



Universidad de Oviedo

Universidá d'Uviéu

University of Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

**UTILIDAD DEL EXUDADO NASAL COMO
MÉTODO PARA LA MEDICIÓN DE
BIOMARCADORES EN EL DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL DEL ICTUS AGUDO**

Doctoranda: Carmen García-Cabo Fernández



Universidad de Oviedo

Universidá d'Uviéu

University of Oviedo

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD

**UTILIDAD DEL EXUDADO NASAL COMO
MÉTODO PARA LA MEDICIÓN DE
BIOMARCADORES EN EL DIAGNÓSTICO
DIFERENCIAL DEL ICTUS AGUDO**

Doctoranda: Carmen García-Cabo Fernández



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma:	Inglés:
2.- Autor	
Nombre:	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: CIENCIAS DE LA SALUD	
Órgano responsable: CENTRO INTERNACIONAL DE POSTGRADO	

RESUMEN (en español)

Múltiples investigaciones han estudiado la utilidad de diversos biomarcadores en el diagnóstico diferencial del ictus agudo. Además del estudio de proteínas, algunas de esas investigaciones apuntan a ciertos metales, como el hierro, el cobre o el zinc, como útiles para dicho fin, dado que son importantes para mantener el balance de ciertos componentes biológicos. El reciente descubrimiento del sistema linfático cerebral y de su posible papel en el aclaramiento de determinados solutos sugiere un papel del mismo en determinadas enfermedades neurológicas. En los estudios realizados se han observado trazas de LCR en el exudado nasal sugiriendo que una de las vías de aclaramiento del sistema linfático cerebral es el nervio olfatorio a través de la lámina cribosa. Nuestro objetivo es discernir si en muestras de exudado nasal podrían detectarse biomarcadores que fueran útiles en el diagnóstico diferencial entre ictus isquémico y hemorrágico agudos.

Analizamos una muestra de 101 pacientes con diagnóstico de ictus isquémico o hemorrágico que ingresan en la Unidad de Ictus del HUCA en el periodo de un año. Se registran datos demográficos, clínicos, analíticos y radiológicos. Se recogen asimismo muestras de exudado nasal de todos ellos en una solución ácido nítrico al 10%. Todas las muestras son analizadas en ICP-QQQ Agilent 8800. Se analizan estadísticamente los datos con el SPSS V22.

El 50% fueron hemorrágicos, siendo la edad media de 71 años. En cada muestra de exudado nasal extraída se midieron los niveles de Hierro, cobre y zinc siendo estadísticamente más elevados en los ictus agudos de origen hemorrágicos que en los de origen isquémico ($p < 0.05$).

Concluimos que algunos metales como el hierro, zinc o cobre pueden ser medidos en exudado nasal, como productos de degradación del daño en la enfermedad cerebrovascular y aclarados por el sistema linfático cerebral, y ser útiles en el diagnóstico diferencial del ictus agudo.

RESUMEN (en Inglés)

Multiple investigations have studied the usefulness of various biomarkers in the differential diagnosis of acute stroke. In addition to the study of proteins, some of these investigations point to certain metals, such as iron, copper or zinc, as useful for this purpose, since they are important for maintaining the balance of certain biological components.



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

The recent discovery of the cerebral lymphatic system and its possible role in the clearance of certain solutes suggests a role in certain neurological diseases. In the studies carried out, traces of CSF have been observed in the nasal exudate suggesting that one of the ways of clearance of the cerebral lymphatic system is the olfactory nerve through the screened lamina. Our objective is to discern if biomarkers that were useful in the diagnosis could be detected in nasal exudate samples differential between acute ischemic and hemorrhagic stroke.

We analyzed a sample of 101 patients diagnosed with ischemic or hemorrhagic stroke who were admitted to the HUCA Stroke Unit in a period of one year. Demographic, clinical, analytical and radiological data are recorded. Samples of nasal exudate are also collected from all of them in a 10% nitric acid solution. All samples are analyzed in ICP-QQQ Agilent 8800. Data are statistically analyzed with SPSS V22.

50% were hemorrhagic, the average age being 71 years. In each sample of nasal exudate extracted, iron, copper and zinc levels were measured being statistically higher in acute strokes of hemorrhagic origin than in those of ischemic origin ($p < 0.05$).

We conclude that some metals such as iron, zinc or copper can be measured in nasal exudate, as products of degradation of damage in cerebrovascular disease and cleared by the cerebral lymphatic system, and be useful in the differential diagnosis of acute stroke.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN CIENCIAS DE LA SALUD

*La ciencia la hacen personas, donde sea, en una buhardilla, cuando
tienen el genio investigador, y no los laboratorios, por ricos que se
construyan y se doten (...)*

Marie Curie

ÍNDICE

CAPÍTULO I

Introducción

AGRADECIMIENTOS.....	1
ÍNDICE DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	3

CAPÍTULO I

Introducción

I. DEFINICIÓN DE ICTUS Y DE SUS VARIANTES PRINCIPALES	9
II. IMPORTANCIA EPIDEMIOLÓGICA, SANITARIA Y SOCIAL DE LAS ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES	10
III. FISIOPATOLOGÍA DEL ICTUS ISQUÉMICO Y HEMORRÁGICO	11
1. Fisiopatología del ictus isquémico	11
2. Fisiopatología del ictus hemorrágico.....	12
IV. ABORDAJE DIAGNÓSTICO DEL ICTUS AGUDO.....	12
1. Diagnóstico del ictus isquémico	13
2. Neuroimagen en las hemorragias cerebrales	15
V. TRATAMIENTO DEL ICTUS	16
1. Estado actual del tratamiento del paciente con ictus isquémico agudo	16
2. Ictus hemorrágico: estado actual del tratamiento	20
2.1 Tratamiento para la prevención del crecimiento del hematoma	22
2.2 Manejo de la tensión arterial.....	22
2.3 Manejo de hemostasia	23
2.4 Tratamiento quirúrgico de evacuación del hematoma	25
2.5 Tratamiento del edema perilesional	26

VI. BIOMARCADORES EN EL ICTUS AGUDO.....	27
1. Biomarcadores proteicos para el diagnóstico diferencial en agudo entre ictus isquémico y hemorrágico	29
1.1 Marcadores estudiados de forma individual	29
A) Biomarcadores de daño endotelial	30
B) Biomarcadores de daño cerebral.....	32
C) Biomarcadores de inflamación	33
D) Otros biomarcadores.....	33
1.2 Marcadores estudiados en paneles	34
2. Biomarcadores metálicos	34
3. Metabolismo del hierro como biomarcador en el ictus agudo	35
4. Otros biomarcadores.....	36
VII. EL SISTEMA LINFÁTICO CEREBRAL.....	37
1. Estructura y función de las barreras del sistema nervioso central	37
2. Sistema linfático cerebral e implicaciones de su descubrimiento.....	38
2.1 Descubrimiento del sistema linfático cerebral	38
2.2 Implicaciones del descubrimiento del sistema linfático cerebral	42
3. Regulación y función de la saliva y su relación con el sistema nervioso central	43
VIII. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS DESARROLLADA.....	44
IX. RESUMEN DE LA INTRODUCCIÓN	44
1. Diagnóstico diferencial entre ictus isquémico y hemorrágico.....	45
2. Biomarcadores en el diagnóstico diferencial entre isquemia y hemorragia.....	46
3. Sistema linfático cerebral	48

CAPÍTULO II

Hipótesis y objetivos del estudio

I.	HIPÓTESIS	49
II.	OBJETIVOS.....	50

CAPÍTULO III

Metodología del estudio

I.	DISEÑO DEL ESTUDIO Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA.....	51
	1. Criterios de inclusión.....	51
	2. Criterios de exclusión	51
II.	DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO CLÍNICO.....	52
III.	DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO DE RECOGIDA DE MUESTRA	53
	1. Material utilizado para la recogida de muestra	54
	2. Sistemática de recogida de la muestra.....	54
	3. Procesamiento y almacenamiento de la muestra.....	54
	4. Determinación de marcadores biológicos	55
IV.	VARIABLES CLÍNICAS.....	56
	1. Gravedad inicial del ictus a las 24 horas y en el momento del alta.....	56
	2. Volumen de infarto	56
	3. Pronóstico funcional a 3 meses	56
	4. Antecedentes médicos	57
	5. Características del ictus	57
V.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	57

CAPÍTULO IV

Resultados

I.	DESARROLLO Y EXPLICACIÓN DE LOS RESULTADOS	58
II.	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS HASTA EL PACIENTE 75	59
	1. Características demográficas	59
	2. Hábitos y factores de riesgo vascular	60
	3. Características del ictus agudo.....	62
	3.1 Lateralidad del ictus	62
	3.2 Localización de la lesión	62
	3.3 Etiología del ictus	64
	4. Características clínicas del paciente en el momento agudo. Escalas NIHSS y mRS basal.....	65
	5. Tratamientos farmacológicos o intervencionistas	67
	6. Parámetros radiológicos.....	67
	7. Variables clínicas de evolución	69
	8. Parámetros de laboratorio en suero	70
	9. Parámetros de laboratorio en exudado	72
	9.1 El hierro en exudado nasal.....	74
	9.2 El zinc en exudado nasal	78
	9.3 El cobre en exudado nasal	82
	9.4 Variación de los niveles de hierro, zinc y cobre en exudado nasal en relación con las variables clínicas al ingreso y variables pronósticas	87
	9.5 Variación de los niveles de hierro, zinc y cobre en exudado nasal en relación con las variables radiológicas	89
	9.6 Análisis por componentes principales	92
	9.7 Análisis multivariante	94
	10. Parámetros de laboratorio en saliva	94
	11. Comparación de la utilidad para el diagnóstico diferencial entre el grupo ISQ y el HIC de la detección de metales con el diagnóstico gold standard.....	96

12. Resumen y conclusiones del apartado resultados hasta el paciente 75	97
III. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS HASTA EL PACIENTE 101	97
1. Características demográficas	97
2. Parámetros de laboratorio en exudado	99
3. Parámetros de laboratorio en saliva	101
4. Resultados en forma de publicaciones y otra producción científica	103

CAPÍTULO V

Síntesis de los resultados y discusión

I. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO PRESENTADO: PUNTOS FUERTES Y LIMITACIONES.....	105
II. UTILIDAD DE LA MEDICIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE FE, ZN Y CU EN EXUDADO NASAL PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE ICTUS ISQUÉMICO Y HEMORRÁGICO	109
III. RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE FE, ZN Y CU MEDIDAS EN EL EXUDADO NASAL Y LAS CARACTERÍSTICAS RADIOLÓGICAS DEL ICTUS HEMORRÁGICO	110
IV. RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE FE, ZN Y CU MEDIDAS EN EXUDADO NASAL Y LAS CARACTERÍSTICAS RADIOLÓGICAS DEL ICTUS ISQUÉMICO	111
V. RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE FE, ZN Y CU MEDIDAS EN EXUDADO NASAL Y EL ESTADO BASAL Y LA GRAVEDAD INICIAL DEL ICTUS AGUDO	111
VI. RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE FE, ZN Y CU MEDIDAS EN EXUDADO NASAL Y EL PRONÓSTICO FUNCIONAL FINAL DEL ICTUS AGUDO	112
VII. RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE FE, ZN Y CU MEDIDAS EN SALIVA Y EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE ICTUS ISQUÉMICO Y HEMORRÁGICO	112

VIII. IMPLICACIONES DE LOS RESULTADOS PRESENTADOS Y DIRECCIONES FUTURAS.....	113
CONCLUSIONES.....	117
ANEXO I	119
ANEXO II	121
ANEXO III.....	123
ANEXO IV.....	124
ANEXO V	127
ANEXO VI.....	129
ANEXO VII.....	137
ANEXO VIII.....	139
ANEXO IX.....	141
ANEXO X	143
BIBLIOGRAFÍA.....	147

AGRADECIMIENTOS

A los pacientes de la Unidad de Ictus del HUCA y a sus familiares, por su paciencia, confianza y contención en los estornudos; ellos son la razón y motivación de este estudio (y de todos los demás) y gracias a ellos ha sido posible.

A los doctores Sergio Calleja y Lorena Benavente (mis directores), ellos me han transmitido sus conocimientos, su incansable entusiasmo y me han contagiado la ilusión en el estudio de personas que sufren un ictus. Gracias por vuestro trabajo diario y por poner vuestros valores en él. Gracias por permitirme aprender de los mejores y ser mis maestros y amigos.

A las enfermeras de la Unidad de Ictus del HUCA por su paciencia y sabiduría.

A Mate, Pablo y Costa, del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Oviedo por su acogida en sus laboratorios, su interés, disposición y curiosidad desinteresada. Sin su inestimable ayuda esta tesis no hubiera sido posible.

A Belén del Servicio de Bioquímica Clínica del HUCA por prestarme la preciosa balanza y ahorrarme muchos quebraderos de cabeza. Gracias por abrirme las puertas del laboratorio.

A Eva Cernuda, por iniciar y plantar la semilla que dio lugar a esta tesis hace años.

A mis compañeros (algunos amigos) de Neurología del Centro Médico, el HUCA y Cabueñes, de todos ellos he aprendido y todos me han ayudado en algún momento.

A mis abuelos, los que están y los que no, sé que son los más felices con esto.

A mis padres por quererme y darme todo, sobretodo su apoyo y por transmitirme constancia.

A mis hermanos por verme con el orgullo y admiración con el que se ve a un hermano mayor, siempre estáis.

Y a Chacón por ser incondicional, conocerme más que yo misma y aceptarme y quereme así. Eres el mejor compañero de vida.

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ACM	Arteria cerebral media
ACA	Arteria cerebral anterior
ACP	Arteria cerebral Posterior
AA	Angiopatía Amiloide
ADMA	Dimetilarginina asimétrica
AUC	<i>Area under the curve</i>
AIT	Accidente Isquémico Transitorio
AngioRM	Angiografía por Resonancia Magnética
AngioTC	Angiografía por Tomografía Computerizada
ASPECTS	<i>Alberta Stroke Program Early CT Scores</i>
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
ATLANTIS	Ensayo clínico para probar eficacia de rTPA
ATACH	<i>Antihypertensive treatment of acute cerebral hemorrhage</i>
ANNEXA 4	<i>Andexanet alfa for reversal of factor Xa inhibitors in patients with acute major bleeding</i>
BHE	Barrera Hematoencefálica
Brb	Bilirrubina
CRASH	<i>Corticosteroid randomisation after significant head injury</i>
CAMS	<i>Celullar adhesion mollecules</i>
Cd	Cadmio
CHC	Complejo de inmunohistocompatibilidad
Cu	Cobre

DL	Dislipemia
DM	Diabetes Mellitus
DTC	Dúplex Transcraneal
DS	Desviación estándar
DEFUSE	<i>Diffusion and perfusion imaging evaluation for understanding stroke evolution</i>
DAWN	<i>DWI or CTP assessment with clinical mismatch in the triage of wake up and late presenting strokes undergoing neurointervention with trevo</i>
ECV	Enfermedad cerebrovascular
ENCHANTED	<i>Enhanced control of hypertension and thrombolysis stroke study</i>
ECASS	<i>European cooperative acute stroke study</i>
ESCAPE	<i>Endovascular treatment for small core and anterior circulation proximal occlusion with emphasis on minimizing CT to recanalization times</i>
ELISA	Inmunoabsorción ligada a enzima
ET	Endotelina
EXTEND IA	<i>Extending the time to thrombolysis in emergency neurological deficits with intra-arterial therapy</i>
ERICH	<i>Ethnic /racial variations of intracerebral hemorrhage</i>
FA	Fibrilación Auricular
FRV	Factores de Riesgo Vascular
Fe	Hierro
Fn	Fibronectina
FSC	Flujo sanguíneo cerebral
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
G	Gramos
GGT	Gammabutilaminotransferasa
HTA	Hipertensión Arterial

HSA	Hemorragia subaracnoidea
HUCA	Hospital Universitario Central de Asturias
HERMES	Metanálisis sobre tratamiento endovascular
HIC	Hemorragia intracerebral
IV	Intravenoso
ICP	Espectrómetro de masas
ISQ	Isquémico
IIA	Ictus isquémico agudo
IL	Interleuquina
INTERACT	<i>Intensive blood pressure reduction in acute cerebral hemorrhage trial</i>
IST	Índice de saturación de transferrina
ICH ADAPT	<i>The intracerebral hemorrhage acutely decreasing arterial pressure trial</i>
LCR	<i>Líquido cefalorraquídeo</i>
LACI	<i>Lacunar infarct</i>
M1	<i>Tronco principal de la ACM</i>
M2	<i>Segmento tras la primera bifurcación de la ACM</i>
MMP-9	<i>Metaloproteinasa-9</i>
mRS	<i>Modified Rankin scale</i>
MISTIE	<i>Minimally invasive surgery with thrombolysis in intracerebral hemorrhage evacuation</i>
MR CLEAN	<i>Multicenter randomized clinical trial of endovascular treatment for acute ischemic stroke in the Netherlands</i>
MAV	<i>Malformación arteriovenosa</i>
mL	<i>Mililitros</i>
NIHSS	<i>National institute of Health Stroke Scale</i>
NO	<i>Óxido Nítrico</i>

<i>NINDS</i>	<i>National institute of neurological disorders and stroke</i>
<i>nM</i>	<i>Nanomolar</i>
<i>OMS</i>	<i>Organización Mundial de la Salud.</i>
<i>PAI-1</i>	<i>Plasminogen activator inhibitor-1</i>
<i>PCR</i>	<i>Proteína C reactiva</i>
<i>PACI</i>	<i>Parcial anterior circulation infarct</i>
<i>POCI</i>	<i>Posterior circulation infarct</i>
<i>PATCH</i>	<i>Platelet infusión versus standard care after acute stroke due to spontaneous cerebral hemorrhage</i>
<i>Pb</i>	<i>Plomo</i>
<i>RBP4</i>	<i>Proteína de unión retinoide</i>
<i>REVERSE AD</i>	<i>Reversal effects of idarucizumab on active dabigatran</i>
<i>REVASCAT</i>	<i>Endovascular revascularization with solitaire device versus best medical therapy in anterior circulation stroke within 8 hours</i>
<i>RETRACE</i>	<i>German wide multicenter analysis of oral anticoagulation associated intracerebral hemorrhage</i>
<i>RM</i>	<i>Resonancia magnética.</i>
<i>SWIFT PRIME</i>	<i>Stent-retriever thrombectomy after intravenous r-TPA vs r_tPA alone in Stroke</i>
<i>STOP AUST</i>	<i>The spot sign and tranexamic acid on preventing ICH growth- Australia trial</i>
<i>SNC</i>	<i>Sistema nervioso central</i>
<i>TAD</i>	<i>Tensión Arterial Diastólica</i>
<i>TAS</i>	<i>Tensión Arterial Sistólica</i>
<i>TC</i>	<i>Tomografía Computerizada</i>
<i>TIBI</i>	<i>Thrombolysis in brain ischemia</i>
<i>TICA</i>	<i>Arteria Carótida Intracraneal Terminal</i>
<i>TICI</i>	<i>Thrombolysis in cerebral ischemia</i>
<i>TOAST</i>	<i>Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment</i>

<i>tPA</i>	<i>Activador Tisular del Plasminógeno endovenoso</i>
<i>TACI</i>	<i>Total anterior circulation infarct</i>
<i>TM</i>	<i>Trombectomía mecánica</i>
<i>TTM</i>	<i>Tiempo de tránsito medio</i>
<i>T_{máx}</i>	<i>Tiempo máximo</i>
<i>TNF</i>	<i>Factor de necrosis tumoral</i>
<i>TICH</i>	<i>Tranexamic acid for intracerebral hemorrhage</i>
<i>VSC</i>	<i>Volumen sanguíneo cerebral</i>
<i>VCM</i>	<i>Volumen corpuscular medio</i>
<i>Zn</i>	<i>Zinc</i>

I. DEFINICIÓN DE ICTUS Y DE SUS VARIANTES PRINCIPALES

El concepto de enfermedad cerebrovascular (ECV) se refiere a todo trastorno en el cual un área del encéfalo se afecta de forma transitoria o permanente por una isquemia o hemorragia, estando uno o más vasos sanguíneos afectados por un proceso patológico. El término ictus representa de forma genérica un grupo de trastornos que incluyen la hemorragia cerebral, el infarto y la hemorragia subaracnoidea. Ictus es un término latino que, significa golpe y describe perfectamente el carácter brusco y súbito del proceso. Son sinónimas las denominaciones accidente cerebrovascular, ataque cerebrovascular y apoplejía¹.

Los ictus se clasifican en dos categorías principales: isquémicos y hemorrágicos (figura 1)². La isquemia cerebral puede ser global, afectando a todo el cerebro, o focal, cuando solo se afecta una parte del parénquima.

Los ictus isquémicos se incluyen dentro de la isquemia focal, y son aquellos en los que la isquemia deja su impronta en el parénquima cerebral y son visibles por tanto en la neuroimagen. Por otro lado, dentro de la isquemia focal, también se incluyen los accidentes isquémico transitorios (AIT) que se definen como síntomas focales cerebrales, espinales o retinianos debidos a una disminución del flujo sanguíneo cerebral, bien por una trombosis, un embolismo asociado a cardiopatía, enfermedad hematológica... sin evidencia de lesiones en la neuroimagen.

Por otro lado, el ictus hemorrágico puede dividirse en hemorragia cerebral, que a su vez puede ser parenquimatosa o ventricular, o hemorragia subaracnoidea.

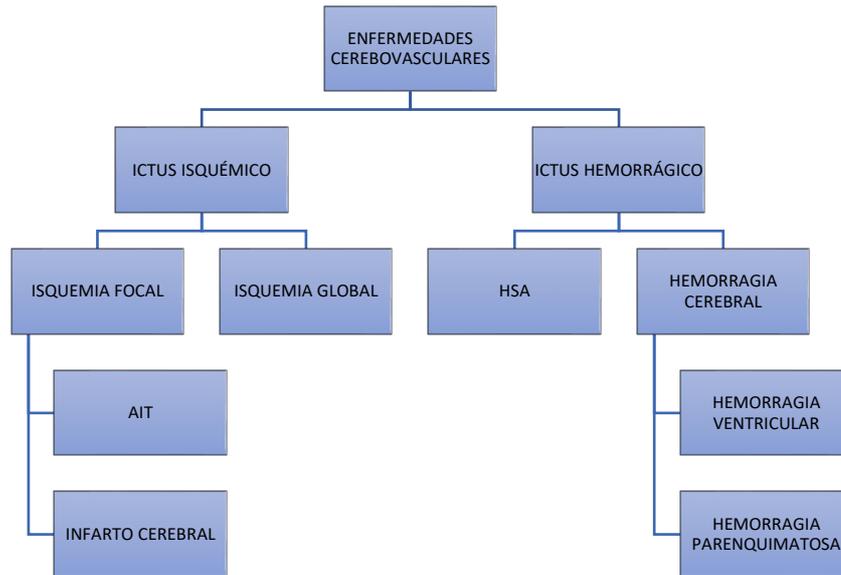


Figura 1: Clasificación de las ECV. HSA: Hemorragia subaracnoidea

II. IMPORTANCIA EPIDEMIOLÓGICA, SANITARIA Y SOCIAL DE LAS ENFERMEDADES CEREBROVASCULARES

Las ECV son muy prevalentes en la población general, siendo responsables del 10% de las muertes en todo el mundo.³ Además son una de las principales causas de hospitalización, consumiendo una cantidad sustancial de recursos de los sistemas de salud de forma global. La incidencia de las ECV se estima en un rango desde 4 a 12 casos por 1000 personas y año en poblaciones mayores de 55 años y desde 46,1 a 73.3 casos por 1000 personas y año en mayores de 65 años⁴.

La morbimortalidad de las ECV alcanza en los pacientes que sufren un ictus un 29% de mortalidad durante el primer año, un 30% de dependencia y alrededor del 16% de institucionalización en centros de larga estancia⁵. Las ECV son una de las principales causas de muerte y constituyen la principal causa de discapacidad en el adulto a nivel mundial. Según la organización mundial de la Salud (OMS) el ictus es la segunda causa de muerte en el mundo, aunque la mortalidad por el mismo haya disminuido en años recientes⁶.

Los datos más completos y actualizados que se acercan a la incidencia de las ECV en España son los reflejados en el estudio Iberictus⁷. Dicho estudio aporta una visión epidemiológica del estado del ictus en España con

una incidencia estimada de ictus en nuestro país de 147 casos por 100000 habitantes y año, así como una prevalencia del 6,4% en mayores de 70 años⁸.

De estos datos se desprende la importancia de las ECV, que constituyen la segunda causa de muerte en el mundo, la causa más frecuente en mujeres y la cuarta causa en hombres.

III. FISIOPATOLOGÍA DEL ICTUS ISQUÉMICO Y HEMORRÁGICO

Como se exponía en el apartado anterior existen dos grandes categorías de daño cerebral en los pacientes que sufren un ictus, la isquemia que consiste en una disminución del flujo sanguíneo con la consiguiente falta de aporte de oxígeno al tejido infartado, y la hemorragia que supone un paso de la sangre al espacio extravascular, derivado de la rotura del vaso y produciendo una interrupción de las vías de conexión neuronal o un aumento de presión intracraneal secundaria a las mismas⁹.

1. Fisiopatología del ictus isquémico

La isquemia puede ser dividida en tres mecanismos: la trombosis, el embolismo y la disminución de perfusión cerebral sistémica.

Por definición, trombosis se refiere a una obstrucción de sangre en relación con un proceso oclusivo en uno o varios vasos sanguíneos. El proceso más común de daño vascular es la aterosclerosis, en la que los tejidos fibrosos y musculares se engrosan por debajo de la capa íntima y posteriormente existe depósito de colesterol, formando placas que estrechan la luz arterial. La aterosclerosis afecta a las pequeñas y grandes arterias de la circulación cerebral¹⁰.

Los vasos de pequeño calibre son, sin embargo, más frecuentemente dañados por la hipertensión. En estos casos, el aumento de presión arterial mantenido da lugar a una hipertrofia de la capa media y a un depósito de material fibrinoide, lo que lleva finalmente a un estrechamiento de la luz del vaso¹¹.

Otras patologías vasculares menos frecuentes incluyen la displasia fibromuscular, las arteritis o las disecciones.

En los embolismos un material formado a cualquier nivel del sistema vascular termina ocluyendo una arteria cerebral provocando un bloqueo del

paso de sangre, por lo que no se trata de un problema primariamente local en contraste con la aterosclerosis¹².

En el caso de una disminución sistémica de la perfusión cerebral, el descenso del flujo sanguíneo cerebral está causada por una merma de la presión de perfusión sistémica, siendo las causas más frecuentes un fallo cardíaco en el contexto de una arritmia o un infarto o bien una hipotensión arterial sistémica.

Todos estos mecanismos dan lugar a un daño temporal, en el caso de los AIT, o permanente del tejido cerebral, que por convenio es lo que denominamos infarto. La instauración del infarto cerebral depende de la localización de la isquemia y de la duración del mismo.

2. Fisiopatología del ictus hemorrágico

La hemorragia intracerebral puede dividirse en 2 subtipos: la subaracnoidea y la parenquimatosa, no considerándose dentro de la clasificación de ictus hemorrágico clásico la hemorragia subdural y la epidural. Cada uno de ellos tiene diferentes causas y su manejo también es distinto.

En el caso de la hemorragia subaracnoidea, que frecuentemente es debida a rotura de aneurismas o a malformaciones vasculares, la sangre se posiciona en la superficie del cerebro diseminándose rápidamente por el líquido cefalorraquídeo a los espacios alrededor del cerebro.

Por otro lado, el término hemorragia cerebral, que equivale a hemorragia parenquimatosa, se refiere a aquellas hemorragias que tienen lugar en el espesor del tejido cerebral y en las que la hipertensión arterial es la causa principal. Otras causas como la angiopatía amiloidea o las causas secundarias a tumores, coagulopatías...

Tanto el hematoma subdural como el epidural son causados habitualmente por traumatismos.

IV. ABORDAJE DIAGNÓSTICO DEL ICTUS AGUDO

La importancia de la diferenciación fisiopatológica desarrollada en el apartado anterior, viene dada por el diferente manejo según se trate de un tipo u otro de ictus, y de dicho manejo depende el pronóstico vital y funcional del

paciente. En los siguientes apartados se resume el estado actual del diagnóstico en ictus isquémico y hemorrágico y su importancia.

1. Diagnóstico del ictus isquémico

El diagnóstico de la condición isquémica de un ictus agudo teniendo en cuenta tan solo sus características clínicas ha sido clásicamente considerado imposible, debido a que no existen síntomas ni signos exploratorios patognomónicos de la misma. Aunque existen biomarcadores (se desarrollarán en los siguientes apartados) que han buscado realizar de forma fiable este diagnóstico diferencial, e incluso escalas clínicas¹³ que buscan especificidad para el mismo fin, ninguno ha alcanzado un valor predictivo positivo suficiente que desbanque a la neuroimagen como método diagnóstico *gold standard* en el momento actual.

Además, tomar decisiones en el tratamiento del ictus isquémico se ha tornado un desafío en los últimos tiempos, que es aún más dificultoso en los pacientes con hora inicio indeterminado¹⁴.

Múltiples modalidades de neuroimagen pueden ayudar a reconocer el tejido en isquemia potencialmente recuperable, incluso en aquellos pacientes que presentan un ictus de inicio desconocido, o aún ser útiles a la hora de reconocer patrones diferenciados si nos encontramos ante un *stroke mimic*¹⁵ (entiéndase por aquellos casos en los que la sospecha inicial es un ictus, y después de completar el estudio y ver la evolución se clasifican como episodios de causa no cerebrovascular).

Dentro de estas técnicas se incluye la Tomografía Computerizada (TC) de perfusión, el *mismatch* (término que proviene del inglés y se traduce como desajuste o diferencia) en la Resonancia Magnética (RM) usando las secuencias de perfusión y la difusión, y el *mismatch* visual entre la secuencia de difusión y FLAIR en la RM.

En el caso de la TC de perfusión, se han propuesto diversos parámetros hemodinámicos para identificar las áreas de hipoperfusión, tales como el volumen sanguíneo cerebral (VSC), el flujo sanguíneo cerebral (FSC), el tiempo de tránsito medio (TTM) o el tiempo al pico (Tmax). Aunque no existe consenso sobre los valores a utilizar, el *core* isquémico suele definirse como una región con VSC y FSC disminuidos y aumento de TTM y Tmax^{16,17,18}.

Por otro lado, a pesar de que el *mismatch* perfusión-difusión de la RM es otro de los métodos validados para medir el tejido isquémico en riesgo, tiene en su contra el tiempo que lleva realizar la prueba y su limitada disponibilidad frente a la TC. Además existen similares limitaciones a la hora de determinar los puntos de corte óptimos para diferenciar isquemia de tejido potencialmente salvable¹⁹.

Recientemente se han desarrollado softwares que permiten realizar las medidas de forma objetiva y proporcionan una cuantificación automática del *core* y la penumbra y que sirven tanto para su uso en TC como en RM. La intención de dichos softwares es hacer más fácil y rápida la toma de decisiones, así como hacer más fiable el diagnóstico de penumbra o isquemia irreversible, y de hecho se han utilizado en estudios recientes²⁰.

Por último, la presencia de lesión establecida en la secuencia de difusión de la RM, combinada con la ausencia de la misma en la secuencia FLAIR tiene un 62% de sensibilidad y un 78% de especificidad para la elección de pacientes candidatos a fibrinólisis en las primeras 4,5 horas²¹.

En la figura 2 se aclaran los conceptos oligohemia, penumbra y *core* del infarto en los que se basan las técnicas descritas en este apartado.



Figura 2: Conceptos a tener en cuenta en la neuroimagen de perfusión. TTP= tiempo al pico; TTM= tiempo máximo; CBV= Volumen sanguíneo cerebral; CBF= Flujo sanguíneo cerebral

2. Neuroimagen en las hemorragias cerebrales

La hemorragia cerebral es difícil de diferenciar del ictus de origen isquémico en función de los datos clínicos, como se ha expuesto en apartados anteriores. Sin embargo, ciertos síntomas del paciente pueden orientar hacia ella, como la presencia de dolor de cabeza, crisis comiciales, vómitos o disminución de nivel de conciencia, pero su especificidad y sensibilidad son bajas.

A pesar de todo, ante un paciente con clínica focal neurológica de inicio agudo debe realizarse una neuroimagen de forma inmediata, en vistas a confirmar el diagnóstico de ictus y del proceso patológico subyacente, bien sea isquemia, hemorragia u otro proceso.

La RM es el método que define mejor la anatomía, pero se trata de una prueba cara y no accesible en todos los centros, por lo que a menudo es desplazada por la TC cerebral en el momento agudo y utilizada más en la fase subaguda de cara a la búsqueda de la causa subyacente a la hemorragia²².

Por tanto, la TC sin contraste es el estudio que se utiliza de inicio para el diagnóstico de hemorragia cerebral, dando información de la localización, el volumen, si existe o no vertido ventricular, si hay hemorragia subaracnoidea que oriente hacia un aneurisma subyacente o hacia AA²³...

La probabilidad de una lesión vascular subyacente al hematoma es del 15% en adultos con hemorragia cerebral²⁴. Por ello, la decisión de si ampliar estudios con secuencias angiográficas debe guiarse por la edad del paciente, la historia de hipertensión o la presencia en la TC simple de enfermedad de pequeño vaso.

Una vez se realiza la TC con secuencias angiográficas, existen varios signos que predicen con cierta solidez la progresión o expansión del hematoma, entre ellos destaca el *spot sign*²⁵. Este signo ha sido el foco de atención en muchos estudios y artículos, dado que se ha presupuesto que conociendo el punto de sangrado activo puede llegarse a un mejor entendimiento del mecanismo por el cual se produce la hemorragia²⁶. El *spot sign* se puede detectar con cierta fiabilidad tras entrenamiento²⁷ y, además de dar información sobre la probabilidad del crecimiento del hematoma, lo hace sobre el pronóstico funcional, tanto sin intervención como tras intervención quirúrgica como tratamiento²⁸⁻²⁹.

V. TRATAMIENTO DEL ICTUS

La importancia del diagnóstico diferencial desarrollado en el apartado anterior, viene dada por el diferente manejo según se trate de un tipo u otro de ictus, y de dicho manejo depende el pronóstico vital y funcional del paciente. En los siguientes apartados se resume el estado actual del tratamiento en ictus isquémico y hemorrágico y su trascendencia.

1. Estado actual del tratamiento del paciente con ictus isquémico agudo

El tratamiento médico estándar, que intenta reperfundir el tejido isquémico mediante la recanalización del vaso obstruido en el ictus isquémico agudo es el activador tisular recombinante del plasminógeno (rTPA), un agente trombolítico endovenoso que está aprobado en aquellos pacientes que tengan acceso a él en las primeras 4,5 horas desde el inicio de los síntomas^{30,31,32}. Su eficacia y seguridad son hoy en día bien conocidas y apoyadas por múltiples ensayos clínicos randomizados y confirmado por registros de efectividad en vida real³³.

Aunque la dosis estándar para la fibrinólisis endovenosa es de 0,9 mg/kg, con una dosis inicial del 10% en bolo y el resto en perfusión continua durante 60 minutos, se han usado dosis más pequeñas (habitualmente 0,6 mg/kg) en los casos con alto riesgo de sangrado intracraneal en pacientes asiáticos³⁴. Sin embargo, el estudio ENCHANTED (*Enhanced control of hypertension and thrombolysis stroke study*), que compara directamente la dosis estándar con dosis baja de rTPA no demostró claramente la no inferioridad de la dosis baja frente a la estándar en cuanto al objetivo de muerte y discapacidad, aunque sí se reportaron menos casos de transformación hemorrágica³⁵. En un análisis post hoc sí que se sugiere que en aquellos pacientes que previamente estaban antiagregados podría ser beneficioso el uso de la dosis baja de rTPA, aunque de momento no hay reflejo en las guías de manejo de ictus agudo en cuanto a dosis bajas de rTPA³⁶.

Aunque se han probado diferentes alternativas al rTPA, como la estreptoquinasa administrada hasta 6 horas desde el comienzo de la clínica, y la desmoteplasa de 3 a 9 horas desde el inicio de la clínica^{37,38,39}, sólo la tecteplasa ha demostrado resultados prometedores, con eficacia comparable al rTPA⁴⁰. De hecho, en pacientes seleccionados, ha demostrado unos porcentajes más altos de perfusión que la rTPA⁴¹.

Otro de los tratamientos médicos propuestos para el ictus isquémico agudo es el tratamiento con antiagregantes plaquetarios endovenosos, si bien tampoco han demostrado un beneficio neto hasta el momento. Existe una revisión de la Cochrane sobre la administración endovenosa de los antagonistas de los receptores de la glicoproteína IIB/III_A, donde se objetiva un aumento del riesgo hemorrágico y no claros beneficios en cuanto a supervivencia y pronóstico funcional⁴².

Más recientemente, la trombectomía mecánica se ha mostrado efectiva en pacientes con ictus isquémico agudo que cumplieran determinadas características y con una evolución de hasta 24 horas desde el inicio de la clínica⁴³. La aparición e inclusión de la trombectomía mecánica en las recomendaciones de las guías de tratamiento, ha supuesto un giro en el manejo global del ictus, tanto prehospitalario, con la promoción creciente de su identificación y triaje clínico por parte de los equipos de emergencias⁴⁴, como en el manejo hospitalario, con la apertura de los criterios de inclusión para el tratamiento agudo en pacientes con ictus isquémico y la consiguiente dotación de recursos para el desarrollo de las técnicas⁴⁵.

En la tabla 1 se resumen los principales estudios realizados para el tratamiento farmacológico o endovascular del ictus isquémico agudo.

TIPO DE ESTUDIO	ESTUDIO	POBLACIÓN	INTERVENCIÓN	PRONÓSTICO
FIBRINOLISIS ENDOVENOSA CON RTPA	NINDS I y II ⁴⁶		rTPA 0,9 mg/kg vs placebo	Mejoría pronóstica, más HIC
	ATLANTIS B ⁴⁷	613 IIA con t 3-5h	rTPA 0.9 mg/kg vs placebo	Finalizado precozmente
	ECASS III	821 IIA con t 3-4,5h	rTPA 0,9 mg/kg vs placebo	Mejoría pronóstica y más HIC
	WAKE-UP	503 IIA con t desconocido de inicio.	RM DWI/FLAIR:rTPA vs placebo	Mejor pronóstico funcional en el grupo tratado con rTPA.
	ENCHANTED	3310 IIA con t <4,5 h..	rTPA 0,6mg/kg vs dosis estándar	Fallo en demostrar no inferioridad.
FIBRINOLISIS ENDOVENOSA CON TECNECTEPLASA	NOR-TEST ⁴⁸	1100 IIA con t<4,5h	TNK 0,4mg/kg vs rTPA 0,9mg/kg	Sin diferencias
	EXTENDIA	202 IIA con t<4,5h y candidatos a TM	TNK 0,25 mg/kg vs rTPA pre TM	Mejoría de los ratios de recanalización en el grupo de TNK
TROMBECTOMÍA MECÁNICA	MR CLEAN ⁴⁹	500 IIA con t<6h	TM+ rTPA vs estándar	TM efectiva y segura
	ESCAPE ⁵⁰	316 IIA con t <12h	TM+ rTPA vs estándar	Gran vaso y core pequeño
	REVASCAT ⁵¹	206 iia con t <8h	TM+ rTPA vs estándar	TM mejora pronóstico funcional y menor grado discapacidad.
	SWIFT PRIME ⁵²	196 IIA con t<6h	TM+ rTPA vs estándar	Mejoría pronóstico a 90 días.
	EXTENDIA	70 IIA t >4,5h	TM+ rTPA vs estándar	TM efectiva y segura
	HERMES ⁵³	1287 IIA metanálisis estudios previos	TM+ rTPA vs estándar	TM efectiva y segura
	DAWN ⁵⁴	206 IIA t 6-24h	TM+rTPA vs estándar	TM efectiva y segura, en pacientes seleccionados por imagen.
	DEFUSE 3	182 IIA t 6-16h	TM+rTPA vs estándar	TM efectiva y segura en pacientes seleccionados por neuroimagen de perfusión.

Tabla1: Tratamientos del ictus isquémico. IIA= ictus isquémico agudo; t= tiempo; h= horas; TM= trombectomía mecánica; rTPA= activador tisular del plasminógeno

Además de los tratamientos farmacológicos o endovasculares que tienen como fin la interrupción del trombo, se han estudiado tratamientos neuroprotectores que buscan mejorar el resultado de las terapias anteriores o la reconstitución del tejido nervioso una vez el daño se produce.

En dicho sentido el control de constantes como la tensión arterial⁵⁵, la glucemia⁵⁶ o la temperatura ha demostrado ser beneficioso en pronóstico funcional posterior al ictus y en la respuesta del mismo al tratamiento. Sin embargo, no existe consenso sobre qué cifras son las adecuadas a día de hoy en vistas a optimizar los resultados de su manejo.

En aras de lo anterior, también las unidades de ictus han demostrado disminuir las ratios de mortalidad y dependencia (OR 0,8) en el ictus agudo, gracias a una mayor precocidad en la detección de complicaciones, control de tratamiento y estudio más incisivo de la causa subyacente al ictus⁵⁷.

A pesar de un correcto tratamiento farmacológico o intervencionista en fase aguda, un buen control de las constantes y un ingreso adecuado en las unidades de ictus, en ocasiones los pacientes no alcanzan una buena respuesta funcional final. El objetivo principal del tratamiento del ictus es restablecer el flujo sanguíneo de una manera que no exacerbe el daño causado por la privación de oxígeno en los tejidos y uno secundario podría ser modular los factores que causan ese daño y si es posible actuar en la neurorreparación. Por ello se han desarrollado estudios en el campo de la excitotoxicidad, el estrés oxidativo y la neurorreparación⁵⁸.

Aunque la excitotoxicidad ha sido la diana de múltiples ensayos clínicos en neuroprotección, sobre todo con el uso de antagonistas NMDA, todos ellos han fallado en demostrar beneficio en los pacientes⁵⁹. Otras moléculas como la NA-1 (se trata de un inhibidor postsináptico de naturaleza proteica que se une a receptores NMDA) están siendo utilizadas en estudios prehospitalarios en el momento actual en ensayos clínicos (FRONTIER; nº de registro NCT02315443).

Otra de las llaves de la cascada isquémica es la generación de radicales libres que incluyen el oxígeno reactivo y derivados del nitrógeno. Existen evidencias robustas de que evitando la producción de estos radicales libres se mejora el daño debido a la isquemia y a la reperfusión. Sin embargo, dicha evidencia no se ha trasladado aún a la práctica clínica. La molécula NXY-059 ha sido la más estudiada, no pudiendo demostrar beneficio en ensayos clínicos⁶⁰. Por otro lado, el ácido úrico se sugiere como una terapia segura

que mejora el pronóstico de los pacientes con ictus tratados con rTPA frente a placebo (OR 6,2), aunque los propios autores recomiendan la realización de un ensayo clínico más extenso que refrende estos resultados⁶¹.

2. Ictus hemorrágico: estado actual del tratamiento

A pesar de que la hemorragia cerebral espontánea supone sólo el 10-20% de todos los ictus agudos⁶², la carga de discapacidad expresada en discapacidad ajustada por años de vida perdidos es mayor en esta que en los ictus isquémicos⁶³.

En el momento actual no se dispone de un tratamiento efectivo que revierta la enfermedad, o frene sus efectos más devastadores, como ocurre en el ictus isquémico, existen evidencias que en los últimos 30 años muestran una disminución de la mortalidad temprana, lo que puede estar motivado por una mejora en el manejo precoz de dicha patología⁶⁴.

La mayoría de las investigaciones enfocadas al estudio del tratamiento de la hemorragia cerebral espontánea llevan como objetivo primario demostrar su efecto sobre la mortalidad de la enfermedad⁶⁵⁻⁶⁶⁻⁶⁷. Sin embargo, el pronóstico tras una hemorragia cerebral, así como lo es en el ictus isquémico, es un tema complejo en el que se deben tener en cuenta múltiples factores y valorar desde diferentes perspectivas (figura 3).

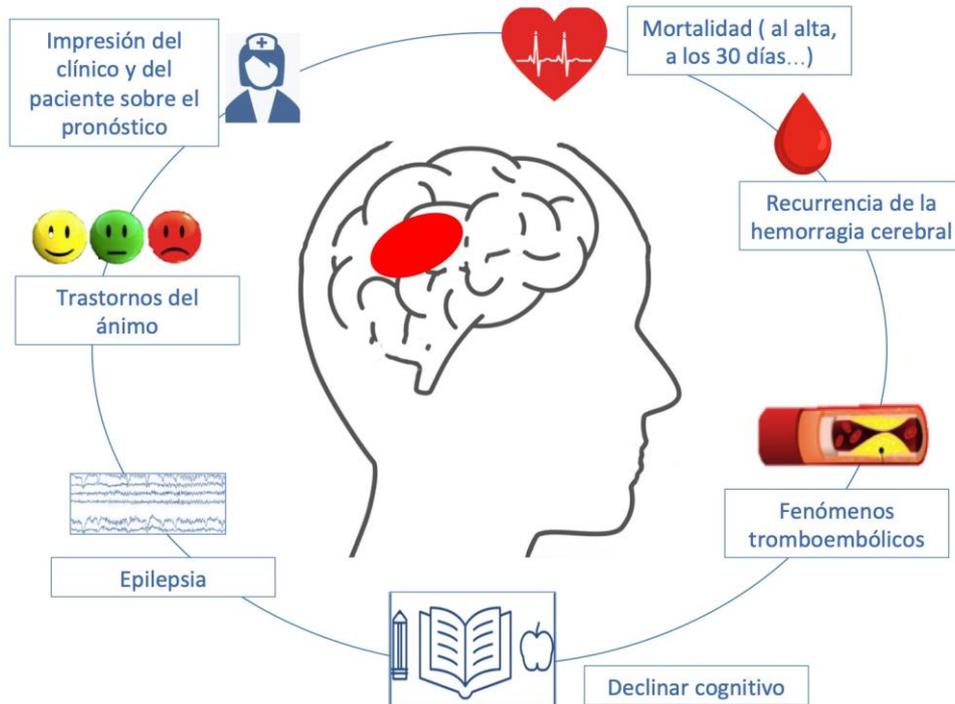


Figura 3: Factores a tener en cuenta en el pronóstico de una hemorragia cerebral

El factor de riesgo más importante para padecer una hemorragia cerebral es la hipertensión arterial, que hace que se desarrolle una vasculopatía en las pequeñas arterias que penetran en los ganglios de la base, el tronco del encéfalo y el tálamo, predisponiendo al sangrado en estas regiones.

Estas hemorragias debidas a la hipertensión y de localización profunda deben ser diferenciadas etiológicamente de las hemorragias cerebrales lobares, más frecuentes en pacientes ancianos y asociadas con la angiopatía amiloide, que se caracteriza por el depósito de esta sustancia en los vasos, lo que conduce a una fragilidad de la pared de los mismos.

También la anticoagulación es una causa creciente de hemorragias intracerebrales debido al número cada vez mayor de pacientes que la precisan estos tratamientos como prevención antitrombótica⁶⁸.

Aunque existe consenso al recomendar un tratamiento integral y activo en las primeras 48 horas desde la presentación de una hemorragia cerebral⁶⁹, todavía no existe un algoritmo pronóstico que permita predecir con claridad qué pacientes se pueden beneficiar de una u otra medida.

En los siguientes apartados se intentará ahondar en la evidencia científica que apoya el uso de los distintos tratamientos empleados en la hemorragia cerebral.

2.1 Tratamiento para la prevención del crecimiento del hematoma

Un crecimiento significativo de una hemorragia cerebral se define como un aumento del volumen de la misma del 33% y ocurre en un cuarto de los pacientes que la padece de forma espontánea y en alrededor de un 40% de los que toman anticoagulación oral⁷⁰.

Los pacientes con alto riesgo de crecimiento del hematoma cerebral pueden ser identificados mediante parámetros radiológicos tales como el *spot sign* (extravasación activa de contraste en el interior del hematoma intraparenquimatoso espontáneo que se visualiza bien en el angioTC, bien en un TC simple tras la administración de contraste), que en algunas series alcanza un valor predictivo negativo del 78%⁷¹. Además del *spot sign*, recientemente se han descrito varios parámetros de la TC sin contraste para intentar predecir el crecimiento del hematoma, entre los que se encuentran el *blend sign*, los niveles dentro del hematoma, las hipodensidades intrahematoma, el *black hole sign* (área hipoatenuada en el espesor del hematoma de bordes bien definidos), el *swirl sign* (descrito inicialmente en los hematomas epidurales, áreas de hipodensidad en el espesor del hematoma en los TC sin contraste que indican distintos estadios temporales de sangrado)...⁷².

Los esfuerzos terapéuticos en este campo se han centrado principalmente en el control de la tensión arterial y en el manejo de la hemostasia.

2.2 Manejo de la tensión arterial

La tensión arterial (TA) elevada se encuentra en hasta un 75% de los pacientes con ictus y se ha asociado a riesgo de crecimiento del hematoma y mal pronóstico funcional y vital⁷³.

Hasta hace un tiempo se creía que una bajada de TA excesiva podría conllevar a un compromiso de la perfusión perihematoma, pero desde la publicación del estudio ICH ADAPT⁷⁴ se ha desterrado dicho concepto. El estudio demostró que los niveles de FSC medido por TC de perfusión eran

similares en pacientes con bajada de TA sistólica por debajo de 150 mmHg y en aquellos con ella por debajo de 180 mmHg.

Posteriormente, los estudios randomizados INTERACT 1⁷⁵ y ATACH 1⁷⁶ contribuyeron a confirmar la seguridad de un control intensivo de la TA y demostraron que el mismo disminuía la expansión del hematoma en las primeras 72 horas. A pesar de ello, en 2013, se publica el estudio INTERACT 2⁷⁷ que no consigue demostrar que un descenso de la TA sistólica por debajo de 140 mmHg en las primeras horas disminuya de forma significativa los ratios de muerte o discapacidad. Sin embargo, en este mismo estudio se consigue una significación estadística a favor de la intervención al realizar un análisis ordinal de regresión. El estudio ATACH 2⁷⁸, viene a intentar confirmar la conclusión del INTERACT 2, pero ha de ser finalizado de forma prematura al no conseguirlo. Además, en este estudio el tratamiento agresivo para bajar la TA se asoció con un número mayor de efectos adversos graves.

Con el objetivo de aclarar qué dirección tomar en el manejo de la TA en las hemorragias agudas, en un análisis reciente que aúna los resultados de ambos estudios⁷⁹ e incluye 3829 pacientes, se objetiva una relación lineal entre los niveles de TA sistólica y su variabilidad con la muerte y el deterioro neurológico, sin objetivarse en aquellos pacientes con control estricto de la TA hipotensión sintomática o alteraciones renales significativas.

2.3 Manejo de hemostasia

El principal objetivo en este sentido es parar la expansión de la hemorragia. Para ello se han diseñado varios estudios que lo abordan mediante diferentes estrategias, todas ellas resumidas en la tabla que sigue.

TIPO DE ESTUDIO	ESTUDIO	INTERVENCIÓN	RESULTADOS
HEMORRAGIA CEREBRAL ESPONTÁNEA	FAST ⁸⁰	Uso de rFVIIa en HIC espontánea	Disminución de expansión del hematoma, no mejoría en ratios de mortalidad.
	CRASH 2 ⁸¹	Uso de TXA en pacientes con hemorragia traumática.	En desarrollo
	TICH 2 ⁸²	Uso TXA en pacientes con HIC espontánea	Mejoría en mortalidad
	STOP AUST ⁸³	TXA para reducción de expansión del hematoma.	Mejoría pronóstica.
	TRANSACT ⁸⁴	TXA con monitorización por spot sign	En desarrollo
	TRAIGE ⁸⁵	TXA con monitorización por spot sign	En desarrollo

TIPO DE ESTUDIO	ESTUDIO	INTERVENCIÓN	RESULTADOS
HEMORRAGIA ASOCIADA A ANTI VITAMINA K	INCH ⁸⁶	Uso de complejo de protrombina vs plasma fresco congelado.	Superioridad de complejo de protrombina
	RETRACE ⁸⁷	Efecto de la reversión de ACO en la expansión de la HIC	Disminución de la expansión
HEMORRAGIA ASOCIADA A ACOD	REVERSE AD ⁸⁸	Estudio del efecto del idarucizumab	Reducción de la tasa de mortalidad con el uso pero no objetivo primario.
	ANNEXA 4 ⁸⁹	Efecto del andexanet	En desarrollo
	TICH-NOAC ⁹⁰	Efecto del TXA en estos pacientes	En desarrollo
HEMORRAGIA ASOCIADA A ANTIAGREGANTES	PATCH ⁹¹	Efecto de la transfusión de plaquetas	Mayores ratios de efectos adversos y mortalidad en el grupo de tratamiento.

Tabla 2: Estudios para el manejo de la hemostasia en hemorragia cerebral. HIC= Hemorragia intracraneal, rFVIIa= factor VII recombinante, TXA= ácido tranexámico, ACO=anticoagulantes orales, ACOD=anticoagulantes orales directos

2.4 Tratamiento quirúrgico de evacuación del hematoma

La intención con este tratamiento, al reducir el tamaño del hematoma, es solucionar el problema de espacio y con ello prevenir las posibles herniaciones, mejorar el edema y reducir la cantidad de tóxicos a los que el cerebro está expuesto con la consecuente inflamación.

Sin embargo, el papel de la evacuación del hematoma de forma generalizada es controvertido.

Existen dos estudios multicéntricos randomizados⁹²⁻⁹³ que intentan demostrar el beneficio de esta actitud en pacientes con hematomas cerebrales supratentoriales, y ambos concluyen que se consigue beneficio en el objetivo pronóstico funcional si se realiza una craniectomía descompresiva en algunos subgrupos del estudio.

Por otro lado, el estudio MISTIE⁹⁴ evalúa la eficacia de la introducción de un catéter para la evacuación y posterior trombolisis del hematoma con rTPA sin conseguir demostrar diferencias en cuanto a seguridad, mortalidad, resangrado... De cara a la reevaluación en una muestra mayor de pacientes, se encuentra en marcha el estudio MISTIE III (NTC01827046).

En el caso de los hematomas infratentoriales, parece existir menos controversia. Un hematoma infratentorial puede llevar rápidamente a una compresión del tronco del encéfalo o a una hidrocefalia aguda, es por eso que hay consenso en las guías que indican la cirugía en aquellos pacientes con un hematoma cerebeloso de más de 3 centímetros de diámetro, o bien si este comprime el tronco o produce hidrocefalia.

2.5 Tratamiento del edema perilesional

El desarrollo de edema peri-hemorragia cerebral es muy habitual y está relacionado con un deterioro neurológico temprano neurológico y mal pronóstico⁹⁵.

En la fase aguda del edema sucede una extravasación de factores osmóticos que dan lugar a una fase vasogénica, mientras que a posteriori el edema puede verse agravado por activación de la cascada inflamatoria y de la coagulación conduciendo al edema citotóxico⁹⁶. Esta fase de edema citotóxico ha sido la diana terapéutica en la que se han centrado los estudios que usan los agentes osmóticos con la idea de reducir el mismo. En el estudio ERICH⁹⁷, que enfrentaba el pronóstico de 304 pacientes con hemorragia cerebral tratados con agentes hiperosmolares frente al mismo número de pacientes que no recibían dicho tratamiento, no consiguió objetivarse beneficio del tratamiento, demostrando incluso peor pronóstico funcional a 3 meses en el mismo grupo. Sin embargo, un estudio reciente apunta al manitol como agente que mejora la supervivencia en los pacientes con hemorragia cerebral⁹⁸.

Otro de los recursos estudiados es el uso de la hipotermia por su eventual efecto neuroprotector⁹⁹. Sin embargo, aunque se indica bajar la fiebre cuando se presenta, el beneficio de inducir una hipotermia está aún en estudio¹⁰⁰.

VI. BIOMARCADORES EN EL ICTUS AGUDO

Como se ha introducido en el apartado anterior, en el momento actual la TC simple es la prueba de elección para el diagnóstico diferencial entre ictus isquémico y hemorrágico. Aunque se trata de una prueba muy fiable, no está disponible en entornos no hospitalarios en la mayoría de los países, aunque existen ambulancias que lo incorporan en otros¹⁰¹. Tampoco es accesible en muchas regiones en países en vías de desarrollo, ni siquiera en muchos hospitales¹⁰². Es una técnica muy sensible para el diagnóstico de hemorragia cerebral, pero no lo es tanto para el diagnóstico de ictus isquémico, dado que basa el diagnóstico del mismo en la ausencia de signos de hemorragia, lo cual no está exento de error y además expone a los pacientes a radiación ionizante¹⁰³⁻¹⁰⁴.

Por otro lado, aunque la RM es más fiable que la TC en el diagnóstico de ictus, el problema de su disponibilidad y su coste se acentúa enormemente con esta técnica. Por ello, a pesar de los avances en el campo de la neuroimagen, existen limitaciones potenciales para su uso aún a día de hoy¹⁰⁵.

En el año 2001 se publicó la definición de consenso de marcador biológico o biomarcador, como aquella sustancia característica que puede ser medida de forma objetiva y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica¹⁰⁶.

En el campo del ictus, a lo largo de los años se han estudiado diferentes biomarcadores en sangre o líquido cefalorraquídeo (LCR) que puedan ayudar en el diagnóstico diferencial de ictus isquémico y hemorrágico, o incluso diferenciar entre los diferentes subtipos etiológicos de cada grupo. De hecho hay autores que afirman que algunos de esos biomarcadores pueden ofrecer de forma fiable y coste- efectiva un diagnóstico diferencial rápido entre isquemia y hemorragia, o incluso ayudar en la selección de pacientes para uno u otro tratamiento¹⁰⁷. Sin embargo, no existe aún un biomarcador aceptado globalmente para estos objetivos.

Idealmente, los biomarcadores pueden ayudarnos en diferentes etapas, desde la identificación de la enfermedad cerebrovascular aguda, la clasificación de esta en diferentes subtipos (isquémico vs. hemorrágico) o en diferentes grupos etiológicos, hasta el manejo del tratamiento fibrinolítico o el establecimiento de un pronóstico funcional en el paciente con ictus. Además de ser potenciales herramientas en el ámbito puramente asistencial, los biomarcadores pueden tener un papel muy importante en el diseño y realización de ensayos clínicos, ayudando a un mejor fenotipado de los pacientes y por tanto mejorando el rendimiento de este tipo de estudios experimentales¹⁰⁸. En cuanto a las cualidades teóricas que debe tener un biomarcador que pueda resultar útil en la práctica clínica se resumen en la siguiente tabla.

UTILIDAD DEL BIOMARCADOR	CARACTERÍSTICAS	
DIAGNÓSTICO DEL ICTUS	Alta sensibilidad	Debe detectarse incluso a volúmenes de infarto pequeños.
	Alta especificidad	De forma ideal debería ser específico para isquemia o hemorragia.
	Rápidamente detectable en un fluido accesible	Debería detectarse rápidamente desde el comienzo de los síntomas.
	Diferenciar ictus frente a mimics	Capaz de diferenciar entre isquemia, hemorragia y entidades que las simulan
COMPLICACIONES DEL ICTUS	Infarto maligno ACM	Capaz de identificar pacientes con riesgo evado de mala evolución
TRATAMIENTO DEL ICTUS ISQUEMICO	Transformación hemorrágica	Capaz de identificar pacientes en riesgo de transformación.
	Recanalización	Correlación con apertura del vaso
PRONÓSTICO DEL ICTUS	Volumen de infarto Estado funcional	Volumen medido por TC o RM mRS

Tabla 3: Cualidades teóricas de un buen biomarcador (Adaptado de Dassan *et al*, 2009¹⁰⁹)

En los siguientes apartados se hará una revisión de los biomarcadores estudiados hasta la fecha para el diagnóstico diferencial entre ictus isquémico y hemorrágico.

1. Biomarcadores proteícos para el diagnóstico diferencial en agudo entre ictus isquémico y hemorrágico

El diagnóstico diferencial del ictus isquémico y hemorrágico puede suponer un reto, dado que está ligado a técnicas de neuroimagen y en la mayoría de los casos no son accesibles de forma prehospitalaria. Este hecho no se da en otras patologías como el síndrome coronario, en el que con un electrocardiograma o marcadores proteícos, como son las troponinas, accesibles de forma global, se puede realizar un diagnóstico diferencial precoz y fiable. Por ello se ha tendido a la búsqueda de biomarcadores de tipo proteico que distingan de forma aguda, a nivel prehospitalario, entre un ictus isquémico y hemorrágico, así como entre ictus y *stroke mimic*. Algunos de ellos medidos en sangre han demostrado ser altamente sensibles y específicos para ese fin.

Dentro de este apartado se resumirán tan solo aquellos que se han usado para diferenciar entre isquemia y hemorragia, dividiéndolos entre los estudiados de forma individual y los estudiados dentro de paneles.

1.1 Marcadores estudiados de forma individual

Los estudios basados en proteínas se fundamentan en los cambios de concentración de las mismas registradas en el contexto de los diferentes procesos fisiopatológicos que se ponen en marcha cuando acontece un ictus: pueden reflejar inflamación, daño neuronal o glial, activación endotelial, hemostasia y disfunción cardíaca entre otros (figura 4). A continuación se resumirán las investigaciones más relevantes sobre ellos.

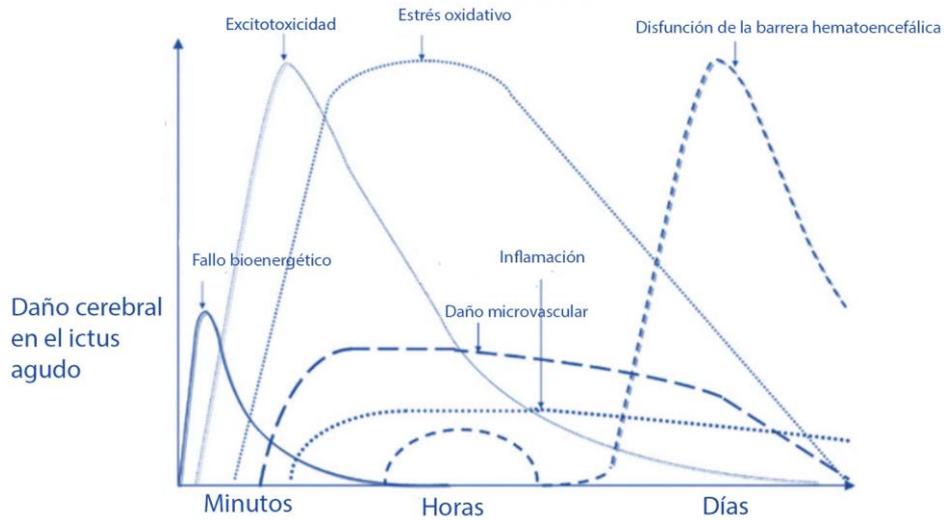


Figura 4: Fisiopatología del ictus en la que se basan los biomarcadores

A) Biomarcadores de daño endotelial

En la fisiopatología del ictus isquémico frecuentemente se encuentra disfunción endotelial debida a la aterosclerosis subyacente a la ECV.

Además la disfunción endotelial puede ser causada por la elevación de la dimetilarginina asimétrica (ADMA), que inhibe la liberación del ácido nítrico derivado del endotelio (NO) cuando acontece el ictus agudo. Esta disminución de la liberación del NO hace que se libere endotelina 1 (ET1), que lleva a una vasoconstricción y la consecuente reducción del flujo sanguíneo cerebral.

El daño vascular cerebral, bien sea isquémico o hemorrágico, condiciona también una degradación de la lámina basal por metaloproteinasas (MMP) y la liberación de fibronectina (Fn)¹¹⁰.

Algunos de los biomarcadores que son la muestra de este daño endotelial se muestran en la figura 5.

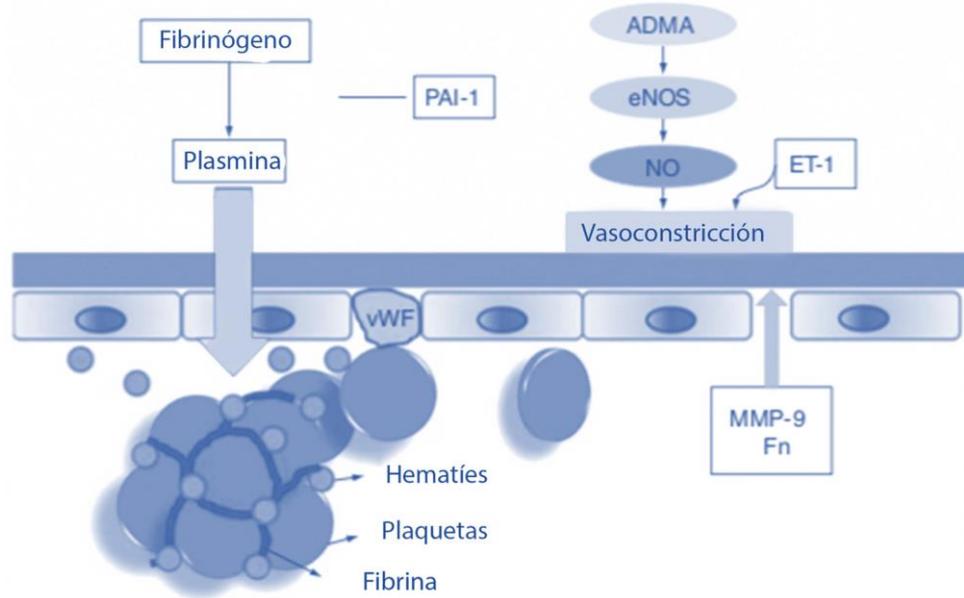


Figura 5: Cascada de daño endotelial cerebral e inflamatoria del ictus agudo con los biomarcadores potenciales.

En algunos ensayos clínicos el ADMA demostró ser más alto en aquellos pacientes con ictus isquémico que en controles ¹¹¹. Además, en otros estudios se objetivó un aumento de ADMA en aquellos ictus isquémicos de origen cardioembólico y en los pacientes que sufrían un AIT, pero no en aquellos con ictus de origen no cardioembólico o que sufrían un ictus hemorrágico ¹¹².

Aún así, estos prometedores resultados no fueron reproducibles posteriormente ¹¹³, por lo que aún debe investigarse el papel de este biomarcador en el diagnóstico diferencial del ictus agudo.

La ET-1 también ha sido estudiada en este sentido, encontrando a su vez resultados contradictorios en los estudios publicados. Mientras unos refieren su elevación en el ictus hemorrágico y no en el isquémico ¹¹⁴, otros buscan diferencias en su concentración entre ictus isquémicos y controles sin lograr encontrarlas ¹¹⁵.

Otros marcadores de daño endotelial como la Fn, la MMP-9 o el D-dímero han demostrado su utilidad en predecir con mayor o menor fiabilidad el subtipo etiológico de ictus isquémico, el pronóstico funcional o la probabilidad de transformación hemorrágica ¹¹⁶⁻¹¹⁷.

Por otro lado, las apolipoproteínas también han sido diana de varios estudios con el objetivo de diferenciar ictus isquémico de hemorrágico. En 2004 un estudio publicado por Allard *et al* apuntaba el potencial de la Apo CI y la CIII para distinguir entre isquemia y hemorragia, siendo los niveles de estas proteínas más altos en los pacientes con ictus isquémico alcanzando una alta sensibilidad y especificidad¹¹⁸. Estos resultados aplicados a la Apo CIII fueron refrendados posteriormente por López *et al* en 2012¹¹⁹.

B) Biomarcadores de daño cerebral

La proteína glial fibrilar acídica (GFAP) es una proteína cerebro-específica, detectable en plasma a muy baja concentración en condiciones fisiológicas y no se eleva en enfermedades neurológicas que no sean un ictus.^{120_121_122} Esta proteína se detecta a las 6 horas de un daño cerebral o espinal y su nivel disminuye dependiendo del volumen del daño¹²³.

Numerosos estudios han demostrado que la GFAP se eleva de forma más llamativa en el ictus hemorrágico que en el isquémico. En 2006 Foerch *et al*¹²⁴ desarrollaron un estudio piloto que incluía 93 ictus isquémicos y 42 hemorrágicos y observaron que la GFAP en suero podía diferenciar de forma fiable entre uno y otro tipo de ictus, con un punto de corte de 2.9 ng/L con una sensibilidad del 79% y una especificidad del 98%. Seis años más tarde, el mismo grupo realizó un estudio de similares características con mayor número de pacientes (163 ictus isquémicos y 39 hemorrágicos) confirmando los mismos resultados¹²⁵.

Otro estudio en 2009 de Dvorak *et al*¹²⁶ fue diseñado en el mismo sentido y demostró también que la GFAP podría de forma significativa diferenciar un ictus isquémico de uno hemorrágico en el periodo de 2 a 48 horas desde el inicio de los síntomas, con una sensibilidad del 70% y una especificidad del 100% para un punto de corte de 0,04 ng/ml.

Tras éstos, varios estudios han sido publicados con resultados similares a los expuestos^{127,128,129}, demostrando incluso su utilidad en el campo prehospitalario¹³⁰.

Existe también una familia de proteínas multigénicas dependientes del calcio, las S100, que solo se expresan en seres vivos vertebrados. Entre ellas, la S100 B es una proteína implicada en procesos de crecimiento, diferenciación y regeneración neuronal que se expresa principalmente en los astrocitos y las células de Schwann en el ser humano. Además, su aumento a

nivel extracelular tras el daño cerebral sugiere que juega un papel importante en el mecanismo neurodegenerativo de las células dañadas. La S100B aumenta rápidamente en el LCR y luego en la sangre tras un ictus agudo¹³¹, según demostraron Alpua *et al.*

El mismo año, Abbasi *et al.*¹³² evidenciaron que los niveles de S100B eran más altos en aquellos pacientes que iban al servicio de urgencias con un daño cerebral traumático, particularmente en aquellos con hemorragia cerebral y fractura craneal. Posteriormente, también el grupo de Senn *et al.*¹³³ demostró dicho incremento en pacientes con hemorragia no traumática. Su uso también fue probado en el ámbito prehospitalario por los mismos autores que lo hicieron con la GFAP.

C) Biomarcadores de inflamación

La inflamación es el evento clave en la cascada de daño tras el insulto isquémico. Por ello, algunas moléculas inflamatorias liberadas desde la unidad neurovascular han sido la diana de las investigaciones en este campo.

En dicho sentido, un único estudio, llevado a cabo en 2011 por Roudbary *et al.*¹³⁴ que incluyó 32 pacientes con ictus agudo, postuló que los niveles de proteína C Reactiva (PCR) estaban incrementados en pacientes con ictus isquémico si se comparaba con hemorrágicos.

Por su parte, la expresión de moléculas de adhesión celular (CAMs) es inducida en circunstancias inflamatorias y median en el reclutamiento de leucocitos, la migración celular transendotelial y la adhesión de células a dicho endotelio. Por ello se perfilan también como buenas candidatas a biomarcadores de ictus y algunos estudios han demostrado que algunos subtipos como la sICAM-1 o la sVCAM-1 se expresan en mayores concentraciones en pacientes con ictus que en controles sanos^{135 -136}.

D) Otros biomarcadores

Otros biomarcadores de inflamación, disrupción de BHE o de daño cerebral como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleuquina 1 y 6 (IL-1 e IL-6) y el glutamato, han sido estudiados en hemorragia e isquemia cerebral con resultados inconsistentes¹³⁷.

1.2 Marcadores estudiados en paneles

A lo largo de los años y con el objetivo de aumentar la capacidad predictiva de los marcadores conocidos, se han combinado varios de ellos en paneles. Un ejemplo es el de Unden *et al* en 2009, que combinó la GFAP con la APC consiguiendo una sensibilidad del 71% y una especificidad del 73% para diferenciar isquemia de hemorragia¹³⁸.

Posteriormente, Montaner *et al* estudiaron en 2012 un panel de biomarcadores en sangre que incluían la S100B, la MMP-9, la S-RAGE, la PCR, el D-dímero, la secretagonina, la cerebelina y otros para examinar su valor de predicción entre ictus y hemorragia¹³⁹. Objetivaron niveles de S100 B mayores y de s-RAGE menores en ictus hemorrágicos, consiguiendo diferenciar en combinación ambos tipos de ictus con una sensibilidad del 22,7% y una especificidad del 80,2%. Este panel no incluye la GFAP, lo que resulta llamativo dados los buenos resultados previos con dicha proteína.

En 2016 investigadores del grupo de Montaner (Llombart *et al*) combinaron la GFAP con la proteína de unión al retinol 4 (RBP4), consiguiendo con dicha combinación una especificidad del 100% para predicción de hemorragia, pero a costa de un estudio basado en un número pequeño de pacientes y de una sensibilidad menor al 50% para detección de las hemorragias¹⁴⁰.

El mismo grupo, en 2017, llevó a cabo el estudio STROKE-CHIP, un ensayo multicéntrico desarrollado en 6 centros de Cataluña, en el que de forma prehospitalaria y con un panel de 21 marcadores combinados con variables clínicas, intentaron encontrar un patrón de predicción para un tipo de ictus u otro (isquémico o hemorrágico), pero concluyendo que los biomarcadores no eran suficientes para ese fin¹⁴¹.

2. Biomarcadores metálicos

Los metales en niveles óptimos son necesarios para numerosos procesos metabólicos en el cuerpo humano ¹⁴² y además tienen una influencia importante en el desarrollo de funciones cerebrales ¹⁴³. El zinc (Zn), el hierro (Fe), el magnesio (Mg) y el cobre (Cu) son micronutrientes esenciales incorporados en muchas metaloproteínas que están implicadas en el metabolismo celular, la producción de neurotransmisores y la regulación del estrés inflamatorio ¹⁴⁴. Estos hechos han llevado a que múltiples estudios

hayan buscado diferencias en los niveles del Fe, Cu o Zn en ictus isquémicos o hemorrágicos con resultados variables^{145 -146}.

En 2010, el grupo de Munshi *et al* tomó muestras de sangre de 256 pacientes con ictus isquémicos midiendo niveles de metales como el Fe, el Zn, el Cu, el cadmio... y los comparó con las muestras obtenidas de 180 controles sanos. En este estudio no hubo diferencias significativas entre los niveles de Fe, Cu y calcio en ambos grupos. Sin embargo, los niveles de Zn demostraron ser significativamente más bajos en pacientes que en controles. No se comparó entre ictus isquémicos y hemorrágicos.

Unos años más tarde, en 2013, el grupo de Karadas *et al* publicó dos artículos en este sentido.

En el primero de ellos¹⁴⁷ comparaban los niveles de varios metales en sangre de 126 pacientes con ictus hemorrágico y 29 controles, encontrando que de forma significativa el Fe, el Cd y el plomo (Pb) eran más altos en pacientes con hemorragia, y que sin embargo los niveles de Cu, Zn, magnesio y manganeso eran significativamente más bajos.

En el segundo de los estudios¹⁴⁸ se siguieron unos métodos similares para determinar en 24 pacientes con ictus isquémico y 25 controles los niveles de metales en sangre, excluyendo en esta ocasión la medición de hierro. Encontraron que de forma significativa el Cu, el cobalto, el Pb y el Cd eran más altos en ictus isquémicos que en controles.

Aunque dicho grupo no realizó estudios comparativos entre los grupos isquemia y hemorragia, de sus estudios se desprende que solo un metal actuaría de forma diferencial entre ambos subgrupos, el Cu.

En 2017 y con el fin de valorar el efecto de dichos metales y su papel en la fisiopatología del ictus isquémico, Skalny *et al*¹⁴⁹ compararon de forma indirecta los niveles de algunos metales en hombres con ictus isquémico y controles. Este grupo obtuvo valores Zn y Cu significativamente más elevados en ictus isquémicos y Fe más bajo en dichos pacientes comparados con controles.

3. Metabolismo del hierro como biomarcador en el ictus agudo

El hierro, por su naturaleza doble redox, es un metal esencial que cataliza procesos como la respiración mitocondrial, el transporte de oxígeno en sangre o la síntesis de neurotransmisores en el cerebro^{150 -151}. Paradójicamente, esta

bivalencia hace al Fe potencialmente tóxico, dado que si se somete a las reacciones de Haber-Weis puede generar especies reactivas de oxígeno y dañar a las células.

La toxicidad del Fe se evita en condiciones fisiológicas por mecanismos homeostáticos que lo mantienen en su forma férrica o unida a quelantes. Estos mecanismos de regulación son aún más importantes en el caso concreto del cerebro, que mantiene los niveles de hierro estables a través de su captación por la BHE¹⁵². Sin embargo, se acepta de forma general que esta homeostasis se altera cuando ocurre un ictus agudo, dado que el hierro es uno de los primeros mediadores de la cascada de la inflamación y la isquemia¹⁵³.

En este sentido existen diversos estudios que hablan del papel del hierro en el ictus, de tal manera que algunos sugieren que el exceso del mismo se relaciona con peor pronóstico funcional en el paciente con ictus isquémico¹⁵⁴
_155.

También existen evidencias en estudios en ratas de que los niveles altos de hierro influyen negativamente no sólo en la respuesta a tratamiento con rTPA, sino en los ratios de transformación hemorrágica¹⁵⁶.

En el caso del ictus hemorrágico, Pérez de la Ossa *et al*¹⁵⁷ en 2010 llevaron a cabo un estudio con 100 pacientes con hemorragia intraparenquimatosa supratentorial, reclutados en las primeras 12 horas tras el inicio de los síntomas. En ellos midieron los niveles de ferritina sérica entre otras determinaciones, observado que un aumento de los niveles de la misma contribuía a un aumento del mal pronóstico objetivado mediante la escala modificada de Rankin.

4. Otros biomarcadores

Algunos estudios han valorado el uso de la metabolómica con el fin de distinguir entre ictus isquémico y hemorrágico¹⁵⁸, pero sin embargo sus resultados son confusos y difícilmente reproducibles debido a la complejidad de la técnica¹⁵⁹.

También existen trabajos sobre la detección de biomarcadores en LCR para el estudio de enfermedad cerebrovascular¹⁶⁰, siendo limitados en el objetivo de la diferenciación entre isquemia y hemorragia, dado que la técnica para la extracción de la muestra de LCR podría contraindicar un posterior tratamiento fibrinolítico en el caso de un ictus isquémico.

VII. EL SISTEMA LINFÁTICO CEREBRAL

Las neuronas del SNC se comunican mediante una combinación de señales químicas y eléctricas que necesitan de una regulación precisa. Esto ha llevado a apoyar la teoría a lo largo de los años de que eran necesarios mecanismos de barrera entre la sangre y el tejido nervioso para mantener la homeostasis adecuada. Por ello se ha interpretado que el sistema nervioso actúa como un sistema aislado inmunológicamente¹⁶¹.

Estudios recientes han descrito de nuevo el sistema linfático cerebral, abriendo nuevos caminos para el estudio de las enfermedades del sistema nervioso. En los siguientes apartados se realizará un resumen del estado actual del tema.

1. Estructura y función de las barreras del sistema nervioso central

Todos los organismos con un sistema nervioso desarrollado tienen BHE¹⁶². En el cerebro y la médula espinal de los mamíferos, entre los que se incluye el ser humano, la BHE está formada principalmente por las células endoteliales que forman la pared de los capilares. El área total de esta barrera es la mayor para el intercambio de sustancias entre cerebro y sangre y alcanza entre 12-18 m² de media en un humano adulto¹⁶³.

Una segunda interfaz entre tejido el nervioso y la sangre tiene lugar a través de las células epiteliales del plexo coroideo en contacto con el LCR, lo que constituye la barrera hemato- LCR.

El LCR se secreta por los plexos coroideos hacia los ventrículos cerebrales ¹⁶⁴, mientras que el fluido cerebral extracelular restante, líquido intersticial, es transportado al menos en parte por las células endoteliales de la BHE¹⁶⁵. El fluido intersticial y el LCR se comunican libremente en varias localizaciones.

Existe una tercera interfaz, que es la que se lleva a cabo en las células epiteliales avasculares de la aracnoides, cercandando completamente el SNC. Esta interfaz es la que completa el cierre entre los fluidos extracelulares del SNC y el resto del cuerpo¹⁶⁶.

En las tres interfaces, la barrera del SNC resulta de una combinación de una barrera física (mediante las *tight junctions*), de transporte (con

mecanismos de transporte específicos a su través) y metabólica (enzimas que metabolizan las moléculas en tránsito) (figura 4).

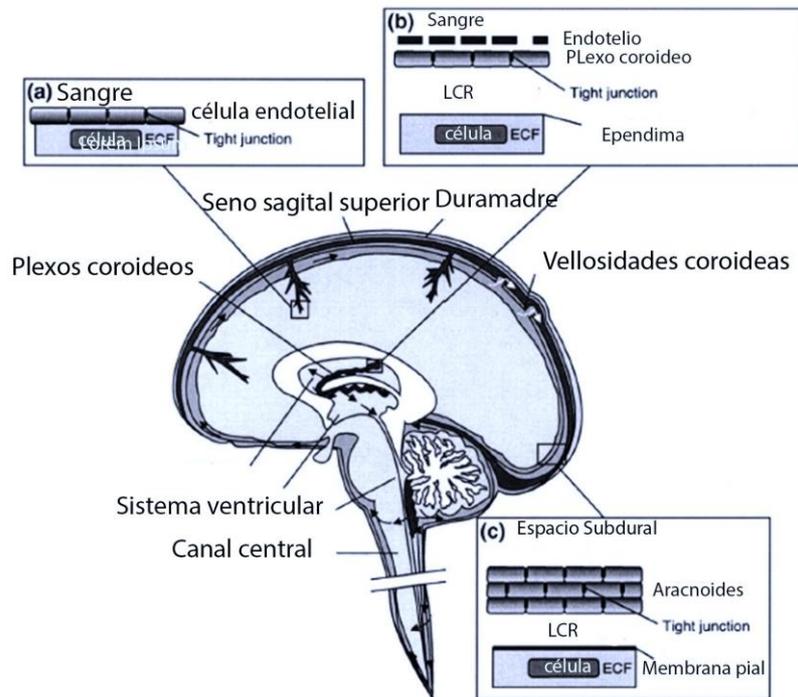


Figura 6: Barreras del cerebro. LCR= Líquido cefalorraquídeo; ECF: Líquido intersticial

La BHE no sólo proporciona un entorno estable para que se desarrollen correctamente las funciones neuronales, sino que regula el contenido iónico y de neurotransmisores del SNC, previene la entrada de macromoléculas o de neurotoxinas y se encarga de la nutrición cerebral^{167, 168, 169, 170, 171}.

2. Sistema linfático cerebral e implicaciones de su descubrimiento

Como se ha explicado en el apartado previo, el cerebro se ha considerado de forma tradicional un órgano inmuno-privilegiado, debido a la falta de vasculatura linfática en él¹⁷².

2.1 Descubrimiento del sistema linfático cerebral

Hace unos dos siglos, se propuso la existencia de un sistema linfático cerebral en el ser humano, sin embargo, dichas teorías fueron descartadas¹⁷³. Por lo tanto, hasta el momento se aceptaba que mientras en otros órganos las células T circulaban y drenaban por el sistema linfático, en el cerebro estas lo hacían a través de la circulación venosa¹⁷⁴.

En un modelo articulado por Davson¹⁷⁵, y más tarde elaborado por Cserr¹⁷⁶, los desechos cerebrales se intercambian con el LCR a través de la difusión local y posteriormente ese LCR se reabsorbe.

Los estudios publicados por Weed en 1914¹⁷⁷ establecieron un modelo de reabsorción de LCR que ha persistido en gran parte intacto hasta nuestros días: que el LCR y sus solutos asociados salen del espacio subaracnoideo hacia los senos duros a través de las estructuras celulares finas de las granulaciones aracnoideas.

Recientemente, dos laboratorios de forma independiente demostraron la existencia de un sistema linfático cerebral en las meninges.

El primero de ellos fue el laboratorio del grupo de Kipnis. En él Louveau *et al*¹⁷⁸, con el fin de buscar las rutas responsables de la circulación de las células inmunes de las meninges, estudiaron los espacios meníngeos y las células inmunes que ocupaban dichos espacios. Primero prepararon disecciones de meninges de ratones, estudiándolas mediante tinciones de inmunohistoquímica para células endoteliales, células T y células que expresaban el complejo de histocompatibilidad II (CHCII). El etiquetado de estas células reveló un reparto restringido de las células inmunes en los compartimentos meníngeos, con una alta concentración de las mismas cercanas a los senos duros.

Los senos duros drenan a través de las venas cerebrales interna y externa a las venas yugulares. Para descartar artefactos debidos a una perfusión incompleta, estudiaron la localización exacta de los linfocitos T alrededor de los senos, de modo que se realizaron cortes coronales de la duramadre que se tiñeron para CD3e (células T) y CD31 (células endoteliales) y se encontró que las células T estaban fuera de la luz de los senos. Posteriormente y para confirmar este hallazgo, se les inyectó a los ratones lecitina Dylight 488 o anticuerpo anti CD45 fluorescente antes de sacrificarlos, encontrándose que efectivamente las células T estaban fuera del seno venoso. Esto les sugirió que podría existir un sistema diferente al venoso por el que circularan dichas células T.

Previamente otros grupos habían estudiado el sistema linfático con el marcador Lyve-1. Por ello se decidió también teñir las meninges de los ratones del estudio con este marcador, demostrando una red de vasos Lyve-1 positivos paralelos y adyacentes a los senos venosos cerebrales. Dichos vasos tenían una luz diferenciada de los senos, hecho que se confirmó con la

inyección pre-mortem de lecitina Dylight 488 y otros marcadores clásicos de células endoteliales linfáticas.

Este grupo describió que la red de vasos linfáticos cerebrales comenzaba en ambos ojos y subían hasta el bulbo olfatorio para alinearse desde allí con los senos duros y posteriormente, al demostrar la existencia de este sistema, demostraron también el intercambio de sustancias entre las meninges y el LCR. Para ello inyectaron a los ratones fluoresceína intravenosa y QDot655 en los ventrículos cerebrales, y luego examinaron todo el cerebro con un microscopio electrónico multifotón. Encontraron entonces que los vasos teñidos con QDot655 y no con fluoresceína, se alineaban con los senos venosos, demostrando que los mismos, y no los pertenecientes al sistema cardiovascular, eran los que drenaban LCR.

Previamente a los estudios de este grupo, también se había visto que alteraciones en el LCR producían respuestas inmunes en los ganglios linfáticos cervicales, proponiendo que la vía anatómica era a través de la lámina cribosa y posteriormente por los vasos linfáticos nasales¹⁷⁹. Para corroborar este hecho, el grupo de Louveau *et al* inyectó a los ratones *Evans blue* intraventricular, demostrando que 30 minutos tras la inyección el trazador se localizaba en los vasos linfáticos cerebrales, pero también en los ganglios linfáticos cervicales (figura 7).

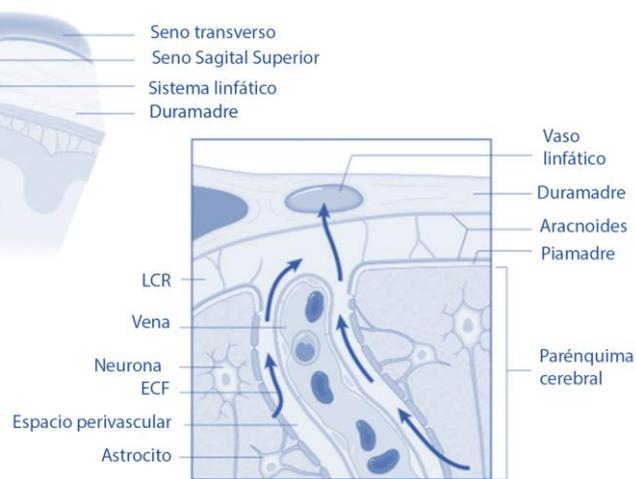


Figura 7: Conexión entre el sistema gliolinfático y el sistema linfático meníngeo
(Modificado de Louveau *et al*)

Aspelund *et al*¹⁸⁰ fueron el grupo que demostró de forma independiente estos hallazgos. Realizando tinciones para vaso linfático (Prox-1-GPF), encontraron que no existían vasos linfáticos en la piamadre y sin embargo descubrieron, tras retirar el cerebro de los ratones, que existía una extensa red de vasos linfáticos alrededor de las meninges recubriendo todo el cráneo, y que esos vasos se encontraban incluso en la salida del cráneo rodeando a la arteria pterigopalatina, algunos pares craneales (el nervio óptico, el trigémino, el vago y el accesorio) y atravesando la lámina cribosa hacia la mucosa nasal (figura 8).

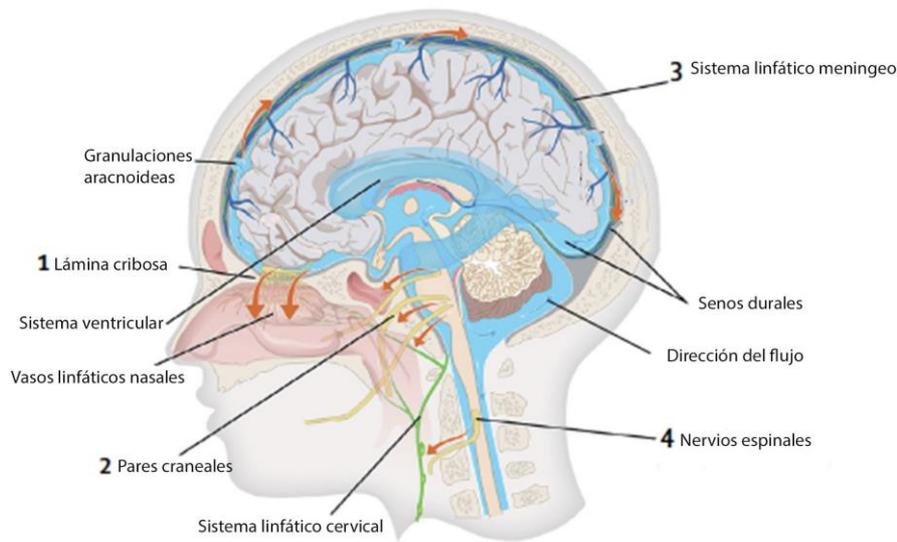


Figura 8: Vías de drenaje linfático (modificado de Rasmussen *et al*¹⁸¹)

2.2 Implicaciones del descubrimiento del sistema linfático cerebral

Si bien estos dos estudios que describen los vasos linfáticos asociados con la duramadre representan un paso importante hacia la comprensión de la función biológica básica del cerebro, quedan aún aspectos importantes por resolver.

Por un lado, funcionalmente, no está claro cuáles son las contribuciones relativas de estas vías linfáticas al aclaramiento de los solutos intersticiales o del LCR en relación con las vías de flujo de salida clásicas, incluidas las granulaciones aracnoideas durales y las vainas perineurales. ¿Cumplen funciones distintas, como, por ejemplo, la depuración de solutos frente a la vigilancia inmunológica?

Por otro lado, ¿cómo se modulan estas vías de drenaje linfático por la variación fisiológica? Está descrito que existe una variación circadiana que parece significativa: la función gliolinfática, siendo la eliminación intersticial de residuos de proteínas es principalmente activa durante el sueño¹⁸².

Además, es importante recordar que los estudios funcionales de los sistemas linfático, gliolinfático y meníngeo se han limitado hasta ahora a los modelos animales.

A pesar de las lagunas en su conocimiento aún hoy existentes, el papel de estas vías de drenaje parece activo tanto en el aclaramiento de solutos intersticiales del cerebro como en el tráfico de células inmunitarias, lo que puede sugerir su participación en enfermedades tan diversas como las proteinopatías y las enfermedades desmielinizantes.

El aclaramiento de amiloide en la enfermedad de Alzheimer, el aclaramiento de alfa sinucleína extracelular en la enfermedad de Parkinson... y de hecho la progresión de todas las proteinopatías que se suponen de tipo priónico, podría verse influido por la competencia funcional de estas vías de drenaje linfático^{183 -184}.

De hecho, teóricamente el compromiso funcional de estas vías de drenaje puede suprimir no solo el aclaramiento de los solutos, sino también el flujo de LCR o líquido intersticial en sí, pudiendo predecirse condiciones sindrónicamente tan diversas como la hipertensión intracraneal primaria y el glaucoma¹⁸⁵.

Siguiendo un razonamiento similar, los agentes inmunes que salen del cerebro pueden ejercer una vigilancia inmunitaria previamente no reconocida que sirva para movilizar células inmunitarias contra antígenos extraños que invaden el cerebro antes de que se reconozcan en él de manera efectiva. Un mecanismo de este tipo podría provocar un replanteamiento de los mecanismos tanto de la activación de las células T como del tráfico de las mismas en enfermedades como la esclerosis múltiple, así como de las estrategias terapéuticas dirigidas a las mismas¹⁸⁶.

3. Regulación y función de la saliva y su relación con el sistema nervioso central

La saliva es un fluido biológico que actúa como protector de la boca al mismo tiempo que se muestra como un factor clave en el proceso de la digestión de los alimentos. Sin embargo, esta es solo una de sus múltiples funciones, dado que esta secreción mucoserosa contiene diversas sustancias químicas que se ha demostrado pueden funcionar como patrón para medir diversos aspectos relacionados con la salud. Mediante el análisis de la saliva, concretamente, se pueden detectar algunos tipos de cáncer, determinar si existe o no una predisposición genética a padecer distintas patologías cardiovasculares, o incluso, enfermedades infecciosas¹⁸⁷.

El flujo salival se encuentra bajo el control del sistema nervioso autónomo, principalmente por el sistema parasimpático. La inervación parasimpática de la glándula parótida se produce por el nervio glossofaríngeo (par craneal IX), vía ganglión ótico. El nervio facial (par craneal VII) proporciona la inervación parasimpática a las glándulas submandibular y sublingual, vía ganglión submandibular. La inervación de las glándulas menores es principalmente parasimpática con transmisión colinérgica; las glándulas salivales menores producen secreción de forma espontánea en ausencia de estímulos nerviosos, permitiendo la protección de la mucosa oral durante todo el día. La estimulación parasimpática produce secreción salival abundante¹⁸⁸.

Al ser un fluido regulado por pares craneales podría vehicular información del SNC.

VIII. JUSTIFICACIÓN DE LA TESIS DESARROLLADA

En el diagnóstico diferencial para el ictus agudo, dado el diferente manejo y tratamiento según su naturaleza isquémica o hemorrágica, la prueba gold-standard es la neuroimagen.

Aunque se han estudiado múltiples biomarcadores principalmente en sangre, algunos con resultados prometedores, no existen datos concluyentes que permitan generalizar su uso.

El descubrimiento reciente de las vías de drenaje del sistema linfático cerebral, abre la puerta al estudio del sistema nervioso central desde una perspectiva hasta ahora no estudiada, permitiendo el abordaje y la exploración de nuevos mecanismos fisiopatológicos, dianas terapéuticas, e incluso fluidos para el estudio de biomarcadores.

IX. RESUMEN DE LA INTRODUCCIÓN

En el apartado introducción se han descrito los métodos diagnósticos convencionales aceptados para el diagnóstico diferencial entre isquemia y hemorragia, se ha realizado un resumen de los principales biomarcadores, en su mayoría en suero, publicados para dicho fin y se ha introducido el concepto de sistema linfático cerebral con sus implicaciones y nueva caracterización.

El presente apartado pretende resumir los previos orientándose a justificar las hipótesis que se plantean en esta tesis.

1. Diagnóstico diferencial entre ictus isquémico y hemorrágico

El ictus es una de las principales causas de mortalidad y discapacidad en nuestro medio.

Aproximadamente el 85% de los ictus agudos, según la literatura, son de origen isquémico, y, aunque existen tratamientos para isquemia y hemorragia, solo en el primero de los casos este está ampliamente aceptado de forma global, se incluye de forma unánime en las guías de práctica clínica de diferentes sociedades científicas y ha dado lugar a una serie de protocolos pre e intrahospitalarios para facilitar al mayor número de personas posible el acceso al mismo.

En el ictus isquémico, el tratamiento fibrinolítico con rTPA ha demostrado reducir la mortalidad frente a placebo en diversos estudios y su uso está extendido en nuestro medio desde hace al menos 10 años. Otros fibrinolíticos como la tecnecteplasa, a pesar de haber demostrado eficacia, no tienen un uso tan extendido aún. Por otro lado desde 2015, el uso de la trombectomía mecánica es también recomendado en combinación con la rTPA o en aquellos pacientes que la tengan contraindicada, demostrando también una reducción de mortalidad muy significativa en el ictus agudo y habiéndose ampliado los criterios de tratamiento en cuanto a tiempo recientemente.

Por su lado, en el ictus hemorrágico no existe un tratamiento extendido y global. Aunque existe cierto consenso sobre las medidas generales, no hay tal a la hora de decidir el uso de fibrinolíticos intraventriculares o cirugía.

De esta disonancia entre la terapéutica de uno y otro tipo de ictus, así como de la evidencia en ambos tipos de un beneficio en la atención del paciente en unidades especializadas, nace la necesidad de un diagnóstico diferencial temprano y lo más sensible y específico posible.

A día de hoy sólo las pruebas de neuroimagen, y en concreto la TC y la RM ofrecen una fiabilidad suficiente para ese fin.

TRATAMIENTOS ICTUS ISQUÉMICO	TRATAMIENTOS ICTUS HEMORRÁGICO
Fibrinólisis con rTPA Fibrinólisis con tecnecteplasa Trombectomía mecánica	Control de la TA Cirugía descompresiva TXA, fVIII... Tratamiento del edema perilesional
Diagnóstico diferencial mediante <ul style="list-style-type: none"> • TC • RM 	

Tabla 4: Resumen del tratamiento y diagnóstico del ictus agudo

2. Biomarcadores en el diagnóstico diferencial entre isquemia y hemorragia

A lo largo de los años se han estudiado multitud de biomarcadores y sus combinaciones, de naturaleza proteica u otras, con el fin de ayudar en el diagnóstico diferencial entre isquemia y hemorragia.

Aunque se han descrito numerosos biomarcadores en suero con diferentes sensibilidades y especificidades para distinguir ictus isquémico de hemorrágico, los resultados son en muchas ocasiones confusos, y no existe a día de hoy acuerdo sobre el uso extendido de ninguno de ellos, ni de forma individual ni en combinación.

Solamente la GFAP parece obtener resultados similares y reproducibles en todos los estudios realizados.

En cuanto al sustrato utilizado para medir dichos biomarcadores, el suero sanguíneo ha sido el más extendido, dado que la técnica para la obtención de LCR podría contraindicar un posterior y eventual tratamiento fibrinolítico en el caso del ictus isquémico.

En la tabla 5 se resumen los principales biomarcadores abordados en este apartado.

TIPO DE BIOMARCADOR	BIOMARCADOR	COMPORTAMIENTO EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL
DAÑO ENDOTELIAL	<ul style="list-style-type: none"> ADMA ET-1 Apolipoproteínas 	<ul style="list-style-type: none"> ↑Ictus isquémico con respecto a controles y en el cardioembólico frente a hemorragias ↑Ictus hemorrágico con respecto a isquémicos CI y II ↑Ictus isquémico con respecto a hemorrágico
DAÑO CEREBRAL	<ul style="list-style-type: none"> GFAP S100B 	<ul style="list-style-type: none"> ↑Ictus hemorrágico. Alta S y E. ↑reproductibilidad. ↑Ictus hemorrágico
MARCADORES DE INFLAMACIÓN	<ul style="list-style-type: none"> PCR CAMS 	<ul style="list-style-type: none"> ↑Ictus isquémico sICAM Y sVCAM ↑Ictus isquémico que controles
PANELES DE BIOMARCADORES	<ul style="list-style-type: none"> GFAP+APC SRAGE+S100B GFAP+ RBP4 STROKE CHIP 	<ul style="list-style-type: none"> ↑Ictus hemorrágico S100B aumenta y SRAGE disminuye en hemorrágico ↑Ictus hemorrágico Biomarcadores no suficientes para Dx diferencial en paneles con variables clínicas.
METALES	<ul style="list-style-type: none"> Zn y Cu Fe 	<ul style="list-style-type: none"> ↑Ictus isquémico ↓Ictus isquémico
METABOLISMO DEL HIERRO	<ul style="list-style-type: none"> Ferritina 	<ul style="list-style-type: none"> ↑Ictus hemorrágico
METABOLOMICA		<ul style="list-style-type: none"> Resultados confusos

Tabla 5: Resumen de los biomarcadores que evalúan el diagnóstico diferencial entre isquemia y hemorragia en el ictus agudo

3. Sistema linfático cerebral

Aunque el sistema linfático periférico desempeña funciones fisiológicas esenciales como la homeostasis del líquido intersticial y las proteínas y la vigilancia inmunológica, la aparente ausencia de vasos linfáticos convencionales en el sistema nervioso central ha sido hasta fechas recientes un misterio de la neurociencia, particularmente a la luz de la sensibilidad exquisita de las células neuronales a la composición de su entorno extracelular.

Durante mucho tiempo se ha apreciado que la circulación del LCR desempeña un papel excretor, que funciona como un sumidero de los desechos metabólicos producidos en el SNC que no pueden eliminarse fácilmente a través de la BHE.

Dos estudios clave publicados de forma independiente en los últimos años demuestran que, contrariamente a esta creencia de larga data, el cerebro es drenado por vasos linfáticos asociados con los senos duros.

Tanto el estudio de Louveau *et al* publicado en Nature, como el estudio de Aspelund *et al* publicado en el Journal of Experimental Medicine, objetivaron la presencia de pequeñas estructuras vasculares asociadas a los senos venosos cerebrales que expresaban marcadores de células endoteliales linfáticas, como LYVE1, PROX1 y VEGFR-3, pero que no están marcadas con trazadores intravenosos (iv) , lo que demuestra que estos vasos no son elementos del aparato circulatorio.

Si bien ambos estudios documentan la asociación entre estos supuestos vasos linfáticos y los senos sagitales y transversales superiores, la caracterización anatómica más completa realizada por Aspelund *et al* demuestra que estos vasos también están asociados con las arterias meníngeas medias y salen del cráneo a lo largo de las venas y arterias, así como de la lámina cribosa y las vainas de los pares craneales.

Estos dos estudios abren la puerta a la reconsideración de la fisiopatología de muchas enfermedades, el planteamiento de nuevas dianas terapéuticas de algunas otras e incluso el estudio de marcadores de enfermedad del SNC, dado que se trata de una vía de drenaje de desechos, por nuevas vías, a través, por ejemplo, del exudado nasal.

Hipótesis y objetivos del estudio

I. HIPÓTESIS

Postulamos que el exudado nasal puede ser un nuevo fluido en el que medir biomarcadores en enfermedades neurológicas, dado que la lámina cribosa y posteriormente el cornete superior son vías de drenaje del sistema linfático cerebral.

Conjeturamos que la saliva como fluido cuya secreción es regulada por los pares craneales, por cuyas vainas es vehiculado el drenaje linfático cerebral, podría ser un nuevo fluido en que medir biomarcadores en enfermedades neurológicas.

Hipotetizamos que, en el caso concreto del ictus agudo, el hierro como producto de degradación de la hemoglobina, y eventualmente otros metales como productos de degradación de otras proteínas, podrían medirse en el exudado nasal y saliva siendo marcadores diferenciales entre ictus isquémico y hemorrágico (figura 9).

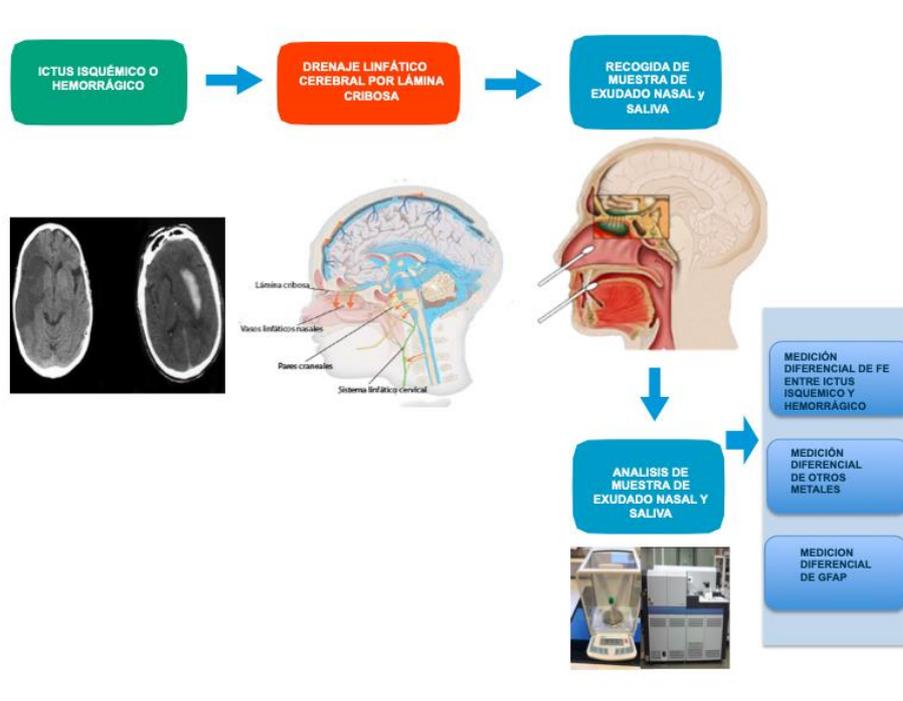


Figura9: Hipótesis: El Hierro y algunas proteínas medidas en exudado nasal y saliva pueden ser marcadores diferenciales entre ictus isquémico y hemorrágico

II. OBJETIVOS

De acuerdo a los aspectos postulados en las hipótesis, los principales objetivos de la presente tesis son los siguientes:

1. **Objetivo Principal:** Evaluar la presencia de biomarcadores de enfermedad cerebrovascular en el exudado nasal y eventualmente en la saliva en los pacientes con ictus agudo.
2. **Objetivos específicos:**
 - a. Analizar si la presencia de hierro y otros metales en dichos fluidos es útil en el diagnóstico diferencial entre isquemia y hemorragia.
 - b. Fijar los puntos de corte analíticos en dichos biomarcadores para el diagnóstico de enfermedad cerebrovascular isquémica o hemorrágica en los pacientes de nuestro Centro.
 - c. Valorar la sensibilidad y especificidad de la prueba.
 - d. Comparar la sensibilidad y especificidad de la prueba con el gold standard para el diagnóstico, entendiendo como tal la realización de una TC craneal al ingreso del paciente.
 - e. Valorar el coste-efectividad de la utilización sistemática de esta prueba diagnóstica respecto al coste-efectividad del uso de la técnica estándar.

I. DISEÑO DEL ESTUDIO Y SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Estudio prospectivo observacional de pacientes con una hemorragia cerebral intraparenquimatosa de menos de 48 horas desde el inicio de los síntomas ingresados de forma consecutiva en la Unidad de Ictus del Servicio de Neurología del Hospital Universitario Central de Asturias de Oviedo. Como controles se recogieron el mismo número de pacientes con ictus isquémico de menos de 48 horas desde el inicio de los síntomas ingresados en la misma unidad. Todos los sujetos fueron ajustados y pareados por edad y sexo.

1. Criterios de inclusión

1. Hemorragia intraparenquimatosa cerebral o ictus isquémico de menos de 48 horas de evolución.
2. Edad superior a 18 años
3. Firma del consentimiento informado por parte del paciente o sus familiares

2. Criterios de exclusión

1. Enfermedad hepática, hematológica o renal, sangrado nasal, toma de hierro como tratamiento.
2. Localización subdural, subaracnoidea o epidural de la hemorragia intracraneal.

**Este estudio se ha realizado de acuerdo con la Declaración de Helsinki de la World Medical Association y aprobada por el Comité de Ética de nuestro hospital.*

II. DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO CLÍNICO

El protocolo general del estudio se muestra en la figura 10. En resumen, tras la llegada del paciente a la Unidad de Ictus se registraron las variables clínicas basales (antecedentes médicos, tratamientos previos) y la gravedad inicial del ictus mediante la Escala de Ictus de los *National Institutes of Health* (NIHSS). Se realizó una analítica según el protocolo habitual de manejo en la Unidad de Ictus (hemograma, bioquímica general, estudio de coagulación, perfil de anemias, lipídico y hepático), un electrocardiograma y se extrajo una muestra de exudado nasal y saliva que fue almacenada en las mismas condiciones para todos los pacientes. Se realizó una neuroimagen en fase aguda y se documentó la oclusión arterial mediante Dúplex Transcraneal (DTC) o Angiotomografía Computerizada (angioTC) en el caso de los ictus isquémicos y la localización de las hemorragias y sus características en el caso de las hemorragias intraparenquimatosas. Se consideró como oclusión de arteria cerebral media, anterior, posterior, carótida interna, vertebral o basilar, según los resultados del angioTC. Se aceptó como hemorragia lobar cuando la localización era superficial afectando a la corteza cerebral, y profunda en caso de no implicar a la corteza.

Se practicó una neuroimagen de control a las 24-48h para evaluar la eventual transformación hemorrágica en aquellos pacientes que recibieron tratamiento de reperfusión en el caso de los ictus isquémicos, así como para la valoración del volumen final de la lesión (isquemia o hemorragia). Posteriormente se realizó una visita de seguimiento a los 3 meses para determinar el grado de recuperación funcional.

Los pacientes se sometieron o no a tratamientos de reperfusión en fase aguda (fibrinólisis iv y/o tratamiento intraarterial) en el caso de los ictus isquémicos, y recibieron tratamiento médico o quirúrgico en el caso de las hemorragias, siguiendo los protocolos de nuestro centro y en consonancia con las guías nacionales e internacionales de tratamiento del ictus agudo. Durante el ingreso en la Unidad de Ictus se realizaron los procedimientos diagnóstico-terapéuticos habituales.

Los ictus isquémicos se clasificaron etiológicamente según criterios TOAST¹⁵⁷ en: aterotrombóticos, cardioembólicos, lacunares, indeterminados u otros de causa inhabitual.

Las hemorragias cerebrales se clasificaron etiológicamente según los criterios estandarizados en: hipertensivas (HTA), debidas a angiopatía

amiloide (AA), en relación con malformación vascular (MAV), en relación con coagulopatía o de causa indeterminada.

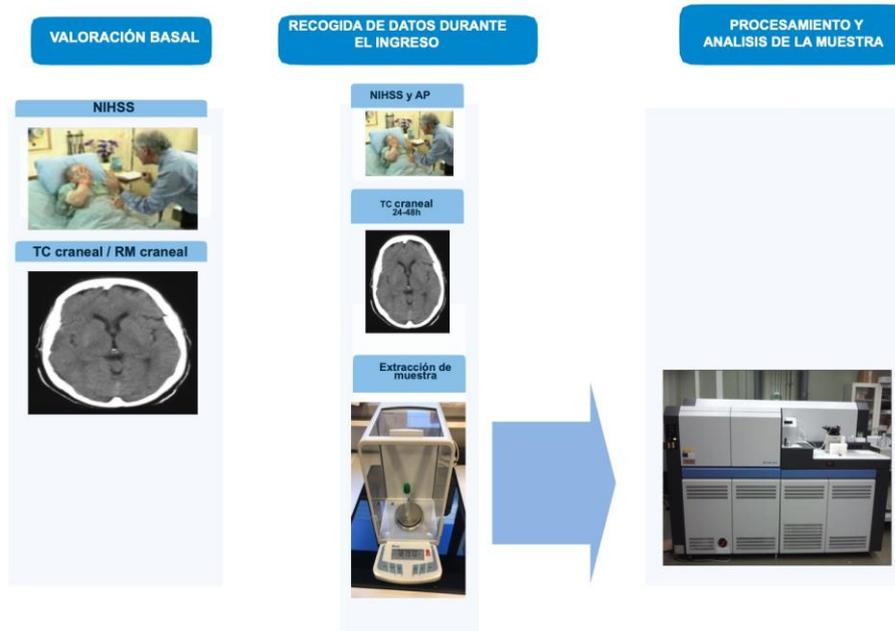


Figura 10: Protocolo clínico

III. DESCRIPCIÓN DEL PROTOCOLO DE RECOGIDA DE MUESTRA

En las primeras 48h del ingreso del paciente en la Unidad de Ictus un investigador independiente, ciego a las variables clínicas y biológicas del paciente, realizó una recogida de la muestra de exudado nasal y de saliva a aquellos pacientes que cumplían los criterios de inclusión del estudio.

Como se ha podido constatar en la introducción, existe gran heterogeneidad en la recogida de muestras para medir biomarcadores y la mayor parte de ellos se miden en suero o líquido cefalorraquídeo. Por el momento, no existen datos de esa recogida en la muestra para exudado nasal ni saliva en los diferentes estudios publicados, por lo que no hay un método estándar unificado para su recogida.

1. Material utilizado para la recogida de muestra

Con el objeto de ser más precisos, en el presente proyecto se han utilizado hisopos estériles modelo FLOQSwabs™ Sterile Flexible mini tip para la recogida de las muestras. Para su almacenaje, se han utilizado tubos estériles de fondo redondo con faldón de 12 mL (tapón verde). En ellos la muestra era embebida en 2mL de solución bien de ácido nítrico al 2% en el caso de que la muestra estuviera destinada para medir metales, o de buffer en el caso de que fuera una muestra destinada para la medición de proteínas.

2. Sistemática de recogida de la muestra

Se realizó una recogida de la muestra de exudado nasal mediante la introducción en cada narina del mismo hisopo para cada paciente, realizando movimientos circulares en la zona cercana al cornete superior durante 3 segundos. Las muestras de saliva fueron extraídas mediante el paso de otro hisopo por la superficie de la lengua y la cara interna de ambas mejillas durante un periodo de tiempo similar.

3. Procesamiento y almacenamiento de la muestra

Dado que por la naturaleza de la muestra a extraer se estimaba una medición dificultosa del volumen, los cálculos del mismo se realizaron tras realizar una pesada diferencial de todos los componentes de la recogida en una balanza del Laboratorio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Central de Asturias modelo Ohaus discovery con una división de escala de 0,00001 gramos (g), una capacidad de 210 g y un error en la pesada que se muestra para cada valor en la tabla 6.

VALOR TEÓRICO (G)	INCERTIDUMBRE PATRÓN (G)
0,005	0,000014
0,01	0,000014
0,05	0,000014
0,1	0,000016
0,2	0,000020
1	0,000030
5	0,000050

Tabla 6: Incertidumbre de la pesada de la muestra

Por tanto, para cada muestra recogida se realizaron cuatro pesadas: una del tubo vacío, otra del tubo con la solución correspondiente, otra del hisopo y finalmente una de la totalidad del material una vez incluida la muestra.

Una vez recogidas las muestras se conservaron en un ambiente homogéneo para todas ellas hasta su transporte al Departamento de Química Analítica de la Universidad de Oviedo, donde se conservaron a una temperatura de 4°C hasta su análisis.

4. Determinación de marcadores biológicos

Se proyectó analizar elementos inorgánicos como marcadores biológicos: hierro (Fe), cobre (Cu), zinc (Zn), plomo (Pb) y Cadmio (Cd).

En base a la literatura revisada, uno de los objetivos iniciales de este proyecto consistía en determinar los niveles de EI en exudado nasal de los pacientes incluidos.

El EI que era objetivo principal de la medición era el Fe, por su papel como producto de degradación de la hemoglobina, ya que ha sido estudiado como biomarcador en diferentes estudios para ictus tanto isquémico como hemorrágico. Además se realizó la medición de otros metales (Cu, Zn, Cd y Pb) teniendo en cuenta su papel como componentes en sitios de unión de diferentes proteínas que juegan un papel fisiopatológico en el daño cerebral tras la isquemia y la hemorragia. De entre ellos solo fueron medibles el Cu y el Zn, siendo los valores de Cd y Pb variables y en ocasiones negativos, lo que no permitió una medición fiable.

Cada extracción constó de una muestra de exudado o saliva recogidos por un hisopo según el protocolo referido en el apartado III que se incluyó en un tubo estéril de fondo redondo con faldón de 12 mL (tapón verde) con 2ml de ácido nítrico. Posteriormente se procedió a repartir la muestra en 2 alícuotas de 1 ml en tubos aptos para posterior análisis en un ICP de masas (espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente). En cada tubo se añadieron 3 mililitros de ácido nítrico, un preservante que se ha demostrado eficaz en estabilizar los metales¹⁸⁹.

El ICP-MS es una técnica de análisis inorgánico elemental e isotópico capaz de determinar y cuantificar la mayoría de los elementos de la tabla periódica en un rango dinámico lineal de 8 órdenes de magnitud (ng/L – mg/L), además de poder llevar a cabo la determinación de los elementos en

un análisis multielemental que provee la composición de la muestra analizada. Es capaz además de cuantificar la composición isotópica y estudiar la estabilidad de isótopos traza. El ICP tiene como finalidad atomizar la muestra, excitar los átomos presentes y finalmente ionizarlos. El espectrómetro separa los iones monocargados de cada isótopo de acuerdo a su masa.

En el presente estudio se analizaron las muestras en un ICP-MS Agilent 8800.

Previa a la recogida en pacientes, en el laboratorio se llevó a cabo un estudio de la validez del análisis de los elementos inorgánicos en muestras de exudado nasal y saliva de controles comparándolas con muestras limpias. El estudio demostró que las muestras de exudado y saliva permitían el correcto recuento de los EI: Fe, Cu y Zn.

IV. VARIABLES CLÍNICAS

1. Gravedad inicial del ictus a las 24 horas y en el momento del alta

La gravedad del ictus se evaluó mediante la escala NIHSS en el momento del ingreso en el hospital (Anexo 1).

2. Volumen de infarto

El volumen final del infarto se obtuvo de una TC Craneal realizada como control después de las primeras 24 horas tras el ictus. El volumen se midió en centímetros cúbicos (cc). Se empleó la fórmula $A \times B \times C / 2$, donde “A” y “B” corresponden a los diámetros mayores de la lesión en los cortes axiales de la TC y “C” al número de cortes de 10 mm en los que aparecía la hipodensidad del infarto o la hemorragia cerebral. Dichos volúmenes fueron medidos por un investigador experto en Neurología y entrenado para dicho fin.

3. Pronóstico funcional a 3 meses

Para evaluar la recuperación funcional del paciente se calculó la escala mRS en la visita de seguimiento a los 3 meses tras el ictus. El buen pronóstico funcional se definió como un mRS ≤ 2 . La escala mRS se detalla en el Anexo 2.

4. Antecedentes médicos

Se recogieron los antecedentes médicos relacionados con factores y hábitos de riesgo vascular (tabaquismo, enolismo crónico, dislipemia, hipertensión arterial, diabetes mellitus, cardiopatía, claudicación intermitente), enfermedad inmune, hemopatía, nefropatía o hepatopatía, tratamientos crónicos y presencia o no de eventos cerebrovasculares previos (ictus isquémico, AIT o hemorragia cerebral).

5. Características del ictus

Se clasificaron los ictus en isquémicos y hemorrágicos.

De los isquémicos se recogió el lugar de la oclusión en caso de ser objetivable, la clasificación Oxfordshire (Anexo 3) y la TOAST (Anexo 4).

En el caso de las hemorragias cerebrales se recogió la localización (lobar o profunda) y se clasificaron según su etiología (angiopatía amiloide, hipertensivas, por malformación vascular, secundaria a anticoagulación, por coagulopatía u otras).

V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se creó una base de datos prospectiva con la información clínica, neurosonológica, radiológica y de laboratorio de todos los pacientes. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS 21.0 (SPSS Inc. Chicago IL USA) para IOS.

El cálculo del tamaño muestral se estimó en un mínimo de 100 pacientes, asumiendo un error alfa de 0.05 y una potencia estadística del 80%.

Los resultados se representaron mediante el valor absoluto y porcentaje para las variables categóricas y mediante la media y desviación estándar (DS) para las variables continuas de distribución normal o con la mediana y rango intercuartílico para las variables que no seguían una distribución normal. La comparación bivariada de grupos se realizó con los Tests de Chi-cuadrado para variables categóricas, t-Student para variables continuas de distribución normal y Tests de U-Mann-Whitney para variables continuas de distribución diferente a la normal.

I. DESARROLLO Y EXPLICACIÓN DE LOS RESULTADOS

El estudio incluye un total de 101 pacientes con ictus agudo ingresados en la Unidad de ictus del HUCA desde el 1 de febrero de 2018 hasta el 1 de febrero de 2019.

Cincuenta pacientes sufrieron un ictus de origen isquémico y 51 de origen hemorrágico. En función del origen se establecen dos grupos para el estudio y comparación de los mismos, siendo el primero el “grupo ISQ” (grupo ictus isquémicos) y el segundo el “grupo HIC” (grupo ictus hemorrágicos). Los pacientes con ictus hemorrágico se seleccionaron de manera consecutiva de entre los pacientes ingresados en la Unidad de Ictus en el periodo del estudio. Los pacientes con ictus isquémico fueron seleccionados el mismo día que los hemorrágicos de entre los pacientes ingresados en las mismas condiciones (tiempo desde el inicio de la clínica menor de 48 horas, ingreso en la Unidad de Ictus y cumplir criterios de inclusión del estudio). El *screening log* para los pacientes con del grupo HIC se muestra en la figura 11.



Figura 11: Screening Log de los ictus hemorrágicos atendidos en el periodo del estudio

Tras el análisis del paciente número 75, el ICP utilizado para realizar la cuantificación de metales sufrió una avería técnica, habiendo de sustituir el filtro del aparato, por lo que las medidas del paciente 76 en adelante no pueden considerarse tomadas en las mismas condiciones. Por dicha razón se dividen los resultados en un primer apartado en el que se desarrollan los obtenidos en los primeros 75 pacientes y un segundo apartado en el que se exponen los resultados totales.

II. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS HASTA EL PACIENTE 75

Treinta y dos pacientes conforman el grupo ISQ y 43 el grupo HIC.

1. Características demográficas

Hay una diferencia significativa en el sexo entre ambos grupos, predominando los varones en el grupo ISQ. Sin embargo, no hay diferencias en la distribución de la edad, como se muestra en la tabla 7.

	GRUPO ISQ	GRUPO HIC	p
SEXO. Varones n, %	24 (72,7%)	21 (48,8%)	0,036
EDAD. Media +/- Desviación estándar	72,03 (+/- 11)	72,26 (+/- 12,44)	0,935

Tabla 7: Características demográficas

En el grupo ISQ 24 (72,7%) eran varones y 9 (27,3%) mujeres, y en el grupo HIC 21 (48,8%) eran varones y el 51,2% mujeres. En el grupo ISQ existen diferencias significativas ($p=0,03$), lo cual podría ser explicado por la mayor incidencia de este subtipo de ictus de forma global en varones.

La media de edad estudiada fue de 72,03 (+11) en el grupo ISQ y de 72,26 (+12) en el grupo HIC. No existen diferencias significativas con respecto a la distribución de edad en ambos grupos ($p=0,935$).

Tampoco existe relación significativa entre la edad de los pacientes y el sexo ($p=0,218$).

2. Hábitos y factores de riesgo vascular

A continuación se describen en la tabla 7 los datos epidemiológicos en cuanto a factores de riesgo vascular, de toda la serie, desglosada en función del subtipo de ictus agudo sufrido.

En el ítem tabaquismo se consideró solo a aquellos pacientes que tuvieran un hábito activo en el momento del evento.

En el ítem consumo de riesgo de alcohol se consideró a aquellos varones que tuvieran un consumo diario $> 40\text{g}$ y aquellas mujeres que lo tuvieran $> 24\text{g}$.

El ítem Cardiopatía incluye a aquellos pacientes con arritmias, miocardiopatías y cardiopatía isquémica previa al ictus.

El ítem varios incluye aquellos pacientes que además de un FRCV aislado o en las combinaciones descritas presentan otro u otros adicionales.

El método estadístico empleado fue la prueba no paramétrica X^2 .

Existe una distribución homogénea entre las características de los pacientes de ambos grupos, sin detectarse diferencias significativas entre los mismos con una $p=0,583$ para el global de los factores estudiados. Sin embargo, se objetiva una mayor incidencia de HTA aislada o asociada a otros FRCV en el grupo HIC de forma no significativa. Del mismo modo, se observa una mayor incidencia de cardiopatía en el grupo ISQ de forma de nuevo no significativa.

FACTOR DE RIESGO N, %	GRUPO ISQ	GRUPO HIC	p
HTA	4 (12,9%)	8 (18,6%)	0,067
DL	1 (3,2%)	3 (7%)	0,123
Tabaquismo activo	3 (9,7%)	3 (7%)	0,897
Consumo de riesgo de alcohol	0 (0%)	1 (2,3%)	0,543
Cardiopatía previa	2 (6,5%)	1 (2,3%)	0,642
Ictus previo	1 (3,2%)	2 (4,7%)	0,751
HTA + DM	1 (3,2%)	0	0,243
HTA + DL	1 (3,2%)	2 (4,7%)	0,152
DL+ DM	1 (3,2%)	0	0,225
Varios FRCV	15 (48,4%)	17 (39,5%)	0,995
Ningún FRCV	3 (9,7%)	3 (7%)	0,874

Tabla 8: Factores de riesgo vascular para los dos grupos de estudio. (FRCV: Factores de riesgo vascular; HTA: Hipertensión arterial; DL: Dislipemia; DM: Diabetes Mellitus)

3. Características del ictus agudo

En este apartado se repasarán la lateralidad del ictus agudo en ambos grupos, la localización de la lesión y la clasificación clínica y etiológica de cada uno de ellos.

3.1 Lateralidad del ictus

Se clasificó la lateralidad según la clínica presentada por el paciente en derecha izquierda y posterior. Existe una distribución homogénea sin diferencias significativas ($p=0,635$) para esta característica entre grupos.

Los datos para ambos grupos se muestran en la tabla 9.

LATERALIDAD	GRUPO ISQ	GRUPO HIC	p
DERECHA	11 (34,4%)	17 (42,5%)	0,635
IZQUIERDA	18 (56,3%)	18 (45%)	0,635
POSTERIOR	3 (9,4%)	5 (12,5%)	0,635

Tabla 9: Lateralidad del ictus agudo según subtipo

3.2 Localización de la lesión

La localización en el caso del grupo ISQ se valoró clínicamente mediante la clasificación Oxfordshire (tabla 10) y mediante la localización del trombo en caso de que se encontrara alterado el angioTC (tabla 11).

Clasificación Oxfordshire. N, %	GRUPO ISQ
TACI	14 (45,2%)
PACI	7 (22,6%)
LACI	5 (16,1%)
POCI	5 (16,1%)

Tabla 10: Clasificación Oxfordshire

Localización oclusión arterial N, %	GRUPO ISQ
ACM M1	13(41, 9%)
ACM M2	4 (12,9%)
ACI	3 (3,9%)
ACP	2 (6,5%)
Ninguna	8 (10,5%)
Otra	1 (1,3%)

Tabla 11: Localización de la oclusión arterial

La localización en el caso del grupo HIC se valoró según las hemorragias fueran lobares, profundas, subaracnoideas, subdurales, epidurales. Como las tres últimas localizaciones estaban excluidas de inicio, solo se tuvo en cuenta para clasificarlas como tales, en el caso de que existiera un componente mixto, es decir, una extensión extraparenquimatosa de la hemorragia primariamente originada en el parénquima cerebral (subaracnoidea y lobar o profunda, subdural y lobar o profunda...) Los resultados se muestran en la tabla 12.

Localización hemorragia. N, %	GRUPO HIC
Lobar	17 (38,6%)
Profunda	24 (54,5%)
Subaracnoidea	2 (4,6%)
Subdural	1 (2,3%)

Tabla 12: Localización de la hemorragia en el grupo HIC

3.3 Etiología del ictus

La etiología del ictus en el caso del grupo ISQ se clasificó siguiendo la clasificación TOAST y se muestra en la tabla 13. En el grupo HIC la etiología se consideró según los grupos: origen hipertensivo, tumoral, angiopatía amiloide, malformación vascular, coagulopatía o transformación hemorrágica. Todo ello se muestra en la tabla 14.

Clasificación TOAST N, %	GRUPO ISQ
Aterotrombótico	9 (30 %)
Cardioembólico	10 (33,3%)
Lacunar	6 (20%)
Infrecuente	0 (0%)
Indeterminado por falta de estudios	1 (3,3%)
Confluencia de varias causas	1 (3,3%)
Criptogénico	3 (10%)

Tabla 13: Clasificación TOAST

Aunque los datos obtenidos en cuanto a etiología de los ictus isquémicos no muestran el total de la población atendida en la Unidad de Ictus del HUCA, por lo que no se han de interpretar como el resultado de un registro reglado de los ictus isquémicos, si los comparamos con registros previos, la distribución por grupos etiológicos se acerca más a la publicada en 2018 por el grupo del Hospital de Albacete¹⁹⁰ que a los registros históricos como el del Stroke Data Bank¹⁹¹. Así, se mantiene la tendencia observada de aumento de la causa cardioembólica.

Etiología hemorragia	GRUPO HIC
N, %	
HTA	25 (56,8%)
AA	8 (18,2%)
Tumoral	2 (4,5%)
MAV	4 (9,1%)
Coagulopatía	1 (2,3%)
Transformación hemorrágica	3 (6,8%)
Indeterminada	1 (2,3%)

Tabla 14: Clasificación etiológica de las hemorragias cerebrales

En el caso de las hemorragias cerebrales, aunque como en el grupo ISQ no se trata de un registro hospitalario de hemorragias reglado, la distribución por etiología se acerca a la descrita clásicamente por la literatura¹⁹².

4. Características clínicas del paciente en el momento agudo. Escalas NIHSS y mRS basal

Se comparó el valor de la escala NIHSS al inicio de los síntomas en ambos grupos de pacientes sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre la media de uno y otro grupo ($p=0,183$), por lo que traduce una gravedad clínica similar entre ambos (tabla 15).

	MEDIA	+/- DESVIACIÓN ESTANDARD
GRUPO ISQ	10,61	6,864
GRUPO HIC	8,44	6,857

Tabla 15: NIHSS media al ingreso

A continuación se muestra en la figura 12 el estado funcional basal de los pacientes de ambos grupos de acuerdo con la puntuación en la escala modificada de Rankin.

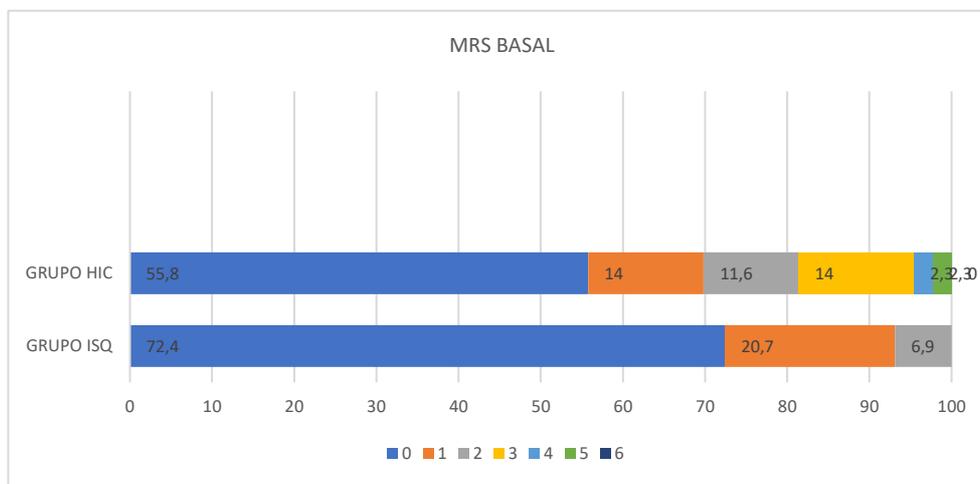


Figura 12: Distribución de la mRS basal por grupos

No existen diferencias significativas en la mRS basal ($p=0,218$), si bien todos los pacientes pertenecientes al grupo ISQ presentan un mRS basal ≤ 2 , mientras que en el grupo HIC un 20% de los pacientes partían de una situación funcional basal peor, con mRS >2 . Esto podría explicarse por el hecho de que los pacientes con ictus isquémicos seleccionados fueron solo aquellos que ingresaron en la Unidad de ictus del HUCA. En Asturias la atención al ictus agudo está dividido por áreas sanitarias, de tal manera que se realiza un triaje prehospitalario según el origen y características basales del paciente, así como el tiempo de evolución del ictus y otros¹⁹³. Por dicha razón, los pacientes que en general llegan a ingresar en la Unidad de Ictus del HUCA son pacientes en general más seleccionados y con mejor estado basal. Durante el periodo de recogida de datos para la presente tesis doctoral no estaba en marcha un protocolo de triaje y atención a hemorragias, pero, tal vez la gravedad percibida en el ámbito hospitalario de los pacientes con hemorragia cerebral

lleve a ubicar estas en dispositivos con mejor control, incluso en aquellos pacientes con situaciones funcionales previas menos favorables.

5. Tratamientos farmacológicos o intervencionistas

A continuación se reflejan en la tabla 16 los tratamientos realizados en el contexto agudo del ictus isquémico.

Tratamiento empleado N, %	GRUPO ISQ
Ninguno	21(55,3%)
rTPA	5(13,2%)
TM	10(26,3%)
rTPA+ TM	2(5,2%)

Tabla 16: Tratamiento empleado de forma aguda para grupo ISQ

Como se comentaba apartados previos, al no tratarse de un registro de ictus isquémicos, no pueden extraerse conclusiones de los porcentajes de pacientes con tratamientos de reperfusión aguda, ni de su distribución por tipo de tratamiento.

En el caso de los pacientes del grupo HIC solamente recibieron tratamiento de soporte, sin emplearse en ninguno de los pacientes recogidos craneotomía ni drenajes ventriculares.

6. Parámetros radiológicos

En el grupo ISQ se evaluó la escala *Alberta Stroke Programme Early CT Score* (ASPECTS, Anexo 5), el resultado de la angioTC y la TC de perfusión en caso de haberse realizado. En este último caso se dividió a los pacientes según presentasen ictus establecido, patrón *target mismatch*¹⁹⁴ u otros patrones. También se valoró la transformación hemorrágica clasificándola según la propuesta de Fiorelli *et al*¹⁹⁵, en el caso de existir solamente en el caso de que esta ocurriera tras la recogida de la muestra (en los 3 casos en los

que se consideró transformación previa a la recogida los pacientes fueron incluidos en el grupo HIC). Los resultados de la escala ASPECTS, la TC de perfusión y los datos de transformación hemorrágica se muestran en las tablas 17, 18 y 19 respectivamente. Los resultados de la angioTC se han mostrado previamente en la tabla 11.

Puntuación en la escala ASPECTS N, %	GRUPO ISQ
>7	21(74%)
<7	4(16%)

Tabla 17: Escala ASPECTS

TC de perfusión N, %	GRUPO ISQ
No realizado	3(14,3%)
Target mismatch	11(52,4%)
Ictus establecido	1(4,8%)
Otros patrones	6(28,6%)

Tabla 18: Resultados de la TC de perfusión

Transformación hemorrágica N, %	GRUPO ISQ
No	21(87,5%)
IH2	2(8,3%)
HPR1	1(4,2%)

Tabla 19: Transformación hemorrágica

En el grupo HIC se recogió la presencia de vertido ventricular y microsangrados en caso de realizarse RM posterior. Dichos datos se presentan en las tablas 20 y 21.

VERTIDO VENTRICULAR N, %	GRUPO HIC
SI	9(20%)
NO	34(80%)

Tabla 20: Vertido ventricular

Microsangrados en RM N, %	GRUPO HIC
SI	21(50%)
NO	22(50%)

Tabla 21: Microsangrados en RM

En ambos grupos se valoró el volumen de la lesión valorada por la fórmula $axbxc/2$ en la neuroimagen de control, no existiendo diferencias significativas entre el volumen del grupo ISQ y HIC ($p=0,923$). Sin embargo, en el grupo ISQ sin embargo existe una mayor variabilidad en los volúmenes de la lesión, probablemente debido al menor volumen de los ictus isquémicos de origen lacunar (tabla 22).

	VOLUMEN (ml) Media, DE
GRUPO ISQ	72,8(+/-163,37)
GRUPO HIC	72,6(+/-84,13)

Tabla 22: Volumen de la lesión. ml=mililitros

7. Variables clínicas de evolución

La evolución clínica de los pacientes se evaluó con la escala mRS valorada a tres meses tras el ictus agudo. Los resultados de cada grupo aparecen reflejados en la figura 13.

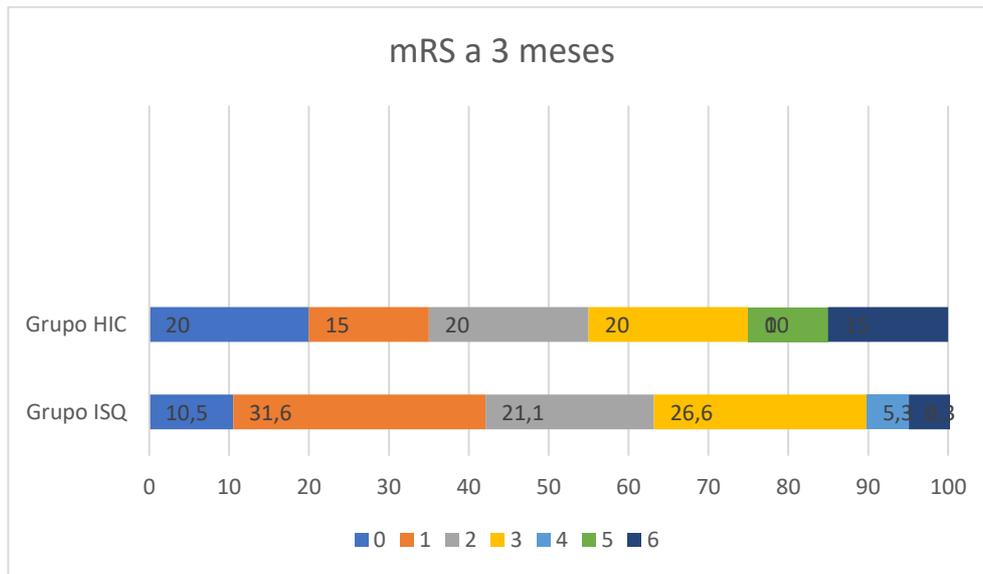


Figura 13: Escala modificada de Rankin a 3 meses

A pesar de que de nuevo no existen diferencias significativas ($p=0,451$), podemos observar que el porcentaje de pacientes con $mRS > 2$ es mayor en los ictus hemorrágicos, dato que se correlaciona con los disponibles en la literatura que establecen una mayor morbilidad asociada al grupo HIC.

8. Parámetros de laboratorio en suero

Se estudiaron en todos los pacientes de ambos grupos los niveles de hemoglobina (Hb), hierro (Fe), ferritina, homocisteína, enzimas hepáticas, ácido úrico, bilirrubina total (Brb), volumen corpuscular medio (VCM), recuento de hematíes e índice de saturación de transferrina.

No se encontró asociación significativa entre ninguno de dichos parámetros y el grupo de pacientes ISQ o HIC. Solo se observó una tendencia a la significación los niveles de homocisteína, que se mostraban más elevados en el grupo ISQ ($p=0,216$), y el recuento de hematíes que se mostraba más alto en el grupo HIC ($p=0,189$). En el caso de la homocisteína la relación en mayor medida con el grupo ISQ puede deberse a la acción protrombótica descrita para esta molécula¹⁹⁶ y su asociación con eventos cardio y cerebrovasculares¹⁹⁷. Por otro lado, el aumento de recuento de hematíes en el grupo HIC puede deberse a la fisiopatología de una hemorragia en cualquier localización y la respuesta de la médula ósea con el consecuente aumento de producción de eritrocitos.

En lo concerniente al metabolismo del hierro, también se observa una tendencia a mayor concentración de Fe y transferrina en el grupo HIC, y esa tendencia se invierte en el caso de la ferritina. No existen trabajos que comparen de forma directa el Fe o sus proteínas transportadoras en los ictus isquémicos o hemorrágicos como se ha desarrollado en el apartado biomarcadores metálicos de la introducción, por lo que estos resultados son difícilmente interpretables.

A continuación, en la tabla 23 se representan los valores de los parámetros analíticos estudiados.

FACTOR DE RIESGO Media, DE	GRUPO ISQ	GRUPO HIC	p
Recuento de hematíes (x10⁶)	4,32 (0,61)	4,61 (1,05)	0,189
Hb	13,03 (1,80)	13,09 (2,49)	0,918
VCM	88,34 (4,65)	86,96 (4,99)	0,243
GGT	106,25 (91,76)	82,22 (81,65)	0,645
ALT	21,28 (20,60)	23,97 (19,07)	0,607
AST	30(35,96)	50 (36,76)	0,344
Homocisteína	26,14 (35,96)	15,94 (4,74)	0,216
Ácido úrico	2,66 (3,2%)	6,22 (4,7 %)	
Fe	58,38 (28,07)	66,05 (31,58)	0,323
IST	19,29 (10)	19,61 (9,10)	0,899
Transferrina	216,61 (50,99)	224,19 (47,01)	0,548
Ferritina	355,40(178,82)	169,00 (214,96)	0,286

Tabla 23: Valores analíticos en ambos grupos. Hb= hemoglobina, VCM: volumen corpuscular medio, GGT= gammabutiltransferasa, ALT: alaninotransferasa, AST: Aspartatotransferasa, Fe= hierro, IST= índice de saturación de transferrina

9. Parámetros de laboratorio en exudado

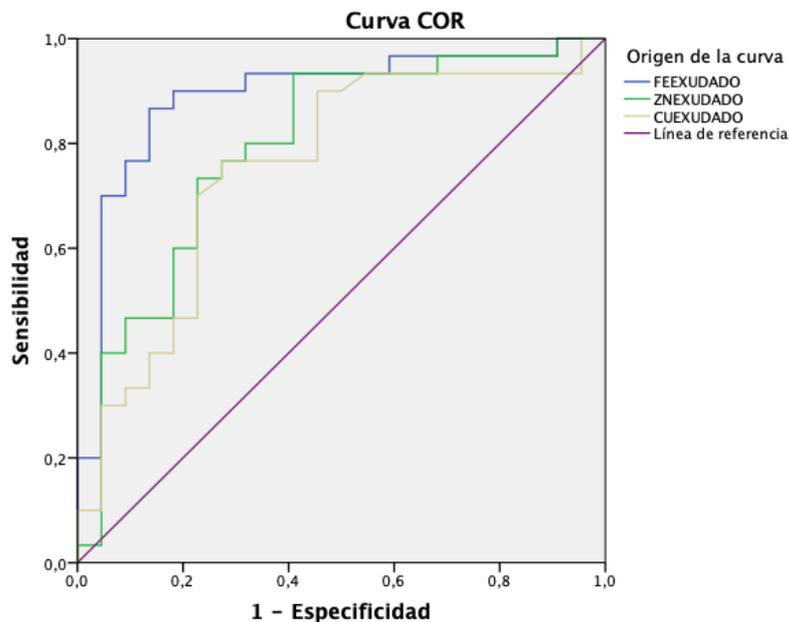
En el exudado nasal se estudiaron los niveles de Fe, Cu, Zn, Pb y Cd en todos los pacientes, consiguiéndose valores interpretables tan solo en los tres primeros metales que fueron los posteriormente analizados.

Los niveles de metales fueron analizados en un ICP de masas Agilent de forma simultánea y según el método descrito en el apartado metodología. Los valores de concentración de cada metal se expresan en nanomolar por miligramo de exudado (nM x mg exudado), siendo sus valores medios y desviación estándar los expresados en la tabla 24.

Metal	Subtipo de Uctus	Media (nM x mg exudado)	Desviación estándar	P
Hierro	ISQ	0,077670	+/- 0,0836	0,0001
	HIC	0,479902	+/- 0,5540	
Zinc	ISQ	0,155305	+/- 0,3034	0,086
	HIC	0,376857	+/- 0,5323	
Cobre	ISQ	0,022475	+/- 0,0228	0,015
	HIC	0,074021	+/- 0,1150	

Tabla 24: Niveles medios de metales medidos en exudado nasal

Para todos los metales se calculó el área bajo la curva de ROC (AUC) que viene representada en la figura 14 y en la tabla 25.



Los segmentos de diagonal se generan mediante empates.

Figura 14: AUC para Fe, Zn y Cu

Metal	AUC	Intervalo 95%
Hierro	0,891	0,793-0,988
Zinc	0,795	0,668-0,923
Cobre	0,755	0,617-0,893

Tabla 25: AUC para Fe, Zn y Cu

Tanto el Fe como el Cu, de forma significativa, muestran niveles más elevados en las muestras extraídas en pacientes con ictus hemorrágico. En el caso del Zn se objetiva una tendencia al mismo comportamiento, pero sin significación estadística. Los resultados en este caso podrían explicarse por un mayor grado de destrucción de tejido e inflamación en el caso del grupo HIC, lo que explicaría un mayor drenaje de desechos por el sistema linfático cerebral vía lámina cribosa.

Los resultados para cada elemento se desarrollarán en los siguientes apartados.

9.1 El hierro en exudado nasal

El Fe, además de ser un metal empleado como biomarcador en ictus por el aumento de sus niveles en el contexto de la inflamación provocada por la isquemia, es un producto de degradación de la hemoglobina presente en la sangre vertida al parénquima cerebral de los pacientes con HIC. Por ello lo elegimos como potencial biomarcador a ser medido en exudado.

En el apartado previo se mostraban los niveles medios de Fe para el grupo ISQ (0,077670 nM x mg exudado +/- 0,0836) y para el grupo HIC (0,479902 nM x mg exudado +/- 0,5540), que resultaron significativamente diferentes ($p=0,0001$). Dichos resultados se representan gráficamente en la figura 15.

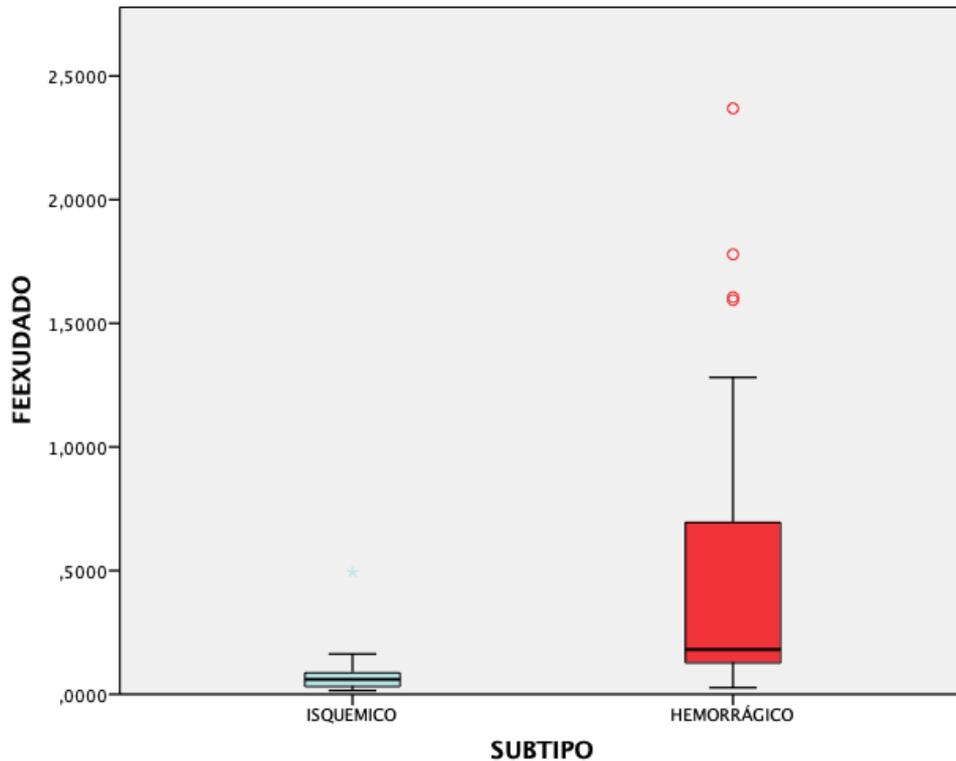


Figura 15: Niveles de Fe en nM x mg exudado en grupo ISQ y grupo HIC

El AUC es una representación gráfica de la sensibilidad frente a la especificidad para un sistema clasificador binario según se varía el umbral de discriminación, que proporciona herramientas para seleccionar los modelos posiblemente óptimos y descartar modelos subóptimos. Se considera que un test es bueno si el AUC es mayor de 0,75, muy bueno si >de 0,9 y excelente si >0,97.

Para el Fe en exudado obtenemos un AUC de 0,896 (figura 16), cercano a 0,9. por lo que puede considerarse un test muy bueno. Los valores de sensibilidad y especificidad para cada punto de corte se muestran en la tabla 26.

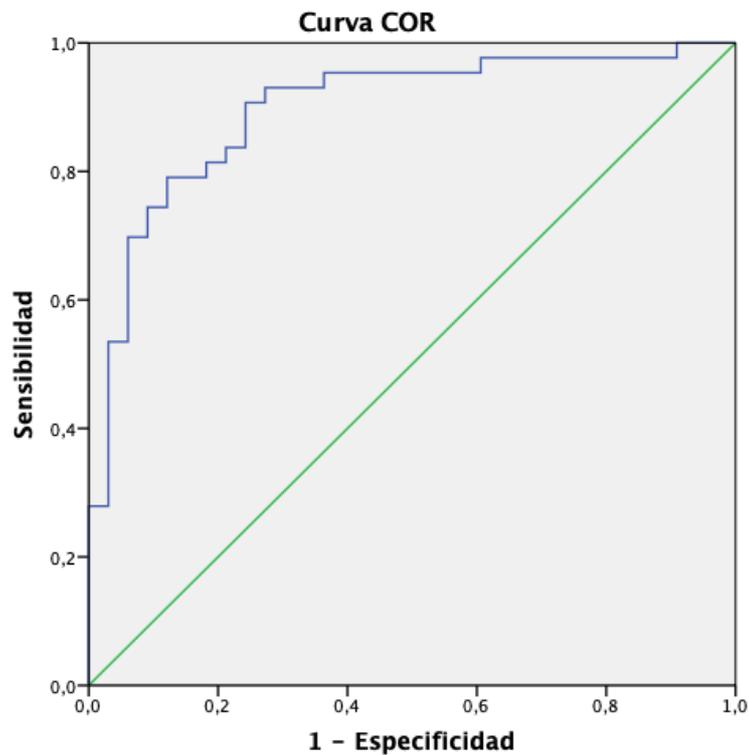


Figura 16: AUC para el Fe en Exudado

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad	Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
-,985500	1,000	1,000	,104400	,860	,242
,016900	1,000	,970	,105200	,837	,242
,021250	1,000	,939	,108100	,837	,212
,024800	1,000	,909	,110400	,814	,212
,027550	,977	,909	,111750	,814	,182
,029000	,977	,879	,113050	,791	,182
,029500	,977	,848	,113750	,791	,152
,030150	,977	,818	,117150	,791	,121
,030700	,977	,788	,121050	,767	,121
,031100	,977	,758	,126200	,744	,121
,032650	,977	,727	,130700	,744	,091
,034100	,977	,697	,131300	,721	,091
,036050	,977	,667	,133100	,698	,091
,038950	,977	,636	,136000	,698	,061
,042550	,977	,606	,138900	,674	,061
,048000	,953	,606	,143500	,651	,061
,053200	,953	,576	,146600	,628	,061
,055700	,953	,545	,148700	,605	,061
,058100	,953	,515	,151650	,581	,061
,062250	,953	,485	,153750	,558	,061
,066150	,953	,455	,159050	,535	,061
,069800	,953	,424	,166300	,535	,030
,071800	,953	,394	,175250	,512	,030
,073150	,953	,364	,206650	,488	,030
,074600	,930	,364	,235900	,465	,030
,075300	,930	,333	,266600	,442	,030
,076700	,930	,303	,330050	,419	,030
,078000	,930	,273	,371750	,395	,030
,082550	,907	,273	,382950	,372	,030

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad	Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
,095450	,907	,242	,390450	,349	,030
,104200	,884	,242	,392500	,326	,030
,570600	,279	,000	,428200	,302	,030
,694600	,256	,000	,478500	,279	,030
,742350	,233	,000	1,222850	,116	,000
,799000	,209	,000	1,437250	,093	,000
,891950	,186	,000	1,599700	,070	,000
1,032400	,163	,000	1,692300	,047	,000
1,150400	,140	,000	2,074050	,023	,000

Tabla 26: Coordenadas de la curva ROC para la variable Fe en exudado

El punto de corte óptimo para detección del grupo HIC con un 93% de sensibilidad y un 73% de especificidad es 0,07800 nM x mg exudado. Por encima del valor 0,5 nM x mg exudado existe una detección 100% específica para ictus hemorrágico con una sensibilidad del 28% (figura 17).

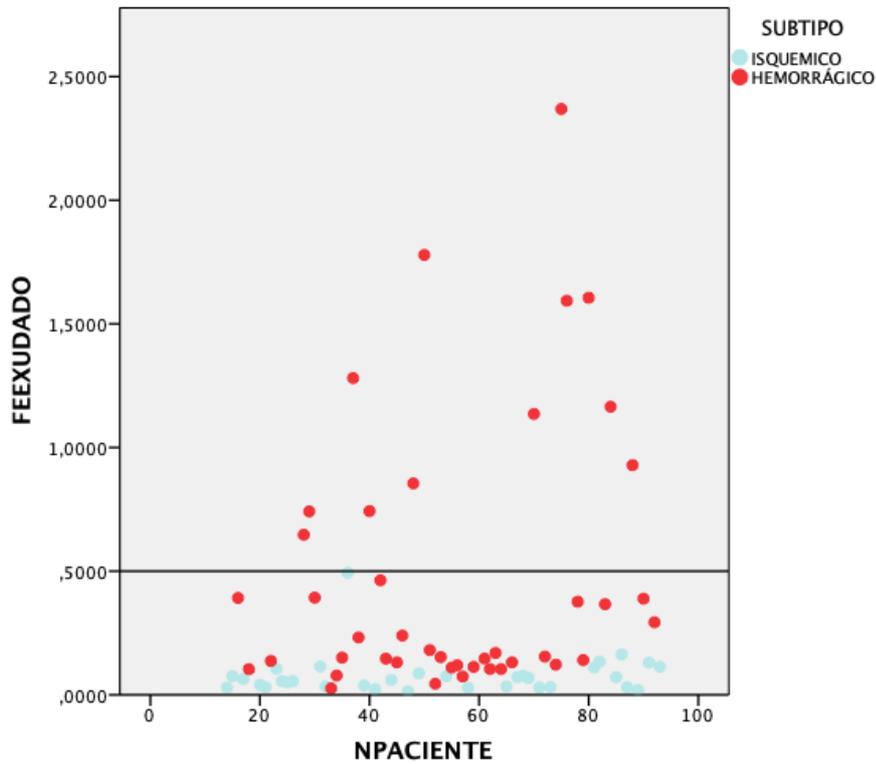


Figura 17: Niveles de Fe en nM x mg exudado para grupo ISQ y grupo HIC

9.2 El zinc en exudado nasal

El Zn es un metal que se encuentra en los puntos de unión de numerosas proteínas del SNC que se degradan cuando ocurre el insulto isquémico o hemorrágico. Por ello lo elegimos como potencial biomarcador a ser medido en exudado.

En el apartado de inicio se mostraban los niveles medios de Zn para el grupo ISQ (0,155305 nM x mg exudado +/- 0,3034) y para el grupo HIC (0,376857 nM x mg exudado +/- 0,5323) que resultaron diferentes de forma no significativa ($p=0,086$). Dichos resultados se representan gráficamente en la figura 18.

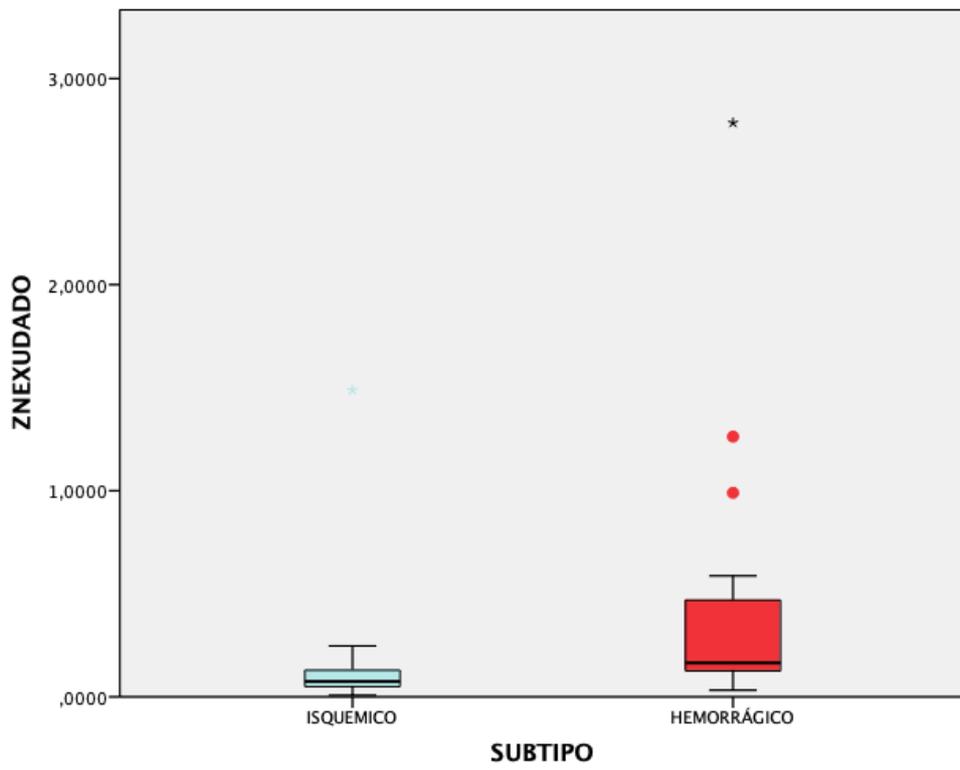


Figura 18: Niveles de Zn en nM x mg exudado en grupo ISQ y grupo HIC

Para el Zn en exudado obtenemos un AUC de 0,795 (figura 19), por encima de 0,75, por lo que puede considerarse un test bueno. Los valores de sensibilidad y especificidad para cada punto de corte se muestran en la tabla 27.

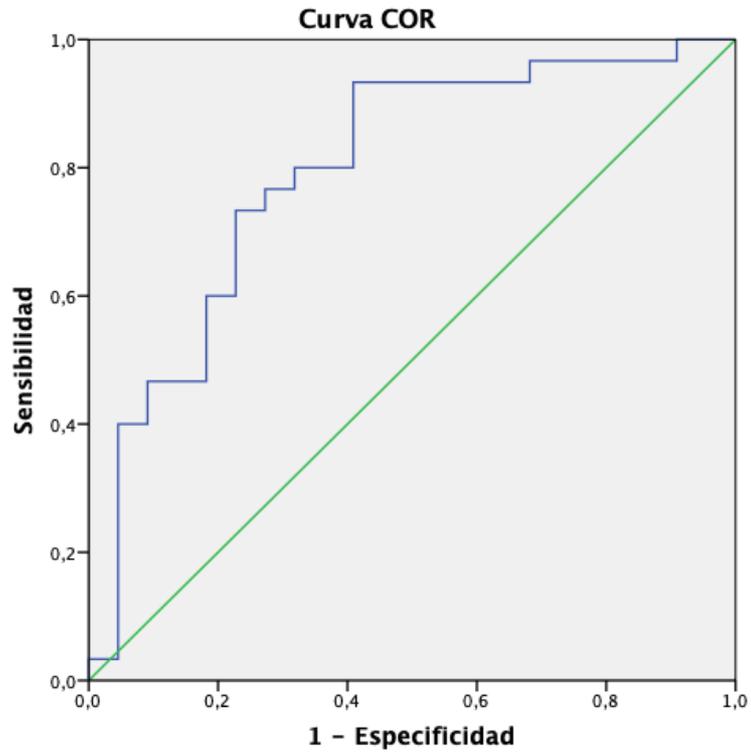


Figura 19: AUC para el Zn en Exudado

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad	Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
-,992200	1,000	1,000	,164750	,500	,182
,019100	1,000	,955	,168200	,467	,182
,031200	1,000	,909	,186250	,467	,136
,034000	,967	,909	,210050	,467	,091
,036450	,967	,864	,218150	,433	,091
,040650	,967	,818	,233000	,400	,091
,047050	,967	,773	,254350	,400	,045
,054000	,967	,727	,273900	,367	,045
,060550	,967	,682	,327550	,333	,045
,064800	,933	,682	,386700	,300	,045
,070650	,933	,545	,436850	,267	,045
,074800	,933	,500	,476700	,233	,045
,075250	,933	,455	,494950	,200	,045
,081350	,933	,409	,523300	,167	,045
,088000	,900	,409	,564050	,133	,045
,095500	,867	,409	,788450	,100	,045
,105350	,833	,409	1,126450	,067	,045
,108800	,800	,409	1,375350	,033	,045
,111100	,800	,364	2,136650	,033	,000
,116400	,800	,318	3,785500	,000	,000
,121400	,767	,318	,149000	,567	,182
,124550	,767	,273	,156750	,533	,182
,127750	,733	,273			
,134100	,733	,227			
,139700	,700	,227			
,142300	,667	,227			
,144300	,633	,227			
,145050	,600	,227			
,146600	,600	,182			

Tabla 27: Coordenadas para la curva ROC para la variable Zn en exudado

El punto de corte óptimo para detección del grupo HIC con un 80% de sensibilidad y un 69% de especificidad es 0,1164 nM x mg exudado. Por encima del valor 2,13 nM x mg exudado existe una detección 100% específica para ictus hemorrágico con una sensibilidad del 3% (figura 20).

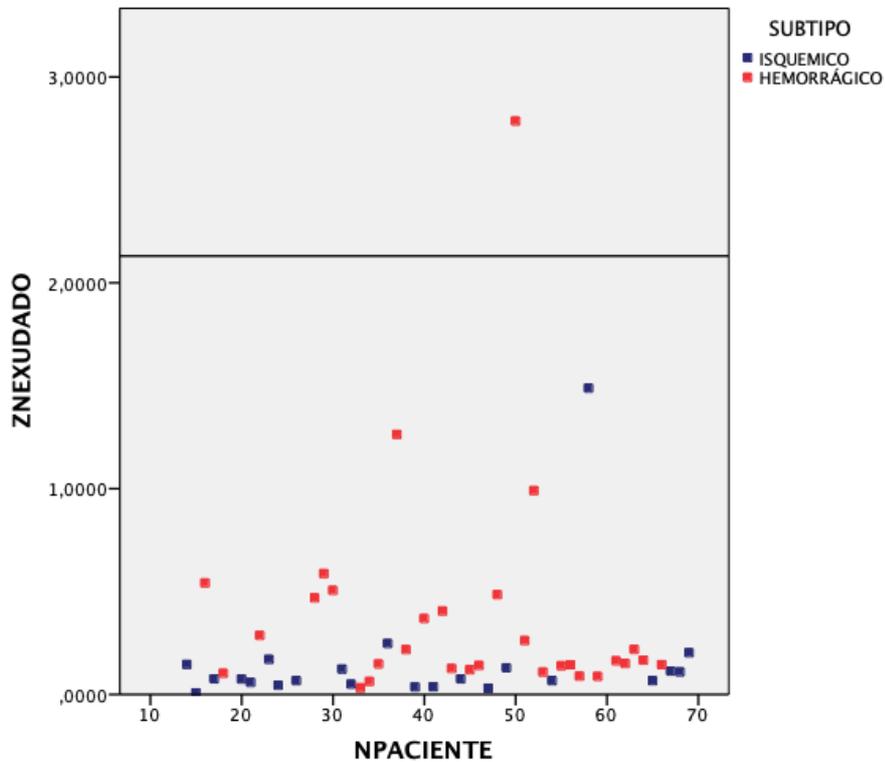


Figura 20: Niveles de Zn en nM x mg exudado para grupo ISQ y grupo HIC

9.3 El cobre en exudado nasal

El Cu, al igual que el Zn, es un metal que se encuentra en los sitios de unión de numerosas proteínas del SNC que se degradan cuando ocurre el insulto isquémico o hemorrágico. Por ello lo elegimos junto con el Fe y el Zn como potencial biomarcador para ser medido en exudado.

Anteriormente se mostraban los niveles medios de Cu para el grupo ISQ (0,022475 nM x mg exudado +/- 0,0228) y para el grupo HIC (0,074021 nM x mg exudado +/- 0,1150) que resultaron estadísticamente diferentes (p=0,015), aunque con menor potencia que los resultados obtenidos con el Fe. Dichos resultados se representan gráficamente en la figura 21.

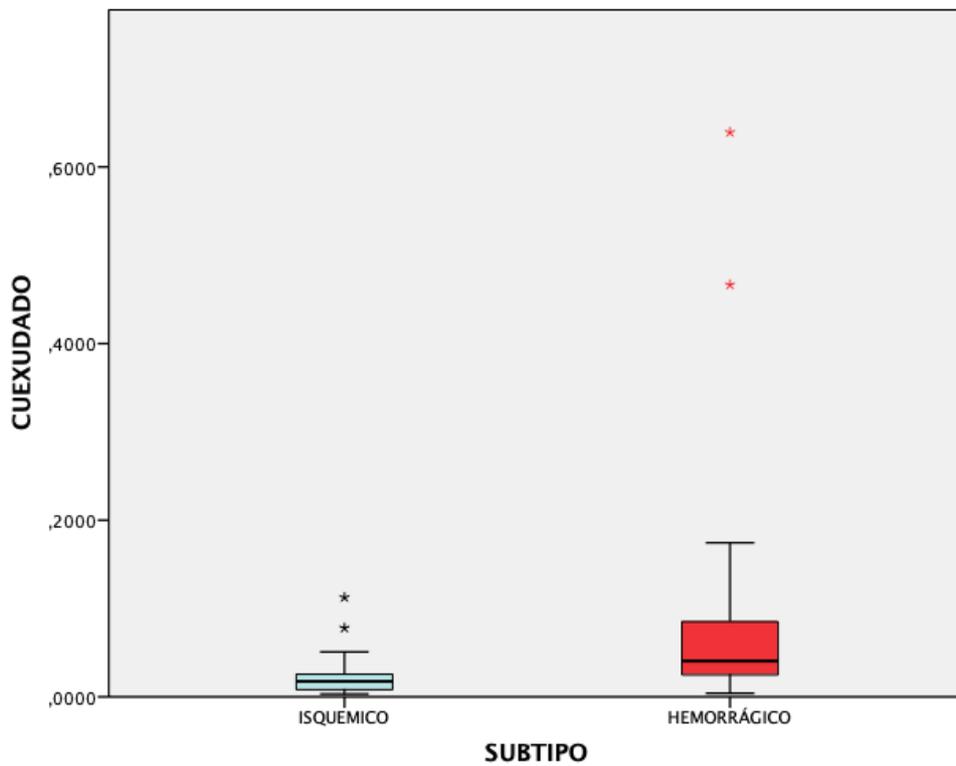
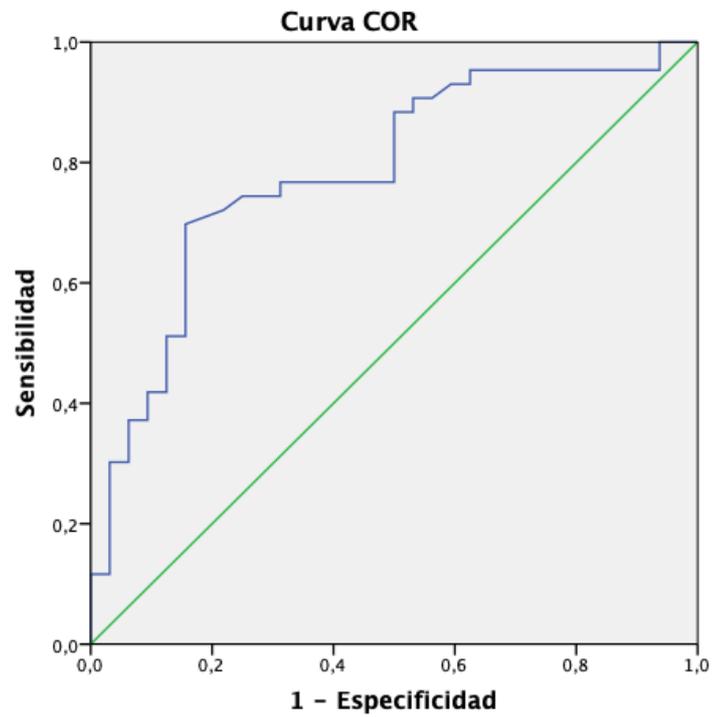


Figura 21: Niveles de Cu en exudado nasal según el grupo ISQ o grupo HIC

Para el Cu en exudado obtenemos un AUC de 0,755 (figura 22), por encima de 0,75, por lo que puede considerarse un test bueno para el diagnóstico diferencial entre isquemia y hemorragia, pero peor que los dos marcadores anteriores. Los valores de sensibilidad y especificidad para cada punto de corte se muestran en la tabla 28.



Los segmentos de diagonal se generan mediante empates.

Figura 22: AUC para el Cu en exudado nasal

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad	Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
,000000	1,000	1,000	,024100	,744	,313
,003500	1,000	,969	,024800	,744	,281
,003800	1,000	,938	,025550	,744	,250
,004450	,977	,938	,026350	,721	,219
,005150	,953	,938	,027150	,698	,156
,005450	,953	,906	,028050	,674	,156
,005800	,953	,875	,030400	,651	,156
,006750	,953	,844	,033050	,628	,156
,007800	,953	,781	,034000	,605	,156
,008250	,953	,750	,035200	,581	,156
,008750	,953	,719	,036400	,558	,156
,009200	,953	,688	,036700	,535	,156
,009450	,953	,656	,038300	,512	,156
,009700	,953	,625	,040100	,512	,125
,010150	,930	,625	,041050	,488	,125
,011900	,930	,594	,041700	,465	,125
,013450	,907	,563	,041850	,442	,125
,013850	,907	,531	,043150	,419	,125
,014400	,884	,531	,044500	,419	,094
,015600	,884	,500	,046350	,395	,094
,016550	,860	,500	,049550	,372	,094
,017750	,837	,500	,052500	,372	,063
,019050	,814	,500	,057250	,349	,063
,019500	,791	,500	,061150	,326	,063
,020100	,767	,500	,069900	,302	,063
,020600	,767	,469	,079650	,302	,031
,021000	,767	,438	,082750	,279	,031
,021400	,767	,406	,085000	,256	,031

Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad	Positivo si es mayor o igual que ^a	Sensibilidad	1 - Especificidad
,021850	,767	,375	,086800	,233	,031
,022450	,767	,344	,090050	,209	,031
,023300	,767	,313	,092900	,186	,031
,111000	,116	,031	,101350	,163	,031
,113800	,116	,000	,109300	,140	,031
,122450	,093	,000			
,152100	,070	,000			
,320450	,047	,000			
,552900	,023	,000			
1,000000	,000	,000			

Tabla 28: Coordenadas de la curva COR para Cu en exudado

El punto de corte óptimo para la detección del grupo HIC, con un 77% de sensibilidad y un 69% de especificidad, es 0,02330 nM x mg exudado. Por encima del valor 0,113 nM x mg exudado existe una detección 100% específica para ictus hemorrágico con una sensibilidad del 12% (figura 23).

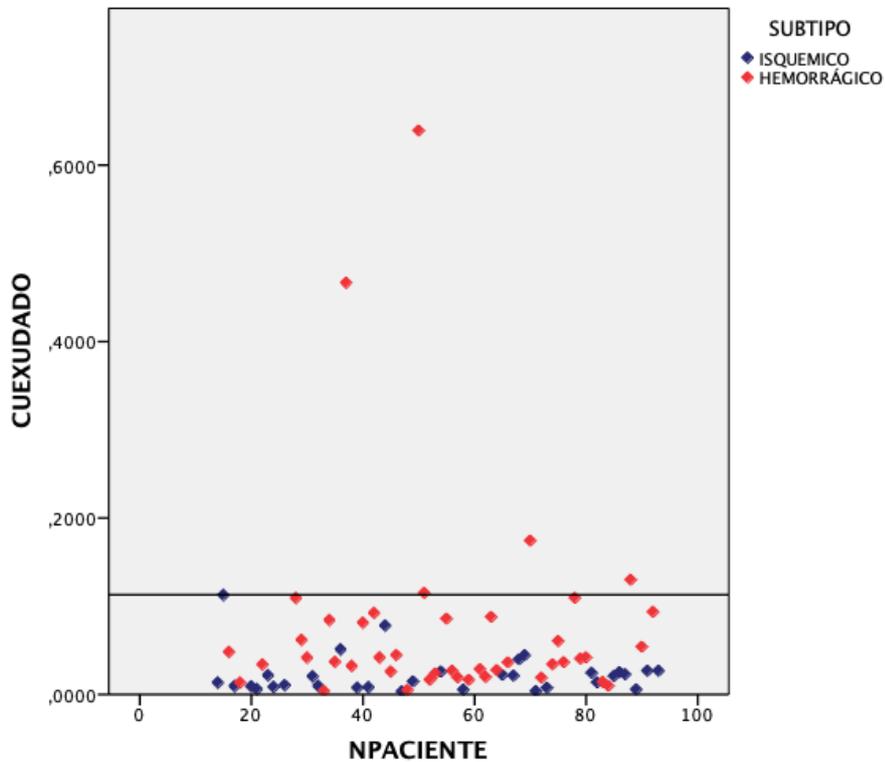


Figura 23: Niveles de Cu en exudado

9.4 Variación de los niveles de hierro, zinc y cobre en exudado nasal en relación con las variables clínicas al ingreso y variables pronósticas

Se analiza la eventual relación de los niveles de Fe, Zn y CU en exudado con el estado funcional del paciente previo al ictus (valorado por la escala mRS basal) y la gravedad clínica del ictus al ingreso mediante la escala NIHSS. Los resultados se muestran en las tablas 29 y 30.

METAL	NIHSS al ingreso	Media	Desviación estándar	p
Fe exudado	>= 10	0,59820	0,6897906	0,239
	< 10	0,39472	0,4267229	
Zn exudado	>= 10	0,43918	0,7577460	0,609
	< 10	0,33530	0,3276198	
Cu exudado	>= 10	0,08715	0,1441533	0,532
	< 10	0,06456	0,0906308	

Tabla 29: NIHSS y su relación con los niveles de Fe, Zn y Cu en exudado nasal

METALES	mRS al ingreso	Media	Desviación estándar	P
Fe en exudado	> 2	0,51466	0,6595108	0,576
	<= 2	0,46484	0,5136210	
Zn en exudado	> 2	0,46916	0,9378358	0,790
	< =2	0,34329	0,3061786	
Cu en exudado	> 2	0,09822	0,1655813	0,370
	< =2	0,06353	0,0862663	

Tabla 30: mRS previo al ictus y su relación con los niveles de Fe, Zn y Cu en exudado nasal

Además, se valora la relación de estos marcadores con el pronóstico final del ictus mediante la escala mRS a 3 meses (tabla 31).

METALES	mRS a 3 meses	Media	Desviación estándar	P
Fe en exudado	> 2	0,68541	0,6510729	0,961
	<= 2	0,34654	0,3832465	
Zn en exudado	> 2	0,53380	0,9273175	0,225
	< =2	0,50907	0,3493977	
Cu en exudado	> 2	0,10280	0,1692784	0,426
	< =2	0,04944	0,0366053	

Tabla 31: mRS a tres meses y su relación con los niveles de Fe, Zn y Cu en exudado nasal

No se encuentra relación significativa entre los niveles de metales en exudado y las variables NIHSS al ingreso, mRS basal y a los 3 meses.

Sin embargo, existe una tendencia a obtener niveles más altos de estos metales en relación con peor pronóstico a largo plazo (mRS>2 a los 3 meses).

Se valora también la eventual asociación de los niveles de Fe, Zn y Cu con la etiología subyacente al subtipo de ictus, en el caso del grupo ISQ valorado mediante la clasificación TOAST y en el caso del grupo HIC según fueran de origen HTA, amiloide...

No se encontraron diferencias significativas entre los subgrupos etiológicos en el caso del grupo ISQ (p=0,371), y tampoco en el caso del grupo HIC (p=0,385).

9.5 Variación de los niveles de hierro, zinc y cobre en exudado nasal en relación con las variables radiológicas

No se encuentra relación significativa entre los niveles de metales en exudado y el volumen de lesión en ambos grupos de estudio.

No existe asociación entre la concentración de diferentes metales y el volumen de la lesión para ambos subgrupos (p=0,539). Aunque, en las figuras que representa el volumen en relación con dichas concentraciones, si se confirma de forma gráfica los niveles superiores de metales en el grupo HIC.

Se estudia la relación entre los niveles de metales y el volumen final de la lesión (figuras 24-26).

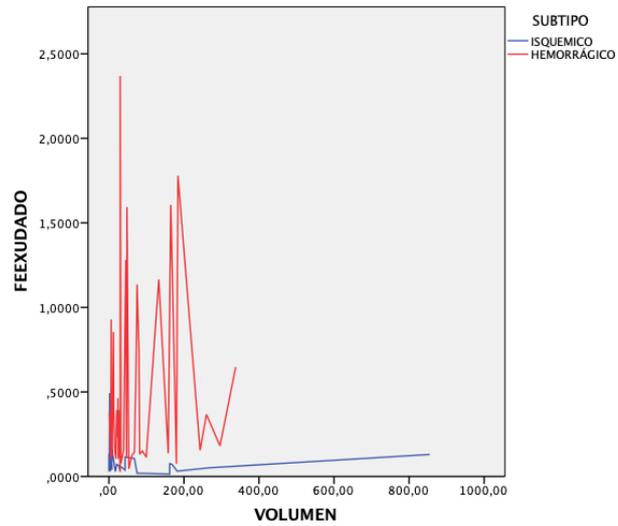


Figura 24: Relación de Fe en exudado con volumen de la lesión en el grupo ISQ y HIC

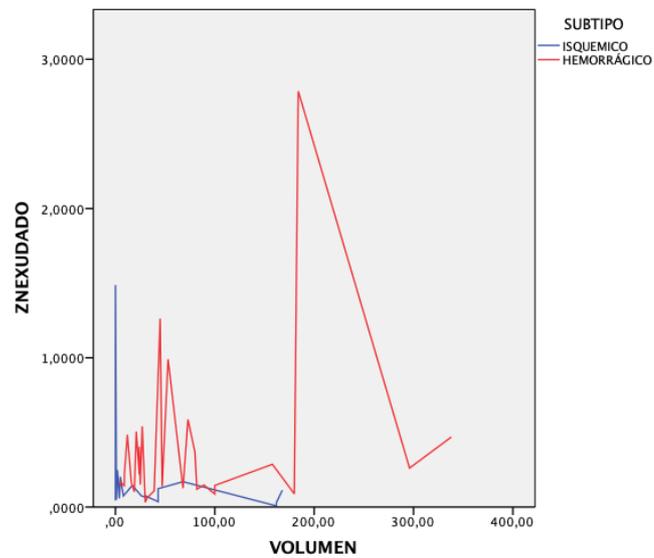


Figura 25: Zn en exudado en relación con volumen en grupo ISQ y HIC

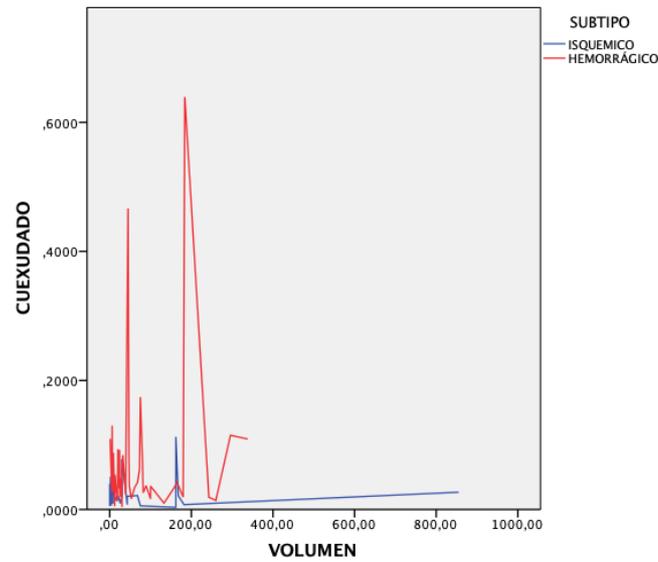


Figura 26: Cu en exudado en relación con volumen en grupo ISQ y HIC

Si realizamos un análisis diferenciando el volumen de la lesión en mayor de 30 ml o menor de 30 ml (Rotzel y cols definen un volumen de infarto mayor a dicho volumen como marcador de peor pronóstico y mortalidad¹⁹⁸) tampoco se ven diferencias significativas, si bien es cierto que el Fe muestra una tendencia a mayores concentraciones si el volumen de infarto es mayor de 30 ml ($p=0,129$).

Se estudia así mismo la relación de los niveles de metales con la presencia de vertido ventricular del sangrado y de microsangrados, todo ello valorado en el grupo HIC, siendo los resultados expresados en las tablas 32 y 33.

METALES	Vertido ventricular	Media	Desviación estándar	P
Fe en exudado	SI	1,60570	0,4449780	0,049
	NO	0,40762	0,3338679	
Zn en exudado	SI	0,47226	0,3464789	0,856
	NO	0,36115	0,2122491	
Cu en exudado	SI	0,04190	0,0417010	0,803
	NO	0,05455	0,0411501	

Tabla 32: Relación entre niveles de metales en exudado y presencia de vertido ventricular en el grupo HIC

METALES	Presencia de microsangrados	Media	Desviación estándar	P
Fe en exudado	SI	0,41022	0,5811870	0,975
	NO	0,42122	0,3267238	
Zn en exudado	SI	0,39830	0,5774819	0,802
	NO	0,31580	0,2514166	
Cu en exudado	SI	0,15340	0,2103262	0,401
	NO	0,05652	0,0410812	

Tabla 33: Relación entre niveles de metales en exudado y presencia de microsangrados en el grupo HIC

En este caso solo se encuentran diferencias estadísticamente significativas en el caso de la concentración de Fe en exudado, que es más elevada cuando la hemorragia conlleva vertido ventricular ($p=0,049$).

9.6 Análisis por componentes principales

En estadística el análisis por componentes principales es una técnica utilizada para describir un conjunto de datos en términos de nuevas variables (componentes) no correlacionadas. Los componentes se ordenan por la cantidad de varianza original que describen, buscando la proyección según la

cual los datos pueden ser mejor representados y la construcción de modelos predictivos¹⁹⁹.

Se realizó un análisis de componentes principales introduciendo todos los metales estudiados en exudado nasal con vistas a valorar un posible modelo que aumentara la especificidad de la prueba para detectar el grupo HIC.

Se estudió en tanto en cuanto los componentes (en este caso Fe, Zn y Cu) contribuían a la detección de sangrado cerebral y se encontró que las varianzas se distribuyeron en un 90,807% para la concentración de Fe, 5,303% para la concentración de Zn y 3,890% para la de Cu (tabla 34, figura 27).

Componente	Autovalores iniciales			Sumas de extracción de cargas al cuadrado		
	Total	% de varianza	% acumulado	Total	% de varianza	% acumulado
Fe	2,724	90,807	90,807	2,724	90,807	90,807
Zn	0,159	5,303	96,110			
Cu	0,117	3,890	100,000			

Tabla 34: Análisis por componentes principales, resumen de varianzas

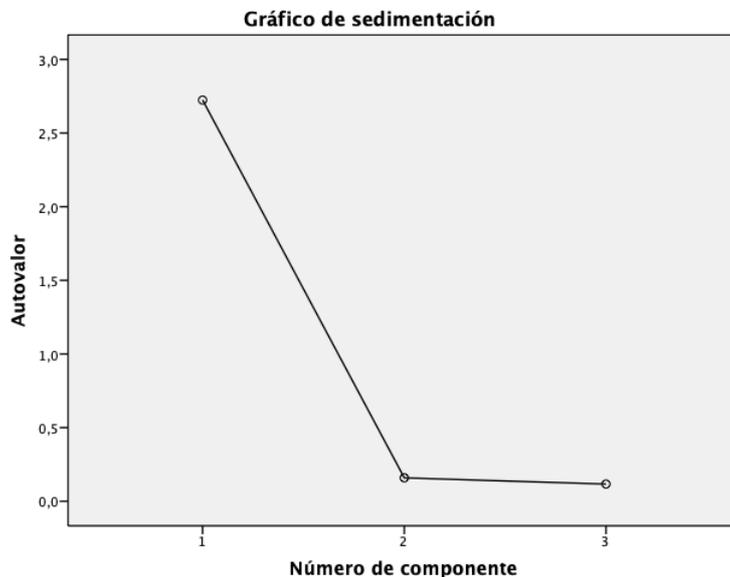


Figura 27: Representación gráfica de los componentes (1=Fe, 2=Zn, 3=Cu)

El hierro parece por tanto el metal que más relacionado con la detección de hemorragia cerebral, teniendo el Zn y el Cu una aportación marginal para dicho fin.

9.7 Análisis multivariante

En el análisis de regresión lineal múltiple, si ajustamos los niveles de Fe, Zn y Cu en exudado por edad, sexo, NIHSS al ingreso y niveles de Fe en sangre, los niveles de dichos metales se relacionan de forma directa con el grupo HIC, como se muestra en la tabla 35 a continuación.

METALES	R ²	Edad	Sexo	FRCV	NIHSS ingreso	Fe sangre
Fe en exudado	0,021	0,840	0,943	0,683	0,583	0,638
Zn en exudado	0,214	0,862	0,095	0,322	0,326	0,504
Cu en exudado	0,104	0,891	0,273	0,265	0,362	0,473

Tabla 35: Análisis de regresión lineal múltiple. FRCV= Factores de riesgo cardiovascular; Fe= hierro; Zn= zinc; Cu= cobre

10. Parámetros de laboratorio en saliva

En la saliva se estudiaron los niveles de Fe, Cu, Zn, Pb y Cd en todos los pacientes, consiguiéndose valores interpretables tan solo en los tres primeros metales, que fueron los posteriormente analizados en un ICP de masas.

Los niveles de metales fueron analizados en un ICP de masas Agilent de forma simultánea y según el método descrito en el apartado metodología. Los valores de concentración de cada metal se expresan en nanomolar por miligramo de saliva (nM x mg saliva), siendo sus valores medios y desviación estándar los expresados en la tabla 36.

Metal	Subtipo de Ictus	Media (nM x mg exudado)	Desviación estándar	p
Hierro	ISQ	1,026590	+/- 2,02164	0,613
	HIC	0,790587	+/- 1,85320	
Zinc	ISQ	0,468782	+/- 0,94377	0,192
	HIC	0,216329	+/- 0,41604	
Cobre	ISQ	0,061504	+/- 0,13919	0,110
	HIC	0,024539	+/- 0,03840	

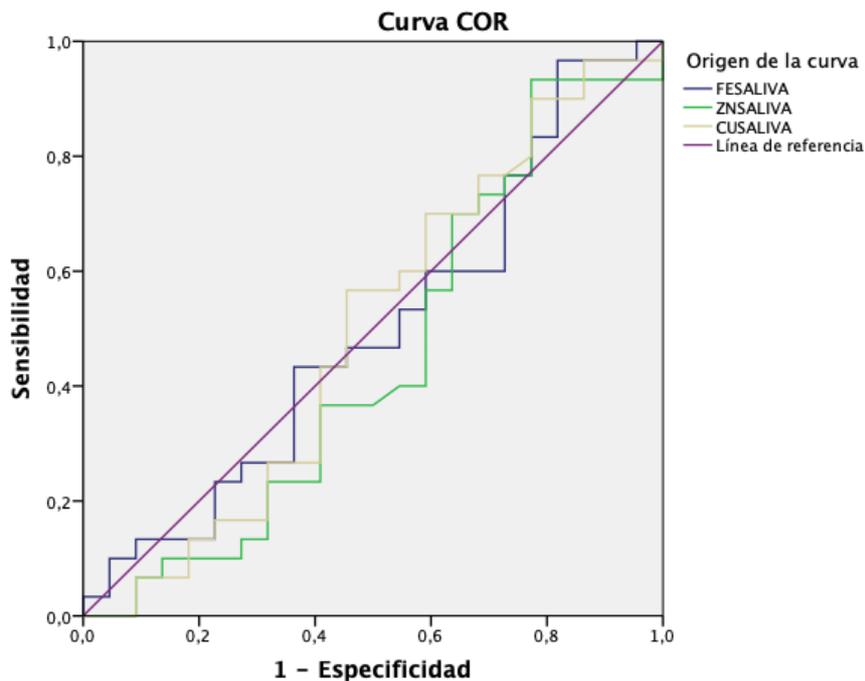
Tabla 36: Niveles de metales en saliva

En el caso de la saliva, aunque sí existe una tendencia a que los niveles de metales sean mayores en el grupo ISQ, no se alcanza significación estadística para ninguno de los metales estudiados. Dicha diferencia con los datos hallados en exudado nasal podría deberse a que el estímulo para la secreción de saliva por los pares craneales no hace que estos contacten de forma directa con la misma, siendo de ese modo los desechos de origen cerebral en dicho fluido residuales.

Al realizar un análisis del contenido de estos metales en este fluido como método diagnóstico para diferenciar el grupo ISQ del HIC, encontramos un valor de AUC que se representa en la tabla 37 y en la figura 28.

Metal	AUC	Intervalo 95%
Hierro	0,479	0,334-0,660
Zinc	0,451	0,284-0,618
Cobre	0,498	0,331-0,665

Tabla 37: AUC para los metales en saliva



Los segmentos de diagonal se generan mediante empates.

Figura 28: AUC para los metales en saliva

Todos los valores de la AUC en este caso son $< 0,5$ por lo que no pueden considerarse test buenos para el diagnóstico en este caso.

11. Comparación de la utilidad para el diagnóstico diferencial entre el grupo ISQ y el HIC de la detección de metales con el diagnóstico gold standard

A pesar de que los valores del AUC indican como buenos métodos diagnósticos a la concentración de Fe, Cu y Zn medida en el exudado nasal, solo el Fe demostró un AUC compatible con prueba diagnóstica muy buena, donde el punto de corte óptimo para detección de la hemorragia con un 93% de sensibilidad y un 70% de especificidad es 0,0767 nM x mg exudado.

La saliva, por el contrario, no demuestra que los metales elegidos sean buenos marcadores en el diagnóstico diferencial de isquemia y hemorragia en dicho medio.

El método gold estándar para el diagnóstico diferencial entre ictus isquémico y hemorrágico hasta el momento es, como se ha desarrollado en la introducción, la neuroimagen, y de forma más concreta y extendida la TC craneal, que tiene una sensibilidad cercana al 100% y una alta especificidad para la detección de hemorragia cerebral²⁰⁰.

Por otro lado, en la tabla 38 se hace una comparativa del coste de la realización de una TC frente al coste de la realización de una detección de metales en exudado nasal.

COSTES	TC CRANEAL	ANÁLISIS DE EXUDADO
Costes derivados del aparataje (TC craneal/ICP MS)	200000-400000	100000-200000
Costes de calibrado del equipo	-	40
Costes de análisis del elemento	-	2
Costes exploración radiológica	195	-

Tabla 38: Coste en Euros de las técnicas diagnósticas estándar versus el análisis de exudado nasal

Los datos del coste de las técnicas están extraídos de las hojas de gastos de varias universidades públicas y centros de la sanidad pública del país publicados online.

En el presente estudio se han analizado 75 pacientes, por lo que la realización de una TC cerebral urgente a cada uno de ellos supondría un coste estimado de 4000 euros por paciente. En el otro lado, el coste de la realización de un análisis de elementos mediante el ICP MS supondría un coste estimado de 2000 euros por paciente.

12. Resumen y conclusiones del apartado resultados hasta el paciente 75

La descripción de las vías de drenaje del sistema linfático cerebral abre nuevas vías de exploración de biomarcadores.

En el presente trabajo se analiza la utilidad de los fluidos exudado y saliva como vehículos que transporten biomarcadores que eventualmente sean útiles para diferenciar la naturaleza isquémica de la hemorrágica en el ictus agudo.

Se demuestra que los metales Fe, Zn y Cu medidos en exudado nasal, son marcadores válidos, muy sensibles y específicos para detectar hemorragia cerebral, siendo el Fe el mejor marcador entre ellos.

No se consigue demostrar el mismo hecho en saliva.

Las implicaciones derivadas de este descubrimiento se desarrollarán en el siguiente apartado de discusión.

III. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS HASTA EL PACIENTE 101

Cincuenta pacientes conforman el grupo ISQ y 51 el HIC.

1. Características demográficas

La tabla 39 muestra las características en ambos grupos de pacientes en lo relativo a edad, sexo y antecedentes médicos. No existen diferencias significativas en la distribución de dichas características entre los grupos con el subgrupo de pacientes presentados previamente, siendo ambos por tanto comparables.

	GRUPO ISQ	GRUPO HIC	p
SEXO. Varones n, %	29 (63%)	25 (25,5%)	0,137
EDAD. Media +/- Desviación estándar	72,03 (+/- 11)	72,26 (+/- 12,44)	0,934
HTA. Presente, n, %	4 (4,3%)	8 (8,6%)	0,440
DL. Presente, n, %	2 (2,2%)	3 (3,2%)	0,207
TABAQUISMO. Presente, n, %	4 (4,3%)	3 (3,2%)	0,332
ALCOHOL. Consumo perjudicial, n, %	0	1 (1,1%)	0,941
CARDIOPATÍA. Presente, n, %	2 (2,2%)	1 (1,1%)	0,345
ICTUS PREVIO. Presente, n, %	1 (1,1%)	2 (2,2%)	0,265
HTA+ DM. Presente, n, %	1 (1,1%)	0	0,786
HTA+ DL. Presente, n, %	0	5 (5,4)	0,060
DL+DM Presente, n, %	1 (1,1%)	0	0,090
HTA+DM+DL Presente, n, %	0	1 (1,1%)	0,876
VARIOS Presente, n, %	24 (25,8%)	25 (24,7%)	0,798
ENFERMEDAD INMUNE Presente, n, %	0	2(2,2%)	0,015
CLAUDICACIÓN INTERMITENTE. Presente, n, %	2 (2,2%)	1 (1,1%)	0,150
NINGÚN FRCV. N, %	4 (4,3%)	3 (3,2%)	0,465

Tabla 39: Características basales de la muestra del paciente 1-101

2. Parámetros de laboratorio en exudado

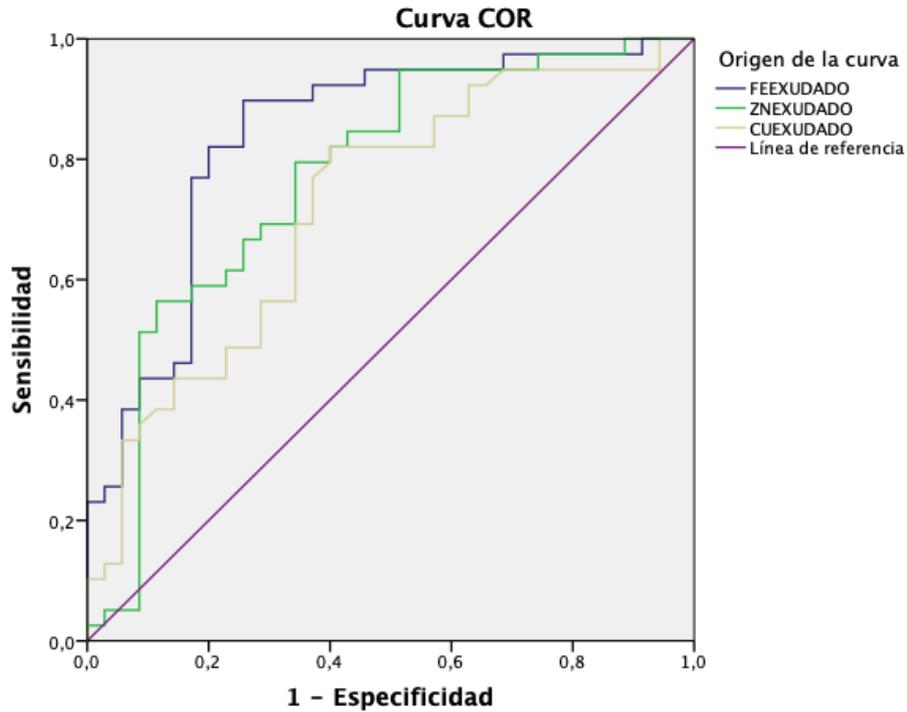
En el exudado nasal se estudiaron los niveles de Fe, Cu, Zn, Pb y Cd en todos los pacientes, consiguiéndose valores interpretables tan solo en los tres primeros metales que fueron los posteriormente analizados.

Los niveles de metales fueron analizados en un ICP de masas Agilent de forma simultánea y según el método descrito en el apartado metodología. Los valores de concentración de cada metal se expresan en nanomolar por miligramo de exudado (nM x mg exudado), siendo sus valores medios y desviación estándar los expresados en la tabla 40.

Metal	Subtipo de Uctus	Media (nM x mg exudado)	Desviación estándar	P
Hierro	ISQ	0,103285	+/- 0,1142768	0,0001
	HIC	0,480631	+/- 0,5102807	
Zinc	ISQ	0,195163	+/- 0,3253603	0,052
	HIC	0,384274	+/- 0,4748683	
Cobre	ISQ	0,028427	+/- 0,0262041	0,004
	HIC	0,080267	+/- 0,1159556	

Tabla 40: Niveles medios de metales medidos en exudado nasal

Para todos los metales se calculó el área bajo la curva de ROC (AUC) que viene representada en la figura 29 y en la tabla 41.



Los segmentos de diagonal se generan mediante empates.

Figura 29: AUC para FE, Zn y Cu

Metal	AUC	Intervalo 95%
Hierro	0,839	0,744-0,933
Zinc	0,772	0,661-0,883
Cobre	0,772	0,605-0,839

Tabla 41: AUC para Fe, Zn y Cu

A pesar de que podemos objetivar que los niveles en este caso son también significativamente más altos en el grupo HIC que en el ISQ, se objetiva en los valores medios un aumento del valor medio global que podría estar motivado por alteraciones metodológicas derivadas de la avería sufrida por la máquina. No obstante, en cuanto a los valores de AUC se encuentran en este caso parecidos a los obtenidos previamente a la avería del ICP, si bien

es cierto que son ligeramente inferiores lo que hablaría de una peor calidad del método diagnóstico.

El punto de corte óptimo en este caso para la detección del grupo HIC en el caso del FE sería de 0,10420 nM x mg exudado, que predeciría con un 89% de sensibilidad y un 75% de especificidad la presencia de hemorragia cerebral. Por encima del valor 0,55 nM x mg exudado todos los casos estudiados serían del grupo HIC.

Con respecto al Zn el punto de corte óptimo para diagnóstico de una hemorragia cerebral sería 0,14660, que predeciría la misma con una sensibilidad del 69% y una especificidad del 70%.

Para el Cu, el punto de corte óptimo sería 0,100550 nM x mg exudado, que con una sensibilidad del 89% y una especificidad del 75% clasificaría correctamente a los pacientes con hemorragia cerebral en el grupo HIC.

A pesar de que los puntos de corte no distan de los obtenidos previamente a la avería del espectrómetro, se puede objetivar un aumento global de los puntos de corte a expensas de una sensibilidad menor del método.

3. Parámetros de laboratorio en saliva

En la saliva se estudiaron los niveles de Fe, Cu, Zn, Pb y Cd en todos los pacientes, consiguiéndose valores interpretables tan solo en los tres primeros metales que fueron los posteriormente analizados en el mismo ICP de masas Agilent que las muestras de exudado, también de forma simultánea y según el método descrito en el apartado metodología. Los valores de concentración de cada metal se expresan en nanomolar por miligramo de saliva (nM x mg saliva), siendo sus valores medios y desviación estándar los expresados en la tabla 42.

Metal	Subtipo de Ictus	Media (nM x mg exudado)	Desviación estándar	P
Hierro	ISQ	0,840572	+/- 1,7705256	0,981
	HIC	0,849722	+/- 1,8588968	
Zinc	ISQ	0,395069	+/- 0,7973179	0,689
	HIC	0,323357	+/- 0,685703	
Cobre	ISQ	0,071055	+/- 0,1412647	0,197
	HIC	0,039662	+/- 0,0779516	

Tabla 42: Niveles de metales en saliva

En el caso de la saliva, continúa observándose una tendencia a que los niveles de metales sean mayores en el grupo ISQ, aunque dicha diferencia se desdibuja y de nuevo no se alcanza significación estadística para ninguno de los metales estudiados, tal y como se representa el valor de AUC en la tabla 43 y en la figura 30.

Metal	AUC	Intervalo 95%
Hierro	0,497	0,358-0,637
Zinc	0,449	0,310-0,588
Cobre	0,490	0,350-0,630

Tabla 43: AUC para los metales en saliva

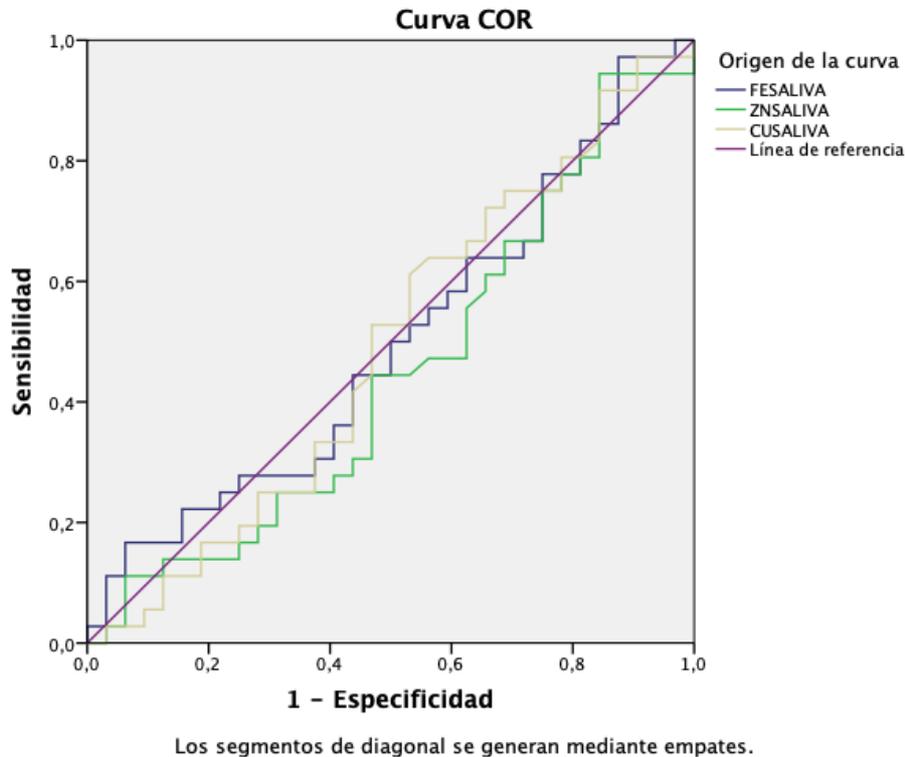


Figura 30: AUC para metales en saliva en los pacientes 1-101

4. Resultados en forma de publicaciones y otra producción científica

- En los anexos 5-9 se adjunta la producción científica derivada de la presente tesis doctoral.
- El anexo 5 corresponde al registro de una patente (P201900087) actualmente en revisión.
- El anexo 6 corresponde a el capítulo de libro “Medición de oligoelementos en exudado nasal en los pacientes con ictus y su uso como biomarcadores en el diagnóstico diferencia entre isquemia y hemorragia. Estudio BIOMICHTUS-HUCA” publicado por la Universidad de Oviedo.
- El anexo 7 corresponde a la publicación: E-Poster Viewing. (2019). *European Stroke Journal*, 4(1_suppl), 150–276.²⁰¹
- Los anexos 8 y 9 corresponden a la publicación como poster en las Jornadas Doctorales del año 2017 y en el congreso europeo de ictus (ESOC) 2019.
- Los anexos 10-13 corresponden a las horas de formación transversal en el programa de doctorado.

Síntesis de los resultados y discusión

I. CARACTERÍSTICAS DEL ESTUDIO PRESENTADO: PUNTOS FUERTES Y LIMITACIONES

El presente estudio tiene un diseño prospectivo y observacional.

Se seleccionaron los pacientes de forma consecutiva de entre todos los pacientes con ictus hemorrágico agudo que acudieron al hospital durante el periodo del estudio (figura 11). Así, de 168 pacientes atendidos en nuestro centro con un ictus agudo hemorrágico entre febrero de 2018 y el mismo mes de 2019, 51 pacientes cumplían los criterios de inclusión (ictus hemorrágico de menos de 48 horas de evolución, sin los criterios de exclusión desarrollados en metodología) y fueron finalmente incluidos, junto con 50 controles de pacientes con ictus isquémico que presentaban características basales (edad, NIHSS) similares a las de la muestra final.

En las tablas 6-21 del apartado de resultados se muestran las características basales de la serie global y las diferencias entre ambos subtipos de ictus agudo (grupo ISQ y grupo HIC).

En el caso del grupo HIC la edad media de los pacientes fue de 72 años, un 48,8% eran varones y el subtipo etiológico más frecuente fue la hemorragia de origen hipertensivo (56,6%). La mediana de NIHSS basal al ingreso fue 6 (4-14). La localización más frecuente de la hemorragia fue la profunda (54,8%), en su mayoría sin vertido a ventrículos (80%). Respecto al tratamiento recibido, todos los pacientes recibieron un tratamiento conservador.

En el grupo ISQ la edad media de los pacientes fue de 72 años, un 72,7% eran varones y el subtipo etiológico de ictus más frecuente fue el cardioembólico (33%). La mediana de NIHSS basal al ingreso fue 8 (6-16). La oclusión arterial más frecuente fue en la ACM proximal (M1) en 13 pacientes (41,9%). Respecto al tratamiento recibido en la fase aguda del ictus, 21 pacientes no recibieron tratamiento (27,6%), 5 fueron tratados con rTPA iv (6,6%) y en 2 más se precisó además de tratamiento endovascular de rescate. A 10 pacientes se les aplicó una terapia de reperfusión endovascular primaria.

Estos datos no distan de las características generales descritas para los pacientes con ictus isquémico y hemorrágico, a pesar de no tratarse el estudio de un registro de ictus agudo al uso.

En ambos grupos la edad es la misma, si bien los pacientes del grupo HIC sufrían más HTA (18,6%), DL (7%) y enolismo crónico (2,3%). Asimismo, los pacientes del grupo ISQ sufrían más cardiopatía (6,5%). Dichas características están descritas en los estudios publicados hasta el momento coincidiendo con nuestros datos²⁰².

A diferencia de los estudios clínicos previos publicados en el ámbito de los biomarcadores (tabla 4 de la introducción), en los que se incluían biomarcadores para diagnóstico diferencial entre ambos subtipos de ictus medidos en sangre, comparados con controles sanos y en diferentes tiempos de evolución, el presente proyecto incluye una muestra homogénea y consecutiva de ictus hemorrágicos en fase aguda, con una gravedad media, todos manejados de forma similar (ingreso en Unidad de Ictus con cuidados protocolizados y homogéneos), así como de controles pacientes con ictus isquémico de características basales similares.

Además, en nuestro estudio los biomarcadores elegidos son metales, mientras que en la mayor parte de estudios previos los biomarcadores elegidos eran moléculas complejas, en su mayor parte proteicas. En los estudios en los que se estudiaba el Fe, el Cu u otros metales y su utilidad para el diagnóstico agudo del ictus no se hacía mención a criterios de inclusión específicos y los criterios de exclusión eran extensos, por lo que las muestras elegidas en ellos son probablemente más heterogéneas.

Desde al año 2015, con la descripción por Asplelund y Louveau del sistema linfático meníngeo, son numerosos los artículos que han intentado explicar el papel del mismo en la fisiopatología de diversas enfermedades del sistema nervioso²⁰³. La mayor parte de los estudios realizados de forma experimental están basados en hallazgos en cerebro de ratón. No obstante, algunos estudios han refrendado la existencia de dicho sistema en el cerebro humano y de otros primates, por métodos de imagen como la RM^{204_205} (figura 31). Además, un estudio en pacientes con enfermedad de Alzheimer en los que se realiza una Tomografía por Emisión de Positrones (PET) confirma en humanos que el LCR aclara principalmente a través de la lámina cribosa y sus marcadores aparecen en el exudado nasal a nivel del cornete superior²⁰⁶.

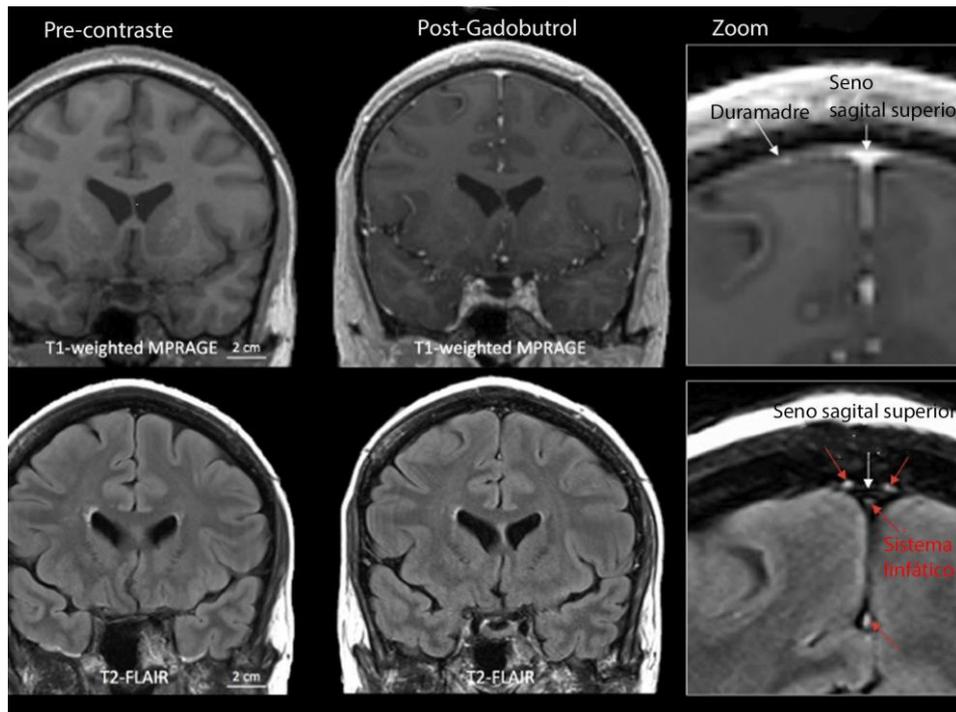


Figura 31: RM de de cerebro humano que muestra el sistema linfático adyacente al sistema venoso tras la administración de contraste específico. Modificado de Absinta *et al*

Sin embargo, no existe ningún estudio que mida elementos en ese exudado y menos aún que compare su contenido entre dos entidades nosológicas con la intención de encontrar elementos que permitan su diagnóstico diferencial. Por ello, la principal singularidad de nuestro estudio es la sistemática evaluación del exudado nasal en los pacientes con ictus agudo de subtipo isquémico y hemorrágico, con el uso de un método validado y en evaluación para ser patentado, que nos ha permitido encontrar concentraciones diferentes y estadísticamente significativas de Fe, Cu y Zn entre ambos tipos, siendo el primer grupo en usar este fluido biológico en busca de biomarcadores para patologías del SNC.

Además de demostrar que los referidos metales, son, en exudado nasal, un marcador de diagnóstico diferencial agudo, en cuanto a las variables pronósticas y en consonancia con los otros estudios publicados, el estudio realiza una evaluación de la relación de los niveles de Fe, Cu y Zn en exudado con el volumen final del infarto y la presencia o no de determinadas características radiológicas para ambos subtipos de ictus agudo, como el vertido a ventrículos de la hemorragia cerebral o la escala ASPECTS en el caso de los ictus isquémicos.

En cuanto al análisis coste-efectividad, la realización de la medición de Fe, Cu y Zn en exudado basal es un método más barato que el *gold standard* mediante la TC cerebral, si bien es cierto que como se ha desarrollado en apartados anteriores, no lo suficientemente perfecto en el momento actual, y por su idiosincrasia y tiempo de realización no es aplicable en un contexto real de abordaje diagnóstico del ictus. A pesar de que su precio divide por dos el de la TC craneal, sigue siendo un método caro y probablemente no accesible en países en vías de desarrollo. Nuestro grupo se encuentra en el momento actual desarrollando un método de análisis electroquímico para la detección de metales en la muestra de exudado nasal que abarataría el coste de la prueba haciéndola accesible.

Esta tesis, no obstante, presenta las siguientes limitaciones a destacar. Una de ellas es el diseño temporal, dado que los pacientes fueron incluidos hasta 48 horas tras el ictus y la medición del nivel de metales se realizó en ese momento. La alternativa de recoger las muestras en el momento inicial del ictus, realizando posteriormente un seguimiento del paciente, hubiera sido más compleja, al tener que involucrar a los médicos de urgencias. Implicaría la necesidad de un mayor tamaño muestral para conseguir la suficiente potencia estadística y chocaría con las dificultades inherentes al empleo de la ICP MS en un contexto más complicado. En base a esos aspectos se está diseñando un soporte electroquímico que realice mediciones de los componentes probados como útiles en vistas a mejorar dicha limitación.

Por otro lado, con el objetivo de estudiar una muestra homogénea (pacientes ingresados en una Unidad de ictus y por ende de gravedad intermedia), los resultados de nuestro estudio pueden no ser extrapolables a ictus hemorrágicos de mayor gravedad que precisan ingreso en una Unidad de Cuidados intensivos, ni a todos los pacientes con hemorragia cerebral (hemorragia subaracnoidea o de origen traumático). Y finalmente, por la dificultad de encontrar una muestra de sujetos sanos o *mimics* el presente estudio no los incluye.

Pero a pesar de sus limitaciones el presente estudio cuenta con un diseño robusto y único en la literatura hasta ahora publicada.

Debido a dificultades técnicas no se han podido evaluar por el momento sustancias proteicas en el mismo fluido biológico, aunque nuestro grupo tiene en marcha el análisis de GFAP en exudado nasal con el fin de añadir especificidad y sensibilidad al método ya probado en metales.

II. UTILIDAD DE LA MEDICIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DE FE, ZN Y CU EN EXUDADO NASAL PARA EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE ICTUS ISQUÉMICO Y HEMORRÁGICO

Como se ha mencionado en el apartado resultados, el nivel medio de concentración de hierro en exudado en el grupo ISQ fue de 0,078 nM x mg exudado, en el caso del Zn de 0,155 nM x mg exudado y en el caso del Cu de 0,022nM x mg exudado. Para el grupo HIC los valores fueron 0,479 nM x mg exudado, 0,377nM x mg exudado y 0,074 nM x mg exudado respectivamente. Los resultados muestran que a mayor nivel de metales presentes en exudado nasal hay mayor probabilidad de que el paciente esté presentando un ictus de tipo hemorrágico (figura 32).

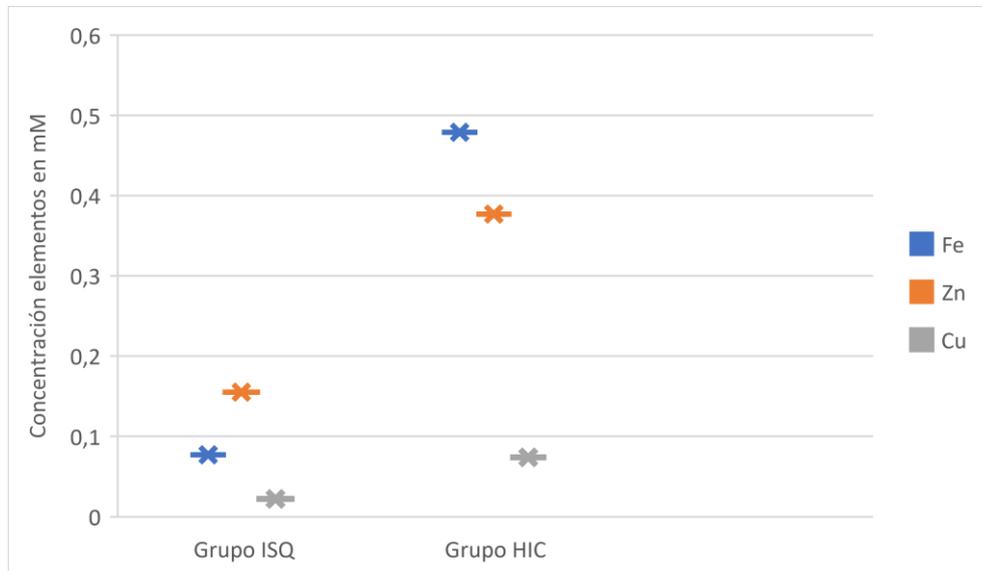


Figura 32: Concentración en nM x mg exudado para cada metal en el grupo ISQ y HIC

Para todos ellos se realizó un análisis de la curva ROC obteniendo valores en todos los casos > de 0,7, lo que los confirma como buenos métodos diagnósticos para el objetivo marcado.

En el análisis de regresión lineal múltiple ajustado por edad, sexo, NIHSS al ingreso y niveles de Fe en sangre, los niveles de Fe, Zn y Cu en exudado se asociaron de forma independiente y directa con el subtipo de ictus hemorrágico (tabla 33 del apartado resultados).

Estos datos no solo refuerzan aquellos estudios que apuntaban a los metales como posibles biomarcadores para ictus isquémico o hemorrágico¹²³⁻¹³⁶, si no que comparan ambos grupos de ictus entre sí, y abren la puerta a

explorar dichos marcadores en un nuevo fluido biológico, el exudado nasal, recientemente propuesto como vía de drenaje de desechos del sistema nervioso²⁰⁷.

III. RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE FE, ZN Y CU MEDIDAS EN EL EXUDADO NASAL Y LAS CARACTERÍSTICAS RADIOLÓGICAS DEL ICTUS HEMORRÁGICO

En cuanto al volumen de la hemorragia no se encuentra asociación entre el mismo y la concentración de diferentes metales ($p=0,539$, figuras 23-25 del apartado resultados). Sin embargo, sí que parece existir una tendencia a obtener niveles mayores de Fe si el volumen del infarto o hemorragia es mayor a 30 ml ($p = 0,125$).

Esta tendencia viene a reforzar los datos presentados en estudios clínicos¹³⁶ previos, en los que los niveles de Fe y ferritina medidos en suero de pacientes con hemorragia cerebral parecían relacionarse con el volumen de la misma.

El vertido a los ventrículos tuvo lugar en el 20% de los pacientes y se relacionó con niveles mayores de Fe presentes en exudados nasal ($p=0,049$).

Estudios experimentales previos sugieren que el intercambio de sustancias de desecho en el SNC tiene lugar entre el líquido intersticial y el LCR¹³⁹⁻¹⁵² y desde 2015 se introduce al sistema linfático cerebral en el mecanismo¹⁵³⁻¹⁵⁵. Esto explicaría que los niveles de metales fueran mayores en relación con el vertido ventricular de la hemorragia. Por otro lado, en estudios clínicos realizados por el grupo de Pérez de la Ossa¹³⁶, los niveles de Fe en suero también se relacionaban de forma directa con el vertido ventricular de la HIC.

Por su parte, en este estudio, la presencia de microsangrados en la RM del grupo HIC se dio en el 50% de los casos sin relacionarse con los niveles de metales.

Estudios recientes relacionan el pronóstico radiológico y clínico de los pacientes con hemorragia cerebral con la presencia de signos como el *spot sign*, *swirl sign* u otros²⁰⁸, por lo que sería interesante valorar su asociación con los niveles de metales en el exudado en busca de un modelo pronóstico mixto. Sin embargo, no existen suficientes pacientes en nuestro estudio con

dichos signos radiológicos registrados, lo que constituye una limitación para dicho análisis en esta muestra.

Los resultados de esta tesis parecen confirmar los de los estudios realizados previamente a nivel clínico y experimental, que asociaban un incremento de los niveles de Fe o las proteínas relacionadas con su metabolismo, medidas en suero, con un mayor volumen de infarto hemorrágico y mayor tasa de vertido ventricular, siendo medidas estas concentraciones en nuestro caso a nivel de exudado nasal.

IV. RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE FE, ZN Y CU MEDIDAS EN EXUDADO NASAL Y LAS CARACTERÍSTICAS RADIOLÓGICAS DEL ICTUS ISQUÉMICO

En el estudio un 74% de los pacientes con ictus isquémico presentaban un ASPECTS mayor de 7. No se obtuvo relación entre dicha puntuación y la concentración de los metales analizados. Tampoco se encontró relación de dichos metales en el exudado nasal con el volumen de infarto isquémico.

Estos datos pueden interpretarse en sintonía con los obtenidos en los estudios experimentales que no encuentran relación entre los niveles de ferritina o Fe y el volumen final de infarto en los ratones estudiados¹³⁵.

V. RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE FE, ZN Y CU MEDIDAS EN EXUDADO NASAL Y EL ESTADO BASAL Y LA GRAVEDAD INICIAL DEL ICTUS AGUDO

El estado funcional basal de los pacientes previo al ictus fue valorado mediante la escala modificada de Rankin. Tanto para el grupo ISQ como para el grupo HIC la mediana de mRS basal fue de 0 y no se encontró relación estadísticamente significativa entre las concentraciones de metales y a la situación funcional previa del paciente.

La gravedad inicial del ictus en los pacientes que se incluyeron en el estudio, fue medida mediante la escala NIHSS, siendo la mediana en el grupo ISQ de 6 y 8 en el grupo HIC. A pesar de que las concentraciones de Fe, Zn o Cu fueron mayores en aquellos pacientes con NIHSS mayor (tabla 27 del apartado resultados), solo el Fe mostró tendencia a la significación estadística.

Estudios clínicos realizados en suero de pacientes con ictus agudo²⁰⁹, ya adelantaban que tanto el Fe como el Cu y las proteínas relacionadas con su metabolismo se relacionaban con la gravedad inicial del ictus agudo. Nuestro estudio, realizado en exudado, muestra una tendencia similar.

Podemos sugerir, por tanto, que los resultados de nuestro estudio van en la línea de aquellas investigaciones previas que apuntaban al aumento de concentración de Fe en sangre como marcador de gravedad inicial del ictus agudo, de nuevo siendo nuestros datos medidos en exudado nasal.

VI. RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE FE, ZN Y CU MEDIDAS EN EXUDADO NASAL Y EL PRONÓSTICO FUNCIONAL FINAL DEL ICTUS AGUDO

Se observó un buen pronóstico funcional a los 3 meses ($mRS \leq 2$) en el 62% del grupo ISQ y en un 55% del grupo HIC. Las diferencias entre grupos pueden explicarse por la naturaleza del ictus agudo subyacente, así como por la existencia de un tratamiento eficaz para el grupo ISQ. Para el análisis del grupo ISQ no se realizó un análisis diferencial entre aquellos pacientes sometidos a terapias de reperfusión y aquellos que no recibieron tratamiento.

Además, en los pacientes que lograron una mejor recuperación funcional en ambos grupos, la edad era menor y la gravedad inicial del ictus inferior.

Al relacionar el pronóstico funcional a 3 meses con las concentraciones de Fe, Zn y Cu en exudado nasal, se encontró que a mayor concentración de Fe, Zn o Cu habría mayores probabilidades de mal pronóstico funcional, sin ser dicha relación estadísticamente significativa para ninguno de los metales.

Los niveles elevados de Fe y otros metales medidos en el suero se habían relacionado en estudios anteriores con un peor pronóstico funcional a 3 meses²¹⁰. Nuestro estudio, si bien no tiene la potencia estadística para reforzar los previos, muestra la misma tendencia en el comportamiento de las concentraciones de metales que la observada en suero.

VII. RELACIÓN ENTRE LAS CONCENTRACIONES DE FE, ZN Y CU MEDIDAS EN SALIVA Y EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE ICTUS ISQUÉMICO Y HEMORRÁGICO

Debido a la utilidad de la saliva como biomarcador en otras patologías, y a la inervación directa mediante los pares craneales bajos, que como se explica de forma extensa en la introducción, a través de sus vainas vehiculan

parte del drenaje linfático cerebral, decidimos además de analizar los metales en exudado nasal hacerlo también en este fluido igual de accesible a la cabecera del paciente.

A pesar de los numerosos estudios para biomarcadores en saliva en otras ramas de la Medicina, el estudio de sustancias en este fluido es todavía novedoso en las investigaciones en el sistema nervioso central²¹¹⁻²¹².

En el campo del ictus agudo se ha estudiado la enolasa salivar neuronal, que ha demostrado ser más alta en aquellos pacientes con ictus isquémico que en controles sanos²¹³ en un estudio aislado. Pero no se ha estudiado ningún otro marcador ni reproducido esos datos más adelante.

Nuestro estudio es, por tanto, el primero que valora la saliva como posible portador de marcadores de daño cerebral provenientes del SNC, hipotetizando que estos pueden aparecer en la saliva a través del drenaje linfático por los pares craneales.

Los niveles del Fe, Zn y Cu en saliva para el grupo ISQ y el grupo HIC se muestran en la tabla 34 del apartado de resultados.

Los datos reflejan una ausencia de relación entre las concentraciones de los biomarcadores valorados en el presente estudio y la probabilidad de presentar un ictus hemorrágico, siendo además el área bajo la curva de COR para cada uno de los metales compatible con un test de baja fiabilidad diagnóstica (ver figura 27 de resultados).

VIII. IMPLICACIONES DE LOS RESULTADOS PRESENTADOS Y DIRECCIONES FUTURAS

En este estudio prospectivo en pacientes con ictus agudo (<48 h) que presentaban un ictus isquémico en el caso del grupo ISQ o hemorrágico (hemorragia intraparenquimatosa) en el caso del grupo HIC, se ha observado que niveles elevados de Fe, Cu y Zn en exudado nasal son buenos predictores del carácter hemorrágico de la lesión cerebral.

Asimismo, los niveles elevados de Fe tienden a ser más elevados a mayor volumen de hemorragia cerebral y en presencia de vertido a los ventrículos en el grupo HIC.

En ambos grupos los niveles elevados de Fe se relacionan con una mayor gravedad inicial del ictus y la elevación de Fe, Cu y Zn con un peor pronóstico funcional.

Lo que es más alentador es que los tres metales medidos en exudado nasal tienen capacidad diagnóstica para diferenciar con una alta sensibilidad y especificidad entre el grupo ISQ y el grupo HIC. Este hecho, además de añadir tres posibles biomarcadores para el diagnóstico diferencial, abre las puertas para el estudio del exudado nasal como vehículo de marcadores de daño cerebral.

El ictus es una de las principales causas de mortalidad y dependencia funcional en el adulto a nivel mundial. A pesar de que existen tratamientos eficaces en la fase aguda del ictus, la estrecha ventana de tiempo para su administración hace que sólo se puedan beneficiar un bajo porcentaje de pacientes. Además, una vez establecido el infarto cerebral no existe una terapia que promueva claramente la recuperación del tejido neuronal dañado. Por este motivo, adquiere gran importancia la búsqueda de vías a través de las cuales podamos obtener un método de diagnóstico potente y seguro.

Los datos de este estudio refuerzan los resultados de las investigaciones previas, que apuntan al exudado nasal como vehículo de drenaje de desechos cerebrales, añadiendo mayor consistencia al ser un estudio específicamente diseñado para evaluar dichos marcadores, incluyendo además una muestra homogénea de pacientes con ictus agudo en los dos subgrupos, y al utilizar un método preciso para registrar los niveles de los marcadores que está en proceso de evaluación con vistas a obtener una patente.

Dichos hallazgos hacen posible el estudio de otros marcadores, que sumen especificidad a los estudiados para el diagnóstico diferencial entre isquemia y hemorragia por esta vía, como los proteícos. Nuestro grupo se encuentra diseñando el estudio de la GFAP en exudado nasal en el momento actual.

Por tanto, con la demostración clínica de la existencia de un drenaje de desechos vía sistema linfático cerebral al exudado nasal, se abre el camino para el estudio de marcadores no solo en la enfermedad cerebrovascular, sino en otras patologías del SNC, salvando de este modo el obstáculo que suponía la BHE.

Con los hallazgos descritos, se podría postular que el hierro medido en exudado nasal es un marcador sensible y específico para la realización del diagnóstico diferencial entre isquemia y hemorragia, y que así mismo se relaciona de forma estadísticamente menos potente con un mayor volumen de hemorragia cerebral, la presencia de vertido a ventrículos y un peor

pronóstico funcional a tres meses. Además, es el primer marcador medido exudado nasal como muestra de degradación de la hemoglobina de pacientes con hemorragia cerebral, posicionándose como una alternativa potencial y segura a las pruebas diagnósticas convencionales y abriendo la vía de estudio en este fluido de otros biomarcadores de daño cerebral en la enfermedad cerebrovascular y otras enfermedades del SNC.

CONCLUSIONES

- I. Las concentraciones de hierro medidas en el exudado nasal de pacientes con ictus agudo permiten diferenciar de modo fiable la naturaleza isquémica o hemorrágica del mismo.
- II. Las concentraciones de Cobre y Zinc en el exudado nasal de pacientes con ictus agudo permiten diferenciar la naturaleza isquémica o hemorrágica del mismo, si bien su fiabilidad es menor que la que demuestra la medición de las concentraciones de hierro.
- III. Los pacientes con concentraciones más elevadas de hierro en el exudado nasal presentan mayor gravedad clínica inicial, mayor volumen de sangrado, mayor frecuencia de vertido intraventricular y peor pronóstico funcional a los tres meses.
- IV. El exudado nasal se configura así como un vehículo adecuado para la medición de biomarcadores de enfermedades del sistema nervioso central.

ANEXO I

ESCALA NIHSS (National institute of Health Stroke Scale)

Preguntas/órdenes	Respuesta	Puntuación
1a. Nivel de Conciencia	Alerta	0
	Somnolencia	1
	Obnubilación	2
	Coma	3
1b. Nivel de Conciencia <i>Preguntas verbales:</i> <i>¿En qué mes vivimos? ¿Qué edad tiene?</i>	Ambas respuestas correctas	0
	Una respuesta correcta	1
	Ninguna respuesta correcta	2
1c. Nivel de Conciencia <i>Órdenes verbales:</i> <i>Cierre los ojos, después ábralos</i> <i>Cierre la mano, después ábrala</i>	Ambas respuestas correctas	0
	Una respuesta correcta	1
	Ninguna respuesta correcta	2
2. Mirada Conjugada (voluntarios o reflejos oculocefálicos) <i>Si lesión de un nervio periférico: 1 punto</i>	Normal	0
	Paresia parcial de la mirada	1
	Paresia total o desviación forzada	2
3. Campos visuales (confrontación) <i>Si ceguera bilateral de cualquier causa: 3 puntos Si extinción visual: 1 punto</i>	Normal	0
	Hemianopsia parcial	1
	Hemianopsia completa	2
	Ceguera bilateral	3
4. Paresia facial	Normal	0
	Paresia leve (asimetría al sonreír)	1
	Paresia total de la musculatura facial inferior	2
	Paresia total de la musculatura facial superior e inferior	3
5. Paresia de las extremidades superiores (ES) <i>Levantar las ES a 45° si en decúbito o a 90° si sentado. Se puntúa cada lado por separado</i> <i>El 9 no contabiliza en el cómputo total</i>	Mantiene la posición 10''	0
	Claudica en menos de 10'' sin llegar a tocar la cama	1
	Claudica y toca la cama en menos de 10'' Hay movimiento pero no vence la gravedad	2
	Parálisis completa	3

	Extremidad amputada o inmovilizada	4
6. Paresia de extremidades inferiores (EI) <i>Debe levantar la pierna extendida y mantener a 30°. Se puntúa cada lado por separado. El 9 no contabiliza en el cómputo total.</i>	Mantiene la posición 5"	0
	Claudica en menos de 5" sin llegar a tocar la cama	1
	Claudica y toca la cama en menos de 5"	2
	Hay movimiento pero no vence la gravedad	3
	Parálisis completa	4
	Extremidad amputada o inmovilizada	9
7. Ataxia de las extremidades <i>Dedo-nariz y talón-rodilla. Si déficit motor impide medir la disimetría: 0 puntos</i>	Normal	0
	Ataxia de una de las extremidades	1
	Ataxia de las dos extremidades	2
8. Sensibilidad <i>Si obnubilado evaluar la retirada a estímulo doloroso. Si déficit bilateral o coma: 2 puntos</i>	Normal	0
	Leve o moderada hipoestesia	1
	Anestesia	2
9. Lenguaje <i>Si coma: 3 puntos. Si Intubación o anartria: explorar escritura</i>	Normal	0
	Afasia leve o moderada	1
	Afasia grave, no posible entenderse	2
	Afasia global o en coma	3
10. Disartria <i>Si afasia: 3 puntos</i>	Normal	0
	Leve, se le puede entender	1
	Grave, ininteligible o anartria	2
	Intubado (no puntúa)	9
11. Extinción-Negligencia <i>Inatención. Si coma: 2 puntos</i>	Normal	0
	Inatención/extinción en una modalidad	1
	Inatención/extinción en más de una modalidad	2

ANEXO II

ESCALA mRS (modified Rankin Scale)

ESCALA RANKIN MODIFICADA (mRS)	
0	Asintomático
1	Discapacidad no significativa pese a la existencia de síntomas. Capaz de realizar su trabajo y actividades habituales sin limitaciones
2	Discapacidad leve: incapaz de realizar todas sus actividades previas, pero puede valerse por sí mismo sin necesidad de ayuda
3	Discapacidad moderada: requiere alguna ayuda pero es capaz de caminar sin ayuda de otra persona
4	Discapacidad moderadamente grave: Incapaz de caminar sin ayuda y dependiente para actividades básicas de la vida diaria. No precisa de supervisión continua
5	Discapacidad grave: Totalmente dependiente, en cama e incontinente. Requiere asistencia continuada
6	Muerte

ANEXO III

CLASIFICACIÓN OCSP (Oxfordshire classification Stroke project)

CLASIFICACIÓN OXFORDSHIRE (OCSP)	
TAC I	Cuando el déficit neurológico cumple los tres criterios siguientes: (1) Disfunción cerebral superior (v.g. afasia, discalculia o alteraciones visuoespaciales); (2) Déficit motor y/o sensitivo en al menos dos de las tres áreas siguientes: cara, brazo, pierna; (3) Déficit homónimos de campo visual. Si el paciente muestra una disminución del nivel de consciencia debe asumirse que están afectadas las funciones cerebrales corticales y el campo visual. Este tipo de infarto constituye alrededor del 15% de los infartos cerebrales, y la embolia es dos veces más frecuente que la trombosis como mecanismo etiopatogénico
PAC I	Cuando se cumple alguno de los criterios siguientes: (1) Disfunción cerebral superior (v.g. afasia, discalculia o alteraciones visuoespaciales); ó (2) Cuando se cumplen dos de los tres criterios de TACI; ó (3) Déficit motor y/o sensitivo más restringido que el clasificado como LACI (v.g. déficit limitado a una sola extremidad). Es el tipo de infarto cerebral más frecuente (aproximadamente el 35%), y la embolia y la trombosis son responsables en similar proporción. El pronóstico inmediato es bueno, pero las posibilidades de recidiva son elevadas, principalmente en los primeros meses.
LAC I	Cuando no existe disfunción cerebral superior ni hemianopsia y se cumple uno de los siguientes criterios: (1) Hemisíndrome motor puro que afecte al menos dos de cara, brazo y pierna; (2) Hemisíndrome sensitivo puro que afecte al menos dos de cara, brazo y pierna; (3) Hemisíndrome sensitivomotor puro que afecte al menos dos de cara, brazo y pierna; (4) Hemiparesia y hemiataxia ipsilaterales; (5) Disartria y mano torpe. Constituye el 25% de los infartos cerebrales y su mecanismo habitual es la trombosis de arterias penetrantes afectadas de lipohialinosis. Tiene muy buen pronóstico y una tasa de recidiva baja.
POC I	Cuando se cumple alguno de los criterios siguientes: (1) Afectación ipsilateral de pares craneales con déficit motor y/o sensitivo contralateral; (2) Déficit motor y/o sensitivo bilateral; (3) Trastornos de los movimientos conjugados oculares; (4) Disfunción cerebelosa sin déficit de vías largas ipsilaterales; (5) Hemianopsia homónima aislada. Son el 25% de los infartos cerebrales. Su pronóstico inmediato es bueno pero la tasa de recidiva alta. El mecanismo patogénico generalmente implicado es la trombosis cerebral.

ANEXO IV

CLASIFICACION TOAST (Trial Org-10172 Acute Stroke Treatment)

CLASIFICACIÓN TOAST (Trial Org-10172 Acute Stroke Treatment)	
ATEROTROMBÓTICO	<p>Infarto generalmente de tamaño medio o grande, de topografía cortical o subcortical y localización carotídea o vertebrobasilar, en el que se cumple alguno de los dos criterios siguientes:</p> <p>A. Aterosclerosis con estenosis: estenosis mayor o igual al 50% del diámetro luminal u oclusión de la arteria extracraneal correspondiente o de la arteria intracraneal de gran calibre (cerebral media, cerebral posterior o tronco basilar), en ausencia de otra etiología.</p> <p>B. Aterosclerosis sin estenosis: presencia de placas o de estenosis inferior al 50% en la arteria cerebral media, cerebral posterior o basilar, en ausencia de otra etiología y en presencia de al menos dos de los siguientes factores de riesgo vascular cerebral: edad mayor de 50 años, hipertensión arterial, diabetes mellitus, tabaquismo o hipercolesterolemia.</p>
CARDIOEMBÓLICO	<p>Infarto generalmente de tamaño medio o grande, de topografía habitualmente cortical, en el que se evidencia, en ausencia de otra etiología, alguna de las siguientes cardiopatías embolígenas: presencia de un trombo o un tumor intracardíaco, estenosis mitral reumática, prótesis aórtica o mitral, endocarditis, fibrilación auricular, enfermedad del nodo sinusal, aneurisma ventricular izquierdo o acinesia después de un infarto agudo de miocardio, infarto agudo de miocardio(menos de 3 meses), o presencia de hipocinesia cardíaca global o discinesia.</p>
LACUNAR	<p>Infarto de pequeño tamaño (menor de 1.5 cm de diámetro) en el territorio de una arteria perforante cerebral, que habitualmente ocasiona clínicamente un síndrome lacunar (hemiparesia motora pura, síndrome sensitivo puro, síndrome sensitivo-motriz, hemiparesia-ataxia y disartria-mano torpe) en un paciente con antecedente personal de hipertensión arterial u otros factores de riesgo cerebrovascular, en ausencia de otra etiología.</p>
INHABITUAL	<p>Infarto de tamaño pequeño, mediano o grande, de localización cortical o subcortical, en territorio carotídeo o vertebrobasilar en un paciente en el que se</p>

	<p>ha descartado el origen aterotrombótico, cardioembólico o lacunar. Se suele producir por enfermedades sistémicas (conectivopatía, infección, neoplasia, síndrome mieloproliferativo, alteraciones metabólicas, de la coagulación...) o por otras enfermedades como: disección arterial, displasia fibromuscular, aneurisma sacular, malformación arteriovenosa, trombosis venosa cerebral, angeítis, migraña, etc.</p>
INDETERMINADO	<p>Infarto de tamaño medio o grande, de localización cortical o subcortical, en territorio carotídeo o vertebrobasilar, en el que tras un exhaustivo estudio diagnóstico, han sido descartados los subtipos aterotrombótico, cardioembólico, lacunar y de causa inhabitual, o bien coexistía más de una posible etiología. Dentro de esta etiología indeterminada se podría plantear unas subdivisiones que aclararían mejor este apartado; estudio incompleto, más de una etiología y desconocida.</p>

ANEXO V

ADMISIÓN A TRÁMITE DE LA PATENTE 201900087



MINISTERIO
DE INDUSTRIA, COMERCIO
Y TURISMO



Oficina Española
de Patentes y Marcas

UNIVERSIDAD DE OVIEDO
San Francisco 3
33003 Oviedo
Asturias

Madrid, a 20 de junio de 2019

Admisión a trámite de la solicitud de Patente Nacional 201900087

La Oficina Española de Patentes y Marcas (OEPM) le comunica que su solicitud de patente 201900087 ha sido admitida a trámite con asignación de fecha de presentación correspondiente al día 21/05/2019 y que no se encuentra afectada por lo previsto en el Título XI relativo a patentes de interés para la defensa nacional.

De acuerdo con el artículo 67.2 de la Ley 24/2015 de Patentes, a partir de la fecha antes mencionada usted podría gozar de una protección provisional frente a cualquier tercero que hubiera llevado a cabo una utilización de la invención siempre y cuando notifique a dicho tercero la presentación y el contenido de esta solicitud. Esta protección implicaría el derecho a exigir una indemnización razonable si dicho tercero prosiguiera utilizando su invención entre la fecha de la notificación y la fecha de publicación de la mención en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial (BOPI) de que la patente ha sido concedida. El citado derecho existiría a partir de la fecha de notificación fehaciente y se podría ejercer una vez se publicara la mención de la concesión en el BOPI. El BOPI puede consultarse en la web de la OEPM (www.oepm.es).

La OEPM le remitirá cumplida información de las diferentes etapas del procedimiento de concesión con indicación de los actos a llevar a cabo, los plazos para cumplimentarlos y las fechas a partir de las cuales dichos plazos comienzan a contar.

Finalmente, la OEPM le informa que si está interesado en solicitar su patente en otros países, existe el programa PPH (Patent Prosecution Highway), que le permitirá pedir la tramitación acelerada en otras Oficinas de Patentes que participen en dicho programa. Para más información puede consultar el apartado Propiedad Industrial/ Internacionalización/ Patentes y Modelos de Utilidad en la web de la OEPM, o acceder a través del enlace:
<http://www.oepm.es/cs/OEPMSite/contenidos/PPH/PPH.htm>.

Para cualquier consulta en relación con su expediente, puede ponerse en contacto con la OEPM llamando al teléfono de información 902 157 530 (en horario de 9:00 a 14:30, de lunes a viernes).

Nota informativa: Si el solicitante no reside en estado miembro de la Unión Europea y no ha designado un Agente de la Propiedad Industrial (art. 175 Ley de Patentes), o reside en estado miembro de la Unión Europea pero, a efectos de notificaciones, no ha designado domicilio en España ni dirección de correo electrónico (art. 2.1.c Reglamento Ley de Patentes), deberá designar dicho domicilio o dirección de correo electrónico.

OEPM, Paseo de la Castellana, 75 – 28071 Madrid (España) – Tel: (+34) 902 157 530 – Fax: (+34) 91 349 5597
1001P (04.17)

1 de 2



Atentamente,

Leopoldo Belda Soriano
Jefe/a de Área de Examen de Patentes

ANEXO VI

CAPÍTULO DE LIBRO “MEDICIÓN DE OLIGOELEMENTOS EN EXUDADO NASAL EN LOS PACIENTES CON ICTUS Y SU USO COMO BIOMARCADORES EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIA ENTRE ISQUEMIA Y HEMORRAGIA. ESTUDIO BIOMIC-TUS-HUCA” PUBLICADO POR LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

ISBN:978- 84-17445-07-2

DL:AS-1899-2018

MEDICIÓN DE OLIGOELEMENTOS EN EXUDADO NASAL EN LOS PACIENTES CON ICTUS Y SU USO COMO BIOMARCADORES EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE ISQUEMIA Y HEMORRAGIA. ESTUDIO BIOM-ICTUS HUCA

ÁREA DE CONOCIMIENTO: CIENCIAS DE LA SALUD

García-Cabo, Carmen¹, Llano, Pablo²
Calleja, Sergio³

¹ Hospital Universitario de Cabueñes, España
e-mail: c.garciacabo@gmail.com, España

² Facultad de Químicas Universidad de Oviedo
e-mail: pllano91@gmail.com, España

³ Hospital Universitario Central de Asturias
e-mail: scallejap@gmail.com, España

Resumen. Diferentes estudios han estudiado diversos biomarcadores en el diagnóstico diferencial del ictus agudo (IA). Algunos de ellos apuntan a los oligoelementos (OE), dado que son importantes para mantener el balance de ciertos componentes biológicos. El reciente descubrimiento del sistema linfático cerebral (SLC) y de su posible papel en el aclaramiento de determinados solutos sugiere un papel del mismo en determinadas enfermedades neurológicas. En los estudios realizados se han observado trazas de LCR en el exudado nasal sugiriendo que una de las vías de aclaramiento del SLC es el nervio olfatorio a través de la lámina cribosa. Nuestro objetivo es discernir si en muestras de exudado nasal podrían detectarse OE que fueran útiles en el diagnóstico diferencial de IA isquémico y hemorrágico.

Analizamos una muestra de 15 pacientes con diagnóstico de ictus isquémico o hemorrágico que ingresan en la Unidad de Ictus del HUCA en el periodo de Enero a Mayo de 2018. Se registran datos demográficos, clínicos, analíticos y radiológicos. Se recogen asimismo muestras de exudado nasal de todos ellos en una solución ácido nítrico al 10%. Todas las muestras son analizadas en ICP-QQQ Agilent 8800.

Se analizan los datos con el SPSS V22.

El 60% son ictus isquémicos y 40% hemorrágicos. La edad media fue de 69 años. Se midió en la muestra de exudado los niveles de Fe, Zn y Cu siendo estadísticamente más elevados en los IA hemorrágicos que en los IA isquémico ($p < 0.05$) OE como el Fe, Zn o Cu pueden ser medidos en exudado nasal, como productos de degradación aclarados por el SLC, y ser útiles en el diagnóstico diferencial de IA.

Palabras clave: Ictus, Diagnóstico diferencial, sistema gliolinfático.

INTRODUCCIÓN

El estudio de los biomarcadores de distintas patologías neurológicas ha conocido un notable auge durante los últimos años, tanto con un propósito diagnóstico como de valoración pronóstica. Dichos marcadores han sido estudiados en distintos contextos y en diferentes líquidos biológicos, fundamentalmente en la sangre periférica y en el líquido cefalorraquídeo.

En el caso concreto de la enfermedad cerebrovascular aguda, el estudio del líquido cefalorraquídeo no es una buena opción, pues constituye un procedimiento invasivo que consume bastante tiempo, en el contexto de enfermedades que potencialmente deben recibir tratamientos que incrementan el riesgo de sangrado y en las que el tiempo es un factor determinante para su pronóstico. De ahí que, operativamente, el estudio de la sangre periférica haya sido el único modo de acceder a biomarcadores, con resultados desiguales. Existe abundante literatura científica sobre biomarcadores que permiten predecir la evolución del ictus isquémico, determinar el subtipo etiológico del mismo o anticipar la posibilidad de complicaciones. En los ictus hemorrágicos, sin embargo, las investigaciones son mucho más escasas y hay muy pocas que hayan abordado la posibilidad de diferenciar la isquemia de la hemorragia. Conseguir esta diferenciación en el ámbito prehospitalario, anticipando al máximo en el tiempo la distinción entre ambas, es uno de las más preciadas metas de la investigación en ictus. Hasta el momento, tan sólo la neuroimagen es capaz de establecer indudablemente la diferencia, por lo que, en algunas ciudades, se han puesto en funcionamiento unidades móviles de tomografía computerizada (TAC) que realizan el estudio sobre el terreno. Esto permite tomar decisiones terapéuticas y logísticas, dirigiendo al paciente a un hospital que tenga las mejores opciones de tratamiento para su patología concreta.

Uno de los mayores obstáculos para acceder al estudio de biomarcadores del sistema nervioso central es la barrera hematoencefálica, una barrera de permeabilidad altamente selectiva, que separa la sangre del fluido extracelular cerebral en el sistema nervioso central. Sin embargo, el reciente descubrimiento de un sistema de drenaje linfático cerebral abre nuevas oportunidades para la evaluación de biomarcadores en fluidos distintos. Se han descrito vasos linfáticos que drenan desde el sistema nervioso central hacia la mucosa nasal y hacia los ganglios linfáticos cervicales, por lo que no sería descabellado pensar en la secreción nasal como localización de biomarcadores drenados por vía linfática desde el sistema nervioso central, y de fácil acceso para su estudio.

El hierro y otros oligoelementos así como los productos de degradación de la hemoglobina y otras proteínas han sido estudiados como condicionantes pronósticos en pacientes con ictus isquémico, como predictores del riesgo de transformación hemorrágica y como condicionantes de daño cerebral en pacientes con hemorragia intracerebral. Sin embargo, la posibilidad de estudiar el drenaje linfático cerebral abre nuevas expectativas: la determinación del hierro o los productos de degradación de la hemoglobina en el drenaje linfático cerebral, a través del análisis de la secreción nasal, podría convertirse en un marcador muy específico de la naturaleza hemorrágica de un evento vascular cerebral agudo, permitiendo diferenciarlo netamente de los de naturaleza isquémica.

OBJETIVOS

Determinar si la secreción nasal por el paciente con ictus agudo pueden ser portadores de biomarcadores, vehiculados a través del drenaje linfático cerebral, que nos permitan diferenciar el ictus isquémico del hemorrágico. Identificar dichos biomarcadores y diseñar un sistema que nos permita una determinación rápida de los mismos, anticipando al máximo en el tiempo el diagnóstico diferencial, aportando así utilidad diagnóstica y orientación logística al manejo del paciente con ictus hiperagudo.

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

Diseño y sujetos de estudio

Estudio piloto prospectivo a realizar en el Hospital Universitario Central de Asturias, siendo los sujetos de estudio pacientes consecutivos que accedan a dicho centro a través del Servicio de Urgencias con diagnóstico de ictus agudo. Se estima un número de sujetos de estudio de 50 ictus hemorrágicos y 50 ictus isquémicos, se estudiarán 50 sujetos sanos, pareados con los enfermos en lo relativo a edad y sexo, que servirán como grupo de control. Pacientes y controles sanos serán informados del contenido del estudio por personal médico participante en el proyecto y darán consentimiento informado por escrito.

Variables del estudio

Se recogen las siguientes variables:

- Variables demográficas, incluyendo edad y sexo.
- Factores de riesgo vascular, incluyendo la existencia de hipertensión, diabetes mellitus, dislipemia, cardiopatías embolígenas o hábitos tóxicos.
- Antecedentes de patología cerebrovascular, bien sea isquémica o hemorrágica.
- Antecedentes de patología del sistema nervioso central de naturaleza no vascular.
- Antecedentes de patología sistémica o neurológica que conlleva aumento de los depósitos corporales de hierro, tal como hemocromatosis, enfermedades que cursan con hemólisis, antecedentes de transfusiones múltiples, hemodiálisis prolongada, cirrosis, porfiria cutánea tarda, shunt portocava o neuroferritinopatías.
- Antecedentes de procesos hemorrágicos sistémicos.
- Tipo y localización del ictus.

- Volumen de la lesión cerebral.
- En el caso de las lesiones hemorrágicas se tendrá en cuenta su eventual apertura al espacio subaracnoideo o intraventricular.
- En el caso de las lesiones hemorrágicas se tendrá asimismo en cuenta si la clínica del paciente ha sido estática desde el principio, o si por el contrario se trata de una hemorragia con clínica progresiva o recurrente.
- Estado clínico del paciente en el momento de la recogida de la muestra expresado mediante su puntuación en la escala NIHSS.
- Tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas hasta la determinación.
- Complicaciones neurológicas intrahospitalarias sufridas por los pacientes: crisis epilépticas, edema cerebral maligno o hidrocefalia obstructiva.
- Complicaciones no neurológicas intrahospitalarias sufridas por los pacientes: infecciones respiratorias, infecciones urinarias, fallo cardiaco o trombosis venosa profunda.
- Estado neurológico al alta medido mediante las escalas NIHSS y m-Rankin.

Se construyó un cuaderno de recogida de datos para el posterior análisis de los mismos mediante el paquete de software SPSS v.22.

Recogida de muestras y análisis

La recogida de la muestra se realiza mediante dos técnicas que se aplicarán a todos los sujetos del estudio:

- La recogida del exudado nasal se realiza con una torunda introducida en ambas fosas nasales del paciente. La estimación de la muestra recogida se hace por pesada por diferencia (antes y después de la recogida de la muestra). Los componentes de la muestra obtenida se solubilizan mediante inmersión del extremo de la torunda en 2 ml de ácido nítrico al 10% (calidad específica para espectrometría de masas). Alícuotas de las muestras serán analizadas por espectrometría de masas.

El análisis por ICP-masas se lleva a cabo en el Laboratorio de Química Analítica de la Universidad de Oviedo. Incluye un estudio de barrido para determinación de distintos elementos químicos y un segundo estudio de cuantificación de los más abundantes.

AVANCES Y CONCLUSIONES

En el momento actual existen 33 pacientes reclutados de ellos 19 han padecido ictus isquémico (57,6%) y 14 hemorrágico (42,4%), el 39,4% son mujeres. No se ha comenzado la recogida de sujetos control.

En todos ellos se ha recogido una muestra de exudado nasal y las variables descritas en el diseño del estudio. Se analizado hasta el momento 15 de las muestras, midiendo en ellas los niveles de Fe, Zn, Cu, Cd y Pb.

De las 15 muestras analizadas se han de excluir 3 pacientes (enfermedad hepática, fallo medición).

La edad media es de 69 años. El 30,8% de la muestra son mujeres. El 38,5% sin ictus hemorrágicos. La mediana de NIHSS al ingreso fue de 12.

Los niveles de oligoelementos en exudado siguen una distribución normal según la prueba de Kolmogorov-Smirnov. También se distribuyen de forma normal los valores analíticos analizados.

Se realiza una comparación de medias para los niveles de metales en exudado tomando como significativa una $p < 0.05$.

La media del Fe en exudado en los pacientes con ictus isquémico es de 0,08685 (DE 0,04) y en los que padecen ictus hemorrágico de 0,5007 (DE 0,27) y dicha diferencia es significativa $p = 0.012$ tras realizar una comparación de medias con la T de Student para muestras independientes.

La media del Zn en exudado en los pacientes con ictus isquémico es de 0,0344 (DE 0,13) y en los que padecen ictus hemorrágico de 0,4412 (DE 0,39) y dicha diferencia es significativa $p = 0.001$ tras realizar una comparación de medias con la T de Student para muestras independientes.

La media del Cu en exudado en los pacientes con ictus isquémico es de 0,0993 (DE 0,010) y en los que padecen ictus hemorrágico de 0,0662 (DE 0,07) y dicha diferencia es significativa $p = 0.044$ tras realizar una comparación de medias con la T de Student para muestras independientes.

No se encuentran diferencias estadísticamente significativas en los niveles de Fe en suero entre ambos grupos de pacientes.

El análisis está limitado debido a la escasa N de la muestra y a la inexistencia, en el momento actual de un grupo control sano.

Sin embargo los datos sugieren que el exudado nasal puede ser el medio por el que se eliminan sustancias producto del daño al tejido cerebral en la enfermedad cerebrovascular, y que dichas sustancias puedan servir en el diagnóstico diferencial entre los ictus isquémicos y hemorrágicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aspelund A. (2015) A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J Exp Med*; 212: 991-9

Bechmann I(2007). What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol*; 28: 5-11

Brunswick AS (2012). Serum biomarkers of spontaneous intracerebral hemorrhage induced secondary brain injury. *J Neurol Sci*; 321: 1-10

Choi KH. (2012). The serum ferritin level is an important predictor of hemorrhagic transformation in acute ischaemic stroke. *Eur J Neurol*; 19: 570-7

De Leon, M. (2017). Cerebrospinal fluid clearance in Alzheimer disease measured with dynamic PET. *JNM* 58(7)1471-1476.

García-Yébenes I (2012). Iron overload, measured as serum ferritin, increases brain damage induced by focal ischemia and early reperfusion. *Neurochem Int*; 61: 1364-9

Gonullu H (2013). Levels of serum trace elements in ischaemic stroke patients. *JECM* 30 301-1.

Hayes RL, (2009). Translation of neurological biomarkers to clinically relevant platforms. *Methods Mol Biol*; 566: 303-13

Karadas, S. (2013). Serum levels of trace elements and heavy metals in patients with acute hemorrhagic stroke. *J Membrane Biol* 247:175-180.

Kwan J. (2013)IL-6 is a predictive biomarker for stroke associated infection and future mortality in the elderly after an ischemic stroke. *Exp Gerontol*; 48: 960-5

Louveau A(2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*; 523: 337-41

Mathew TL. (2015)Technologies for Clinical Diagnosis Using Expired Human Breath Analysis. *Diagnostics (Basel)*; 5: 27-60.

Montaner J(2012). Differentiating ischemic from hemorrhagic stroke using plasma biomarkers: the S100B/RAGE pathway. *J Proteomics*; 75: 4758-65

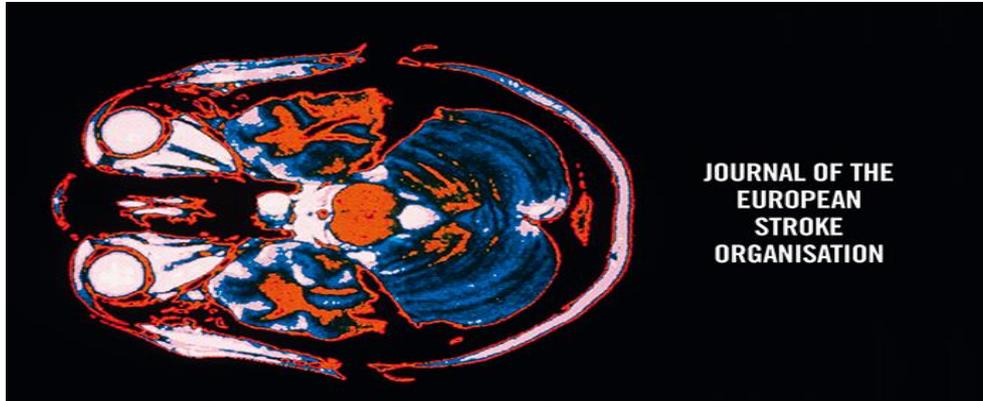
Pérez de la Ossa N (2010). Iron-related brain damage in patients with intracerebral hemorrhage. *Stroke*; 41: 810-3

Santamarina E (2012). Biomarker level improves the diagnosis of embolic source in ischemic stroke of unknown origin. *J Neurol*; 259: 2538-45

Simats A, (2016) Neuroinflammatory biomarkers: From stroke diagnosis and prognosis to therapy. *Biochim Biophys Acta*;1862: 411-24

Whiteley W, (2012). The use of blood biomarkers to predict poor outcome after acute transient ischemic attack or ischemic stroke. *Stroke*; 43: 86-91

ANEXO VII



**EUROPEAN
STROKE
JOURNAL**

<http://journals.sagepub.com/home/eso>



E-Poster Viewing

AS33-009

IRON MEASURED IN NASAL EXUDATE AS A NEW AND USEFUL BIOMARKER IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF PATIENTS WITH ACUTE STROKE

C. García-Cabo Fernández¹, P. Llano², L. Benavente³, J. M. Costa², M. Fernández-Abedul² and S. Calleja³¹Hospital universitario de Cabueñes, Neurology, Gijón, Spain; ²Universidad de Oviedo, Facultad de Química, Oviedo, Spain; ³Hospital Universitario Central de Asturias, Neurology, Oviedo, Spain

Background and Aims: Differential diagnosis between ischemic and hemorrhagic stroke in prehospital setting is one of the major challenges of neurovascular research. Several biomarkers have been studied, but attempts to date have focused on determining their blood levels. Recently, cerebral lymphatic drainage towards the nostrils has been discovered, and this fact gives us the chance of studying nasal exudate looking for biomarkers of neural damage. We sought to determine whether iron levels in nasal exudate could determine the ischemic or hemorrhagic nature of the acute stroke.

Methods: We studied iron nasal exudate levels in 33 ischemic and 43 hemorrhagic stroke patients. All patients underwent neurological examination assessed by National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS), brain computed tomography (CT) to differential diagnosis of stroke subtype, laboratory tests and measure of iron levels in nasal exudate.

Results: The iron levels in nasal exudate were higher in hemorrhagic stroke patients. The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve for ischemic-hemorrhagic stroke discrimination was 0.896 (0.823-0.970), cut point of 0.095 millimolar, sensitivity 90%, specificity 76%.

Conclusions: Our findings suggest that iron levels in nasal exudate may be useful in prehospital setting for differential diagnosis between ischemic and hemorrhagic damage in acute stroke patients. And they also open a potential field for studying biomarkers

Trial registration number: N/A

AS33-041

EVALUATION OF CIRCULATING MIRNAS AS POTENTIAL BIOMARKERS OF VULNERABLE PLAQUE IN PATIENTS WITH CAROTID STENOSIS

C. Gubern¹, S. Bashir¹, L. Pardo¹, M. Reina¹, M. Terceno¹, Y. Silva¹ and J. Serena¹¹IDIBGI, Stroke Unit-Neurology, Girona, Spain

Background and Aims: Carotid stenosis is one of the most prevalent and significant causes of stroke. The identification of vulnerable plaque biomarkers would permit the identification of high and low risk patients, allowing a better selection of patients to indicate surgical or intensive medical treatment. The usefulness of circulating miRNAs as vulnerable plaque biomarkers has not been too explored. Our aim was to analyse plasma levels of selected miRNAs described as differentially expressed in symptomatic or asymptomatic plaques.

Methods: Circulating RNA was extracted from citrated-plasma samples of symptomatic (n = 19), progressive-asymptomatic (n = 16) and stable-asymptomatic (n = 12) patients using the mirVana miRNA Isolation kit and cel-miR-54-3p and cel-miR-39 as spike-in. After reverse transcription and preamplification, miR-16-5p, miR-93-5p, miR-191-5p and miR-24-3p were evaluated as endogenous controls and miR-100-5p, miR-133a-5p, miR-143-3p and miR-494-3p as potential biomarkers using specific TaqManTM Advanced MicroRNA Assays. Statistical differences between

groups were assessed by ANOVA or Kruskal-Wallis test, as appropriate. P < 0.05 was considered significant.

Results: The four analysed miRNAs as endogenous controls except for miR-16-5p were found to have significantly different plasma levels between groups. The analysis of the potential biomarkers (miR-100-5p, miR-133a-5p, miR-143-3p and miR-494-3p) and the miRNAs excluded as endogenous controls (miR-93-5p, miR-191-5p and miR-24-3p) with the miR-16-5p as normaliser showed that none of them have significant different plasma levels between the different profile of patients.

Conclusions: None of the analysed miRNAs seems to be a potential biomarker able to differentiate subtypes of patients with carotid stenosis. Further studies, increasing number of patients, will be conducted to validate these results.

Trial registration number: N/A

AS33-031

EPIGENOMIC AGE IS ASSOCIATED WITH LEUKOARAIOSIS VOLUME IN STROKE PATIENTS, IRRESPECTIVE OF CHRONOLOGICAL AGE

J. Jimenez-Conde¹, E. Giral-Steinhauer¹, C. Soriano-Tarraga¹, M. Mola-Carninal¹, C. Avellaneda¹, U. Lazzcano¹, R. Vivanco-Hidalgo¹, I. Fernandez-Perez¹, A. Ois¹, A. Rodriguez-Campello¹, E. Cuadrado-Godia¹ and J. Roquer¹¹Institut Hospital del Mar d'Investigació Mèdica, Neurology, Barcelona, Spain

Background and Aims: White matter hyperintensity or leukoaraiosis (LK), is a radiological sign of cerebral small vessel disease and is considered as a good marker of brain aging. However, aging is not only due to chronological age, there are age-related DNA-methylation changes in multiple CpG sites across the genome that can be used to estimate the epigenomic age or biological age (b-Age). We seek to analyze if the possible association between LK and b-Age.

Methods: We included 254 individuals with acute ischemic stroke assessed in Hospital del Mar (Barcelona). Demographic and clinical data, chronological age (c-Age), anthropometric data, and vascular risk factors (VRF) were registered. Biological age (b-Age) was estimated with Hannum algorithm, based on DNA methylation in 65 CpGs. Age-Acceleration (AgeDif) was calculated by subtracting c-Age from b-Age. LK variable was obtained in a semiautomatic volumetric measurement in FLAIR sequence of MRI.

Results: Bivariate analyses for LK showed significant associations with c-Age and b-Age (both p < 0.001) and also with AgeDif (cc-0.158, p = 0.012). When included in a multivariate linear regression model all the variables associated in bivariate analyses, AgeDif remained independently associated (beta:0.138; p = 0.038), despite containing c-Age in adjustment. Hypertension (p = 0.009), diabetes (p = 0.016) and smoking habit (p = 0.022) kept significance as well.

Conclusions: Volume of LK is associated with b-Age measured, by DNA methylation in a cohort of stroke patients. It was also associated with Age-Acceleration, irrespective of c-Age. These data supports that healthy aging might modulate LK-burden accumulated throughout life.

Trial registration number: N/A

ANEXO VIII

POSTER JORNADAS DOCTORALES



MEDICIÓN DE OLIGOELEMENTOS EN EXUDADO NASAL EN LOS PACIENTES CON ICTUS Y SU USO COMO BIOMARCADORES EN EL DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE ISQUEMIA Y HEMORRAGIA. ESTUDIO BIOM-ICTUS HUCA

Carmen García-Cabo^{1*}, Pablo Llano², Sergio Calleja Puerta

¹Hospital Universitario de Cabueñes Ojún, HUCA, Oviedo;

²Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo

INTRODUCCIÓN:

Diferentes estudios han valorado diferentes biomarcadores en el diagnóstico diferencial del ictus agudo, algunos de ellos apuntan a los oligoelementos dado que son importantes para mantener el balance de ciertos componentes biológicos. El reciente descubrimiento del sistema linfático cerebral y de su posible papel en el aclaramiento de determinados solutos sugiere un papel del mismo en determinadas enfermedades neurológicas. Además, en los estudios realizados se han observado trazas de LCR en el exudado nasal sugiriendo que una de las vías de aclaramiento del sistema linfático cerebral es el nervio olfatorio a través de la lámina cribosa, lo que abre la puerta a la determinación de biomarcadores cerebrales por esa vía. Nuestro objetivo fue discernir si en muestras de exudado nasal podrían detectarse oligoelementos que fueran útiles en el diagnóstico diferencial entre ictus isquémico y hemorrágico.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Analizamos una muestra de 15 pacientes con diagnóstico de ictus isquémico o hemorrágico que ingresan en la Unidad de Ictus del HUCA en el período de Enero a Mayo de 2018. Se recogen datos demográficos, clínicos, analíticos y radiológicos. Se recogen asimismo muestras de exudado nasal de todos ellos solución de ácido nítrico al 2%. Todas las muestras son analizadas por espectrometría de masas (ICP-QQQ Agilent 8800). Se analizan los en una os datos con el SPSS V22.

RESULTADOS

Figura 1. Características de la muestra

EDAD	Media 69 (48-80)
SEXO	Mujeres 30,8% Varones 69,2%
NIHSS	Media 12 (3-25)
MRS BASAL	Media 1 (0-1)

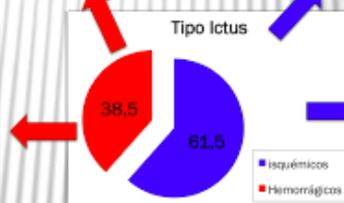
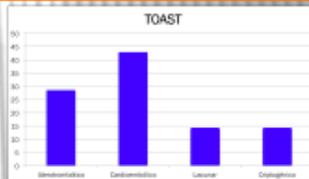
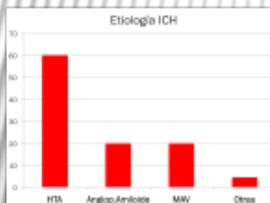


Figura 2. Niveles oligoelementos en exudado

Metal	Media	DE	P
Fe	ISQUÉMICO: 0,034482	0,13	0,012
	HEMORRÁGICO: 0,441260	0,39	
Zn	ISQUÉMICO: 0,086850	0,04	0,001
	HEMORRÁGICO: 0,500760	0,27	
Cu	ISQUÉMICO: 0,0105742	0,003	0,044
	HEMORRÁGICO: 0,0709006	0,03	

El 60% son ictus isquémicos y 40% hemorrágicos. La edad media fue de 69 años. **Se midieron en la muestra de exudado los niveles de Fe, Zn y Cu siendo estadísticamente más elevados en los ictus agudos hemorrágicos que en los isquémicos (p<0.05).**

CONCLUSIONES

Oligoelementos como el Fe, Zn o Cu pueden ser medidos en exudado nasal, como productos de degradación aclaramos por el sistema linfático cerebral, y ser útiles en el diagnóstico diferencial de ictus agudo.

Louveau A(2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*, 523: 337-41
 Aspelund A. (2015) A dual lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J Exp Med*, 212: 991-0
 Brunswick AS (2012). Serum biomarkers of spontaneous intracerebral hemorrhage induced secondary brain injury. *J Neurol Sci*, 321: 1-10



ANEXO IX

POSTER ESOC 2019



IRON MEASURED IN NASAL EXUDATE AS A NEW AND USEFUL BIOMARKER IN THE DIFFERENTIAL DIAGNOSIS OF PATIENTS WITH ACUTE STROKE

C. García-Cabo Fernández¹, P. Llano², L. Benavente³, J.M. Costa², M. Fernández-Abedul², S. Calleja³.
¹Hospital universitario de Cabueñes, Neurology, Gijón, Spain.
²Universidad de Oviedo, Facultad de Química, Oviedo, Spain.
³Hospital Universitario Central de Asturias, Neurology, Oviedo, Spain.

BACKGROUND AND AIMS:

Differential diagnosis between ischemic and hemorrhagic stroke in prehospital setting is one of the major challenges of neurovascular research. Several biomarkers have been studied, but attempts to date have focused on determining their blood levels. **Recently, cerebral lymphatic drainage towards the nostrils has been discovered (Figure 1), and this fact gives us the chance of analysing nasal exudate looking for biomarkers of neural damage.** We ought to determine whether iron levels in nasal exudate could determine the ischemic or hemorrhagic nature of the acute stroke.

PATIENTS AND METHODS:

We studied iron nasal exudate levels in 33 ischemic and 43 hemorrhagic stroke patients. All patients underwent neurological examination assessed by National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS), brain computed tomography (CT) to differential diagnosis of stroke subtype, laboratory tests and determination of iron levels in nasal exudate (Figure 2).

Figure 1. Cerebral lymphatic drainage

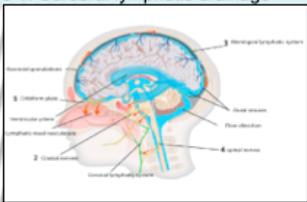
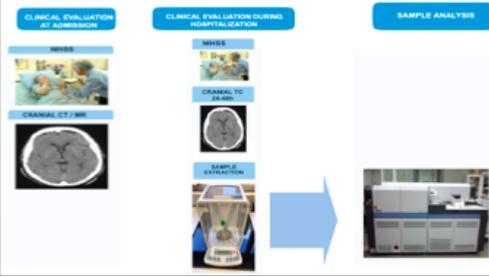
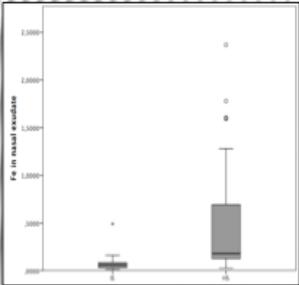


Figure 2. Clinical protocol



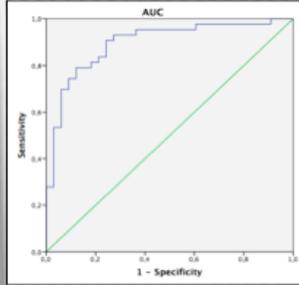
RESULTS

Figure 3. Levels of iron in nasal exudate in patients with ischaemic and hemorrhagic stroke



Levels of iron in ischemic and hemorrhagic stroke (mMolar)

Figure 4. ROC curve for ischemic-hemorrhagic stroke discrimination



AUC= 0.896 cut-off point ≥ 0.095 achieved 90% sensitivity and 76% specificity

The iron levels in nasal exudate were significantly higher in hemorrhagic stroke patients (Figure 3). The area under the receiver operating characteristic (ROC) curve for ischemic-hemorrhagic stroke discrimination was 0.896 (0.823-0.970), cut point of 0.095 milliMolar, sensitivity 90%, specificity 76%. (Figure 4).

CONCLUSIONS

Our findings suggest that iron levels in nasal exudate may be useful in prehospital setting for differential diagnosis between ischemic and hemorrhagic damage in acute stroke patients. And they also open a potential field for studying biomarkers. And they also open a potential field for studying biomarkers, being a proof of concept of the possibility of finding central nervous system biomarkers in nasal exudate.

This work was supported by the University of Oviedo under the project PAPI-18-PUENTE-3

ANEXO X

CURSOS DE FORMACIÓN TRANSVERSAL



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO

CERTIFICA

Que D./ Dña.

CARMEN GARCIA-CABO FERNANDEZ

con Documento Identificativo nº

ha asistido a las

VI JORNADAS DOCTORALES

organizadas por esta Universidad dentro del Programa de Formación Transversal del Centro Internacional de Postgrado en colaboración con el Instituto de Investigación e Innovación Educativa y celebrada en las siguientes fechas:

Fechas de celebración	7 de julio de 2017
Horas lectivas	20

Y para que conste, a los efectos oportunos, expide el presente Certificado en Oviedo a
31 de julio de 2017

Código de Verificación Electrónica: 12203a1e-19ab-40ab-9fcb-ad7b8982282b Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento electrónico en la dirección http://sede.uniovi.es/validador/codigoverificacion		
Firmante	Universidad de Oviedo	
Fecha y hora de la firma	31/07/2017 14:37:27 GMT+0200	
Emisor del certificado firmante	O=FNMT-RCM, C=ES, OU=AC Componentes Informáticos	



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO

CERTIFICA

Que D./ Dña.

CARMEN GARCIA-CABO FERNANDEZ

con Documento Identificativo nº

ha asistido a las

VII JORNADAS DOCTORALES Y I CONGRESO DE INVESTIGACIÓN

organizadas por esta Universidad dentro del Programa de Formación Transversal del Centro Internacional de Postgrado en colaboración con el Instituto de Investigación e Innovación Educativa y celebrada en las siguientes fechas:

Fechas de celebración	4 y 5 de julio de 2018
Horas lectivas	20

Y para que conste, a los efectos oportunos, expide el presente Certificado en Oviedo a
8 de agosto de 2018

Código de Verificación Electrónica: b9535ba1-985-4580-9085-c29144dfc46a Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento electrónico en la dirección http://sede.uniovi.es/validador/codigoverificacion		
Firmante	Universidad de Oviedo	
Fecha y hora de la firma	08/08/2018 12:55:00 GMT+0200	
Emisor del certificado firmante	O=FNMT-PCM, C=ES, OU=AC Componentes Informáticos	



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO

CERTIFICA

Que

CARMEN GARCIA-CABO FERNANDEZ

con Documento Identificativo nº

ha asistido al curso

PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN: DISEÑO EXPERIMENTAL

desarrollado por esta Universidad dentro del **Programa de Formación Transversal de Doctorado** del **Centro Internacional de Postgrado** celebrado en las fechas siguientes

Fechas de impartición	1 y 2 de febrero de 2019
Horas lectivas	20

Y para que conste, a los efectos oportunos, expide el presente Certificado en Oviedo a
22 de marzo de 2019

Código de Verificación Electrónica: 0cc625e7-a2da-497d-b442-8e4557b962f8 Permite la verificación de la integridad de una copia de este documento electrónico en la dirección http://sede.uniovi.es/validador/codigoverificacion		
Firmante	Universidad de Oviedo	
Fecha y hora de la firma	22/03/2019 12:02:52 GMT +0100	
Emisor del certificado firmante	O=FNMT-RCM, C=ES, OU=AC Componentes Informáticos	

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ National institute of neurological disorders and stroke. Classification of cerebrovascular diseases III. Stroke 1990; 21: 637-741.
- ² Strokeassociation.org. AHA/ASA. [Consulted Dec 12th 2016]. Available at: http://www.strokeassociation.org/STROKEORG/AboutStroke/TypesofStroke/Types_of-Stroke_UCM_308531_SubHomePage.jsp
- ³ Brainin M, Heiss WD. Textbook of Stroke Medicine.2nd Edition. Cambridge Medicine.
- ⁴ WHO.int. World Health Organization. [Consulted November 30th 2016] Available at: <http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/>
- ⁵ Feigin VL, Mensah GA, Norrving B, Murray CJ, Roth GA; GBD 2013 Stroke Panel Experts Group. Atlas of the Global Burden of Stroke (1990-2013): The GBD 2013 Study.Neuroepidemiology. 2015;45(3):230-6.
- ⁶WHO.int. World Health Organization. [Consulted November 30th 2016] Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
- ⁷ Díaz-Guzmán J, Egido JA, Gabriel-Sánchez R, Barberá-Comes G, Fuentes-Gimeno B, Fernández-Pérez C; IBERICTUS Study Investigators of the Stroke Project of the Spanish Cerebrovascular Diseases Study Group. Stroke and transient ischemic attack incidence rate in Spain: the IBERICTUS study. Cerebrovasc Dis. 2012; 34 (4): 272-81
- ⁸ Boix R, de Barrio JL, Saz P, Reñé R, Manubens JM, Lobo A, *et al.* Stroke prevalence among de Spanish elderly:an analyis base don screening surveys. BMC Neurol. 2006 (6): 36.
- ⁹ Wagner KR, Xi G, Hua Y, *et al.*: Early metabolic alterations in edematous perihematoma brain regions following experimental intracerebral hemorrhage. J Neurosurg. 1998; 88: 1058-65.
- ¹⁰ Fisher CM, Gore I, Okabe N, *et al.* Atherosclerosis of the carotid and vertebral arteries- extracranial and intracranial. J Neuropathol Exp Neurol 1965; 24: 455-76.
- ¹¹ Fisher CM. The arterial lesions underlying lacunes. Acta Neuropathol 1969; 12: 1-15.
- ¹² Caplan LR, Manning W. Cardiac sources os embolism: the usual suspects. En Caplan LR Manning WJ (eds): Brain embolism. Nueva York: Informa Health Care, 2006 pp: 129-159.

-
- ¹³ Besson G, Robert C, Hommel M, Perret J. Is it clinically possible to distinguish nonhemorrhagic infarct from hemorrhagic stroke? *Stroke*. 1995; 26 (7): 1205-9.
- ¹⁴ Fink JN, Kumar S, Horkan C, Linfante I, Selim MH, Caplan LR, *et al*. The stroke patient who woke up: clinical and radiological features, including diffusion and perfusion MRI. *Stroke* 2002; 33: 988-93.
- ¹⁵ Thomalla G, Cheng B, Ebinger M, Hao Q, Tourdias T, Wu O, *et al*. DWI-Flair mismatch for identification of patients with acute ischemic stroke within 4.5 hours of symptom onset (pre-flair): a multicentre observational study. *Lancet Neurol*. 2011; 10: 978-86.
- ¹⁶ Wintermarck M, Flanders AE, Velthuis B, Meuli R, van Leeuwen M, Glodseher D, *et al*. Perfusion-CT assessment of infarct core and penumbra: reiver operating characteristic curve analysis in 130 patients suspected of acute hemispheric stroke. *Stroke*. 2006; 37: 979-85.
- ¹⁷ Bivard A, Levi C, Spratt N, Parsons M. Perfusion CT in acute stroke: a comprehensive analysis of infarct and penumbra. *Radiology*. 2013; 267: 543-50.
- ¹⁸ Campbell BC, Christensen S, Levi CR, Desmond PM, Donnan GA, Davis SM, *et al*. Comparison of computed tomography perfusion and magnetic resonance imaging perfusion-difusion mismatch in ischemic stroke. *Stroke*. 2012; 43:2648-53
- ¹⁹ Dani KA, Thomas RG, Chappel FM, Shuler K, MacLeod MJ, Muir Kw *et al*. Computed tomography perfusion and magnetic resonance perfusion imaging in acute stroke: definitions and thresholds. *Ann Neurol*. 2011; 70: 384-401.
- ²⁰ Albers GW, Marks MP, Kemp S, Christensen S, Tsai JP, Ortega-Gutierrez S, *et al*. Thrombectomy for stroke at 6 to 16 hours with selection of perfusion imaging. *N Engl J Med*. 2018; 378: 708-18.
- ²¹ Thomalla G, Simonsen CZ, Boutitie F, Andersen G, Berthezene Y, Cheng B *et al*. MRI-guided thrombolysis for acute stroke with unknown time of onset. *N Engl J Med*. 2018.
- ²² Smith EE, Nandigam KR, Chen YW, Jeng J, Salat D, Halpin A, *et al*. MRI markers of small vessel disease in lobar and deep hemispheric intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2010; 41: 1933-38.
- ²³ Rodrigues MA, Samarasekera N, Lerpiniere C, Humphreys C, McCarron MO, White PM, *et al* The Edinburgh CT and genetic diagnostic criteria for lobar intracerebral haemorrhage associated with cerebral amyloid angiopathy: model development and diagnostic test accuracy study. *Lancet Neurol*. 2018; 17: 232-4.
- ²⁴ Delgado Almandoz JE, Schaefer PW, Forero NP, Falla JR, Gonzalez RG, Romero JM. Diagnostic accuracy and yield of multidetector CT angiography in the evaluation of spontaneous intraparenchymal cerebral hemorrhage. *Am J Neuroradiol*. 2009 Jun; 30 (6): 1213-21.

-
- ²⁵ Wada R, Aviv RI, Fox AJ, Sahlas DJ, Gladstone DJ, Tomlinson G, *et al.* CT angiography “spot sign” predicts hematoma expansion in acute intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2007; 38: 1257–1262.
- ²⁶ Orito K, Hirohata M, Nakamura Y, Takeshige N, Aoki T, Hattori G, *et al.* Leakage Sign for Primary Intracerebral Hemorrhage: A Novel Predictor of Hematoma Growth. *Stroke*. 2016 Apr; 47 (4): 958-63.
- ²⁷ Chan, S., Conell, C., Veerina, K. T., Rao, V. A., & Flint, A. C. (2015). Prediction of Intracerebral Haemorrhage Expansion with Clinical, Laboratory, Pharmacologic, and Noncontrast Radiographic Variables. *International Journal of Stroke*, 10 (7), 1057–1061.
- ²⁸ Delgado Almandoz JE Yoo AJ Stone MJ, Schaefer PW, Goldstein JN, Rosand J, *et al.* Systematic characterization of the computed tomography angiography spot sign in primary intracerebral hemorrhage identifies patients at highest risk for hematoma expansion: the spot sign score. *Stroke*. 2009; 40: 2994-3000.
- ²⁹ Delgado Almandoz JE Yoo AJ Stone MJ *et al.* The spot sign score in primary intracerebral hemorrhage identifies patients at highest risk of in-hospital mortality and poor outcome among survivors. *Stroke*. 2010; 41: 54-60.
- ³⁰ Lees KR, Emberson J, Blackwell L, Bluhmki E, Davis SM, Donnan GA *et al.* Effects of alteplase for acute stroke on the distribution of functional outcomes: a pooled analysis of 9 trials. *Stroke*. 2016; 47: 2373-9.
- ³¹ Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, *et al.* Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2008; 359: 1317-29.
- ³² Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, *et al.* Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Stroke Study (ECASS). *JAMA*. 1995; 274:1017-25.
- ³³ Wallgren N, Ahmed N, Davalos A, Ford GA, Grund M, Hacke W, *et al.* Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke in the safe implementation of thrombolysis in stroke monitoring study (sits-most): an observational study. *Lancet*. 2007; 369: 275-82.
- ³⁴ Kim BG, Han MK, Park TH, Park SS, Lee KB, Lee BC, *et al.* Low versus standard dose alteplase for ischemic stroke within 4.5 hours: a comparative effectiveness and safety study. *Stroke*. 2015; 46: 2541-8.
- ³⁵ Anderson CS, Robinson T, Lindley RI, Arima H, Lavados PM, Lee TH, *et al.* Low dose versus standard dose intravenous alteplase in acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2016; 374: 2313-23.
- ³⁶ Powers WJ, Rabinstein AA, Ackerson T, Adeoye OM, Bambakidis NC, Becker K *et al.* 2018 guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for health care professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2018; 49: e46-e110.

-
- ³⁷ Hacke W, Furlan AJ, AlRAWiY, Davalos A, Fiebaach JB, Gruber F, *et al.* Intravenous desmoteplase in patients with acute ischemic stroke selected by MRI perfusión-diffusion weighted imaging or perfusión CT (DIAS-2): A prospective, randomised, doublé-blind, placebo-controlled study. *Lancet Neurol.* 2009; 8: 141-50.
- ³⁸ Hacke W, Albers G, Al Rawi Y, Bougousslavsky J, Davalos A, Eliasziw M *et al.* The desmoteplase in acute ischemic stroke trial (DIAS): a phase II MRI based 9 hour window acuye stroke thrombolysis trial with intravenous desmoteplase.
- ³⁹ Von Kummer R, Mori E, Truelsen T, Jensen JS, Gronning BA, Fiebach JB, *et al.* Desmoteplase 3 to 9 hours after major artery occlusion in stroke: the DIAS 4 trial (efficacy and safety study of desmoteplase to treat acute ischemic stroke). *Stroke* 2016; 47: 2880-7.
- ⁴⁰ Huang X, Cheripelli BK, Lloyd SM, KAlladka D, Moreton FC, Siddiqui A, *et al.* Alteplase versus tecnecteplase for thrombolysis after ischemic stroke (ATTEST): a phase 2, randomised, open label blinded endpoint study. *Lancet neurol.* 2015; 14: 368-76.
- ⁴¹ Parsons M, Spratt N, Bivard A, Campbell B, Chung K, Miteff F, *et al.* A randomized trial of tecnecteplase versus alteplase for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.*2012; 366: 1099-107.
- ⁴² Ciccone A, Motto C, Abraha I, Cozzolino F, Santilli I. Glicoprotein IIb-IIIa inhibitors for acute stroke. *Cochrane database Syst Rev.* 2014; 204 (3): CD005208.
- ⁴³ Sheinberg DI, Mc Arthy DJ, Peterson EC, Starke Rm. Defuse- 3 trial: reinforcing evidence for extended endovascular intervention time window for ischemic stroke. *World Neurosurg.* 2018; 112: 275-6.
- ⁴⁴ Xu Y, Parikh NS, Jiao B, Willey JZ, Boehme AK, Elkind MSV. Decision analysis model for prehospital triahe of patients with acute stroke. *Stroke.* 2019; 50 (4): 970-77.
- ⁴⁵ Turc G, Bhogal P, Fisher U, Khatri P, Lobotesis k, Mazighi M, *et al.* European Stroke Organization (ESO)- European Society for minimally invasive neurological therapy (ESMINT) guidelines on mechanical thrombectomy in acute ischaemic stroke endorsed by stroke alliance of Europe (SAFE). *Eur Stroke J.* 2019; 4 (1): 6-12.
- ⁴⁶ Ingall TJ, O´Fallon WM, Asplund K, Goldfrank LR, Hertzberg VS, Louis TA, Christianson TJ. Findings from the reanalysis of the NINDS tissue plasminogen activator for acute stroke treatment trial. *Stroke* 2003; 35: 2418-24.
- ⁴⁷ Clark WM, Albers GW, Madden KP, Hamilton S. The rTPA (aletplase) 0 to 6 hour acute stroke trial, part A (A0276g): results of a doubled blind, placebo-controlled, multicenter study. Thrombolytic therapy in acute ischemic stroke study investigators. *Stroke.* 2000; 31: 811-16.
- ⁴⁸ Logallo N, Novotny V, Assmus J, Kvistad CE, Altehheld L, Roming OM, *et al.* Tecnecteplase versus alteplase for manegement of acute ischemic stroke

-
- (NORD-TEST): a phase 3, randomised open label blinded endpoint trial. *Lancet Neurol.* 2017; 16: 781-8.
- ⁴⁹ Berkhemer OA, Fransen PS, Beumer D, *et al.* MR CLEAN investigators. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2015; 372: 11-20.
- ⁵⁰ Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, *et al.* ESCAPE trial investigators. Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2015; 372: 1019-30.
- ⁵¹ Jovin TG, Chamorro A, Cobo E, *et al.* REVASCAT trial investigators. Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *N Engl J Med* 2015; 372: 2296-306.
- ⁵² Saber JL, Goyal M, Bonafe A, *et al.* SWIFT PRIME investigators. Stent-retriever thrombectomy after intravenous r-TPA vs r-TPA alone in stroke. *N Engl J Med* 2015; 372: 2285-95.
- ⁵³ Goyal M, Menon MB, van Zwan WH, Dippel W, *et al.* Endovascular Thrombectomy after large vessel ischemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomized trials. *Lancet*, 2016. 387:1723-31
- ⁵⁴ Nogueira RG, Jadhav AP, HAussen DC, Bonafe A, Budzik RF, Bhuvu P, *et al.* Thrombectomy 6 to 24 hours after stroke with a mismatch between deficit and infarct.
- ⁵⁵ Robinson TG, Potter JF, Ford JA, Bulpitt CJ, Chernova J, Jagger C, *et al.* Effects of antihypertensive treatment after acute stroke in the context of stop post-stroke antihypertensives collaborative study (COSSACS): a prospective, randomized, open, blinded, endpoint trial. *Lancet Neurol* 2010; 9 (8): 767-75.
- ⁵⁶ Capes SE, Hunt D, Malmberg K, Pathak P, Gerstein HC. Stress hyperglycaemia and prognosis of stroke in non diabetic and diabetic patients: a systematic overview. *Stroke* 2001; 32: 2426-32.
- ⁵⁷ Stroke Unit Trialist collaboration. Organised inpatient (stroke unit) care for stroke. *Cochrane database of systematic reviews.* 2013, Issue 9.
- ⁵⁸ Neuhaus AA, Couch Y, Hadley G, Bucha AM: Neuroprotection in stroke. The importance of collaboration and reproducibility. *Brain.* 2017; 140 (8): 2019-92.
- ⁵⁹ Hoyte L, Barber PA, Buchan AM, Hill MD. The rise and fall of NMDA antagonist for ischemic stroke. *Curr Mol Med* 2004; 4: 131-6.
- ⁶⁰ Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, *et al.* NXT-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2007; 357: 562-71.
- ⁶¹ Chamorro A, Amaro S, Castellanos M, Gomis M, Urra X, Blasco J, *et al.* Uric acid therapy improves the outcomes of stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator and mechanical thrombectomy. *Int J stroke* 2017; 12 (4): 377-82.

-
- ⁶² Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Vegar Kolko SL, *et al.* Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol.* 2009; 8: 355-369.
- ⁶³ Krishnamurthi RV, Feigin VL, Fouron Zafar MH, Mensah GA, *et al.* Global and regional burden of first ever ischemic and hemorrhagic stroke during 1999-2010: findings from the global burden disease study 2010. *Lancet Glob Heal.* 2013; 1: e259-81.
- ⁶⁴ Jolink WM, Klijn CJ, Brouwers PJ, Kappelle LJ *et al.* Time trends in incidence, case-fatality and mortality of intracerebral hemorrhage. *Neurology.* 2015; 85: 1318-24
- ⁶⁵ Anderson CS, Heeley E, Huang Y, Wang J, *et al.* Investigators INTERACT 2. Rapid blood-pressure lowering in patients with acute intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med.* 2013; 368: 2355-65.
- ⁶⁶ Qureshi AI, Palesch YY, Brasan WG, Hanley DF, Hsu CY, Martin RL *et al.* Intensive blood pressure lowering in patients with acute cerebral hemorrhage. *N Engl J Med.* 2016; 375: 1033-43.
- ⁶⁷ Mayer SA, Brun NC, Begtrup K, Broderick J *et al.* Efficacy and safety of recombinant activated factor VII for acute intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med.* 2008; 358: 2127-37.
- ⁶⁸ Qureshi Ai, Mendelow Ad, Hanley DF. Intracerebral hemorrhage. *Lancet.* 2009; 373 (9675): 1632-44.
- ⁶⁹ Hemphill JC, Greenberg SM, Anderson CS, Becker K, *et al.* Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the american heart association/American stroke association. *Stroke.* 2015; 46 (7): 2032-60.
- ⁷⁰ Delcourt C, Huang Y, Arima H, Chalmers J, *et al.* Hematoma growth and outcomes in intracerebral hemorrhage: the INTERACT 1 study. *Neurology.* 2012; 79 (4): 314-9.
- ⁷¹ Demchuck Am, Dowlatshahi D, Rodriguez Luna D, Molina CA, *et al.* Prediction of hematoma growth and outcome in patients with intracerebral hemorrhage using the CT angiography spot sign (PREDICT): a prospective observational study. *Lancet Neurolog.* 2012; 11 (4): 307-14.
- ⁷² Morotti A, Boulouis G, Romero JM, Brouwers HB, *et al.* Blood pressure reduction and noncontrast CT markers of intracerebral hemorrhage expansion. *Neurology.* 2017; 89: 548-54
- ⁷³ Kobayashi J, Koga M, Tanaka F, Okada Y, *et al.* Continuous antihypertensive therapy throughout the initial 24 hours of intracerebral hemorrhage: the acute stroke management with urgent risk factor assessment and improvement intracerebral hemorrhage study. *Stroke.* 2014; 45 (7): 868-70.
- ⁷⁴ Butcher KS, Jeerakathil T, Hill M, Demchuck AM, *et al.* The intracranial hemorrhage acutely decreasing arterial pressure trial. *Stroke.* 2013; 44 (3): 620-6.

-
- ⁷⁵ Anderson CS, Huanhg Y, Wang JG, Arima H, *et al.* Intensive blood pressure reduction in acute cerebral hemorrhage trial (INTERACT): A randomized pilot trial. *Lancet Neurol.* 2008; 7 (5): 391-9.
- ⁷⁶ Qureshi AI, Palesch YY, Martin R, Novitzke J, *et al.* Effect of systolic blood pressure reduction on hematoma expansion, perihematomal edema and 3 month outcome among patients with intracerebral hemorrhage: results from the antihypertensive treatment of acute cerebral hemorrhage study. *Arch Neurol.* 2010; 67 (5): 570-6.
- ⁷⁷ Anderson CS, Heeley E, Huang Y, Wang J, *et al.* Rapid blood pressure lowering in patients with acute intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med.* 2013; 368 (25): 2355-65.
- ⁷⁸ Qureshi AI, Palesch YY, Barsan WG, Hanley DF, *et al.* Intensive blood pressure lowering in patients with acute cerebral hemorrhage. *N Engl J Med.* 2016; 375 (11): 1033-43.
- ⁷⁹ Moullaali T, Wang X, Shipes V, Robinson T, Chalmers J, Suarez J, *et al.* INTERACT 2/ATCAH II IPD pooling project to define optimal levels of systolic blood pressure control in acute intracerebral hemorrhage. ESOC 2019.
- ⁸⁰ Mayer SA, Brun NC, Begtrup K, Broderick J, *et al.* Efficacy and safety of recombinant activated factor VII for acute intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med.* 2008; 358 (20): 2127-37.
- ⁸¹ Roberts I, Shakur H, Coats T, Hunt B, *et al.* The CRASH 2 trial: a randomised controlled trial and economic evaluation of the effects of tranexamic acid on death, vascular occlusive events and transfusion requirement in bleeding trauma patients. *Health Technol Assess.* 2013; (10): 1-79.
- ⁸² Sprigg N, Flaherty K, Appleton JP, Salman RA, *et al.* Tranexamic acid for hyperacute primary intracerebral hemorrhage (TICH-2): an international randomised, placebo controlled, phase 3 superiority trial. *Lancet.* 2018; 391: 2107-15.
- ⁸³ Meretoja A, Churilov L, Campbell BC, Aviv RI, *et al.* The spot sign and tranexamic acid on preventing ICH growth-Australasia Trial (STOP-AUST): protocol of a phase II randomized, placebo controlled, double-blind, multicenter trial. *Int J Stroke.* 2014; 9 (4): 519-24.
- ⁸⁴ Liu L, Wang Y, Meng X, Li N, *et al.* Tranexamic acid for acute intracerebral hemorrhage growth predicted by spot sign trial: rationale and design. *Int J Stroke.* 2017; 12 (3): 326-31.
- ⁸⁵ Brouwers HB, Chang Y, Falcone GJ, Cai X, *et al.* Predicting hematoma expansion after primary intracerebral hemorrhage. *JAMA Neurol.* 2014; 71 (2): 158-64.
- ⁸⁶ Steinert T, Poli S, Griebel M, Husing J, *et al.* Fresh frozen plasma versus prothrombin complex concentrate in patients with intracerebral hemorrhage related to vitamin K antagonist (INCH): a randomized trial. *Lancet Neurol.* 2016; 15 (6): 566-73.

-
- ⁸⁷ Kuramatsu JB, Sembill JA, Gerner ST, Sprugel MI, *et al.* Management of therapeutic anticoagulation in patients with intracerebral hemorrhage and mechanical heart valves. *Eur Heart J.* 2018; 39: 1709-23.
- ⁸⁸ POLLACK CV, Reilly PA, van Ryn J, Eikelboom JW, *et al.* Idaruzumab for dabigaran reversal- full cohort analysis. *N Engl J Med.* 2017; 377 (5): 431-41.
- ⁸⁹ Connolly SJ, Milling TJ, Eikelboom JW, Gibson CM, *et al.* Andexanet alfa for acute major bleeding associated with factor Xa inhibitors. *N Engl J Med.* 2016; 375: 1131-41.
- ⁹⁰ Siegel DM, Curnutte JT, Connolly SJ, Lu G, *et al.* Andexanet alfa for the reversal of factor Xa inhibitor activity. *N Engl J Med.* 2015; 373: 2413-24.
- ⁹¹ Baharoglu MI, Cordonnier C, Salman RA, de Gans K, *et al.* Platelet transfusion versus standard care after acute stroke due to spontaneous intracerebral hemorrhage associated with antiplatelet therapy (PATCH): a randomised, open label, phase 3 trial. *Lancet.* 2016; 387: 2605-13.
- ⁹² Mendelow AD, Gregson BA, Fernandez HM, Murray GD, Gholkar A, Mitchell PM. Early surgery versus initial conservative treatment in patients with spontaneous supratentorial intracerebral hematomas in the international surgical trial in intracerebral hemorrhage (STICH): a randomised trial. *Lancet.* 2005; 365: 387-97.
- ⁹³ Mendelow AD, Gregson BA, Rowan EN, Murray GD, Gholkar A, Mitchell PM: Early surgery versus initial conservative treatment in patients with spontaneous supratentorial lobar intracerebral hematomas (STICH II): a randomised trial. *Lancet.* 2013; 382: 397-408.
- ⁹⁴ Hanley DF, Thompson RE, Muschelli J, Rosenblum M, McBee N, Lane K, *et al.* Safety and efficacy of minimally invasive surgery plus alteplase in intracerebral hemorrhage evacuation (MISTIE): a randomised, controlled, open label phase 2 trial. *Lancet Neurol.* 2016; 15 (12): 1228-37.
- ⁹⁵ Volbers B, Giede-Jeppe A, Gerner St, Sembill JA, Kuramatsu JB, Lang S, *et al.* Peak perihemorrhagic edema correlates with functional outcome in intracerebral hemorrhage. *Neurology.* 2018; 90 (12): e1005-12.
- ⁹⁶ Xi G, Keep RF, Hoff JT. Mechanism of brain injury after intracerebral hemorrhage. *Lancet Neurol.* 2006; 5: 53-63.
- ⁹⁷ Shah M, Bimbaum L, Ramussen J, Sekar P, Moomaw, Osborne J, *et al.* Effect of hyperosmolar therapy on outcome following spontaneous intracerebral hemorrhage: Ethnic/Racial variations of intracerebral hemorrhage (ERICH) study. *J Stroke Cerebrovasc Di.* 2018; 27 (4): 1061-7.
- ⁹⁸ Poole D, Citerio G, Helbok R, Ichai C, Meyfroidt G, Oddo M, *et al.* Evidence for Mannitol as an Effective Agent Against Intracranial Hypertension: An Individual Patient Data Meta-analysis. *Neurocrit Care.* 2019; doi: 10.1007/s12028-019-00771-y.

-
- ⁹⁹ Staykov D, Wagner I, Volbers B, Doerfler A, Schwab S, Kollmar R. Mild prolonged hypothermia for large intracerebral hemorrhage. *Neurocrit Care*. 2013; 18 (2): 178-83.
- ¹⁰⁰ Rincon F, Friedman DP, Bell R, Mayer SA, Bray PF, Targeted temperature management after intracerebral hemorrhage (TTM-ICH): methodology of a prospective randomised clinical trial. *Int J Stroke*. 2014; 9 (5): 646-51.
- ¹⁰¹ Calderon VJ, Kasturiarachi BM, Lin E, Bansal V, Zaidat OO. Review of the mobile stroke unit experience worldwide. *Interv Neurol*. 2018; 7 (6): 347-58.
- ¹⁰² Ngoya PS, Muhogora WE, Pitcher RD. Defining the diagnostic divide: an analysis of registered radiological equipment resources in a low-income African country. *Pan African Medical Journal*. 2016; 25: 99.
- ¹⁰³ Brenner DJ, Hall EJ. Computed tomography an increasing source of radiation exposure. *N Engl J Med*. 2007; 357 (22): 2277-84.
- ¹⁰⁴ Smith-Bindman R, Lipson J, Marcus R, Kim KP, Mahesh M, Gould R, *et al*. Radiation dose associated with common computed tomography examinations and the associated lifetime attributable risk of cancer. *Arch Intern Med*. 2009 Dec 14; 169 (22): 2078-86.
- ¹⁰⁵ Grotta JC, Chiu D, Lu M, Patel S, Levine SR, Tilley BC, *et al*. Agreement and variability in the interpretation of early CT changes in stroke patients qualifying for intravenous rtPA therapy. *Stroke*. 1999 Aug; 30 (8): 1528-33.
- ¹⁰⁶ Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001; 69 (3): 89-95.
- ¹⁰⁷ Misra S, Kumar A, Kumar P, Yadav AK, Mohania D, Pandit AK, *et al*. Blood-based protein biomarkers for stroke differentiation: A systematic review. *Proteomics Clin Appl*. 2017; 11 (9-10).
- ¹⁰⁸ Calva-Mercado JJ. Estudios clínicos experimentales. *Salud Pública de México* 2000; 42 (4)
- ¹⁰⁹ Dassan P, Keir G, Brown MM. Criteria for a clinically informative serum biomarker in acute ischemic stroke: A review of S100B. *Cerebrovasc Dis*. 2009; 27 (3): 295-302
- ¹¹⁰ Miao Y, Liao JK. Potential serum biomarkers in the pathophysiological processes of stroke. *Expert Rev Neurother*. 2014; 14 (2): 173-85.
- ¹¹¹ Scherbakov N1, Sandek A, Martens-Lobenhoffer J, Kung T, Turhan G, Liman T, *et al*. Endothelial dysfunction of the peripheral vascular bed in the acute phase after ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2012; 33 (1): 37-46.
- ¹¹² Leong T, Zylberstein D, Graham I, Lissner L, Ward D, Fogarty J, *et al*; Swedish-Irish-Norwegian Collaboration. Asymmetric dimethylarginine independently predicts fatal and nonfatal myocardial infarction and stroke in women: 24-year follow-up of the population study of women in Gothenburg. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008; 28 (5): 961-7.

-
- ¹¹³ Rueda-Clausen CF, Córdoba-Porras A, Bedoya G, Silva FA, Zarruk JG, López-Jaramillo P, *et al.* Increased plasma levels of total homocysteine but not asymmetric dimethylarginine in Hispanic subjects with ischemic stroke FREC-VI sub-study. *Eur J Neurol.* 2012; 19 (3): 417-25.
- ¹¹⁴ Paczkowska E, Gołąb-Janowska M, Bajer-Czajkowska A, Machalińska A, Ustianowski P, Rybicka M, Kłós P, Dziedziejko V, Safranow K, Nowacki P, Machaliński B. Increased circulating endothelial progenitor cells in patients with haemorrhagic and ischaemic stroke: the role of endothelin-1. *J Neurol Sci.* 2013; 325 (1-2): 90-9.
- ¹¹⁵ Haapaniemi E1, Tatlisumak T, Hamel K, Soinne L, Lanni C, Opgenorth TJ, Kaste M. Plasma endothelin-1 levels neither increase nor correlate with neurological scores, stroke risk factors, or outcome in patients with ischemic stroke. *Stroke.* 2000; 31 (3): 720-5.
- ¹¹⁶ Alvarez-Perez FJ, Castelo-Branco M, Alvarez-Sabin J. Usefulness of measurement of fibrinogen, D-dimer, D-dimer/fibrinogen ratio, C reactive protein and erythrocyte sedimentation rate to assess the pathophysiology and mechanism of ischaemic stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2011; 82 (9): 986-92.
- ¹¹⁷ Barr TL, Latour LL, Lee KY, Schaewe TJ, Luby M, Chang GS, *et al.* Blood-brain barrier disruption in humans is independently associated with increased matrix metalloproteinase-9. *Stroke.* 2010; 41 (3): e123-8.
- ¹¹⁸ Allard L, Lescuyer P, Burgess J, Leung KY, Ward M, Walter N, *et al.* ApoC-I and ApoC-III as potential plasmatic markers to distinguish between ischemic and hemorrhagic stroke. *Proteomics.* 2004; 4 (8): 2242-51.
- ¹¹⁹ Lopez MF, Sarracino DA, Prakash A, Athanas M, Krastins B, Rezai T, *et al.* Discrimination of ischemic and hemorrhagic strokes using a multiplexed, mass spectrometry-based assay for serum apolipoproteins coupled to multi-marker ROC algorithm. *Proteomics Clin Appl.* 2012; 6 (3-4): 190-200
- ¹²⁰ Foerch C1, Montaner J, Furie KL, Ning MM, Lo EH. Invited article: searching for oracles? Blood biomarkers in acute stroke. *Neurology.* 2009 Aug 4; 73 (5): 393-9.
- ¹²¹ Missler U1, Wiesmann M, Wittmann G, Magerkurth O, Hagenström H. Measurement of glial fibrillary acidic protein in human blood: analytical method and preliminary clinical results. *Clin Chem.* 1999 Jan; 45 (1): 138-41.
- ¹²² Mayer CA1, Brunkhorst R, Niessner M, Pfeilschifter W, Steinmetz H, Foerch C. Blood levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in patients with neurological diseases. *PLoS One.* 2013 Apr 23; 8 (4): e62101.
- ¹²³ Lei J, Gao G, Feng J, Jin Y, Wang C, Mao Q, *et al.* Glial fibrillary acidic protein as a biomarker in severe traumatic brain injury patients: a prospective cohort study. *Crit Care.* 2015 Oct 12; 19: 362.
- ¹²⁴ Foerch C, Curdt I, Yan B, Dvorak F, Hermans M, Berkefeld J, *et al.* Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for intracerebral haemorrhage in patients with acute stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006 Feb; 77 (2): 181-4.

-
- ¹²⁵ Foerch C1, Niessner M, Back T, Bauerle M, De Marchis GM, Ferbert A, *et al*; BE FAST Study Group. Diagnostic accuracy of plasma glial fibrillary acidic protein for differentiating intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia in patients with symptoms of acute stroke. *Clin Chem*. 2012 Jan; 58 (1): 237-45.
- ¹²⁶ Dvorak F, Haberer I, Sitzler M, Foerch C. Characterisation of the diagnostic window of serum glial fibrillary acidic protein for the differentiation of intracerebral haemorrhage and ischaemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2009; 27 (1): 37-41.
- ¹²⁷ Xiong L, Yang Y, Zhang M, Xu W. The use of serum glial fibrillary acidic protein test as a promising tool for intracerebral hemorrhage diagnosis in Chinese patients and prediction of the short-term functional outcomes. *Neurol Sci*. 2015 Nov; 36 (11): 2081-7.
- ¹²⁸ Llombart V, García-Berrocoso T, Bustamante A, Giralt D, Rodriguez-Luna D, Muchada M, *et al*. Plasmatic retinol-binding protein 4 and glial fibrillary acidic protein as biomarkers to differentiate ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *J Neurochem*. 2016; 136 (2): 416-24.
- ¹²⁹ Zhang J, Zhang CH, Lin XL, Zhang Q, Wang J, Shi SL. Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for differentiating intracerebral hemorrhage and ischemic stroke in patients with symptoms of acute stroke: a systematic review and meta-analysis. *Neurol Sci*. 2013 Nov; 34 (11): 1887-92.
- ¹³⁰ Rozanski M, Waldschmidt C, Kunz A, Grittner U, Ebinger M, Wendt M, *et al*. Glial Fibrillary Acidic Protein for Prehospital Diagnosis of Intracerebral Hemorrhage. *Cerebrovasc Dis*. 2017; 43 (1-2): 76-81.
- ¹³¹ Alpua M, Bakir F, Oztekin N, Ak F. The relationship between serum S100B protein levels and lesion type, size and location in patients with cerebrovascular stroke. *J Fac Med Koc Univev* 2014; 16: 8-14.
- ¹³² Abbasi M, Sajjadi M, Fathi M, Maghsoudi M. Serum S100B protein as an outcome prediction tool in emergency department patients with traumatic injury. *Turk J of Emerg Med*. 2014; 14: 147-152.
- ¹³³ Senn R, Elkind MS, Montaner J, Christ-Crain M, Katan M. Potential role of blood biomarkers in the management of nontraumatic intracerebral hemorrhage. *Cerebrovasc Dis*. 2014; 38 (6): 395-409.
- ¹³⁴ Roudbary SA, Saadat F, Forghanparast K, Sohrabnejad R. Serum C-reactive protein level as a biomarker for differentiation of ischemic from hemorrhagic stroke. *Acta Med Iran*. 2011; 49 (3): 149-52.
- ¹³⁵ Rallidis LS, Zolindaki MG, Vikelis M, Kaliva K, Papadopoulos C, Kremastinos DT. Elevated soluble intercellular adhesion molecule-1 levels are associated with poor short-term prognosis in middle-aged patients with acute ischaemic stroke. *Int J Cardiol*. 2009; 132 (2): 216-20.
- ¹³⁶ Castillo J1, Alvarez-Sabín J, Martínez-Vila E, Montaner J, Sobrino T, Vivancos J; MITICO Study Investigators. Inflammation markers and prediction of post-stroke vascular disease recurrence: the MITICO study. *J Neurol*. 2009; 256 (2): 217-24.

-
- ¹³⁷ Brunswick AS, Hwang BY, Appelboom G, Hwang RY, Piazza MA, Connolly ES Jr. Serum biomarkers of spontaneous intracerebral hemorrhage induced secondary brain injury. *J Neurol Sci.* 2012;15; 321 (1-2): 1-10.
- ¹³⁸ Undén J, Strandberg K, Malm J, Campbell E, Rosengren L, Stenflo J, *et al.* Explorative investigation of biomarkers of brain damage and coagulation system activation in clinical stroke differentiation. *J Neurol.* 2009; 256 (1): 72-7.
- ¹³⁹ Montaner J, Mendioroz M, Delgado P, García-Berrocso T, Giralt D, Merino C, *et al.* Differentiating ischemic from hemorrhagic stroke using plasma biomarkers: the S100B/RAGE pathway. *J Proteomics.* 2012; 75 (15): 4758-65.
- ¹⁴⁰ Llombart V, García-Berrocso T, Bustamante A, Giralt D, Rodriguez-Luna D, Muchada M, *et al.* Plasmatic retinol-binding protein 4 and glial fibrillary acidic protein as biomarkers to differentiate ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *J Neurochem.* 2016; 136 (2): 416-24.
- ¹⁴¹ Bustamante A, López-Cancio E, Pich S, Penalba A, Giralt D, García-Berrocso T, *et al.* Blood Biomarkers for the Early Diagnosis of Stroke: The Stroke-Chip Study. *Stroke.* 2017; 48 (9): 2419-2425.
- ¹⁴² Mertz W. The scientific and practical importance of trace elements. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1981 Aug 14; 294 (1071): 9-18.
- ¹⁴³ Hickenbottom SL, Gotta J. Neuroprotective therapy. *Sem Neurol* 1998; 18: 485-92.
- ¹⁴⁴ Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. Trace elements in human physiology and pathology. *Copper. Biomed Pharmacother.* 2003 Nov; 57 (9): 386-98.
- ¹⁴⁵ Munshi A, Babu S, Kaul S, Shafi G, Rajeshwar K, Alladi S, Jyothy A. Depletion of serum zinc in ischemic stroke patients. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2010; 32 (6): 433-6.
- ¹⁴⁶ Uza G, Gomes L, Uza D, Pop O. Serum zinc and copper in patients with cerebral vascular disease. *Rom J Intern Med* 1995. 33: 19-26.
- ¹⁴⁷ Karadas S, Sayın R, Aslan M, Gonullu H, Katı C, Dursun R, Duran L, Gonullu E, Demir H. Serum levels of trace elements and heavy metals in patients with acute hemorrhagic stroke. *J Membr Biol.* 2014; 247 (2): 175-80.
- ¹⁴⁸ Gonullu H, Karadas S, Milanlioglu A, Gonullu E, KAİ C, Demir H. Levels of serum trace elements in ischemic stroke patients. *J Exp Clinical Med* 2013; 30: 301-4.
- ¹⁴⁹ Skalny AV, Klimenko LL, Turna AA, Budanova MN, Baskakov IS, Savostina MS, *et al.* Serum trace elements are associated with hemostasis, lipid spectrum and inflammatory markers in men suffering from acute ischemic stroke. *Metab Brain Dis.* 2017; 32 (3): 779-788.
- ¹⁵⁰ MacKenzie EL, Iwasaki K, Tsuji Y. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal.* 2008.

-
- ¹⁵¹ Pantopoulos K, Porwal SK, Tartakoff A, Devireddy L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. *Biochemistry*. 2012; 51:5705-5724.
- ¹⁵² Russo N, Edwards M, Andrews T, O'Brien M, Bhatia KP. Hereditary haemochromatosis is unlikely to cause movement disorders—a critical review. *J Neurol*. 2004; 251:849–852.
- ¹⁵³ Ishimaru H, Ishikawa K, Ohe Y, Takahashi A, Tatemoto K, Maruyama Y. Activation of iron handling system within the gerbil hippocampus after cerebral ischemia. *Brain Res*. 1996; 726:23–30.
- ¹⁵⁴ Millan M, Sobrino T, Castellanos M, Nombela F, Arenillas JF, Riva E, *et al*. Increased body iron stores are associated with poor outcome after thrombolytic treatment in acute stroke. *Stroke*. 2007; 38:90–95.
- ¹⁵⁵ Dávalos A, Fernandez-Real JM, Ricart W, Soler S, Molins A, Planas E, *et al*. Iron-related damage in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1994; 25:1543–1546.
- ¹⁵⁶ García-Yébenes I, García-Culebras A, Peña-Martínez C, Fernández-López D, Díaz-Guzmán J, Negro P, *et al*. Iron Overload Exacerbates the Risk of Hemorrhagic Transformation After tPA (Tissue-Type Plasminogen Activator) Administration in Thromboembolic Stroke Mice. *Stroke*. 2018; 49 (9): 2163-2172.
- ¹⁵⁷ Pérez de la Ossa N, Sobrino T, Silva Y, Blanco M, Millán M, Gomis M, *et al*. Iron-related brain damage in patients with intracerebral hemorrhage. *Stroke*. 2010; 41 (4): 810-3.
- ¹⁵⁸ Zhang X, Li Y, Liang Y, Sun P, Wu X, Song J, *et al*. Distinguishing Intracerebral Hemorrhage from Acute Cerebral Infarction through Metabolomics. *Rev Invest Clin*. 2017; 69 (6): 319-328.
- ¹⁵⁹ Jové M, Mauri-Capdevila G, Suárez I, Cambray S, Sanahuja J, Quilez A, *et al*. METabolomics predicts stroke recurrence after transient ischemic attack. *Neurology*. 2015; 84 (1): 36-45.
- ¹⁶⁰ Vilar-Bergua A, Riba-Llena I, Nafria C, Bustamante A, Llombart V, Delgado P, Montaner J. Blood and CSF biomarkers in brain subcortical ischemic vascular disease: Involved pathways and clinical applicability. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2016; 36 (1): 55-71.
- ¹⁶¹ Abbott NJ. 1992. Comparative physiology of the blood-brain barrier. Bradbury, MWB. *Physiology and pharmacology of the blood brain barrier*. Springer, Heilderberg. 371-396.
- ¹⁶² Abbott, N.J., 2005. Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell. Mol. Neurobiol*. 25, 5–23.
- ¹⁶³ Nag, S., Begley, D.J., 2005. Blood–brain barrier, exchange of metabolites and gases. *Pathology and Genetics. Cerebrovascular Diseases*. ISN Neuropath. Press, Basel, pp. 22–29.
- ¹⁶⁴ Brown, P.D., Davies, S.L., Speake, T., Millar, I.D. Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience* 2004. 129, 957–970.

-
- ¹⁶⁵ Cserr, H.F., Patlak, C.S., 1992. Secretion and bulk flow of interstitial fluid. In: Bradbury, M.W.B. (Ed.), *Physiology and Pharmacology of the Blood–Brain Barrier*. Springer, Heidelberg, pp. 245–261.
- ¹⁶⁶ Abbott, N.J., Rönnbäck, L., Hansson, E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Rev Neurosci*. 2006; 7: 41–53.
- ¹⁶⁷ Nischwitz, V., Berthele, A., Michalke, B. Speciation analysis of selected metals and determination of their total contents in paired serum and cerebrospinal fluid samples: an approach to investigate the permeability of the human blood–cerebrospinal fluid-barrier. *Anal Chim Acta*. 2008; 627: 258–269.
- ¹⁶⁸ Bernacki, J, Dobrowolska, A, Nierwińska, K, Małecki, A. Physiology and pharmacological role of the blood–brain barrier. *Pharmacol Rep*. 2008; 60: 600–622.
- ¹⁶⁹ Gingrich, M.B., Junge, C.E., Lyuboslavsky, P., Traynellis, S.F. Potentiation of NMDA receptor function by the serine protease thrombin. *J Neurosci*. 2000; 20: 4582–4595.
- ¹⁷⁰ Lim, D.A., Huang, Y.C., Alvarez-Buylla, A. The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies. *Neurosurg Clin N Am*. 2007; 18: 81–92.
- ¹⁷¹ Shimizu F, Sano Y, Maeda T, Abe MA, Nakayama H, Takahashi R, *et al*. Peripheral nerve pericytes originating from the blood–nerve barrier expresses tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells. *J Cell Physiol*. 2008; 217: 388–399.
- ¹⁷² Galea I., Bechmann I., Perry V.H. What is immune privilege (not)? *Trends Immunol*. 2007; 28:12–18.
- ¹⁷³ Lukic I.K., Gluncic V., Ivkic G., Hubenstorf M., Marusic A. Virtual dissection: a lesson from the 18th century. *Lancet*. 2003; 362: 2110–2113.
- ¹⁷⁴ Ransohoff R.M., Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol*. 2012; 12: 623–635.
- ¹⁷⁵ Davson H, Segal MB. *Physiology of the CSF and blood-brain barriers*. Boca Raton: CRC Press; 1996.
- ¹⁷⁶ Cserr HF. Role of secretion and bulk flow of brain interstitial fluid in brain volume regulation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1988; 529: 9–20.
- ¹⁷⁷ Weed LH. *Studies on Cerebro-Spinal Fluid*. No. III: The pathways of escape from the Subarachnoid Spaces with particular reference to the Arachnoid Villi. *The Journal of medical research*. 1914; 31(1): 51–91.
- ¹⁷⁸ Louveau A., Smirnov I., Keyes T.J., Eccles J.D., Rouhani S.J., Peske J.D., *et al*. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature*. 2015; 523: 337–341.

-
- ¹⁷⁹ Laman JD, Weller Ro. Drainage of cells and soluble antigen from the CNS to regional lymph nodes. *J Neuroimmune Pharmacol Off J Soc Neuroimmune Pharmacol*. 2013; 8: 840-856.
- ¹⁸⁰ Aspelund A, Antila S, Proulx ST, Karlsen TV, Karaman S, Detmar M, *et al*. A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J Exp Med*. 2015; 212 (7): 991-9.
- ¹⁸¹ Rasmussen MK, Mestre H, Nedergaard M. The glymphatic pathway in neurological disorders. *Lancet Neurol* 2018; 17: 1016–24
- ¹⁸² Kress BT, Iliff JJ, Xia M, *et al*. Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. *Annals of neurology*. 2014; 76 (6): 845–61.
- ¹⁸³ Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen WA *et al*. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Science translational medicine*. 2012; 4(147): 147ra11.
- ¹⁸⁴ Iliff JJ, Chen MJ, Plog BA, Zeppenfeld DM, Soltero M, Yang L, *et al*. Impairment of glymphatic pathway function promotes tau pathology after traumatic brain injury. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*. 2014; 34 (49): 16180–93.
- ¹⁸⁵ Iliff JJ, Lee H, Yu M, Feng T, Logan J, Nedergaard M, *et al*. Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. *The Journal of clinical investigation*. 2013; 123 (3): 1299–309.
- ¹⁸⁶ Iliff JJ, Goldman SA, Nedergaard M. Clearing the mind: Implications of dural lymphatic vessels for brain function. *Lancet Neurol*. 2015; 14 (10): 977–979.
- ¹⁸⁷ Olier-Castillo Doris. Determinaciones en Saliva: método no invasivo atractivo para diagnóstico. *Revista CSV*, 2017; 9 (1): 1-3
- ¹⁸⁸ Sánchez Martínez P. La saliva como fluido diagnóstico. *Ed Cont Lab Clín*; 16: 93 - 108
- ¹⁸⁹ Stewart I, Olesik JW. Steady state acid effects in ICP-MS. *J Anal At Spectrom*. 1998; 13: 1312-20
- ¹⁹⁰ Sánchez-Larsen A, García-García J, Ayo-Martín O, Hernández-Fernández F, Diaz-Maroto I, Fernández-Díaz E, *et al*. ¿Se ha producido un cambio en la etiología del ictus isquémico en las últimas décadas?. Análisis y comparación de una base de datos de ictus actual frente a las históricas. *Neurología* 2018; 33 (6): 369-377
- ¹⁹¹ Foulkes MA, Wolf PA, Price TR, Mohr JP, Hier DB. The stroke data bank: Design, methods and baseline characteristics. *Stroke* 1988; 19: 547-54.
- ¹⁹² Qureshi AI, Tuhrim S, Broderick JP. Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med* 2001; 344 (19): 1450-1460.
- ¹⁹³ García-Cabo C, Benavente L, Martínez Ramos J, Pérez Álvarez A, Trigo A, Calleja S. Analysis of the new code stroke protocol in Asturias after one year. Experience at one hospital. *Neurología*. 2018; 33 (2): 92-97.

-
- ¹⁹⁴ Bivard A, Levi C, Spratt N, Parsons M. Perfusion in acute stroke: a comprehensive analysis of infarct and penumbra. *Radiology*. 2013; 267: 543-50
- ¹⁹⁵ Fiorelli M, Bastianello S, von Kummer R, del Zoppo GJ, Larrue V, Lesaffre E, *et al.* Hemorrhagic transformation within 36 hours of cerebral infarct: relationships with early clinical deterioration and 3-month outcome in the European cooperative acute stroke study (ECASS I) cohort. 1999, *Stroke*; 30: 2280-4
- ¹⁹⁶ Hayashi T, Honda G, Suzuki K. An atherogenic stimulus homocysteine inhibits cofactor activity of thrombomodulin and enhances thrombomodulin expression in human umbilical vein endothelial cells. *Blood* 1992; 79: 2930.
- ¹⁹⁷ Christen WG, Ajavi UA, Glyn RJ, Hennekens CH. Blood levels of homocysteine and increased risk of cardiovascular disease: casual or causal?. *Arch Intern Med* 200; 160: 422
- ¹⁹⁸ Rotzel HB, Serrano A, Aguillon D, Mesejo A, Sanchís C, Rodriguez M, *et al.* Hematoma volumen and other prognostic factors with mortality in spontaneous cerebral hemorrhage. *Intensive care Med exp*, 2015. 3(Suppl 1): A981.
- ¹⁹⁹ Peres-Neto PR, Jackson D, Somers K. How many principal components? Stopping rules for determining the number of non trivial axes revisited. *Computational statistics and data analysis* 49 84): 974-97.
- ²⁰⁰ Mair G, Wardlaw JM. Imaging of acute stroke prior to treatment: current practice and evolving techniques. *Br J Radiol*, 2014; 87 (1040): 2014-0216.
- ²⁰¹ E-Poster Viewing. (2019). *European Stroke Journal*, 4(1_suppl), 150–276.
- ²⁰² O'Donnell MJ, Chin SL, Rangarajan S, Xavier D, Lui L, Zang H, *et al.* Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case control study. *Lancet*. 2016; 388: 761-775.
- ²⁰³ Da Mesquita S, Fu Z, Kipnis J. The meningeal lymphatic system: a new player in neurophysiology. *Neuron*. 2018; 100 (2): 375-88.
- ²⁰⁴ Absinta M, Ha SK, Nair G, Sati P, Luciano NJ, Palioc M, *et al.* Human and non human primate meninges harbor lymphatic vessels that can be visualized noninvasively by MRI. *eLIFE*. 2017; 6: e29738.
- ²⁰⁵ Eide PK, Vatnehol SAS, Emblem KE, Ringstad G. Magnetic resonance imaging provides evidence of lymphatic drainage from human brain to cervical lymph nodes. *Scientific reports*. 2018; 8:7194.
- ²⁰⁶ Leon MJ, Li Y, Okamura N, Tsui WH, Saint Louis LA, Glodzik L, *et al.* Cerebrospinal fluid clearance in Alzheimer disease measured by dynamic PET. *J Nucl Med*. 2017; 58: 1471-76.
- ²⁰⁷ Sandrone S, Moreno-Zambrano D, Kipnis J, van Gijn J. A (delayed) history of the brain lymphatic system. *Nature Med*. 2019; 25 (4): 538-40.

-
- ²⁰⁸ Wageman BA; Klinkenberg S, Postma AA. Teaching neuroimages: swirl sign and spot sign in intraparenchymal hematoma. *Neurology* 2016; 87 (18): e225-e226.
- ²⁰⁹ Altamura C, Squitti R, Pasqualetti P, Gaudino C, Palazzo P, Tibuzzi F, *et al.* Ceruplasmin/transferrin system is related to clinical status in acute stroke. *Stroke* 2009; 40 (4): 1282-8.
- ²¹⁰ Squitti R, Siotto M, Assenza G, Giannantoni NM, Rongioletti M, Zappasodi F, *et al.* Prognostic value of serum copper for post- stroke recovery: a pilot study. *Front Neurol.* 2018; 9:333.
- ²¹¹ Kang UJ, Goldman JG, Alcalay RM, Xie T, Tuite P, Henchcliffe C, *et al.* The BioFIND study: characteristics of a clinically typical Parkinson's disease biomarker cohort. *Mov Disord* 2016; 31 (6): 924-32.
- ²¹² Goldman JG, Andrews H, Amara A, Naito A, Alcalay RN, Shaw LM, *et al.* Cerebrospinal fluid, plasma and saliva in the BioFIND study: relationship among biomarkers and Parkinson's disease features. *Mov Disord.* 2018; 33 (2): 282-88
- ²¹³ Al-Rawi NH, Atiyah KM. Salivary neuron specific enolase: an indicator for neuronal damage in patient with acute stroke and stroke prone patients. *Clin Chem Lab Med.* 2009; 47 (12):1519-24.