.* Lactate and the lactate-to-pyruvate molar ratio cannot be used as independent biomarkers for monitoring brain energetic metabolism: a microdialysis study in patients with traumatic brain injuries. *PLoS One* 2014; 9(7): e102540.
 25. Gorji A, Stemmer N, Rambeck B, Jürgens U, May T, Pannek HW *et al.* Neocortical Microenvironment in Patients with Intractable Epilepsy: Potassium and Chloride Concentrations. *Epilepsia* 2006; 47(2): 297-310.
 26. Hartings JA, Watanabe T, Bullock MR, Okonkwo DO, Fabricius M, Woitzik J *et al.* Spreading depolarizations have prolonged direct current shifts and are associated with poor outcome in brain trauma. *Brain* 2011; 134(Pt 5): 1529-1540.
 27. Strong AJ, Dardis R. Depolarisation phenomena in traumatic and ischaemic brain injury. *Advances and Technical Standards in Neurosurgery* 2005; 30: 3-49.
 28. Betz AL, Keep RF, Beer ME, Ren XD. Blood-brain barrier permeability and brain concentration of sodium, potassium, and chloride during focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994; 14(1): 29-37.
 29. Boada FE, Qian Y, Nemoto E, Jovin T, Jungreis C, Jones SC *et al.* Sodium MRI and the assessment of irreversible tissue damage during hyper-acute stroke. *Translational stroke research* 2012; 3(2): 236-45.
 30. Kawamata T, Mori T, Sato S, Katayama Y. Tissue hyperosmolality and brain edema in cerebral contusion. *Neurosurgical Focus* 2007; 22(5): E5.
 31. Maeda T, Katayama Y, Kawamata T, Koyama S, Sasaki J. Ultra-early study of edema formation in cerebral contusion using diffusion MRI and ADC mapping. *Acta Neurochir (Wien) Suppl.* 2003; 86(Journal Article): 329-331.
 32. Katayama Y, Kawamata T. Edema fluid accumulation within necrotic brain tissue as a cause of the mass effect of cerebral contusion in head trauma patients. *Acta Neurochir (Wien) Suppl.* 2003; 86: 323-327.
 33. Kawamata T, Katayama Y. Cerebral contusion: a role model for lesion progression. *Prog Brain Res* 2007; 161: 235-41.
 34. Lindenberg R, Freytag E. Morphology of cortical contusions. *AMA. Arch Pathol.* 1957; 63(1): 23-42.
 35. Katayama Y, Mori T, Maeda T, Kawamata T. Pathogenesis of the mass effect of cerebral contusions: rapid increase in osmolality within the contusion necrosis. *Acta Neurochir (Wien) Supplement* 1998; 71:289-92: 289-292.
 36. Nguyen MK, Kurtz I. Quantitative interrelationship between Gibbs-Donnan equilibrium, osmolality of body fluid compartments, and plasma water sodium concentration. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)* 2006; 100(4): 1293-300.
 37. O'Donnell ME. Blood-Brain Barrier Na Transporters in Ischemic Stroke. In: Thomas PD (ed) *Advances in Pharmacology*, vol. Volume 71. Academic Press, 2014, pp 113-146.
 38. Wetterling F, Gallagher L, Mullin J, Holmes WM, McCabe C, Macrae IM *et al.* Sodium-23 magnetic resonance imaging has potential for improving penumbra detection but not for estimating stroke onset time. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; 35(1): 103-10.
 39. Leis JA, Bekar LK, Walz W. Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia* 2005; 50(4): 407-16.
 40. Hubschmann OR, Kornhauser D. Effects of intraparenchymal hemorrhage on extracellular cortical potassium in experimental head trauma. *J Neurosurg* 1983; 59(2): 289-93.
 41. Simard JM, Kent TA, Chen M, Tarasov KV, Gerzanich V. Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol.* 2007; 6(3): 258-268.
 42. Simard JM, Kahle KT, Gerzanich V. Molecular mechanisms of microvascular failure in central nervous system injury: synergistic roles of NKCC1 and SUR1/TRPM4. *J Neurosurg* 2010; 113(3): 622-9.
 43. Kurland D, Hong C, Aarabi B, Gerzanich V, Simard JM. Hemorrhagic progression of a contusion after traumatic brain injury: a review. *J. Neurotrauma* 2012; 29(1): 19-31.
 44. Simard JM, Chen M, Tarasov KV, Bhatta S, Ivanova S, Melnitchenko L *et al.* Newly expressed SUR1-regulated NC(Ca-ATP) channel mediates cerebral edema after ischemic stroke. *Nat Med* 2006; 12(4): 433-40.
 45. Simard JM, Chen M. Regulation by sulfanylurea receptor type 1 of a non-selective cation channel involved in cytotoxic edema of reactive astrocytes. *J Neurosurg Anesthesiol* 2004; 16(1): 98-9.
 46. Martínez-Valverde T, Vidal-Jorge M, Martínez-Saez E, Castro L, Arikan F, Cordero E *et al.* Sulfanylurea receptor 1 in humans with post-traumatic brain contusions. *J. Neurotrauma* 2015.
 47. Mangat HS, Härtl R. Hypertonic saline for the management of raised intracranial pressure after severe traumatic brain injury. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2015; 1345(1): 83-88.

2. Estudio del perfil iónico del espacio extracelular postraumático e isquémico

En el trabajo sobre la utilización de la MD cerebral como herramienta para el estudio del perfil iónico del edema cerebral incluido esta memoria se expuso que una de las principales limitaciones observada era la baja resolución temporal que confería el método de cuantificación de los iones de estudio (Martínez-Valverde *et al.*, 2015). Por ello, tal y como se indicó en la discusión del artículo, se ha estudiado la posibilidad de aplicación de un método de detección más sensible, la ICP-MS. A partir de este método de análisis alternativo, el objetivo de este estudio fue determinar el perfil iónico del EEC cerebral tras un TCE o un IMACM en distintas áreas del cerebro (zona sana y regiones de penumbra y core de la lesión traumática o isquémica) definidas por neuroimagen. Este estudio significa una primera aplicación clínica de los resultados obtenidos en el artículo publicado recientemente por nuestro grupo en *Journal of Neurotrauma* (Martínez-Valverde *et al.*, 2015).

2.1 La ICP-MS versus el electrodo selectivo

El primer objetivo de este estudio fue establecer si era posible utilizar el modelo lineal, definido previamente (Martínez-Valverde *et al.*, 2015), para determinar las concentraciones iónicas en el EEC del cerebro aplicando otro método de detección. Para ello se analizaron 20 muestras de LCR de pacientes que eran portadores de un drenaje lumbar o ventricular para el tratamiento de sus patologías primarias mediante dos técnicas, el electrodo selectivo (utilizado en nuestro trabajo anterior (Martínez-Valverde *et al.*, 2015)) y la ICP-MS. Los resultados obtenidos mediante ambos métodos se compararon estadísticamente. La concordancia entre ambos métodos fue excelente, objetivándose que la diferencia media para todos los iones se situaba dentro de $1,96 \pm SD$, a pesar de que el electrodo selectivo sobreestimaba la concentración de Na^+ en las muestras analizadas. Estos resultados apoyaron la idoneidad del ICP-MS como herramienta de análisis en el conjunto de muestras de microdializado que forman parte del presente estudio.

2.2 Grupo de estudio

Se llevó a cabo un estudio prospectivo en muestras en pacientes de entre 18 y 70 años, ingresados en la UCI de Neurotraumatología del Hospital Universitario Vall d'Hebron entre febrero de 2011 y julio 2014, afectados de un TCE grave o un IMACM que requirieron monitorización de la PIC y MD durante las primeras 48 horas tras el traumatismo o el inicio de los síntomas del infarto. Se incluyeron un total de 34 pacientes, 21 con un TCE grave y 13 con un IMACM. La cohorte de pacientes que habían sufrido un TCE estaba formada 21 hombres de entre 18 y 57 años (mediana: 36). El grupo pacientes que había sufrido un IMACM estaba compuesto por 11 hombres y 2 mujeres con edades comprendidas entre los 36 y los 65 años (mediana: 52). La recogida de muestras de MD se inició en diferentes tiempos tras el traumatismo o el inicio de los síntomas del IMACM (pacientes con TCE: mediana: 33 horas, mín: 9 – máx: 47; pacientes con IMACM: mediana: 31 horas, mín: 21 – máx: 47 horas). La **Tabla 8** muestra el resumen de los datos demográficos y clínicos de ambos subgrupos de pacientes, de los que se obtuvieron un total de 374 muestras.

2.3 Grupo control

Como grupo control se incluyeron pacientes intervenidos quirúrgicamente de lesiones de fosa posterior que no presentaban ninguna imagen patológica en el compartimento supratentorial y que requirieron la implantación de un catéter intraventricular para el drenaje de LCR durante la cirugía y en el periodo postoperatorio inmediato. A través del mismo orificio de trépano utilizado para la inserción del catéter ventricular, se introdujo un catéter de MD para determinar los valores de normalidad de moléculas del metabolismo cerebral. En todos los casos se obtuvo de forma previa el consentimiento informado y el proyecto fue previamente aprobado por el CEIC de nuestro centro (proyecto: PR-AG-140/2011). Con estos criterios se incluyeron 7 pacientes, cuyos datos demográficos se resumen en la **Tabla 8**, en los que se cuantificaron mediante ICP-MS los niveles de Na^+ , K^+ y Cl^- de los 2 primeros microviales recogidos durante el estado de vigilia. La **Tabla 9** muestra los valores obtenidos para este grupo.

A partir de los resultados obtenidos se definió como umbral superior de referencia el percentil 97,5 para cada ion, lo que corresponde a 161,6 mmol/L para el Na⁺, 4,1 mmol/L para el K⁺ y 157,3 mmol/L para el Cl⁻.

Tabla 8. Datos demográficos y clínicos de los pacientes incluidos

Grupo	N	Edad	Sexo	GCS	NIHSS	GOSe	mRS
TCE	21	34 (18 - 57)	21 M: 0 F	5 (3 - 13)	NA	3 (1 - 8)	NA
IMACM	13	52 (36 - 65)	11 M: 2 F	NA	19 (23- 14)	NA	4 (3 - 6)
Control	7	38 (22 - 60)	1M: 6 F	NA	NA	NA	NA

N: número de casos; **ECG:** escala de coma de Glasgow; **NIHSS:** escala del *National institute of Health Stroke*; **GOSe:** escala de resultados de Glasgow ampliada; **mRS:** escala Ranking modificada; **M:** masculino; **F:** femenino; **NA:** no aplicable.

2.4 Contenido iónico por patología cerebral y zona de inserción del catéter de microdiálisis

Para este estudio, las zonas de monitorización cerebral se categorizaron según la patología primaria y la zona de inserción del catéter de MD, distinguiendo entre: tejido normal, penumbra traumática, penumbra isquémica, core traumático y core isquémico. Los criterios aplicados para esta clasificación están descritos en el apartado de material y métodos del artículo remitido a la revista *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* (actualmente en proceso de revisión). Aplicando los criterios descritos: en 5 pacientes el catéter se colocó en tejido macroscópicamente normal (generando 59 muestras, todas procedentes de pacientes con un TCE), en 10 había sido insertado en una zona de penumbra traumática (101 muestras), en un único paciente el catéter se implantó en una zona de penumbra isquémica (generando 12 muestras), en 6 pacientes el catéter se implantó en core traumático (generando 61 muestras), mientras que en 12 pacientes se determinó que la punta del catéter se encontraba en el core de la lesión isquémica (generando 141 muestras). La **Tabla 9** muestra la mediana y los valores mínimos y máximos de las concentraciones obtenidas en las diversas regiones de estudio.

Tabla 9. Perfil iónico por patología cerebral y zona de inserción del catéter de MD

Grupo	[Na ⁺] mmol/L	[K ⁺] mmol/L	[Cl ⁻] mmol/L
Control	149.9 (144.4 – 161.8)	3.03 (2.78 – 4.08)	140.1 (126.1 – 158.5)
Normal	145.5 (115.5 – 169.1)	3.08 (2.64 – 6.47)	150.2 (119.6 – 179.9)
Penumbra	150.8 (123.9 – 219.9)	3.58 (2.32 – 6.07)	155.7 (117.3 – 224.4)
Core isquémico	149.7 (132.7 – 223.1)	5.25 (2.48 – 19.9)	152.0 (136.7 – 228.3)
Core traumático	163.0 (143.2 – 264.3)	5.43 (2.56 – 11.0)	166.5 (136.4 – 276.2)

Valores expresados como mediana (mín – máx). MD: microdiálisis

En el **tejido macroscópicamente normal**, a pesar de que se obtuvieron 8 lecturas de Na⁺ por encima de 162 mmol/L (todas del mismo paciente) y 2 lecturas de K⁺ por encima de 4,1, las diferencias entre las concentraciones medias de todos los valores y los del grupo control no fueron estadísticamente significativas para ninguno de los iones estudiados.

En la **zona de penumbra**, el 23,4% de las lecturas de Na⁺ se encontraban por encima del umbral superior de 162 mmol/L y aproximadamente un tercio presentaban valores de K⁺ por encima de 4,1 mmol/L. Las diferencias observadas para ambos iones entre los valores de este grupo fueron estadísticamente significativas tanto si se comparaban con los resultados del grupo control como con los obtenidos a partir de los catéteres insertados en regiones cerebrales macroscópicamente normales (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$ para el Na⁺ y $p < 0,001$ para el K⁺). En cambio, para el Cl⁻ fueron significativas únicamente cuando se compararon con las del grupo control ($p = 0,009$).

El **core isquémico** se caracterizó por un incremento significativo de los valores de K⁺ (Kruskal-Wallis test, $p < 0,001$). Sin embargo, aunque se observaron valores de Na⁺ más elevados que los de los controles, las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Un hallazgo consistente en todas las muestras estudiadas en este grupo fue que la concentración de Cl⁻ aumentaba o disminuía de forma lineal con la concentración Na⁺ con un coeficiente de correlación de Pearson de 0,93 ($p < 0,001$).

Por último, en el **core traumático** se observó que el 52% de las lecturas de Na⁺ se encontraban por encima del umbral superior para este ion (162 mmol/L) y que

en el caso del K^+ el 80% eran superiores a 4,1 mmol/L. Las diferencias entre las concentraciones medias de los iones obtenidos en el core de las lesiones traumáticas fueron estadísticamente significativas en todos los casos cuando se compararon con el grupo control (Kruskal-Wallis, $p < 0,001$). Del mismo modo que en el core isquémico, las muestras con una concentración de Na^+ superior a 162 mmol/L también se acompañaban de valores de Cl^- elevados.

2.5 Discusión

A pesar de que investigadores como Reinert y colaboradores han estudiado el contenido tisular de K^+ en pacientes con TCE (Reinert *et al.*, 2000), nuestro estudio es el primero en el que se determina el perfil iónico (Na^+ , K^+ y Cl^-) de distintas regiones cerebrales, más o menos lesionadas, en pacientes que han sufrido un TCE o un IMACM y que, además, compara los resultados con los de un grupo control. En nuestro artículo anterior (Martínez-Valverde *et al.*, 2015), incluido en el cuerpo de esta Tesis, se estudió la RR *in vitro* de Na^+ , K^+ y Cl^- mediante membranas CMA71 reproduciendo las condiciones aplicadas en el entorno clínico, obteniéndose un factor de corrección que permitió estimar, para todos los iones analizados, la concentración real de la matriz o solución problema a partir de la concentración obtenida en los microdializados. Este estudio demostró, además, su aplicabilidad *in vivo*, estimando el perfil iónico de 2 pacientes neurocríticos. Sin embargo, la baja resolución temporal que permitía el método de detección disponible en nuestro centro (requería un volumen mínimo de 85 μ L, equivalente a 8 - 10 horas de monitorización cerebral) supuso una gran limitación en nuestro estudio previo. Por ello, en el presente estudio se optó por un método más sensible, la ICP-MS, que permitió llevar a cabo la determinación de los iones de estudio en muestras de 12 - 15 μ L (obtenidos en 1 - 2 horas de neuromonitoreización). Las diferencias observadas entre ambos métodos de detección fueron las esperadas como consecuencia de los principios físico-químicos en los que se basan cada una de las técnicas. A grandes rasgos, el ICP-MS detecta y cuantifica la mayoría de los elementos de la tabla periódica, tras la vaporización de la muestra, en función de la masa de cada elemento (la cual es específica), mientras que el electrodo selectivo está formado por un sensor capaz de convertir la actividad de cada ion en solución en un potencial eléctrico, que puede ser medido por un voltímetro. El electrodo del sensor está

constituido por una membrana específica para cada ion a analizar. No obstante, se ha observado que las membranas utilizadas para la detección de Na^+ pueden tener pequeñas interferencias con la actividad otros cationes como el H^+ y K^+ , cuando estos se encuentran en concentraciones elevadas (Ehling *et al.*, 2010). Esto podría explicar la sobreestimación del Na^+ observada en las muestras de LCR. Sin embargo, como se ha indicado, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, demostrando que ambas técnicas pueden ser utilizadas indistintamente, si el volumen de muestra lo permite.

Perfil iónico del parénquima cerebral

Por razones fundamentalmente éticas, hasta ahora el rango de referencia para la concentración iónica del EEC cerebral normal en el humano no había sido determinado. Por ello, la mayoría de grupos, incluido el nuestro, habían utilizado los valores obtenidos en LCR como la referencia más aproximada a las concentraciones iónicas del EEC cerebral. Sin embargo, en el desarrollo de un estudio de nuestro grupo aprobado por el CEIC del Hospital Universitario Vall d'Hebron cuyo objetivo primario era establecer los valores normales de glucosa, lactato, piruvato y glicerol ha permitido establecer, además, valores normales de Na^+ , K^+ y Cl^- . Las determinaciones de estos iones en muestras de microdializado cerebral se compararon con los valores obtenidos en LCR (Martínez-Valverde *et al.*, 2015), observándose que únicamente existían diferencias estadísticamente significativas para el Cl^- (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). La concentración mediana de Cl^- en las muestras de LCR fue de 141 mmol/L, mientras que la de las muestras obtenidas a partir de los catéteres de MD fue de 130 mmol/L. Estos resultados permitieron concluir que la estimación del perfil iónico de EEC cerebral a partir de los valores obtenidos en LCR es fiable.

Perfil iónico del tejido macroscópicamente sano

En nuestro estudio se diferenció entre controles (pacientes sin lesiones en el compartimento cerebral supratentorial) y pacientes que habían sufrido un TCE en los que el catéter de MD se les colocó en una zona macroscópicamente normal. Esta diferenciación es importante dado que, como se ha descrito en modelos animales, una lesión cerebral aparentemente focal puede causar una sobreexpresión de canales iónicos en regiones cerebrales alejadas de la misma

(Simard *et al.*, 2009b; Patel *et al.*, 2010) y alterar la permeabilidad iónica de la BHE. Como diferencias más destacables entre los 2 grupos de muestras (grupo control y tejido cerebral macroscópicamente normal en pacientes traumáticos), se observó un modesto incremento del contenido de Na^+ y Cl^- en los pacientes traumáticos, aunque en todos los casos los valores de K^+ se situaron dentro de los límites normales. Un único paciente presentó 2 lecturas de K^+ por encima de 4,1 mmol/L (límite superior en el grupo control) que revertieron espontáneamente en la siguiente lectura. Los aumentos reversibles de K^+ se pueden asociar con crisis epilépticas clínicas o subclínicas (Gorji *et al.*, 2006) y también con fenómenos de despolarización cortical propagada, frecuentemente relacionados con un mal resultado neurológico (Strong and Dardis, 2005; Hartings *et al.*, 2011). En nuestro paciente no se objetivó ninguna causa aparente que pudiera explicar el aumento puntual de este ion.

Incremento de la permeabilidad de la BHE en la zona de penumbra

En la serie de pacientes en los que el catéter de MD había sido insertado en una zona de penumbra (10 con un TCE y 1 afecto de un IMACM) se observó que el 60% de las lecturas obtenidas mostraron un perfil iónico estrictamente normal para el Na^+ y el K^+ . Confirmando así los hallazgos de Wetterling y colaboradores quienes demostraron que la penumbra isquémica puede definirse como una región con un aporte sanguíneo reducido en la que todavía se mantiene el gradiente de concentración de Na^+ (Wetterling *et al.*, 2015). La anomalía más frecuentemente detectada en estos pacientes fue un aumento aislado de Na^+ (acompañado de un aumento paralelo de Cl^- para preservar la electroneutralidad), aunque en la mayoría de los casos con valores de K^+ dentro del rango normal (22 de 27 muestras). La presencia de valores normales o ligeramente aumentados de K^+ fue la diferencia más evidente entre el área de penumbra y el core traumático o isquémico, sugiriendo que la zona perilesional todavía preservaba activos los mecanismos de regulación del contenido celular de K^+ . Sin embargo, los valores ligeramente aumentados de K^+ podrían deberse a un fenómeno de difusión desde el core de la lesión (Antunes *et al.*, 2014). Estos niveles elevados de K^+ cercanos al tejido sano o levemente dañado podrían provocar un mayor deterioro del tejido, así como una expansión del core traumático o isquémico (Sick *et al.*, 1998). En cambio, los aumentos aislados de Na^+ sugieren un incremento de la

permeabilidad de la BHE como consecuencia de la sobreexpresión de canales iónicos como SUR1-TRPM4 en células endoteliales y neuronas (Simard and Chen, 2004; Simard *et al.*, 2006), que podría indicar estadios tempranos de edema iónico y vasogénico, como ya ha sido descrito en tejido isquémico y traumático (Simard *et al.*, 2007; Simard *et al.*, 2010; Kurland *et al.*, 2012). Los resultados obtenidos en nuestro estudio en tejido pericontusional (Martínez-Valverde T, ahead of print), incluido en esta tesis, refuerzan esta hipótesis.

Perfil iónico del core de la lesión isquémica y traumática

El contenido total de Na⁺ en el cerebro ha sido ampliamente estudiado tanto en modelos animales como en humanos. En modelos animales en los que se ha ocluido la ACM se ha observado que el contenido de Na⁺ aumenta de forma progresiva durante las 8 primeras horas tras el infarto (Betz *et al.*, 1994). Éste constituye el fundamento de que el contenido de ²³Na detectado mediante RM se utilice a día de hoy para determinar el tiempo transcurrido desde el inicio del infarto y se utilice para definir la viabilidad del tejido infartado (Boada *et al.*, 2012). Sin embargo, en los pacientes de nuestro estudio a los que se implantó el catéter de MD en el core de la lesión isquémica se objetivó la presencia de concentraciones muy elevadas de K⁺, observadas en el 62% de lecturas, y un perfil aparentemente normal para el contenido de Na⁺ y Cl⁻ (sólo se observaron alteraciones en el 20% de las lecturas de Na⁺ y en el 38% de las de Cl⁻). Estos hallazgos confirman los resultados observados en el paciente analizado en nuestro trabajo publicado en *J Neurotrauma* (Martínez-Valverde *et al.*, 2015). No obstante, estos resultados también demuestran que las mediciones de Na⁺ total del cerebro realizadas por RM no tienen por qué coincidir con las determinadas de forma local mediante la MD cerebral.

El cerebro sano tiene mecanismos para controlar el exceso de K⁺. Los astrocitos desempeñan un papel fundamental en el cerebro en el control y mantenimiento de la homeostasis de este ion, redistribuyéndolo desde el citoplasma o las uniones tipo gap (Leis *et al.*, 2005). En condiciones normales, los niveles fisiológicos de K⁺ se mantienen por acción de las células gliales y por su paso al LCR, que actúa como una fuente de eliminación de metabolitos, semejante a la acción que ejerce el sistema linfático periférico. Sin embargo, cuando existe un infarto, ambos mecanismos se inactivan en el core isquémico y pueden llegar a

ser disfuncionales en la penumbra isquémica. Esto explica porqué el tejido infartado mantiene concentraciones elevadas de K^+ . Si esta situación no se corrige, el exceso de K^+ puede comprometer la viabilidad del tejido circundante (zona de penumbra) o incluso afectar al resto de cerebro normal.

A la vista de nuestros resultados es posible afirmar que el incremento del contenido extracelular de K^+ es la característica más importante de un tejido cerebral irreversiblemente dañado, dado que no se detectaron valores tan elevados de este ion ni en el tejido normal ni en las zonas de penumbra. En diversos modelos experimentales y clínicos (TCE grave, hemorragia subaracnoidea aneurismática e infarto cerebral isquémico o hemorrágico) se ha descrito que el contenido extracelular de K^+ es un buen biomarcador de la gravedad del daño cerebral (Sick *et al.*, 1998; Valadka *et al.*, 1998; Doppenberg *et al.*, 1999; Goodman *et al.*, 1999; Reinert *et al.*, 2000; Antunes *et al.*, 2014). En nuestro estudio, los valores de K^+ obtenidos en las muestras de MD no se correlacionaron con los valores plasmáticos. En los pacientes con lecturas cerebrales de K^+ superiores a 4,1 mmol/L, los valores plasmáticos de este ion fueron inferiores (mediana: 3,91 mmol/L, mín: 2,82, máx: 4,68). Este hallazgo también había sido descrito por Antunes y colaboradores en pacientes con hemorragia subaracnoidea aneurismática (Antunes *et al.*, 2014).

A pesar de lo expuesto, es importante matizar que en un 32,6% de las muestras procedentes del core isquémico analizadas los niveles extracelulares de Na^+ , Cl^- y K^+ se encontraban dentro de los límites de referencia. Esto explica porqué los valores medios de las diferencias entre el contenido iónico de Na^+ y Cl^- no fueron estadísticamente significativos con respecto a los controles o al cerebro no lesionado. Nuestra hipótesis para explicar este fenómeno, como ya habíamos enunciado en el segundo trabajo que conforma esta Tesis Doctoral (Martínez-Valverde *et al.*, 2015), es que el tejido necrótico del core isquémico es un potente imán para el agua y que el aumento inicial de iones se normaliza horas después como consecuencia del incremento acuoso y de la dilución que genera. Este fenómeno no había sido observado de forma previa, probablemente debido al relativamente corto periodo de seguimiento que se realiza en los modelos experimentales de infarto cerebral isquémico (6 - 8 horas) (Betz *et al.*, 1994; Sick *et al.*, 1998).

El origen del edema cerebral isquémico ha sido ampliamente estudiado. En un artículo reciente Vella y colaboradores revisan el papel de las aquaporinas (canales específicos de agua) en la fisiopatología del infarto cerebral (Vella *et al.*, 2015). La sobreexpresión de este canal, detectada en ya en las primeras horas tras la inducción del infarto en modelos animales, podría explicar la entrada masiva de agua y la consiguiente pseudonormalización del contenido iónico en el core del infarto. El agua es atraída por la elevada osmolaridad que se genera como resultado de la necrosis tisular (incremento masivo de iones y proteínas). Esta afinidad por el agua del tejido necrótico ha sido ampliamente estudiada por el grupo de Katayama en tejido contusionado (Katayama and Kawamata, 2003; Maeda *et al.*, 2003; Kawamata *et al.*, 2007).

De forma similar al core isquémico, el core de la lesión traumática se caracteriza por una rápida pannecrosis, desintegración y homogenización del tejido cerebral afectado (Freytag and Lindenberg, 1957; Kawamata and Katayama, 2007), lo que crea un gradiente osmótico que atrae agua hacia el core de la contusión (Katayama *et al.*, 1998; Katayama and Kawamata, 2003; Maeda *et al.*, 2003). Es importante matizar que el incremento en el contenido de agua del tejido, estimado gravimétricamente, se debe al incremento de la osmolaridad, sin que esto implique un incremento del contenido iónico del mismo (Kawamata *et al.*, 2007). Según Kawamata y colaboradores, en el tejido dañado el incremento de la osmolaridad detectado esta causado por la acumulación de metabolitos producto de la degradación de lípidos, proteínas, ADN y otros procesos catabólicos que tienen lugar en dicho tejido (Kawamata *et al.*, 2007).

A diferencia del core isquémico, el core traumático está constituido por un tejido más heterogéneo y menos caracterizado metabólicamente, en el que coexisten regiones muy dañadas con membranas celulares aun conservadas. En el core traumático, el principal hallazgo de nuestra serie fue la detección de niveles muy elevados para todos los iones de estudio, con valores significativamente diferentes a los objetivados en el grupo control y en el cerebro no lesionado. Del mismo modo que en el core isquémico, el paso de K^+ desde el compartimiento intracelular se produce debido a la ruptura de las membranas celulares asociada a la muerte celular inducida por el daño mecánico o isquémico (Doppenberg *et al.*, 1999; Reinert *et al.*, 2000). Sin embargo, en nuestros pacientes el aumento de K^+ estaba acompañado de un incremento de los niveles de Na^+ . En ausencia de

transporte activo (que permita el paso de Na^+ en contra de gradiente de concentración) el Na^+ extracelular del cerebro no puede exceder al contenido de Na^+ plasmático. Teóricamente, en el core de la lesión traumática los bajos niveles de ATP junto con la disfuncionalidad celular del tejido necrótico imposibilitan este tipo de transporte. Por ello, este hallazgo es difícil de explicar.

El aumento del Na^+ extracelular detectado podría deberse a: 1) el tratamiento de los pacientes con soluciones de salinas hipertónicas, que provocaría un incremento de los niveles de Na^+ extracelular causado por los elevados niveles plasmáticos; sin embargo, esto no puede aplicarse a nuestros pacientes, puesto que, a excepción de 2 lecturas (161 y 166.6 mmol/L) de un mismo paciente, todos presentaban valores de Na^+ plasmático dentro del rango normal (min: 138,6 - máx: 146 mmol/L); 2) la posible liberación de Na^+ por parte de las proteínas y de los complejos de ADN-histonas liberadas por las células que mueren en los procesos de desintegración celular (Nguyen and Kurtz, 2006); 3) el aumento de la concentración de proteínas cargadas negativamente en el core podría atraer cationes como el Na^+ ; 4) la liberación del Na^+ acumulado durante las primeras fases de edema citotóxico en las células y 5) el incremento de la actividad de los intercambiadores Na^+/H^+ en el área de penumbra podría liberar Na^+ al core. No obstante, estas hipótesis son especulativas y cualquier aclaración adicional de estos hallazgos requiere estudios experimentales en modelos animales en los que las condiciones experimentales puedan ser controladas.

Aplicaciones clínicas del estudio del perfil iónico del espacio extracelular de los pacientes con lesiones cerebrales agudas

El aumento de la permeabilidad de la BHE para el Na^+ detectado en nuestro estudio plantea algunas dudas o preguntas sobre el uso de soluciones de suero salino hipertónico en el tratamiento de la hipertensión intracraneal en los pacientes con un TCE o un IMACM. El manitol ha sido usado rutinariamente durante décadas para el tratamiento de la hipertensión intracraneal, tanto en pacientes con TCE grave como en aquellos que han sufrido un IMACM. Sin embargo, algunos autores han cuestionado la utilidad de este fármaco cuando existen alteraciones en la permeabilidad de la BHE. Las soluciones de salinas hipertónicas (en concentraciones 2 - 28%) se han introducido de forma más extensa en los últimos años como una alternativa al manitol (White *et al.*, 2006;

Mangat and Hartl, 2015). Los bolus intravenosos de suero salino hipertónico aumentan el volumen intravascular y el gasto cardíaco, mejoran la perfusión capilar y disminuyen el contenido de agua del cerebro (Mangat and Hartl, 2015). El principio fundamental de estos efectos se debe a que el coeficiente de reflexión para Na^+ en la BHE es muy elevado y a que, en condiciones normales, este ion es incapaz de difundir hacia parénquima cerebral. Sin embargo, Kurland y colaboradores demostraron que en las contusiones postraumáticas la permeabilidad del tejido circundante (penumbra y parapenumbra traumáticas, en términos de Simard) tiene un coeficiente de reflexión para Na^+ muy bajo, debido a la sobreexpresión del canal iónico SUR1-TRPM4, que facilita el movimiento de grandes cantidades de Na^+ al tejido cerebral dañado (Kurland *et al.*, 2012). Los datos derivados del presente estudio, junto con el aumento de la expresión del SUR1 en el tejido pericontusional humano observada en nuestro artículo previo (Martínez-Valverde T, ahead of print) sugieren que el uso de suero salino hipertónico debería reconsiderarse en los pacientes que presenten lesiones cerebrales significativas en las que la permeabilidad de la BHE al Na^+ puede estar afectada. Además, para un mejor conocimiento de los posibles efectos adversos a nivel cerebral de los sueros salinos hipertónicos, debería estudiarse el perfil iónico antes y después de la administración de estas soluciones.

Limitaciones del estudio

Nuestro trabajo presenta varias limitaciones que merecen discusión. La primera es que la metodología utilizada, a pesar de ser la más sensible que puede ser aplicada a este tipo de pacientes y muestras, únicamente permite la determinación de la concentración iónica correspondiente al promedio de las 2 últimas horas de monitorización. Por lo tanto, la MD combinada con la ICP-MS no permite el estudio de los flujos rápidos de K^+ , Na^+ y Cl^- extracelular que existen con frecuencia durante las crisis comiciales o los fenómenos de despolarización cortical propagada. Sin embargo, el conocimiento de las tendencias iónicas horarias puede ser útil para identificar el tejido cerebral en situación de riesgo y detectar alteraciones en la permeabilidad de la BHE.

La segunda limitación es el tamaño de nuestro grupo de control. A pesar de que nuestro estudio aporta, por primera vez, valores de las concentraciones iónicas del EEC de zonas no lesionadas, sería necesario incrementar el tamaño muestral

de este subgrupo para establecer unos umbrales superiores de referencia más robustos.

La tercera limitación a mencionar es que los datos del core isquémico provenían de pacientes con infartos cerebrales masivos que fueron monitorizados de forma relativamente tardía (mediana de 36 horas tras el inicio de los síntomas). Por ello, los resultados obtenidos reflejan el perfil iónico del tejido necrótico, pero no permiten estudiar los cambios que se producen poco después de la aparición del infarto cerebral ni definir los umbrales de K^+ y Na^+ extracelular que marcan la transición del tejido cerebral en riesgo al daño tisular irreversible.

Consideraciones finales

Los hallazgos de los estudios efectuados nos permiten concluir que la combinación de la MD con la ICP-MS constituye una poderosa herramienta que ayudará a una mejor comprensión de los complejos cambios iónicos que se producen después de un TCE grave o de un infarto cerebral isquémico o hemorrágico. A pesar de algunas de sus limitaciones intrínsecas, la MD es el único sistema de monitorización que permite mediciones de las concentraciones iónicas y de otros analitos a tiempo cuasi real y a cabecera del paciente, con un riesgo mínimo (Poca *et al.*, 2006). Además, a diferencia de los sensores selectivos de iones aplicados en modelos animales, la MD permite la monitorización simultánea de distintos procesos fisiológicos y bioquímicos en el cerebro vivo, por lo que constituye una poderosa herramienta para conocer mejor la compleja fisiopatología de la disrupción de la BHE, abriendo una vía interesante para investigar cómo se generan los diferentes tipos de edema cerebral. Esto puede ayudar a racionalizar el uso de las soluciones salinas hipertónicas y de otras estrategias terapéuticas en las lesiones cerebrales agudas.

BIBLIOGRAFÍA

Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007; 24 Suppl 1: S1-106.

Aarabi B, Hesdorffer DC, Simard JM, Ahn ES, Aresco C, Eisenberg HM, *et al.* Comparative study of decompressive craniectomy after mass lesion evacuation in severe head injury. *Neurosurgery* 2009; 64(5): 927-39; discussion 39-40.

Aarabi B, Simard JM. Traumatic brain injury. *Curr Opin Crit Care* 2009; 15(6): 548-53.

Aarabi B, Simard JM, Kufera JA, Alexander M, Zacherl KM, Mirvis SE, *et al.* Intramedullary lesion expansion on magnetic resonance imaging in patients with motor complete cervical spinal cord injury. *J Neurosurg Spine* 2012; 17(3): 243-50.

Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis* 2010; 37(1): 13-25.

Abumiya T, Yokota C, Kuge Y, Minematsu K. Aggravation of hemorrhagic transformation by early intraarterial infusion of low-dose vascular endothelial growth factor after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2005; 1049(1): 95-103.

Afinowi R, Tisdall M, Keir G, Smith M, Kitchen N, Petzold A. Improving the recovery of S100B protein in cerebral microdialysis: implications for multimodal monitoring in neurocritical care. *J Neurosci Methods* 2009; 181(1): 95-9.

Alessandri B, Doppenberg E, Zauner A, Woodward J, Young HF, Bullock R. Cortical extracellular sodium transients after human head injury: an indicator of secondary brain damage? *Acta Neurochir Suppl* 1998; 71: 237-40.

Alvarez-Sabin J, Maisterra O, Santamarina E, Kase CS. Factors influencing haemorrhagic transformation in ischaemic stroke. *Lancet Neurol* 2013; 12(7): 689-705.

Antunes AP, Schiefecker AJ, Beer R, Pfausler B, Sohm F, Fischer M, *et al.* Higher brain extracellular potassium is associated with brain metabolic distress and poor outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Crit Care* 2014; 18(3): R119.

Ao X, Sellati TJ, Stenken JA. Enhanced microdialysis relative recovery of inflammatory cytokines using antibody-coated microspheres analyzed by flow cytometry. *Anal Chem* 2004; 76(13): 3777-84.

Ao X, Stenken JA. Microdialysis sampling of cytokines. *Methods* 2006; 38(4): 331-41.

Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell Calcium* 2003; 34(4-5): 325-37.

- Balami JS, Chen RL, Grunwald IQ, Buchan AM. Neurological complications of acute ischaemic stroke. *Lancet Neurol* 2011; 10(4): 357-71.
- Bano D, Nicotera P. Ca²⁺ signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke* 2007; 38(2 Suppl): 674-6.
- Bazzoni G. Endothelial tight junctions: permeable barriers of the vessel wall. *Thromb Haemost* 2006; 95(1): 36-42.
- Benveniste H. Brain microdialysis. *J Neurochem* 1989; 52(6): 1667-79.
- Benveniste H, Huttemeier PC. Microdialysis--theory and application. *Prog Neurobiol* 1990; 35(3): 195-215.
- Betz AL, Keep RF, Beer ME, Ren XD. Blood-brain barrier permeability and brain concentration of sodium, potassium, and chloride during focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994; 14(1): 29-37.
- Bito L, Davson H, Levin E, Murray M, Snider N. The concentrations of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysate of brain, and blood plasma of the dog. *J Neurochem* 1966; 13(11): 1057-67.
- Blyth BJ, Farhavar A, Gee C, Hawthorn B, He H, Nayak A, *et al.* Validation of serum markers for blood-brain barrier disruption in traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2009; 26(9): 1497-507.
- Boada FE, Qian Y, Nemoto E, Jovin T, Jungreis C, Jones SC, *et al.* Sodium MRI and the assessment of irreversible tissue damage during hyper-acute stroke. *Transl Stroke Res* 2012; 3(2): 236-45.
- Bungay PM, Morrison PF, Dedrick RL. Steady-state theory for quantitative microdialysis of solutes and water in vivo and in vitro. *Life Sci* 1990; 46(2): 105-19.
- Burda JE, Bernstein AM, Sofroniew MV. Astrocyte roles in traumatic brain injury. *Exp Neurol* 2015.
- Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 2014; 81(2): 229-48.
- Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostenfeld T, Svendsen CN, *et al.* Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 1999; 23(2): 297-308.
- Castejon OJ. Formation of transendothelial channels in traumatic human brain edema. *Pathol Res Pract* 1984; 179(1): 7-12.

Clark RS, Schiding JK, Kaczorowski SL, Marion DW, Kochanek PM. Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: comparison of weight drop and controlled cortical impact models. *J Neurotrauma* 1994; 11(5): 499-506.

Clough GF. Microdialysis of large molecules. *AAPS J* 2005; 7(3): E686-92.

Cole JT, Yarnell A, Kean WS, Gold E, Lewis B, Ren M, *et al.* Craniotomy: true sham for traumatic brain injury, or a sham of a sham? *J Neurotrauma* 2011; 28(3): 359-69.

Cremer OL, van Dijk GW, van Wensen E, Brekelmans GJ, Moons KG, Leenen LP, *et al.* Effect of intracranial pressure monitoring and targeted intensive care on functional outcome after severe head injury. *Crit Care Med* 2005; 33(10): 2207-13.

Champigny G, Verrier B, Lazdunski M. A voltage, calcium, and ATP sensitive non selective cation channel in human colonic tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 176(3): 1196-203.

Chefer VI, Thompson AC, Zapata A, Shippenberg TS. Overview of brain microdialysis. *Curr Protoc Neurosci* 2009; Chapter 7: Unit7 1.

Chen M, Dong Y, Simard JM. Functional coupling between sulfonyleurea receptor type 1 and a nonselective cation channel in reactive astrocytes from adult rat brain. *J Neurosci* 2003; 23(24): 8568-77.

Chen M, Simard JM. Cell swelling and a nonselective cation channel regulated by internal Ca²⁺ and ATP in native reactive astrocytes from adult rat brain. *J Neurosci* 2001; 21(17): 6512-21.

Chen Y, Liu L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64(7): 640-65.

Chodobski A, Zink BJ, Szmydynger-Chodobska J. Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. *Transl Stroke Res* 2011; 2(4): 492-516.

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, *et al.* ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 2005; 8(6): 752-8.

Davis ME, Grumbach IM, Fukai T, Cutchins A, Harrison DG. Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J Biol Chem* 2004; 279(1): 163-8.

De Los Rios JA, Sahuquillo J, Merino MA, Poca MA, Exposito L. [High-resolution microdialysis. methodological issues and application to the study of inflammatory brain response]. *Neurocirugia (Astur)* 2009; 20(5): 433-48.

Delgado JM, DeFeudis FV, Roth RH, Ryugo DK, Mitruka BM. Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1972; 198(1): 9-21.

- Di Chiara G, Tanda G, Carboni E. Estimation of in-vivo neurotransmitter release by brain microdialysis: the issue of validity. *Behav Pharmacol* 1996; 7(7): 640-57.
- Doppenberg EM, Reinert M, Zauner A, Massie TS, Bullock R. Determinants of cerebral extracellular potassium after severe human head injury. *Acta Neurochir Suppl* 1999; 75: 31-4.
- Dore-Duffy P, Owen C, Balabanov R, Murphy S, Beaumont T, Rafols JA. Pericyte migration from the vascular wall in response to traumatic brain injury. *Microvasc Res* 2000; 60(1): 55-69.
- Duo J, Stenken JA. In vitro and in vivo affinity microdialysis sampling of cytokines using heparin-immobilized microspheres. *Anal Bioanal Chem* 2011; 399(2): 783-93.
- Ehling S, Tefera S, Earl R, Cole S. Comparison of analytical methods to determine sodium content of low-sodium foods. *J AOAC Int* 2010; 93(2): 628-37.
- Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci* 1998; 111 (Pt 13): 1853-65.
- Filippidis AS, Liang X, Wang W, Parveen S, Baumgarten CM, Marmarou CR. Real-time monitoring of changes in brain extracellular sodium and potassium concentrations and intracranial pressure after selective vasopressin-1a receptor inhibition following focal traumatic brain injury in rats. *J Neurotrauma* 2014; 31(14): 1258-67.
- Freytag E, Lindenberg R. Morphology of cortical contusions. *AMA Arch Pathol* 1957; 63(1): 23-42.
- Fukuda S, Fini CA, Mabuchi T, Koziol JA, Eggleston LL, Jr., del Zoppo GJ. Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. *Stroke* 2004; 35(4): 998-1004.
- Galea JP, Tyrrell PJ, Patel HP, Vail A, King AT, Hopkins SJ. Pitfalls in microdialysis methodology: an in vitro analysis of temperature, pressure and catheter use. *Physiol Meas* 2014; 35(3): N21-8.
- Gentleman SM, Leclercq PD, Moyes L, Graham DI, Smith C, Griffin WS, *et al.* Long-term intracerebral inflammatory response after traumatic brain injury. *Forensic Sci Int* 2004; 146(2-3): 97-104.
- Go KG. The normal and pathological physiology of brain water. *Adv Tech Stand Neurosurg* 1997; 23: 47-142.
- Gonul E, Duz B, Kahraman S, Kayali H, Kubar A, Timurkaynak E. Early pericyte response to brain hypoxia in cats: an ultrastructural study. *Microvasc Res* 2002; 64(1): 116-9.

Goodman JC, Valadka AB, Gopinath SP, Uzura M, Grossman RG, Robertson CS. Simultaneous measurement of cortical potassium, calcium, and magnesium levels measured in head injured patients using microdialysis with ion chromatography. *Acta Neurochir Suppl* 1999; 75: 35-7.

Gorji A, Stemmer N, Rambeck B, Jurgens U, May T, Pannek HW, *et al.* Neocortical microenvironment in patients with intractable epilepsy: potassium and chloride concentrations. *Epilepsia* 2006; 47(2): 297-310.

Grande PO, Romner B. Osmotherapy in brain edema: a questionable therapy. *J Neurosurg Anesthesiol* 2012; 24(4): 407-12.

Gray MA, Argent BE. Non-selective cation channel on pancreatic duct cells. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1029(1): 33-42.

Guinamard R, Salle L, Simard C. The non-selective monovalent cationic channels TRPM4 and TRPM5. *Adv Exp Med Biol* 2011; 704: 147-71.

Hacke W, Schwab S, Horn M, Spranger M, De Georgia M, von Kummer R. 'Malignant' middle cerebral artery territory infarction: clinical course and prognostic signs. *Arch Neurol* 1996; 53(4): 309-15.

Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 2007; 10(11): 1387-94.

Harrington MG, Fonteh AN, Cowan RP, Perrine K, Pogoda JM, Biringier RG, *et al.* Cerebrospinal fluid sodium increases in migraine. *Headache* 2006; 46(7): 1128-35.

Harrington MG, Salomon RM, Pogoda JM, Oborina E, Okey N, Johnson B, *et al.* Cerebrospinal fluid sodium rhythms. *Cerebrospinal Fluid Res* 2010; 7: 3.

Hartings JA, Watanabe T, Bullock MR, Okonkwo DO, Fabricius M, Woitzik J, *et al.* Spreading depolarizations have prolonged direct current shifts and are associated with poor outcome in brain trauma. *Brain* 2011; 134(Pt 5): 1529-40.

Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 2005; 57(2): 173-85.

Helmy A, Carpenter KL, Hutchinson PJ. Microdialysis in the human brain and its potential role in the development and clinical assessment of drugs. *Curr Med Chem* 2007; 14(14): 1525-37.

Helmy A, Carpenter KL, Menon DK, Pickard JD, Hutchinson PJ. The cytokine response to human traumatic brain injury: temporal profiles and evidence for cerebral parenchymal production. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011; 31(2): 658-70.

Helmy A, Carpenter KL, Skepper JN, Kirkpatrick PJ, Pickard JD, Hutchinson PJ. Microdialysis of cytokines: methodological considerations, scanning electron microscopy, and determination of relative recovery. *J Neurotrauma* 2009; 26(4): 549-61.

Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19(6): 624-33.

Hillered L, Dahlin AP, Clausen F, Chu J, Bergquist J, Hjort K, *et al.* Cerebral microdialysis for protein biomarker monitoring in the neurointensive care setting - a technical approach. *Front Neurol* 2014; 5: 245.

Hillered L, Persson L, Nilsson P, Ronne-Engstrom E, Enblad P. Continuous monitoring of cerebral metabolism in traumatic brain injury: a focus on cerebral microdialysis. *Curr Opin Crit Care* 2006; 12(2): 112-8.

Hillered L, Vespa PM, Hovda DA. Translational neurochemical research in acute human brain injury: the current status and potential future for cerebral microdialysis. *J Neurotrauma* 2005; 22(1): 3-41.

Hojs R, Bevc S, Ekart R, Gorenjak M, Puklavec L. Serum cystatin C as an endogenous marker of renal function in patients with mild to moderate impairment of kidney function. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21(7): 1855-62.

Hori S, Ohtsuki S, Hosoya K, Nakashima E, Terasaki T. A pericyte-derived angiopoietin-1 multimeric complex induces occludin gene expression in brain capillary endothelial cells through Tie-2 activation in vitro. *J Neurochem* 2004; 89(2): 503-13.

Hurtado-Alvarado G, Cabanas-Morales AM, Gomez-Gonzalez B. Pericytes: brain-immune interface modulators. *Front Integr Neurosci* 2014; 7: 80.

Hutchinson PJ, O'Connell MT, Al-Rawi PG, Maskell LB, Kett-White R, Gupta AK, *et al.* Clinical cerebral microdialysis: a methodological study. *J Neurosurg* 2000; 93(1): 37-43.

Huttner HB, Schwab S. Malignant middle cerebral artery infarction: clinical characteristics, treatment strategies, and future perspectives. *Lancet Neurol* 2009; 8(10): 949-58.

Iadecola C, Goldman SS, Harder DR, Heistad DD, Katusic ZS, Moskowitz MA, *et al.* Recommendations of the National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cerebrovascular biology and disease. *Stroke* 2006; 37(6): 1578-81.

Jauch EC, Saver JL, Adams HP, Jr., Bruno A, Connors JJ, Demaerschalk BM, *et al.* Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 2013; 44(3): 870-947.

Kahle KT, Simard JM, Staley KJ, Nahed BV, Jones PS, Sun D. Molecular mechanisms of ischemic cerebral edema: role of electroneutral ion transport. *Physiology (Bethesda)* 2009; 24: 257-65.

Katayama Y, Kawamata T. Edema fluid accumulation within necrotic brain tissue as a cause of the mass effect of cerebral contusion in head trauma patients. *Acta Neurochir Suppl* 2003; 86: 323-7.

Katayama Y, Mori T, Maeda T, Kawamata T. Pathogenesis of the mass effect of cerebral contusions: rapid increase in osmolality within the contusion necrosis. *Acta Neurochir Suppl* 1998; 71: 289-92.

Kawamata T, Katayama Y. Cerebral contusion: a role model for lesion progression. *Prog Brain Res* 2007; 161: 235-41.

Kawamata T, Mori T, Sato S, Katayama Y. Tissue hyperosmolality and brain edema in cerebral contusion. *Neurosurg Focus* 2007; 22(5): E5.

Kempinski O. Cerebral edema. *Semin Nephrol* 2001; 21(3): 303-7.

Kim JY, Kim N, Yenari MA. Mechanisms and potential therapeutic applications of microglial activation after brain injury. *CNS Neurosci Ther* 2015; 21(4): 309-19.

Kimberly WT, Battey TW, Pham L, Wu O, Yoo AJ, Furie KL, *et al.* Glyburide is associated with attenuated vasogenic edema in stroke patients. *Neurocrit Care* 2014; 20(2): 193-201.

Kimelberg HK. Current concepts of brain edema. Review of laboratory investigations. *J Neurosurg* 1995; 83(6): 1051-9.

Kitagawa R, Yokobori S, Mazzeo AT, Bullock R. Microdialysis in the neurocritical care unit. *Neurosurg Clin N Am* 2013; 24(3): 417-26.

Klatzo I. Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol* 1967; 26(1): 1-14.

Klatzo I. Blood-brain barrier and ischaemic brain oedema. *Z Kardiol* 1987; 76 Suppl 4: 67-9.

Klatzo I. Evolution of brain edema concepts. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1994; 60: 3-6.

Korenaga R, Yamamoto K, Ohura N, Sokabe T, Kamiya A, Ando J. Sp1-mediated downregulation of P2X4 receptor gene transcription in endothelial cells exposed to shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280(5): H2214-21.

Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 1996; 19(8): 312-8.

Kurland D, Hong C, Aarabi B, Gerzanich V, Simard JM. Hemorrhagic progression of a contusion after traumatic brain injury: a review. *J Neurotrauma* 2012; 29(1): 19-31.

Lalancette-Hebert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci* 2007; 27(10): 2596-605.

Landolt H, Langemann H. Cerebral microdialysis as a diagnostic tool in acute brain injury. *Eur J Anaesthesiol* 1996; 13(3): 269-78.

Lang GE, Stewart PS, Vella D, Waters SL, Goriely A. Is the Donnan effect sufficient to explain swelling in brain tissue slices? *J R Soc Interface* 2014; 11(96): 20140123.

Launay P, Fleig A, Perraud AL, Scharenberg AM, Penner R, Kinet JP. TRPM4 is a Ca²⁺-activated nonselective cation channel mediating cell membrane depolarization. *Cell* 2002; 109(3): 397-407.

Lee KR, Colon GP, Betz AL, Keep RF, Kim S, Hoff JT. Edema from intracerebral hemorrhage: the role of thrombin. *J Neurosurg* 1996; 84(1): 91-6.

Leis JA, Bekar LK, Walz W. Potassium homeostasis in the ischemic brain. *Glia* 2005; 50(4): 407-16.

Lieutaud T, Dailler, F., Artru, F. and Renaud, B. Boston, pps. xiv, 697 p. Neurochemical monitoring in neurointensive care using intracerebral microdialysis. In: Westerink BHC, Cremers, T.I.F.H. (eds), editor. *Handbook of microdialysis : methods, applications and perspectives*. Boston: Elsevier Academic Press: Amsterdam; 2007. p. 697.

Liss B, Roeper J. Molecular physiology of neuronal K-ATP channels (review). *Mol Membr Biol* 2001; 18(2): 117-27.

Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 2006; 147 Suppl 1: S232-40.

Maas AI, Menon DK, Lingsma HF, Pineda JA, Sandel ME, Manley GT. Re-orientation of clinical research in traumatic brain injury: report of an international workshop on comparative effectiveness research. *J Neurotrauma* 2012; 29(1): 32-46.

Maas AI, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet Neurol* 2008; 7(8): 728-41.

Maeda T, Katayama Y, Kawamata T, Koyama S, Sasaki J. Ultra-early study of edema formation in cerebral contusion using diffusion MRI and ADC mapping. *Acta Neurochir Suppl* 2003; 86: 329-31.

Mangat HS, Hartl R. Hypertonic saline for the management of raised intracranial pressure after severe traumatic brain injury. *Ann N Y Acad Sci* 2015; 1345: 83-8.

Marshall LF. Intercenter variance. *J Neurosurg* 2001; 95(5): 733-4.

Martínez-Valverde T V-JM, Martínez-Saez E, Castro L, Arian F, Cordero E, Rădoi A, Poca MA, Simard J. M, Sahuquillo J. Sulfonylurea Receptor 1 in Humans with Post-Traumatic Brain Contusions. *J Neurotrauma* ahead of print.

Martínez-Valverde T, Vidal-Jorge M, Montoya N, Sánchez-Guerrero A, Manrique S, Munar F, *et al.* Brain microdialysis as a tool to explore the ionic profile of the brain extracellular space in neurocritical patients: a methodological approach and feasibility study. *J Neurotrauma* 2015; 32(1): 7-16.

Mehta RI, Ivanova S, Tosun C, Castellani RJ, Gerzanich V, Simard JM. Sulfonylurea receptor 1 expression in human cerebral infarcts. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013; 72(9): 871-83.

Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol* 2001; 101(3): 249-55.

Mori K, Miyazaki M, Iwase H, Maeda M. Temporal profile of changes in brain tissue extracellular space and extracellular ion (Na⁺), K⁺) concentrations after cerebral ischemia and the effects of mild cerebral hypothermia. *J Neurotrauma* 2002; 19(10): 1261-70.

Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, Arnett DK, Blaha MJ, Cushman M, *et al.* Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2015; 131(4): e29-322.

Munar F, Ferrer AM, de Nadal M, Poca MA, Pedraza S, Sahuquillo J, *et al.* Cerebral hemodynamic effects of 7.2% hypertonic saline in patients with head injury and raised intracranial pressure. *J Neurotrauma* 2000; 17(1): 41-51.

Nag S, Manias JL, Stewart DJ. Pathology and new players in the pathogenesis of brain edema. *Acta Neuropathol* 2009; 118(2): 197-217.

Nguyen MK, Kurtz I. Quantitative interrelationship between Gibbs-Donnan equilibrium, osmolality of body fluid compartments, and plasma water sodium concentration. *J Appl Physiol* (1985) 2006; 100(4): 1293-300.

Nicholson C, Rice ME. The migration of substances in the neuronal microenvironment. *Ann N Y Acad Sci* 1986; 481: 55-71.

Nilius B, Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev* 2001; 81(4): 1415-59.

Noma A. ATP-regulated K⁺ channels in cardiac muscle. *Nature* 1983; 305(5930): 147-8.

Nordenvall M, Ulmsten U, Ungerstedt U. Influence of progesterone on the sodium and potassium concentrations of rat uterine fluid investigated by microdialysis. *Gynecol Obstet Invest* 1989; 28(2): 73-7.

Oddo M, Villa F, Citerio G. Brain multimodality monitoring: an update. *Curr Opin Crit Care* 2012; 18(2): 111-8.

Ono S, Mougouris T, DuBose TD, Jr., Sansom SC. ATP and calcium modulation of nonselective cation channels in IMCD cells. *Am J Physiol* 1994; 267(4 Pt 2): F558-65.

Osborne PG, O'Connor WT, Ungerstedt U. Effect of varying the ionic concentration of a microdialysis perfusate on basal striatal dopamine levels in awake rats. *J Neurochem* 1991; 56(2): 452-6.

Patel AD, Gerzanich V, Geng Z, Simard JM. Glibenclamide reduces hippocampal injury and preserves rapid spatial learning in a model of traumatic brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2010; 69(12): 1177-90.

Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol* 2006; 1(3): 223-36.

Persson L, Hillered L. Chemical monitoring of neurosurgical intensive care patients using intracerebral microdialysis. *J Neurosurg* 1992; 76(1): 72-80.

Poca MA, Sahuquillo J, Vilalta A, de los Rios J, Robles A, Exposito L. Percutaneous implantation of cerebral microdialysis catheters by twist-drill craniostomy in neurocritical patients: description of the technique and results of a feasibility study in 97 patients. *J Neurotrauma* 2006; 23(10): 1510-7.

Popp R, Gogelein H. A calcium and ATP sensitive nonselective cation channel in the antiluminal membrane of rat cerebral capillary endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1108(1): 59-66.

Povlishock JT, Katz DI. Update of neuropathology and neurological recovery after traumatic brain injury. *J Head Trauma Rehabil* 2005; 20(1): 76-94.

Price CJ, Warburton EA, Menon DK. Human cellular inflammation in the pathology of acute cerebral ischaemia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003; 74(11): 1476-84.

Pye IF, Aber GM. Interrelations between cerebrospinal fluid and plasma inorganic ions and glucose in patients with chronic renal failure. *J Clin Pathol* 1982; 35(6): 631-7.

Qureshi AI, Suarez JI. Use of hypertonic saline solutions in treatment of cerebral edema and intracranial hypertension. *Crit Care Med* 2000; 28(9): 3301-13.

Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol* 1967; 34(1): 207-17.

Reiber H, Peter JB. Cerebrospinal fluid analysis: disease-related data patterns and evaluation programs. *J Neurol Sci* 2001; 184(2): 101-22.

Reinert M, Khaldi A, Zauner A, Doppenberg E, Choi S, Bullock R. High level of extracellular potassium and its correlates after severe head injury: relationship to high intracranial pressure. *J Neurosurg* 2000; 93(5): 800-7.

Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Artico M. Development of the blood-brain barrier: a historical point of view. *Anat Rec B New Anat* 2006; 289(1): 3-8.

Rice ME, Gerhardt GA, Hierl PM, Nagy G, Adams RN. Diffusion coefficients of neurotransmitters and their metabolites in brain extracellular fluid space. *Neuroscience* 1985; 15(3): 891-902.

Roozenbeek B, Maas AI, Menon DK. Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol* 2013; 9(4): 231-6.

Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 2002; 39(3): 279-91.

Rosenbloom AJ, Sipe DM, Weedn VW. Microdialysis of proteins: performance of the CMA/20 probe. *J Neurosci Methods* 2005; 148(2): 147-53.

Russell JM. Sodium-potassium-chloride cotransport. *Physiol Rev* 2000; 80(1): 211-76.

Sambrook MA. The relationship between cerebrospinal fluid and plasma electrolytes in patients with meningitis. *J Neurol Sci* 1974; 23(2): 265-73.

Sandoval KE, Witt KA. Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. *Neurobiol Dis* 2008; 32(2): 200-19.

Sanidad mds, política social e igualdad. Lesiones Medulares Traumáticas y Traumatismos Craneoencefálicos en España , 2000-2008; 2011.

Schneider E, Hunke S. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev* 1998; 22(1): 1-20.

Schutte RJ, Oshodi SA, Reichert WM. In vitro characterization of microdialysis sampling of macromolecules. *Anal Chem* 2004; 76(20): 6058-63.

Seino S. ATP-sensitive potassium channels: a model of heteromultimeric potassium channel/receptor assemblies. *Annu Rev Physiol* 1999; 61: 337-62.

Serlin Y, Shelef I, Knyazer B, Friedman A. Anatomy and physiology of the blood-brain barrier. *Semin Cell Dev Biol* 2015.

Shaw CW, Holley HL. Sodium and potassium concentration in human cerebrospinal fluid. I. Normal values. *J Lab Clin Med* 1951; 38(4): 574-6.

Sheth KN, Kimberly WT, Elm JJ, Kent TA, Mandava P, Yoo AJ, *et al.* Pilot study of intravenous glyburide in patients with a large ischemic stroke. *Stroke* 2014a; 45(1): 281-3.

Sheth KN, Kimberly WT, Elm JJ, Kent TA, Yoo AJ, Thomalla G, *et al.* Exploratory analysis of glyburide as a novel therapy for preventing brain swelling. *Neurocrit Care* 2014b; 21(1): 43-51.

Sick TJ, Feng ZC, Rosenthal M. Spatial stability of extracellular potassium ion and blood flow distribution in rat cerebral cortex after permanent middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18(10): 1114-20.

Simard JM, Castellani RJ, Ivanova S, Koltz MT, Gerzanich V. Sulfonylurea receptor 1 in the germinal matrix of premature infants. *Pediatr Res* 2008; 64(6): 648-52.

Simard JM, Chen M. Regulation by sulfanylurea receptor type 1 of a non-selective cation channel involved in cytotoxic edema of reactive astrocytes. *J Neurosurg Anesthesiol* 2004; 16(1): 98-9.

Simard JM, Chen M, Tarasov KV, Bhatta S, Ivanova S, Melnitchenko L, *et al.* Newly expressed SUR1-regulated NC(Ca-ATP) channel mediates cerebral edema after ischemic stroke. *Nat Med* 2006; 12(4): 433-40.

Simard JM, Geng Z, Woo SK, Ivanova S, Tosun C, Melnichenko L, *et al.* Glibenclamide reduces inflammation, vasogenic edema, and caspase-3 activation after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009a; 29(2): 317-30.

Simard JM, Kahle KT, Gerzanich V. Molecular mechanisms of microvascular failure in central nervous system injury--synergistic roles of NKCC1 and SUR1/TRPM4. *J Neurosurg* 2010; 113(3): 622-9.

Simard JM, Kent TA, Chen M, Tarasov KV, Gerzanich V. Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet Neurol* 2007; 6(3): 258-68.

Simard JM, Kilbourne M, Tsybalyuk O, Tosun C, Caridi J, Ivanova S, *et al.* Key role of sulfonylurea receptor 1 in progressive secondary hemorrhage after brain contusion. *J Neurotrauma* 2009b; 26(12): 2257-67.

Simard JM, Woo SK, Gerzanich V. Transient receptor potential melastatin 4 and cell death. *Pflugers Arch* 2012a; 464(6): 573-82.

Simard JM, Woo SK, Schwartzbauer GT, Gerzanich V. Sulfonylurea receptor 1 in central nervous system injury: a focused review. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012b; 32(9): 1699-717.

Smith C. Review: the long-term consequences of microglial activation following acute traumatic brain injury. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2013; 39(1): 35-44.

Stahle L, Segersvard S, Ungerstedt U. A comparison between three methods for estimation of extracellular concentrations of exogenous and endogenous compounds by microdialysis. *J Pharmacol Methods* 1991; 25(1): 41-52.

Stan AD, Ghose S, Gao XM, Roberts RC, Lewis-Amezcu K, Hatanpaa KJ, *et al.* Human postmortem tissue: what quality markers matter? *Brain Res* 2006; 1123(1): 1-11.

Strong AJ, Dardis R. Depolarisation phenomena in traumatic and ischaemic brain injury. *Adv Tech Stand Neurosurg* 2005; 30: 3-49.

Sturgess NC, Hales CN, Ashford ML. Inhibition of a calcium-activated, non-selective cation channel, in a rat insulinoma cell line, by adenine derivatives. *FEBS Lett* 1986; 208(2): 397-400.

Tagliaferri F, Compagnone C, Korsic M, Servadei F, Kraus J. A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir (Wien)* 2006; 148(3): 255-68; discussion 68.

Teasdale G, Jennett B. Assessment and prognosis of coma after head injury. *Acta Neurochir (Wien)* 1976; 34(1-4): 45-55.

Thanvi BR, Treadwell S, Robinson T. Haemorrhagic transformation in acute ischaemic stroke following thrombolysis therapy: classification, pathogenesis and risk factors. *Postgrad Med J* 2008; 84(993): 361-7.

Thomas WE. Brain macrophages: evaluation of microglia and their functions. *Brain Res Brain Res Rev* 1992; 17(1): 61-74.

Tisdall MM, Smith M. Multimodal monitoring in traumatic brain injury: current status and future directions. *Br J Anaesth* 2007; 99(1): 61-7.

Tosun C, Kurland DB, Mehta R, Castellani RJ, deJong JL, Kwon MS, *et al.* Inhibition of the Sur1-Trpm4 channel reduces neuroinflammation and cognitive impairment in subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 2013; 44(12): 3522-8.

Treadwell SD, Thanvi B. Malignant middle cerebral artery (MCA) infarction: pathophysiology, diagnosis and management. *Postgrad Med J* 2010; 86(1014): 235-42.

Trickler WJ, Miller DW. Use of osmotic agents in microdialysis studies to improve the recovery of macromolecules. *J Pharm Sci* 2003; 92(7): 1419-27.

Ungerstedt U, Herrera-Marschitz M, Zetterstrom T. Dopamine neurotransmission and brain function. *Prog Brain Res* 1982; 55: 41-9.

Ungerstedt U, Pycock C. Functional correlates of dopamine neurotransmission. *Bull Schweiz Akad Med Wiss* 1974; 30(1-3): 44-55.

Valable S, Montaner J, Bellail A, Berezowski V, Brillault J, Cecchelli R, *et al.* VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia: both effects decreased by Ang-1. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25(11): 1491-504.

Valadka AB, Goodman JC, Gopinath SP, Uzura M, Robertson CS. Comparison of brain tissue oxygen tension to microdialysis-based measures of cerebral ischemia in fatally head-injured humans. *J Neurotrauma* 1998; 15(7): 509-19.

Vella J, Zammit C, Di Giovanni G, Muscat R, Valentino M. The central role of aquaporins in the pathophysiology of ischemic stroke. *Front Cell Neurosci* 2015; 9: 108.

Vennekens R, Nilius B. Insights into TRPM4 function, regulation and physiological role. *Handb Exp Pharmacol* 2007(179): 269-85.

Verstraeten SV, Mackenzie GG, Oteiza PI. The plasma membrane plays a central role in cells response to mechanical stress. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1798(9): 1739-49.

Wang X, Lo EH. Triggers and mediators of hemorrhagic transformation in cerebral ischemia. *Mol Neurobiol* 2003; 28(3): 229-44.

Wang X, Stenken JA. Microdialysis sampling membrane performance during in vitro macromolecule collection. *Anal Chem* 2006; 78(17): 6026-34.

Westerink BH, Hofsteede HM, Damsma G, de Vries JB. The significance of extracellular calcium for the release of dopamine, acetylcholine and amino acids in conscious rats, evaluated by brain microdialysis. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1988; 337(4): 373-8.

Wetterhall M, Bergquist J, Hillered L, Hjort K, Dahlin AP. Identification of human cerebrospinal fluid proteins and their distribution in an in vitro microdialysis sampling system. *Eur J Pharm Sci* 2014; 57: 34-40.

Wetterling F, Gallagher L, Mullin J, Holmes WM, McCabe C, Macrae IM, *et al.* Sodium-23 magnetic resonance imaging has potential for improving penumbra detection but not for estimating stroke onset time. *J Cereb Blood Flow Metab* 2015; 35(1): 103-10.

White H, Cook D, Venkatesh B. The use of hypertonic saline for treating intracranial hypertension after traumatic brain injury. *Anesth Analg* 2006; 102(6): 1836-46.

Wise BL, Chater N. Effect of mannitol on cerebrospinal fluid pressure. The actions of hypertonic mannitol solutions and of urea compared. *Arch Neurol* 1961; 4: 200-2.

Wong AD, Ye M, Levy AF, Rothstein JD, Bergles DE, Searson PC. The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng* 2013; 6: 7.

Woo SK, Kwon MS, Geng Z, Chen Z, Ivanov A, Bhatta S, *et al.* Sequential activation of hypoxia-inducible factor 1 and specificity protein 1 is required for hypoxia-induced transcriptional stimulation of Abcc8. *J Cereb Blood Flow Metab* 2012; 32(3): 525-36.

Woo SK, Kwon MS, Ivanov A, Gerzanich V, Simard JM. The sulfonylurea receptor 1 (Sur1)-transient receptor potential melastatin 4 (Trpm4) channel. *J Biol Chem* 2013; 288(5): 3655-67.

Xu XZ, Moebius F, Gill DL, Montell C. Regulation of melastatin, a TRP-related protein, through interaction with a cytoplasmic isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(19): 10692-7.

Yamada K, Inagaki N. Neuroprotection by KATP channels. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38(6): 945-9.

Zhang J, Goodlett DR, Peskind ER, Quinn JF, Zhou Y, Wang Q, *et al.* Quantitative proteomic analysis of age-related changes in human cerebrospinal fluid. *Neurobiol Aging* 2005; 26(2): 207-27.

Zheng Z, Yenari MA. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurol Res* 2004; 26(8): 884-92.