

**Facultad de Medicina – Universidad de la República**

**Programa de Investigación Biomédica (ProInBio)**

**Tesis de Doctorado**

**«Respuesta inmune locorregional y sistémica en  
Hemorragia Subaracnoidea Aneurismática  
Aguda»**

**Dr. Leandro Moraes  
Cátedra de Medicina Intensiva  
Hospital de Clínicas**

**DIRECTORES ACADÉMICOS**

**Dr. Alberto Biestro.**

Prof. de la Cátedra de Medicina Intensiva  
Hospital de Clínicas - Facultad de Medicina

**Dra. Sofía Grille.**

Prof. Adj. Depto. Básico de Medicina y  
Prof. Agda. Cátedra de Hematología  
Hospital de Clínicas - Facultad de Medicina

**- Setiembre 2021 -**

**Uruguay**

*A mi amada y paciente esposa Mariana  
y mis queridos hijos, Faustino y Vicente,  
que nacieron con la tesis  
y han crecido a la par de ella.*

## *Muchas Gracias*

A mis tutores, Sofía y el Profesor Biestro.

A Andreina, Natalia y Daniela del LCF.

A Pedro del CTI del Hospital Maciel.

A las Cátedras de Medicina Transfusional y Anestesia.

A mis compañeros del CTI Universitario.

Para realizar esta tesis conté con una beca de Pro.In.Bio.

Este trabajo fue financiado por CSIC y ANII.

# COMUNICACIONES Y PUBLICACIONES

## DERIVADAS DE ESTA TESIS

*Leandro Moraes*, Natalia Trias, Andreina Brugnini, Pedro Grille, Daniela Lens; Alberto Biestro, Sofía Grille. TH17/Treg imbalance and IL-17A increase after severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage. J Neuroimmunol. 2020 Jun 27; 346:577310.

*Leandro Moraes*, Natalia Trias, Andreina Brugnini, Pedro Grille, Alberto Biestro, Daniela Lens, Sofía Grille. Rol de las células T CD4 Th17 y de la IL-17 en la inmunopatogenia de la hemorragia subaracnoidea aneurismática. 64° Aniversario del Hospital de Clínicas Semana Académica 2017. 2do premio en trabajos científicos. Anales de la Facultad de Medicina 2017 (4);2.

*Leandro Moraes*, Natalia Trias, Andreina Brugnini, Pedro Grille, Alberto Biestro, Daniela Lens, Sofía Grille. Activación de la inmunidad innata y adquirida en pacientes con Hemorragia Subaracnoidea Aneurismática. Jornadas rioplatenses de Citometría de Flujo. Buenos Aires. Argentina 2016.

*Leandro Moraes*, Sofía Grille, Paula Morelli, Natalia Trias, Rafael Mila, Andreína Brugnini, Natalia Lluberas, Alberto Biestro, Daniela Lens. Immune cells subpopulations in cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. Springer Plus. 2015 4:195.

*Leandro Moraes*, Sofía Grille, Paula Morelli, Andreina Brugnini, Natalia Trias, Ana I Gruss, Natalia Lluberas, Rafael Mila, Daniela Lens, Alberto Biestro. Immune Cell Subpopulations in CSF and Peripheral Blood of Patients with Subarachnoid Hemorrhage. Neurocritical Care Society Annual Meeting. Denver. USA. 2012. Poster distinguido entre todos los participantes.

# Tabla de contenidos

<b>CAPÍTULO 1. Introducción</b>	<b>13</b>
<b>1. Generalidades sobre HSA aneurismática aguda</b>	<b>13</b>
1.1 Definición y epidemiología	13
1.2 Etiología	13
1.3 Factores de riesgo	14
1.4. Manifestaciones clínicas	15
1.4.1 Breve reseña de la fisiopatología clínica	15
1.4.2 Sintomatología	16
1.5 Diagnóstico del sangrado subaracnoideo y del saco aneurismático	16
1.6 Manejo actual	17
1.6.1 Objetivos terapéuticos y medidas generales	17
1.6.2 Fármacos que han sido estudiados con la finalidad de modular las cascadas injuriantes	19
1.6.3 Fármacos por vía cisternal	22
1.6.4 Medidas terapéuticas no farmacológicas. Drenaje lumbar continuo y controlado	23
1.6.5 Tratamiento precoz del saco aneurismático	24
Impacto de la estrategia terapéutica seleccionada para el tratamiento del aneurisma cerebral sobre la respuesta inmune en HSAa	25
1.7 Complicaciones	25
1.7.1 Vasoespasmo e isquemia diferida	26
1.8 Pronóstico	27
<b>2. Fisiopatología de la HSAa aguda. Injuria encefálica precoz e injuria encefálica diferida</b>	<b>28</b>
2.1 Modelo de isquemia global e injuria por reperfusión	30
2.2 Rol del grupo hemo eritrocitario. Haptoglobina, Hemopexina, Hemo-oxigenasa1. Rol de los productos oxidados de la bilirrubina	31
2.3 Óxido nítrico	33
2.4 Estrés oxidativo-radicales libres	34
2.5 Endotelina-1	35
2.6 Disfunción microcirculatoria y microtrombosis distal: rol de las arteriolas y la microcirculación	35
2.7 Glutamato-Excitotoxicidad	37
2.8 Despolarización cortical propagada	38
2.9 Edema cerebral celular y vasogénico	38
<b>3. Respuesta inmune</b>	<b>39</b>

3.1	Conceptos generales de respuesta inmune innata y adquirida	39
3.1.1	Respuesta Inmune Humoral	47
3.1.2	Respuesta Inmune Celular	48
3.2	Citoquinas	52
3.3	Sistema Neuroinmune	54
3.3.1	Actualización del concepto de inmunoprivilegio del sistema nervioso central	55
3.3.2	Células residentes de la inmunidad innata cerebral	56
3.3.2.1	Microglía	56
3.3.2.2	Astroцитos	57
<b>4.</b>	<b>Rol de la respuesta inmune sistémica en la HSAa</b>	<b>58</b>
<b>5.</b>	<b>Participación de las células del sistema inmune innato en la HSAa</b>	<b>60</b>
<b>6.</b>	<b>Participación de las células del sistema inmune adquirido en la HSAa</b>	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>Citoquinas y otras moléculas biológicamente activas estrechamente relacionadas en HSAa</b>	<b>69</b>
7.1	Evidencia disponible para las citoquinas Proinflamatorias/Th1/Th2/Th17/Treg en HSAa	71
<b><i>CAPÍTULO 2. Objetivos y preguntas de investigación</i></b>		<b>74</b>
2.1	Objetivos Generales	74
2.2	Objetivos específicos	74
2.3	Preguntas de investigación	75
<b><i>CAPÍTULO 3. Materiales y métodos</i></b>		<b>77</b>
3.1	Pacientes y controles	77
3.2	Extracción de las muestras de sangre periférica y líquido cefalorraquídeo	78
3.3	Análisis por Citometría de Flujo de las subpoblaciones celulares	80
3.4	Análisis por Citometría de Flujo de la concentración de citoquinas	87
3.5	Análisis estadístico	88
3.6	Consideraciones éticas	89
<b><i>CAPÍTULO 4. Resultados</i></b>		<b>90</b>
4.1	Características demográficas y clínicas generales	90
4.2	Estudio de la respuesta inmune	91
4.2.1	Leucocitos totales	91
4.2.2	Neutrófilos	92

4.2.3 Monocitos _____	94
4.2.4 Células dendríticas _____	96
4.2.5 Células Natural Killer _____	97
4.2.6 Subpoblaciones linfocitarias _____	99
4.2.6.1 Células T CD4+ Th17 y Tregs _____	101
4.2.6.2 Cédulas T CD4+ Th1 y Th2 _____	103
4.2.6.3 Estado de activación de las células T _____	104
4.2.7 Subpoblaciones celulares y estado de activación según la fase evolutiva, respecto a las variables clínicas de interés _____	110
4.2.7.1 Técnica seleccionada para el tratamiento del saco aneurismático _____	110
4.2.7.2 Gravedad clínica según escala de Hunt y Hess _____	113
4.2.7.3 Escala tomográfica de Fisher _____	115
4.2.7.4 Desarrollo de Vasoespasmo _____	115
4.2.7.5 Mortalidad al alta de la Unidad de Cuidados Intensivos _____	117
<b>4.3 Citoquinas _____</b>	<b>118</b>
4.3.1 Citoquinas en suero y LCR de los pacientes según la fase evolutiva, y en comparación con controles _____	118
4.3.2 Citoquinas en suero y el LCR según la fase evolutiva y las diferentes variables clínicas de interés _____	122
4.3.2.1 Técnica seleccionada para el tratamiento del saco aneurismático _____	122
4.3.2.2 Gravedad clínica según escala de Hunt y Hess _____	122
4.3.2.3 Escala tomográfica de Fisher _____	122
4.3.2.4 Desarrollo de Vasoespasmo _____	122
4.3.2.5 Mortalidad al alta de la Unidad de Cuidados Intensivos _____	124
<b><i>CAPÍTULO 5. Discusión, limitaciones, perspectivas futuras y conclusiones</i></b> _____	<b>126</b>
<b>5.1 Discusión _____</b>	<b>126</b>
<b>5.2 Limitaciones _____</b>	<b>140</b>
<b>5.3 Perspectivas futuras _____</b>	<b>141</b>
<b>5.4 Conclusiones _____</b>	<b>143</b>
<b><i>CAPÍTULO 6. Referencias Bibliográficas</i></b> _____	<b>145</b>

## Tabla de Abreviaturas

AB	arteria basilar
ACI	arteria carótida interna
ACM	arteria cerebral media
AcoA	arteria comunicante anterior
AcoP	arteria comunicante posterior
ACPI	arteria cerebelosa posteroinferior
ACV	ataque cerebrovascular
ADN	ácido desoxirribonucleico
angioTC	angio-tomografía
APCs	antigen presenting cells
BHE	barrera hemato-encefálica
BOXes	productos oxidados de la bilirrubina
CD	antígenos de diferenciación
CDS	sensores de ADN citosólico
CENCs	crisis epilépticas no convulsivas
CLRs	receptores lectina tipo C
CPS	Cerebro Perdedor de Sal
CTQ	citoquina
DAMP	molécula precoz
DAMPs	patrones asociados a peligro
DBI	delayed brain injury
DCs	dendritic cells
DSA	angiografía con sustracción digital
DTC	doppler transcraneal
EEG	electroencefalograma
EM	esclerosis múltiple
ERO	especies reactivas de O <sub>2</sub>
ESbA	espacio subaracnoideo
FSC	Flujo sanguíneo cerebral
GABA	Gamma Amino Butyric Acid

G-CSF	granulocyte colony - stimulating factor
GCS	escala de coma de Glasgow
GOS	Glasgow Outcome Scale
GPx	glutación peroxidasa
GR	glóbulo rojo
H&H	Hunt y Hess
Hb	hemoglobina
HIC	hipertensión intracraneana
HLA	antígenos leucocitarios humanos
HMGB1	High Mobility Group Box-1
HO-1	hemo-oxigenasa 1
Hp	haptoglobina
HSA	hemorragia subaracnoidea
HSAa	hemorragia subaracnoidea aneurismática
IEA	injuría encefálica aguda
IEP	injuría encefálica precoz
KIR	killer inhibitory receptor
KO	ratones knockout
L	lactato
LCR	líquido cefalorraquídeo
LEC	líquido extracelular
LInt	líquido intersticial
LPS	lipopolisacárido
LTP	potenciación a largo plazo
MAVs	malformaciones arteriovenosas
MDC	microdiálisis cerebral
MHC	complejo mayor de la histocompatibilidad
NCR	receptores de citotoxicidad natural
NETs	neutrophil extracellular traps
NIHSS	National Institute of Health Stroke Scale
NK	natural killer
NLCs	nódulos linfáticos cervicales
NLRs	receptores tipo Nod
NMDA	N-metil-D-aspartato

NO	óxido nítrico
P	piruvato
P-CT	TC con perfusión
PAM	presión arterial media
PAMPs	patrones moleculares asociados a patógenos
PbtO <sub>2</sub>	presión tisular de O <sub>2</sub> cerebral
PCor	plexos coroideos
PCR	paro cardiorrespiratorio
PDTC	pyrrolidine dithiocarbamate
PIC	presión intracraneana
PPC	presión de perfusión cerebral
PRR	receptores de reconocimiento de patrones
RL	radicales libres
RLRs	receptores tipo RIG-I
RM	resonancia magnética
SIRS	síndrome de respuesta inflamatoria sistémica
SNC	sistema nervioso central
SOD	superóxido dismutasa
TC	tomografía computada
TCR	T-cell receptor
TLR	receptores tipo Toll
TNF	factor de necrosis tumoral
Treg	célula T reguladora
WFNS	Federación Mundial de Neurocirujanos

## RESUMEN

La hemorragia subaracnoidea aneurismática (HSAa) aguda es una enfermedad que afecta a todas las edades, pero fundamentalmente a mujeres jóvenes en torno a los 50 años. Su impacto individual, familiar y sanitario continúa siendo aún inaceptablemente elevado. Esto se debe, en parte, al conocimiento parcial de los mecanismos injuriantes y reparadores que se desencadenan una vez que el aneurisma se rompe y la sangre arterial se vuelca al espacio subaracnoideo y/o ventricular. La respuesta inmune local y sistémica tiene, potencialmente, un rol protagónico como uno de los principales mecanismos en juego desde los primeros minutos (injurias precoces). Su posible rol como puente o enlace hacia la injuria diferida (vasoespasmos-isquemia) también ha sido postulado. La respuesta innata ha recibido mayor atención (investigación) a la fecha. Sin embargo, la respuesta inmune adquirida también ha captado el interés neurocientífico en los últimos años. No menos importante es la interacción neuro-sistémica que caracteriza a esta enfermedad como una entidad clínica con un impacto multiorgánico precoz. En la presente tesis exploramos tanto la respuesta inmune innata como adquirida. Hicimos énfasis en aquellos efectores celulares más importantes y lo complementamos con el análisis de las citoquinas relacionadas y aquellas variables clínicas de interés tales como severidad del sangrado, vasoespasmos, mortalidad y con la técnica seleccionada para el tratamiento del saco aneurismático. Los resultados encontrados son originales, en algunos casos, mientras que otros corroboran hechos ya conocidos, típicos de la enfermedad. Entre los mismos destacamos que la muestra de pacientes enrolados padeció una HSAa aguda grave tanto desde el punto de vista clínico (pobre grado clínico) como tomográfico (abundante sangre volcada al espacio subaracnoideo). En estas condiciones, observamos una hiperleucocitosis con un aumento de los neutrófilos con un mayor estado de activación, particularmente a nivel del LCR. Concomitantemente aumentaron los monocitos totales y sus subpoblaciones a nivel de la sangre periférica. Por otra parte, tanto las células dendríticas como Natural Killers disminuyeron a nivel de la sangre periférica. Particularmente interesante e intrigante resultó ser la objetivación del predominio en LCR de la subpoblación NK CD56<sup>brigh</sup> CD16<sup>-</sup>. Con respecto al análisis de los linfocitos y subpoblaciones, observamos un descenso relativo de los mismos a nivel de la sangre periférica, pero no a nivel del LCR. Sin duda alguna, entre los hallazgos originales más atractivos desde un punto de vista patogénico, se encuentran los referentes a las

variaciones de las subpoblaciones de células T CD4+ y CD8+ y su mayor estado de activación tanto a nivel de la sangre periférica como del LCR. Pero, además, detectamos un desbalance proinflamatorio del eje Th17/Treg (aumento del cociente) tanto a nivel de la sangre periférica como del LCR. Concomitantemente, la IL-17A aumentó en ambos compartimentos y su incremento a nivel de la sangre periférica en la etapa precoz se asoció al desarrollo ulterior de vasoespasma y mayor mortalidad. Las restantes citoquinas analizadas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ ) también se incrementaron significativamente tanto a nivel de la sangre periférica como del LCR, pero su incremento no se asoció estadísticamente con ninguna de las variables clínicas de interés mencionadas. Con respecto al posible impacto de la estrategia terapéutica seleccionada para el tratamiento del saco aneurismático sobre la respuesta inmune precoz y diferida, encontramos resultados potencialmente opuestos en las subpoblaciones Th1/Th2 a nivel del LCR, pero sin una asociación estadísticamente significativa con el perfil de citoquinas secretadas a dicho nivel.

En suma, hemos demostrado, al igual que diversos investigadores alrededor del mundo, que la respuesta inmune innata tiene un papel protagónico en esta patología. Además, con el estudio del estado de activación hemos jerarquizado el rol de la respuesta inmune adaptativa CD4+ y CD8+. Postulamos al desbalance proinflamatorio del eje Th17/Treg como un potencial jugador patogénico clave y proponemos a la IL-17A como un prometedor biomarcador precoz de mayor morbimortalidad. Sin duda alguna, nuevas estrategias de investigación, experimental y clínica, podrán eventualmente, confirmar nuestros alentadores resultados preliminares comentados.

# CAPÍTULO 1. Introducción

## 1. Generalidades sobre HSA aneurismática aguda

### 1.1 Definición y epidemiología

La hemorragia subaracnoidea (HSA) o hemorragia meníngea se define por el volcado de sangre en el espacio subaracnoideo o leptomeníngeo. La incidencia anual se encuentra entre 4-15 casos/100.000 hab./año y representa alrededor del 5 % de los ataques cerebrovasculares (ACV)<sup>1</sup>. A pesar de una incidencia inferior respecto a la patología cerebrovascular isquémica, dado que afecta predominantemente a individuos jóvenes en torno a los 55 años, su impacto en términos económicos y sociales es abrumador y mayor que el ACV isquémico<sup>2</sup>.

Se trata de una patología cerebrovascular aguda, grave y devastadora, dado que un alto porcentaje de pacientes (10-15 %) fallecen antes de recibir asistencia médica, y de los que logran acceder al sistema de salud, aproximadamente un 25 % fallece en las primeras 24 horas. La mortalidad dentro de los primeros 30 días es aproximadamente del 40 %. El impacto en la morbilidad es también elevado, ya que solo el 15-20 % pueden retornar a una vida normal sin secuelas físicas o neurocognitivas<sup>3</sup>. No encontramos datos epidemiológicos de nuestro país de morbimortalidad, a corto y largo plazo, publicados en revistas arbitradas nacionales o internacionales en los últimos 20 años. El único reporte que describe datos de complicaciones y mortalidad al alta de la unidad de cuidados intensivos del Hospital Maciel fue realizado por Grille P. y colaboradores y publicado en la Revista Médica del Uruguay en 2001<sup>4</sup>.

### 1.2 Etiología

La etiología más frecuente de una HSA es el traumatismo encefalocraneano (HSA traumática). Nosotros haremos referencia a la HSA espontánea no traumática. La misma, en un 85 % de los casos es consecuencia de la ruptura de un aneurisma intracraneano (HSA aneurismática - HSAa)<sup>3</sup>.

Los aneurismas cerebrales se desarrollan en zonas debilitadas y/o sometidas a estrés hemodinámico de la pared de una arteria cerebral<sup>5,6</sup>. Su más temida complicación constituye su ruptura y HSA resultante. En función de su morfología, hay distintos tipos de aneurismas intracraneanos: 1) saculares (tema de nuestro proyecto): forma globular, cuello y domo definidos y 2) fusiformes, menos comunes, que adoptan una forma circular y carecen de cuello y domo. La localización más común es la circulación cerebral anterior o carotídea (80-90 %), en las bifurcaciones (zonas de mayor estrés hemodinámico). Las localizaciones más frecuentes son en la unión de la arteria carótida interna (ACI) - arteria comunicante posterior (ACoP) (38 %) y en la arteria comunicante anterior (ACoA) (36 %). El restante 20 % se localiza en la bifurcación o trifurcación de la arteria cerebral media (ACM). Finalmente, un 10-20 % tiene su origen en la circulación posterior, con mayor frecuencia en la bifurcación de la arteria basilar (AB) y la arteria cerebelosa posteroinferior (ACPI)<sup>7</sup>.

La HSA espontánea puede tener su origen etiológico (no aneurismático) en otras patologías (10-20 %): malformaciones arteriovenosas (MAVs), extensión de un hematoma intraparenquimatoso, hemorragia de origen tumoral, disección arterial, aneurismas micóticos, abuso de drogas (usualmente cocaína), trastornos de la coagulación, trombosis venosa cerebral y vasculitis del sistema nervioso central. Finalmente, en aproximadamente 15-20 % no se encuentra la causa del sangrado, constituyendo este grupo la HSA peri-mesencefálica; su origen es desconocido, pero se plantea un sangrado venoso. Su diagnóstico se apoya en una o dos arteriografías negativas para aneurismas<sup>8,9</sup>.

### 1.3 Factores de riesgo

La patogenia de los aneurismas saculares es compleja y multifactorial. Se producen por una debilidad de la pared arterial. Esa debilidad puede deberse a defectos congénitos estructurales, hereditarios, con trastorno de los tejidos conjuntivos, a variedades anatómicas que hacen que exista un flujo anormalmente alto en un punto determinado (habitualmente se producen en las bifurcaciones o en los orígenes de las divisiones de un tronco principal) y a factores ambientales o tóxicos (tabaco, cocaína). El estrés hemodinámico sobre la pared arterial genera desgaste de la lámina elástica interna, razón por la que los aneurismas son más frecuentes en los vasos intracraneanos que en los

extracraneanos, dado que, en los primeros, la túnica media se encuentra adelgazada y no existe la lámina elástica externa<sup>5,6,10</sup>.

En patologías específicas como el síndrome de Ehlers-Danlos y la poliquistosis renal, entre otros, el rol de los factores genéticos es preponderante. El mecanismo por el cual las enfermedades del tejido conectivo predisponen a la formación y crecimiento de los aneurismas está en relación con una debilidad de la pared vascular. En la poliquistosis renal, la hipertensión puede contribuir con la formación y crecimiento de los aneurismas (en general múltiples)<sup>11-13</sup>.

Adicionalmente, es conocida la mayor predisposición familiar (de primer grado especialmente) aun en ausencia de un síndrome hereditario. La existencia de dos o más familiares de primer grado portadores de aneurismas intracraneanos obliga al *screening* de todos los miembros de la familia (OR50). En caso de un solo miembro portador de aneurismas (OR 2), el *screening* es controvertido y no es práctica habitual realizarlo<sup>14</sup>.

Otros factores de riesgo importantes incluyen: tabaquismo, hipertensión arterial, consumo de drogas, deficiencia de estrógenos<sup>15-17</sup>.

## 1.4. Manifestaciones clínicas

### 1.4.1 Breve reseña de la fisiopatología clínica

Cuando se produce la ruptura aneurismática, irrumpe sangre arterializada a alta presión en el espacio subaracnoideo, lo que provoca un aumento brusco del volumen intracraneal. La velocidad de instalación de esta entidad es tan rápida que no permite una compensación eficaz, por lo que rápidamente sobreviene una elevación brusca de la presión intracraneana (PIC). La hipertensión intracraneana (HIC) puede acercarse o igualar a los valores de presión arterial media (PAM) con la consiguiente caída de la presión de perfusión cerebral (PPC) hasta valores cercanos a cero; esta caída de la PPC equivale a una «detención circulatoria cerebral» (isquemia global – similar al paro cardiorrespiratorio), la cual puede deparar efectos deletéreos sobre el encéfalo (secundarios a la isquemia global) pero puede, a la vez, facilitar la detención del sangrado (debido a la anulación de la presión transaneurismática). Esta, seguida por una respuesta de los mecanismos compensadores cerebrales con hipertensión arterial, puede restablecer

la hemodinámica cerebral, mecanismo por el que el paciente logra sobrevivir al sangrado<sup>18</sup>.

#### 1.4.2 Sintomatología

Los signos y síntomas aparecen de forma brusca en un individuo sin alteraciones neurológicas previas. La cefalea se describe como una sensación de estallido (si aún mantiene lucidez, el paciente cuenta que algo se rompió o rajó dentro de su cabeza, y no tiene duda de que ha sufrido la peor cefalea de su vida). Posteriormente, con frecuencia refiere nuchalgia y fotofobia-acusofobia. Frecuentemente se acompaña de náuseas y vómitos. Esta cefalea puede ir acompañada de alteraciones de la vigilia-conciencia, desde un cuadro confusional agudo hasta el coma profundo. Aproximadamente en la mitad de los casos existe una pérdida transitoria de la conciencia al inicio del cuadro (síncope). Puede asociar alteraciones de los nervios craneales u otra focalidad neurológica sensitivo-motora (cuando el sangrado se extiende al parénquima cerebral). En ocasiones, el paciente o familiar recuerda en los días previos una cefalea inusual, no presente previamente, leve a moderada, que se denomina «cefalea centinela» y marca el sufrimiento aneurismático (epistaxis cerebral). En el sector meníngeo la rigidez de nuca reafirma el planteo clínico; sin embargo, en pacientes en coma profundo, la rigidez puede faltar. Las crisis epilépticas no son infrecuentes y se reportan frecuencias variables de presentación que van desde 4 a 30 %<sup>3,19,20</sup>.

Para la valoración de la gravedad clínica, hoy día las escalas más ampliamente difundidas son la de Hunt y Hess (H&H) y la propuesta por la Federación Mundial de Neurocirujanos (WFNS), basadas en la escala de coma de Glasgow (GCS)<sup>3,21</sup> (Anexo 1).

### 1.5 Diagnóstico del sangrado subaracnoideo y del saco aneurismático

El diagnóstico de HSA se establece sobre la base de un cuadro clínico compatible, junto a la demostración de la presencia de sangre en el espacio subaracnoideo.

El estudio de elección es la tomografía computada (TC) simple de cráneo, cuya sensibilidad se encuentra entre el 98 y el 100 % en las primeras 24 horas, disminuyendo

paulatinamente en los días subsiguientes a medida que la sangre se va lisando y se vuelve isodensa con el parénquima cerebral. A los tres días, la sensibilidad baja a 80 %, a los cinco días a 70 %, a la semana a 50 % y a las dos semanas a 30 %. Teniendo en cuenta la distribución y la cantidad de sangre volcada al espacio subaracnoideo y sistema ventricular en la TC, se puede clasificar la HSA según la escala de Fisher<sup>22</sup>. La punción lumbar se reserva para pacientes cuya presentación clínica evoque una HSA y cuya TC craneal sea negativa, dudosa o técnicamente inadecuada <sup>3,23,24</sup>.

El segundo aspecto a tener en cuenta, cuando se ha diagnosticado una HSA, es el origen de misma. Para la detección de un aneurisma intracraneano, el estudio de elección es la angiografía con sustracción digital (Digital Subtraction Angiography- DSA) que tiene una sensibilidad y especificidad cercanas al 100 %. Sin embargo, últimamente, la angio-tomografía (angioTC) ha ganado terreno en este ámbito diagnóstico, dada su amplia disponibilidad. La misma cuenta con una sensibilidad diagnóstica global de 70 %, siendo su punto débil los aneurismas menores a 5 mm (sensibilidad 57 %) <sup>3,25</sup>.

## 1.6 Manejo actual

A continuación, describimos en forma resumida los principales lineamientos terapéuticos actuales recomendados por las principales sociedades científicas del mundo <sup>3,26,27</sup>.

### 1.6.1 Objetivos terapéuticos y medidas generales

Los objetivos terapéuticos en un paciente que presenta una HSA son: estabilización y medidas generales, tratamiento precoz (quirúrgico o endovascular) del saco aneurismático con la finalidad de prevenir el resangrado, prevención de las complicaciones e inicio precoz de la rehabilitación neurocognitiva y motora.

*Estabilización del paciente:* La HSAa es una emergencia y el manejo se rige por los principios básicos del A-B-C-D. A: asegurar una vía aérea permeable y considerar la necesidad de intubación orotraqueal. B: Asegurar una adecuada ventilación pulmonar simétrica. C: Asegurar una adecuada hemodinamia sistémica: D: abordaje y resolución del compromiso neurológico-neurodeterioro.

*Medidas generales:* Estas incluyen reposo físico y psíquico, analgesia, hidratación y fluidoterapia (euvolémica), control de la glicemia, control térmico, asegurar disponibilidad de oxígeno optimizando el nivel de hemoglobina (Hb) en torno a 10gr/dL y una Presión arterial de oxígeno (PaO<sub>2</sub>) entrono a 150 mmHg.

En centros donde se monitoriza la presión tisular de O<sub>2</sub> cerebral (PbtO<sub>2</sub>) y/o emplean microdiálisis cerebral (MDC), que permite monitorear lactato (L), piruvato (P), cociente L/P y glucosa a nivel del parénquima cerebral (entre otras sustancias), los niveles de Hb (restringir las transfusiones de glóbulos rojos) y PaO<sub>2</sub> pueden ajustarse a este monitoreo e individualizarse paciente a paciente<sup>21,28</sup>.

### **Profilaxis de las complicaciones más frecuentes**

Se realiza prevención de la enfermedad tromboembólica venosa mediante compresión neumática intermitente de miembros inferiores y, luego de la exclusión del aneurisma eventual, con el uso de heparina de bajo peso molecular.

Se realiza profilaxis de isquemia diferida con Nimodipina enteral a 60 mg cada 4 horas hasta completar 21 días (desde el sangrado). Este ha sido el único fármaco que ha demostrado utilidad, dado que mejora los resultados clínicos. La Nimodipina disminuye de forma estadísticamente significativa la isquemia diferida. Su eficacia, cuando se administra por vía intravenosa, no está bien establecida y puede producir hipotensión arterial. Si bien su mecanismo de acción no ha sido aun completamente dilucidado, sabemos que con la dosis enteral mencionada no es capaz de revertir el vasoespasmo. Por lo tanto, se especula con otras hipótesis, planteándose un posible efecto neuroprotector sobre las células isquémicas, mediado por la disminución del influjo de calcio al espacio intracelular.

En pacientes graves, en nuestro centro, en el cual no contamos con electroencefalograma (EEG) continuo (más allá de 24 horas), se realiza profilaxis de las crisis epilépticas precoces. Se indica levetiracetam por 5 a 7 días.

Finalmente, se indica profilaxis de las úlceras de estrés en base al uso de nutrición enteral precoz e inhibidores de la bomba de protones (ej. omeprazol) o antagonistas de los receptores H<sub>2</sub> de la histamina (ej. ranitidina).

## 1.6.2 Fármacos que han sido estudiados con la finalidad de modular las cascadas injuriantes

Entre las principales vías injuriantes planteadas en este escenario destacamos:

1. Modelo de isquemia global e injuria por reperfusión;
2. Rol del grupo hemo eritrocitario. Haptoglobina, Hemopexina, Hemo-oxigenasa1.  
Rol de los productos oxidados de la bilirrubina;
3. Óxido nítrico;
4. Estrés oxidativo-Radicales Libres;
5. Endotelina-1;
6. Disfunción microcirculatoria y microtrombosis distal: rol de las arteriolas y la microcirculación;
7. Glutamato-Excitotoxicidad;
8. Hipomagnesemia;
9. Despolarización cortical propagada;
10. Edema cerebral;
11. Apoptosis;
12. Respuesta inmune locorregional y sistémica.

En las últimas décadas, se ha hecho un gran esfuerzo para tratar de modular la/s vía/s mencionadas. Y aun cuando los resultados clínicos no han mejorado todo lo que se esperaba, nuevos lineamientos de investigación han surgido. Entre estos se destaca, enmarcado dentro del concepto de Injuria Encefálica Precoz (que analizaremos en profundidad más adelante), la respuesta inmune locorregional/neuroinflamación.

En la Tabla 1 mencionamos algunos fármacos que, apoyados en resultados alentadores en investigación experimental, se ensayaron en proyectos de investigación clínica y, lamentablemente, no lograron reproducir los resultados favorables.

<b>Fármaco</b>	<b>Mecanismo de acción buscado</b>	<b>End-points evaluados</b>	<b>Resultado</b>	<b>Observaciones</b>	<b>Referencias</b>
<b>Estatinas</b>	Anti-inflamatorio, antiagregante, antioxidante y vasomotor	isquemia – infarto diferido, morbimortalidad, seguridad y complicaciones de las drogas	Sin mejorías	Existen estudios clínicos entre los cuales ha participado el CTI del Hospital de Clínicas y varios metaanálisis.	29–32
<b>Sulfato de Magnesio</b>	Vasodilatador y neuroprotector	Isquemia-infarto diferido, morbimortalidad, seguridad y complicaciones de las drogas	Sin mejorías	Estudio fase III Intravenous Magnesium sulphate for Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage (IMASH) y varios metaanálisis	33,34
<b>Clazosentan</b>	Antagonistas del receptor de la endotelina (inhibidor selectivo del receptor de endotelina – 1).	Vasoespasma angiográfico y clínico, seguridad y complicaciones de las drogas	Sin mejorías	Estudios CONSCIOUS-1, CONSCIOUS-2 y CONSCIOUS-3 y varios metaanálisis	35-39
<b>Fasudil</b>	vasodilatador cerebral anti-inflamatorio	Vasoespasma, déficit motor, hidrocefalia, convulsiones, seguridad y complicaciones de las drogas	Mejora déficit motor	Sugerido por las guías clínicas en Japón. Hay estudios en curso para confirmar estos resultados.	40-43
<b>Tirilazad y Nicaraven</b>	Antioxidantes, anti-radicales libres	Muerte, déficits neurológicos, isquemia diferida (vasoespasma), infarto, seguridad y complicaciones de las drogas	Sin mejorías		44-46

<b>Eritropoyetina</b>	Efectos neuroprotectores-reparadores, antiinflamatorios	Isquemia-infarto diferido, morbimortalidad, seguridad y complicaciones de las drogas	Sin mejorías		47-50
<b>Cilostazol</b>	Antiagregante y vasodilatador. Inhibición selectiva de la fosfodiesterasa III, elevando los niveles de monofosfato de adenosina cíclico.	Isquemia-infarto diferido, morbimortalidad, seguridad y complicaciones de las drogas	Reducción de vasoespasmos sintomáticos y mejoría de resultados neurológicos. No existió aumento de sangrado	Es necesario contar con resultados de estudios con mayor n de pacientes y multicéntrico para confirmar resultados preliminares.	51-52
<b>Enoxaparina</b>	Antiinflamatorio	isquemia-infarto diferido, morbimortalidad, seguridad	Menores tasas de vasoespasmos e hidrocefalia.	Bajo n de pacientes; se requieren más estudios	53-55
<b>Metilprednisolona</b>	Esteroides con efecto predominante mineralocorticoide. Anti-inflamatorio.	isquemia-infarto diferido, morbimortalidad, seguridad y complicaciones de las drogas	Escasa mejoría de pronóstico funcional no atribuible a mejoría de vasoespasmos	Se requieren más estudios para corroborar este efecto.	56

**Tabla 1.** Principales fármacos testados a la fecha en investigación experimental y/o clínica cuyos resultados no tuvieron el impacto beneficioso buscado

### 1.6.3 Fármacos por vía cisternal

Con esta vía directa al espacio subaracnoideo se accede al lugar donde ocurren gran parte de las cascadas injuriantes que se gatillan inmediatamente posterior al sangrado, y desde ese lugar promueven la injuria encefálica precoz y diferida. Por otra parte, concomitantemente, se evitan los posibles efectos sistémicos deletéreos que pueden ocurrir con la administración intravenosa sistémica de los fármacos potencialmente beneficiosos. Sin embargo, puede favorecer las complicaciones infecciosas locales, dado que se debe manipular (infundir), a través de catéteres a dicho nivel (meningitis). A lo largo de los años, fundamentalmente drogas trombolíticas (alteplase o uroquinasa) o vasodilatadoras (calcio-antagonistas, incluido el sulfato de magnesio, el nitroprusiato de sodio, la milrrinona, entre otros), con diferentes objetivos, han sido testeadas. Los primeros, con la finalidad de facilitar el clearance del LCR (sanguinolento) y, los segundos, para contrarrestar el componente reversible-espástico del estrechamiento de la luz arterial (vasoespasma) que ocurre, típicamente, a nivel del polígono de Willis o sus ramas proximales<sup>57,58</sup>.

Con este fundamento, por años se ha implementado en Japón la terapia de lavado cisternal (cisternal washing therapy). La misma implica la administración de trombolíticos locales (uroquinasa) y la aplicación de movimientos alternantes de la cabeza (head-shaking method), bajo estricto monitoreo de la presión intracraneana. Los movimientos se ejercen a través de un dispositivo diseñado específicamente para ese fin (Neuroshaker, disponible comercialmente). Se realizan movimientos lentos, suaves y constantes (ej. 1 ciclo/segundo) de la cabeza, por períodos más o menos prolongados que alternan con periodos de quietud. Posteriormente, se «lava» (drena) el LCR sanguinolento. Con este protocolo, Kawamoto y colaboradores reportaron interesantes resultados que comprenden la disminución del vasoespasma, la isquemia diferida y mejores resultados funcionales, especialmente en los pacientes con clínica de severidad (H&H IV) y abundante sangre subaracnoidea (Fisher 3). Sin embargo, existe riesgo hemorrágico por el trombolítico intracisternal (hasta 70 % en otras series con rTPA) y, por los movimientos de la cabeza, se reportó edema cerebral. De forma tal que la seguridad de la terapia combinada mencionada aún no está probada, hecho que ha detenido su uso extendido<sup>59,60</sup>.

Además, otros fármacos han sido explorados, principalmente vasodilatadores arteriales como los calcio-antagonistas: la nicardipina, la nimodipina y el verapamilo. La nicardipina se testeó en un estudio aleatorizado, doble ciego, fase II. A un grupo de pacientes con HSAa grave se les colocó implantes de liberación prolongada de nicardipina en la vecindad de las cisternas basales en el momento del clipado quirúrgico. El grupo con nicardipina presentó menor incidencia de vasoespasmo angiográfico (7 frente a 73 % en controles) y de isquemia diferida en TC craneal (14 frente a 47 %). De igual manera, se observó una mejor evolución funcional medida con la escala de Rankin modificada, mejor situación clínica en función de la escala NIHSS, y una menor mortalidad (38 frente a 6 %). Sin embargo, a pesar de esta serie de beneficios referidos, en un nuevo estudio realizado por los mismos autores en el que se analizó la calidad de vida de los pacientes un año después de la HSA, no se apreció que esta fuera mejor en el grupo tratado con nicardipina, estando más relacionada con la gravedad de la propia hemorragia. Más estudios son necesarios para poder definir mejor el lugar de los implantes cisternales liberadores de fármacos vasodilatadores en este escenario. Podrá ser, además, en combinación con fármacos fibrinolíticos que aseguren una adecuada circulación del LCR<sup>61,62</sup>.

#### 1.6.4 Medidas terapéuticas no farmacológicas. Drenaje lumbar continuo y controlado

El objetivo primario es «lavar» el LCR sanguinolento, que contiene a los principales mediadores humorales y celulares responsables de la injuria encefálica precoz y diferida (que incluye al vasoespasmo)<sup>63</sup>.

Recientemente, basado en los resultados positivos de estudios realizados con drenaje lumbar para la profilaxis del vasoespasmo e isquemia diferida (morbilidad), se opta por la colocación (tunelizada) sistemática en pacientes con HSAa con una escala de Fisher 3-4 fundamentalmente. En el Hospital Universitario, el drenaje permanece abierto con la finalidad de extraer LCR a un ritmo entre 5-10 mL/hora. Concomitantemente se realiza un estricto monitoreo clínico-tomográfico de la herniación descendente. Entre el 3° y el 7° día se lo retira. La complicación infecciosa, claramente menor que para los catéteres ventriculares, no resulta clínicamente relevante (estadísticamente no significativa). Los resultados sobre la mortalidad son menos convincentes<sup>64-67</sup>.

### 1.6.5 Tratamiento precoz del saco aneurismático

El objetivo final del tratamiento del saco aneurismático es lograr, con su oclusión, excluirlo de la circulación cerebral conservando la arteria que le dio origen y la circulación distal a la misma. Con esta medida se previene el resangrado que muchas veces resulta mortal o agrega mayor morbilidad. Adicionalmente, se accede a una situación de mayor seguridad para afrontar la siguiente etapa de riesgo potencial de desarrollo de vasoespaso cerebral<sup>3,26</sup>.

La cirugía ha sido por años el pilar del tratamiento. Sin embargo, las técnicas endovasculares han tomado cada vez mayor importancia. La introducción a principios de los años 90 de las técnicas endovasculares para tratamiento de los aneurismas con coils (de platino), y su perfeccionamiento a lo largo de estos años, ha significado un avance en esta área. Hoy en día, aunque el debate continúa («coil vs clips»), es claro que existen pacientes candidatos, de elección, a una técnica y a otra. Para algunos expertos, si el aneurisma es pasible de tratamiento endovascular, esta debería ser la técnica empleada. Para otros, esto no se cumple. Y la evidencia no ha terminado de dilucidar esta controversia<sup>68,69</sup>.

En términos generales, el tratamiento endovascular no está indicado o sus resultados son inferiores en aneurismas con cuello ancho (se define cuello ancho aquel mayor de 4 mm o bien una relación entre el cuello y el diámetro del saco mayor a 2); concomitancia lesional con hematomas intraparenquimatosos que requieran evacuación quirúrgica urgente; aneurismas gigantes (>25 mm) y grandes de fácil acceso neuroquirúrgico en circulación anterior, aneurismas de la ACM y aneurismas menores de 2 mm<sup>68,69</sup>.

Las indicaciones principales del tratamiento endovascular son, por lo tanto: dificultad quirúrgica y aneurismas complejos con alto riesgo quirúrgico, pobre grado clínico neurológico (H&H IV-V), lábil estabilidad clínica general (sistémica), aneurismas de circulación posterior, vasoespaso al momento del tratamiento del saco y rechazo de la neurocirugía<sup>68,69</sup>.

En cuanto al «timing» del tratamiento, el mejor momento es en las primeras 24-48 horas tras el sangrado, pero remarcamos que debe ser tan precoz como sea posible<sup>3</sup>. La controversia aparece en el caso de los pacientes que ingresan con pobre situación neurológica (H&H IV-V); hoy en día se recomienda un manejo agresivo inicial, en contra de las series antiguas (décadas atrás, sin el conocimiento y la disponibilidad de las

unidades de neuro-intensivismo actuales) que preconizaban el manejo conservador, ya que se ha demostrado una mejor evolución final, con una buena recuperación o discapacidad leve en un 20-40 % de los pacientes tratados de este modo<sup>26,70</sup>.

### Impacto de la estrategia terapéutica seleccionada para el tratamiento del aneurisma cerebral sobre la respuesta inmune en HSAa

**Por el momento, desconocemos si la estrategia terapéutica seleccionada para el tratamiento del aneurisma impacta o no sobre la respuesta inmune gatillada por la propia noxa encefálica.** Por lo tanto, este punto no se tiene en cuenta al momento de seleccionar una u otra opción terapéutica. Sin embargo, indirectamente existen dos situaciones en las cuales el equipo médico-quirúrgico, sin mencionar abiertamente a la respuesta inmune local (neuroinflamación) y sistémica en la toma de las mejores decisiones para un paciente individual, pone en consideración aspectos claramente relacionados con la misma:

- los pacientes más graves e inestables desde el punto de vista neurológico y sistémico serán candidatos a la técnica menos invasiva. Se presume que la neuroanestesia y la neurocirugía (abierto-clipado aneurismático) configuran un mayor estrés quirúrgico<sup>26,71,72</sup>.
- los pacientes que se presentan con vasoespasmos al momento de la consulta serán candidatos al tratamiento endovascular (coiling aneurismático). Una vez más, se asume que la neurocirugía (clips) conlleva mayor trauma quirúrgico y, por lo tanto, conlleva mayor riesgo de infarto cerebral debido a la agravación del vasoespasmos<sup>26,71,72</sup>.

De encontrarse diferencias, quizá una determinada opción terapéutica futura (inmunomoduladora) podría aplicarse a un caso y no a otro.

## 1.7 Complicaciones

Luego de una HSAa, ocurren numerosas complicaciones que se pueden clasificar en neurológicas y extraneurológicas. Dentro de las primeras se encuentran, clásicamente, el vasoespasmos, el resangrado y la hidrocefalia. Entre las extraneurológicas se destacan la

cardiopatía catocolaminérgica y las disnatremias. Dado que la complicación estudiada en la presente tesis en relación con la respuesta inmune es el vasoespasmo, realizaremos algunas precisiones con respecto al mismo.

### 1.7.1 Vasoespasmo e isquemia diferida

El vasoespasmo se define por el estrechamiento de la luz (mayor a 25 %) de las arterias intracraneales. Por lo tanto, se diagnostica con una arteriografía con sustracción digital (DSA), angioTC o angioRM. También se acepta el diagnóstico sonográfico, y recientemente el empleo de la TC de perfusión (P-CT)<sup>74-77</sup>.

Ocurre a nivel de las principales ramas del polígono de Willis. Se relaciona con la cantidad de sangre volcada al espacio subaracnoideo, por lo que numerosas escalas se han diseñado para valorar su riesgo. Entre ellas destacamos la escala de Fisher, Fisher modificada y la de Hijdra<sup>22,78</sup>.

Se trata de un evento fisiopatológico «tardío, o mejor dicho diferido» que aparece entre el 4º y el 14º día (hasta el día 21), con un pico de incidencia al 7º día (injuria encefálica diferida, para diferenciarla de la injuria encefálica precoz). Su frecuencia varía según el método diagnóstico seleccionado para su estudio. El vasoespasmo angiográfico tiene una frecuencia de 60-70 %, el detectado mediante doppler transcraneano del 50-60 %, y el sintomático de 20 a 30 %. En este último caso, la isquemia-infarto cerebral ocurren como consecuencia directa del vasoespasmo<sup>73,76,77</sup>.

Como mencionamos previamente, la cantidad de sangre y su distribución se relacionan con la localización y la gravedad del vasoespasmo. Así, y según la clasificación de Fisher, el grado 3 es el que presenta con mayor frecuencia y gravedad esta complicación, con una mayor incidencia de déficits isquémicos. Para los grados II y IV la frecuencia es intermedia y, finalmente, baja para el grado I. Otros factores que aumentan el riesgo son la edad (jóvenes), la mala situación neurológica (H&H IV – V), la hiperglucemia y el tabaquismo y su abstinencia<sup>22,79-81</sup>.

El desarrollo de un nuevo déficit focal (diferido, no presente previamente), no explicable por la hidrocefalia o el re-sangrado, es el primer potencial síntoma objetivo de vasoespasmo. Por otra parte, el vasoespasmo puede aparecer sin síntomas (focales) evidentes en pacientes comatosos y ser causa de isquemia e infarto cerebral. Por ello, la

sospecha debe ser mayor en pacientes con pobre grado clínico (H&H IV-V); además, estos pacientes tienen más riesgo de presentar vasoespasmos<sup>82-84</sup>.

Clínicamente su manifestación depende del territorio encefálico comprometido (nuevo síndrome focal neurológico), pero también se sospecha su desarrollo ante aumentos inexplicables de la presión arterial y/o la aparición de trastornos hidroelectrolíticos, principalmente la instalación de una poliuria inapropiada con o sin hiponatremia acompañante (al inicio), clásicamente un Cerebro Perdedor de Sal (CPS). Con cierta frecuencia se acompaña de hipertermia/ fiebre con biomarcadores infecciosos bajos (ej. procalcitonina). Generalmente es de comienzo gradual y a veces fluctuante, y suele durar algunos días. Dentro de los estudios complementarios mencionados, el DTC es útil como método de *screening*, especialmente cuando se hace desde las primeras 48 horas con seguimiento posterior cada 24-48 horas. En pacientes con un doppler compatible, es usual continuar con una TC con angiografía y perfusión. Esta última nos permite evaluar el parénquima cerebral y mostrarnos un área con isquemia reversible (no infartada), aún con una TC simple normal<sup>75,76,85</sup>.

En cuanto al tratamiento del vasoespasmos que genera isquemia y nuevo déficit neurológico y/o área de isquemia reversible en la tomografía/resonancia, radica en dos posibles medidas principales: 1) hipertensión arterial euvolumica inducida y 2) abordaje endovascular del vaso culpable: infusión intra-arterial de vasodilatadores o terapia mecánica mediante angioplastia con balón<sup>3,86-89</sup>.

Aclaremos que el vasoespasmos radiológico (la mayoría), que no genera isquemia (evidenciable por la clínica y/o imagenología y/o por el neuromonitoreo en pacientes en coma) no requiere tratamiento específico<sup>3</sup>.

## 1.8 Pronóstico

La mortalidad de los pacientes con HSAa que llegan al hospital es de 20-40 % a los 6 meses y un porcentaje en torno al 15-25 % queda con secuelas neurocognitivas y psicológicas graves<sup>3,90,91</sup>.

Existen diversos factores que influyen en el pronóstico final, destacando la gravedad del sangrado inicial y la edad avanzada. En torno al 20-40 % de los pacientes ingresan con un pobre grado clínico definido por los subgrupos IV-V en las escalas de H&H y la escala de la WFNS. El manejo de este subgrupo de pacientes es controvertido, ya que el

tratamiento quirúrgico se asocia con una elevada mortalidad situada en torno al 60 %, pero también ha quedado claro que sin tratamiento el 90 % fallece. Por lo tanto, aun cuando se recomienda evaluar caso a caso, el concepto general que hoy prima entre los expertos, es ofrecer tratamiento completo inicial (2º-4º día) y revalorar<sup>92,93</sup>.

Los factores relacionados con la localización y morfología del aneurisma responsable del sangrado y que influyen en el pronóstico son: el tamaño y morfología del aneurisma, así como su localización, de tal forma que los aneurismas de circulación posterior conllevan un peor pronóstico<sup>94</sup>.

Como hemos mencionado previamente, la introducción de la neurorradiología intervencionista y su constante perfeccionamiento ha significado un gran avance en esta área. Por lo tanto, otro factor que impacta en el pronóstico es la disponibilidad y accesibilidad a estas técnicas en tiempo y forma<sup>95</sup>.

## 2. Fisiopatología de la HSAa aguda. Injuria encefálica precoz e injuria encefálica diferida

A continuación, haremos hincapié en los eventos fisiopatológicos y patogénicos que ocurren una vez que el saco aneurismático se rompe y la sangre arterializada se vuelca al espacio subaracnoideo (HSA propiamente dicha). No profundizaremos en la patología del aneurisma sacular propiamente dicho (origen y crecimiento).

Desde hace décadas, la Hb liberada con la lisis de los glóbulos rojos (hemólisis), fundamentalmente oxigenada, es aceptada como uno de los agentes principales responsables del inicio de algunas de las cascadas injuriantes post-sangrado<sup>96,97</sup>. Además, sabemos que el riesgo de vasoespasmo-isquemia diferida se relaciona significativamente con la cantidad de sangre derramada al espacio subaracnoideo (medido por varias escalas tomográficas: Fisher, Fisher modificada, Hijdra)<sup>78,98,99</sup>.

Durante años, convencidos del rol mayor del vasoespasmo como causante de los pobres resultados clínicos comentados previamente, mucho se investigó y aprendió alrededor del mundo sobre el mismo. A tal punto, que otros procesos injuriantes fueron «olvidados o descuidados» <sup>100,101</sup> .
---

Sin embargo, ese mejor entendimiento fisiopatológico, con una visión casi unívoca de la injuria postsangrado, no se acompañó de una mejoría significativa de los pacientes. Incluso se descubrieron fármacos o medidas (mecánicas) capaces de revertir o disminuir la incidencia o severidad del vasoespasmo (ya mencionados), pero los resultados clínicos no mejoraron de forma paralela.

Con este panorama, en la última década, investigadores como Zhang y col., han planteado la necesidad de redireccionar nuestra mira hacia eventos que ocurren antes del vasoespasmo, es decir, en las primeras 72 horas<sup>102</sup>.

Actores celulares, humorales y genético-moleculares están involucrados en este proceso injurioso llamado «injuria encefálica precoz» (IEP) o early brain injury (EBI). Del mismo participan no solo estructuras propias del SNC (neuronas, glía, BHE), sino que existe una fuerte interacción con actores sistémicos<sup>103,104</sup>.

Seguidamente, analizaremos algunas de **las principales vías injuriosas planteadas y haremos énfasis en la respuesta inmune locorregional y sistémica como uno de los principales mecanismos involucrados en la IEP y diferida o delayed brain injury (DBI) (a partir del 4º día de evolución).**

1. Modelo de isquemia global e injuria por reperfusión
2. Rol del grupo hemo eritrocitario. Haptoglobina, Hemopexina, Hemo-oxigenasa1.  
Rol de los productos oxidados de la bilirrubina
3. Óxido nítrico
4. Estrés oxidativo – Radicales Libres
5. Endotelina - 1
6. Disfunción microcirculatoria y microtrombosis distal: rol de las arteriolas y la microcirculación
7. Glutamato – Excitotoxicidad
8. Despolarización cortical propagada
9. Edema cerebral

**10. La respuesta inmune locorregional y sistémica se analizarán en el próximo capítulo**

Es válido aclarar que, si bien con fines prácticos la división de los diferentes actores y sus vías de señalización injuriantes («cuesta abajo y cuesta arriba») y/o reparadoras es esclarecedora, la realidad dista radicalmente de este planteamiento. Nos referimos a que, entre todas, se teje una maraña de redes, fuertemente relacionadas unas con otras (en mayor o menor medida), de la cual surge un balance biológico (microambiente) injurioso o reparador preponderante. Es la pérdida del balance-equilibrio interno, en cada una de las vías mencionadas (ej. estrés oxidativo vs antioxidantes, o proinflamatorio vs antiinflamatorio, etcétera) que se transmite (interactúa) hacia otra relacionada funcionalmente, y así el efecto se propaga o interrumpe según el nuevo estado biológico (microambiente) resultante de esta nueva interacción.

## 2.1 Modelo de isquemia global e injuria por reperfusión

El prototipo de injuria encefálica aguda donde ocurre isquemia global con posterior reperfusión es la injuria anoxo-isquémica post paro cardiorrespiratorio (PCR) reanimado con éxito. Este modelo plantea que la lesión/injuria neuroglial/endotelial (BHE) ocurre en ambas fases («*a two-hit model*»), es decir, durante la isquemia, cuando no existe circulación efectiva, pero también durante la reperfusión, una vez restablecido el FSC<sup>105,106</sup>. Con diferencias, fenómenos similares pueden ocurrir, con una magnitud variable, cuando el aneurisma cerebral se rompe. La rotura del aneurisma con el consiguiente volcado de sangre a nivel del espacio subaracnoideo, con una presión similar a la presión arterial, genera un aumento de la PIC con caída de la PPC (no ocurre aumento de la PIC post PCR), resultando en una isquemia global (similar al PCR)<sup>107</sup>. Habitualmente, la traducción clínica de estos hechos queda marcada cuando el paciente sufre, junto a la cefalea o inmediatamente después o incluso sin percibirla, un síncope<sup>108</sup>. Si la hemodinamia intracraneana se restablece, el paciente recupera la vigilia y la conciencia en mayor o menor grado (ej. puede recuperarse lucido o confuso u obnubilado). Por el contrario, si persiste con PIC elevada, la recuperación de la vigilia puede no ocurrir y el paciente permanece estuporoso o en coma (de diferente profundidad), evidenciándose en la TC de cráneo edema cerebral difuso (o swelling)<sup>109,110</sup>. Finalmente, en caso de sangrados masivos, el resultado final es la muerte (súbita, prehospitalaria)<sup>111,112</sup>.

La TC, pero particularmente la RM (más sensible), puede poner en evidencia estos hechos fisiopatológicos mencionados al marcar áreas de hipoperfusión-isquemia-infartos precoces (primeras 72 horas) en territorios limítrofes («watershed cerebral infarction»), entre arterias cerebrales, de la circulación encefálica<sup>113,114</sup>.

La reperfusión, muchas veces hiperóxica (frecuentemente con un componente iatrogénico vinculado a la fracción inspirada de oxígeno elevada seleccionada por el intensivista), es gradual (diferente al post PCR, donde es instantánea) e implica estrés oxidativo y reducción del óxido nítrico (NO) con la consiguiente preponderancia de la vasoconstricción y mayor riesgo de isquemia precoz y diferida<sup>115,116</sup>. Concomitantemente se genera un microambiente proinflamatorio (que analizaremos)<sup>117</sup>.

## 2.2 Rol del grupo hemo eritrocitario. Haptoglobina, Hemopexina, Hemo-oxigenasa 1. Rol de los productos oxidados de la bilirrubina

En condiciones normales, la Hb confinada al glóbulo rojo (GR) se auto-oxida lentamente y genera metaHb y especies reactivas de O<sub>2</sub> (ERO), primariamente anión superóxido. Sin embargo, el GR dispone de un sistema antioxidante capaz de reducir la Hb oxidada y neutralizar las ERO<sup>118-120</sup>.

En pacientes con sangrado subaracnoideo, la cantidad de moléculas de Hb liberadas con la lisis de los GR (250 millones de moléculas por GR, sabiendo que además cada uno posee 4 grupos hemo), rápidamente supera los mecanismos involucrados en su metabolismo cerebral, por lo que numerosas cascadas potencialmente injuriantes son gatilladas. Entre ellas destacamos: producción de radicales libres (RL), disfunción del endotelio y la capa muscular vascular, reducción de la disponibilidad de NO. Por otra parte, el hierro también puede agregar daño celular (incluso muerte neuronal) adicional. El mismo puede ser mitigado por la ferritina (quelante de hierro)<sup>118-120</sup>.

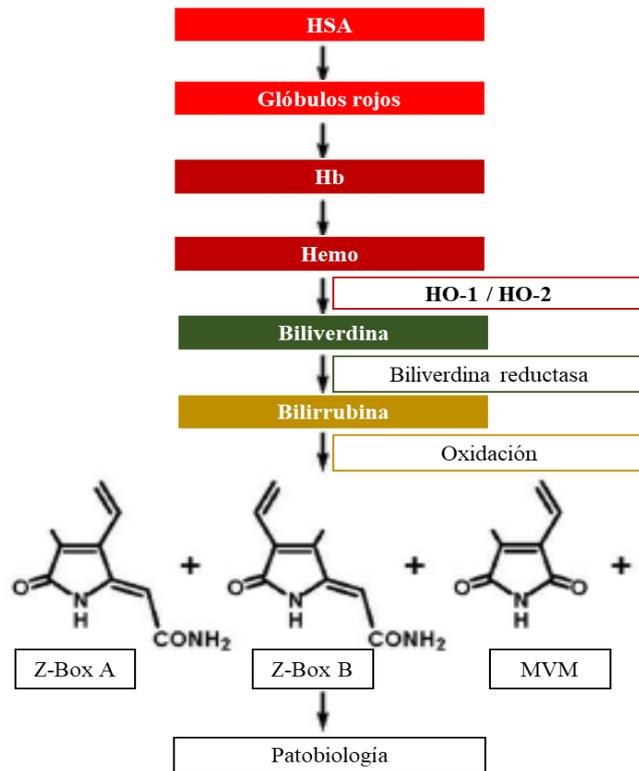
La **haptoglobina (Hp)** constituye una proteína (reactante de fase aguda) de unión a la Hb a nivel plasmático. El complejo Hb-Hp formado es internalizado, a través del receptor de membrana CD163, tanto en monocitos como macrófagos hepáticos y/o esplénicos, así como también a nivel de la microglía a nivel cerebral. Una vez internalizado, el grupo hemo es degradado por la hemo-oxigenasa 1 (HO - 1) en hierro y biliverdina. En ausencia de niveles suficientes de Hp, la Hb es oxidada y el complejo

formado posee menor afinidad por el CD163. A diferencia de los niveles plasmáticos de Hp, a nivel del LCR los mismos son bajos y rápidamente superados por la carga de moléculas de Hb mencionada previamente. Así, el estrés oxidativo (hemo-hierro), encuentra un medio propicio para generar daño. Simultáneamente, la actividad proinflamatoria también se ve favorecida y contribuye con la expansión y propagación del daño vascular y neuro-glial<sup>118,119</sup>.

El hemo puede ser considerado una alarmina (o Damage-associated molecular patterns-DAMPs), es decir que cuando es censado extracelularmente indica daño celular y una amenaza hacia la pérdida de la homeostasis.

Una vez libre en la circulación, bajo su forma lábil (muy reactiva), es reconocido por receptores de reconocimiento de patrones (PRR) expresados a nivel de las células de inmunidad innata fundamentalmente, pero también es posible que sea reconocido por las células T reguladoras (Treg)<sup>121-123</sup>.

A continuación, debemos mencionar un **posible papel de los productos oxidados de la bilirrubina (BOXes)**. Brevemente recordamos que la lisis de los GRs a nivel del LCR libera la hemoglobina y esta dejará libre al hemo. A través de las hemo-oxigenasas (1 y 2) se obtendrá biliverdina. Seguidamente, la enzima biliverdina reductasa producirá a la bilirrubina. Finalmente, en presencia de radicales libres de oxígeno, la bilirrubina (biliverdina y hemo) será oxidada, generando varios productos denominados BOXes. Los mismos, en experimentación animal, son capaces de inducir vasoconstricción (lenta y sostenida) y daño celular mediado, en parte, por glutamato. Además, pueden activar una respuesta proinflamatoria local actuando sobre la microglía, capaz de secretar IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ <sup>120,124</sup>. Figura 1.



**Figura 1.** Metabolismo de la Hemoglobina (Hb), hemo y productos oxidados de la bilirrubina (BOXes).

En este sentido, el hemo se demostró ser capaz de activar al inflamasoma NLRP3 con la consiguiente activación de la vía caspasa-1 y secreción de citoquinas (CTQs) proinflamatorias tales como la IL-1 $\beta$  (piroptótica).

### 2.3 Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO) es reconocido por su efecto vasodilatador y capacidad de regular el flujo sanguíneo a nivel tisular en condiciones fisiológicas. Además, inhibe la agregación plaquetaria, la adhesión leucocitaria (al endotelio vascular) y la proliferación de las células musculares lisas de la pared vascular. Sabiendo que la Hb tiene mil veces más afinidad por el NO que por el O<sub>2</sub>, varios grupos de investigadores comenzaron a plantearse la posibilidad de que el NO juegue un rol patogénico clave en la HSAa aguda. Sehba y Bederson han sintetizado la evidencia experimental animal y clínica en las variaciones de los niveles del NO/NO-Sintetasas (NOS) en 3 fases que han consensuadas por los expertos internacionales. Las mismas ocurren en las primeras 72 horas de ocurrido el sangrado: a) Primera fase: 0-60 minutos. Disminución de los niveles de NO que

determina vasoconstricción, aumento de la adhesión plaquetaria y leucocitaria al endotelio vascular y lesión de la BHE; b) Segunda Fase: 60 minutos-6 horas. Ocurre la recuperación de los niveles de NO a niveles basales, aunque el FSC permanece disminuido, seguramente debido a otras vías biológicas constrictoras simultáneamente alteradas (ej. la vía de la endotelina-1, entre otros); c) Tercera Fase 3: 6-72 horas. Aquí ocurre un incremento de los niveles de NO por encima de sus valores basales. En esta etapa, usualmente los pacientes son enrolados en los proyectos de investigación. La evidencia indica que estos niveles aumentados son más injuriantes que neuroprotectores. El FSC se mantiene bajo e independiente de los niveles de NO mencionados, especulándose que es una alteración de la vía GMPc el trastorno que puede explicar este hecho. Otros mecanismos gatillados por el propio NO, tales como el estrés oxidativo con la consiguiente peroxidación lipídica de las membranas celulares, daño mitocondrial y del ADN nuclear, culminarán con la muerte celular por necrosis y apoptosis<sup>125-127</sup>.

## 2.4 Estrés oxidativo-radicales libres

El estrés oxidativo es uno de los mecanismos injuriantes más importantes en pacientes con HSAA, formando parte de los mecanismos de la injuria encefálica precoz. Los RL más importantes son el anión superóxido, radical hidroxilo, peroxinitrito, y finalmente, el NO ya comentado<sup>128,129</sup>.

Una vez que ocurre el sangrado, el balance redox se inclina claramente hacia el predominio neto del estrés oxidativo. A la vez que aumentan los RL, los mecanismos de protección o sistemas antioxidantes se ven superados ampliamente, sobre todo, cuanto más grave está el paciente. Las fuentes de radicales libres son diversas; entre las más importantes se destacan: producción mitocondrial, la autooxidación de la oxiHb, estrés del retículo endoplasmático, enzimática (fosfolipasa A2, NADPH oxidasa, xantino oxidoreductasa y la NO sintetasa). Fisiológicamente existen varios sistemas enzimáticos encargados de contrabalancear los efectos prooxidantes mencionados. Los 3 más importantes son el superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx) y catalasas. Típicamente, en la HSAA existe un aumento de la actividad SOD (Cu y Zn) e incremento resultante del cociente de actividad SOD/GPx que tiene como resultado final mayor producción de hidroxilo (anión hidróxido), que no puede ser reducido por la GPx, generándose así un balance neto prooxidante. El resultado de la afectación de estos

mecanismos es el daño neuroglial, producto de la peroxidación lipídica de membranas, daño del ADN y daño proteico (enzimas y receptores). Esto resulta en disfunción endotelial y lesión de la BHE (edema cerebral por activación MMP-9 ligada al aumento de la IL-6), microtrombosis y alteraciones de la autorregulación cerebral que conducen a isquemia cerebral. Además, sobreviene la muerte celular por apoptosis (ej. activación de caspasas 3 y 9, o de la vía de señalización p53/MAPK) y necrosis<sup>128-131</sup>.

## 2.5 Endotelina-1

Desde hace ya varios años se especuló con el rol de la endotelina-1 en el vasoespasmo cerebral post HSAa. La evidencia experimental así lo planteaba. La misma, producida por el endotelio vascular y liberada en la pared arterial, así como también por los astrocitos, posee un efecto vasoconstrictor cuando actúa sobre sus receptores tipo A localizados en las células musculares lisas de la pared arterial (mediada por proteína G, fosfolipasa C y aumento del calcio intracelular), y vasodilatación cuando se une a los receptores tipo B localizados en los astrocitos (mediada por NO y prostaciclina)<sup>132</sup>. Por otra parte, sus niveles plasmáticos y en LCR se detectaron aumentados en este escenario<sup>133</sup>. Adicionalmente, debemos mencionar que su síntesis se incrementa por el estímulo (proinflamatorio) de la IL 1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , la hipoxia y el estrés parietal mecánico (shear stress). Por otra parte, su producción disminuye en presencia de NO y prostaciclina<sup>134,135</sup>.

Seguidamente, fundamentados en la sólida evidencia experimental preclínica mencionada, los estudios clínicos comenzaron a llegar. La droga seleccionada fue el **clazosentan**, que ya mencionamos sus resultados clínicos<sup>38,136</sup>.

## 2.6 Disfunción microcirculatoria y microtrombosis distal: rol de las arteriolas y la microcirculación

Como referimos anteriormente, la investigación durante décadas se centró fundamentalmente sobre las arterias del polígono de Willis y sus ramas principales, dado que desde 1951 sabemos que el vasoespasmo (angiográfico en humanos) ocurre ahí y es causa de isquemia diferida<sup>77</sup>. **Solo recientemente, con base en los datos que estamos analizando, los investigadores han lentamente migrado su interés por los hechos**

**fisiopatológicos que ocurren más distalmente en el árbol vascular, es decir, en los lechos arteriolar y/o la microcirculación**<sup>137-139</sup>.

Varios estudios han demostrado discrepancias entre la presencia de vasoespasmo angiográfico y/o sonográfico (doppler transcraneano) y áreas hipodensas de isquemia cerebral en territorios no relacionados o la ausencia de sintomatología clínica explicable por el vasoespasmo proximal. Adicionalmente, se observan áreas de isquemia en pacientes sin vasoespasmo proximal. Más importante aún es el hecho, conocido actualmente, de la ausencia de impacto clínico significativo (morbimortalidad) cuando se valorara en función de la presencia o no de vasoespasmo angiográfico<sup>101,113,140,141</sup>.

Estudios necrópsicos plantean desde hace años la presencia de **microtrombosis** en pacientes que presentaron isquemia-infartos cerebral y fallecieron, y esto no se replica en pacientes que padecieron hidrocefalia o resangrado. Además, la microtrombosis ocurre en áreas cerebrales que determinan sintomatología y se relaciona con la cantidad de sangre subaracnoidea adyacente<sup>142-144</sup>.

Adicionalmente, existe una **actividad procoagulante predominante y la actividad fibrinolítica se encuentra disminuida**. La injuria endotelial inicial estimula la activación-adhesión plaquetaria (exposición del colágeno, liberación del factor de Von Willebrand y la trombina) y estas células activadas liberan sus gránulos con sustancias que promueven la formación del trombo fibrino-plaquetario. Se destaca que estos procesos procoagulantes y antifibrinolíticos comienzan en los primeros días (5 días), previo al periodo de mayor vasoespasmo clásico<sup>145-148</sup>.

Otro hecho intrigante que se ha demostrado con el uso de doppler transcraneano es la presencia de **microémbolos** en relación con el estado procoagulante antes mencionado. Su posible rol patogénico quedó planteado una vez que su detección se asoció con áreas de isquemia/infarto tomográficas. Su incidencia variable llega hasta 70 %, sobre todo en pacientes con vasoespasmo sintomático. Sin embargo, ocurren con frecuencia en ausencia de vasoespasmo. También ocurren en sectores del árbol vascular cerebral sin relación con la topografía del aneurisma (no es planteable la embolia distal desde el saco aneurismático). De esta forma, las microembolias/microtrombosis no deben verse como una causa aislada de isquemia/infarto, sino que como un factor injuriante más, que suma a la hora de provocar/expandir el daño neuro-glial y, por lo tanto, pasible de tratamiento.

Finalmente, otro hecho significativo que ocurre a nivel del árbol arteriolar es la disfunción de la **autorregulación cerebral**. Esta ocurre antes y de forma independiente al vasoespasmo proximal. Pero cuando ocurre en pacientes con vasoespasmo, el riesgo

de isquemia diferida aumenta significativamente. Por otro lado, configura un marcador pronóstico independiente de mortalidad. Entre los mecanismos patogénicos que se han detectado en modelos experimentales preclínicos y clínicos se destacan la microtrombosis, estrés oxidativo, desregulación de la homeostasis del NO, excitotoxicidad glutamatérgica, depolarización cortical propagada y la respuesta inmune locorregional/neuroinflamación (que veremos más adelante)<sup>149-151</sup>.

## 2.7 Glutamato-Excitotoxicidad

Es un aminoácido no esencial y el más abundante neurotransmisor excitatorio en el encéfalo, dando cuenta de aproximadamente el 60 % de la actividad neurotransmisora. Es esencial para dos funciones claves como el aprendizaje y la memoria. Su neurotoxicidad (hiperexcitación) a concentraciones elevadas (a nivel del LEC cerebral) es conocida hace ya años y juega un rol importante como generador de lesión secundaria encefálica aguda (edema celular, apoptosis y muerte celular) o crónica. Por lo tanto, sus niveles encefálicos se mantienen controlados muy estrechamente, permitiendo un equilibrio entre las funciones neurotóxicas versus neurotróficas para las células (alta concentración intracelular (40-60  $\mu\text{M}$ ) versus extracelular muy baja (1-10 $\mu\text{M}$ ), gracias a la existencia de transportadores de glutamato  $\text{Na}^+$  dependientes- transportadores de aa excitatorios<sup>152-154</sup>.

Por tiempo, se dirigió la investigación y pruebas terapéuticas hacia la neuroprotección por antagonismo de sus receptores NMDA (localizados en astrocitos, terminales sinápticas, endotelio capilar cerebral). Sin embargo, los resultados no han cumplido con las expectativas neuroprotectoras deseadas. El problema aquí es que también se antagonizan funciones positivas sobre la integridad y reparación celular. Más recientemente, el objetivo se ha redirigido a lograr descender sus niveles a nivel del LEC, pero promoviendo su clearance cerebral facilitando su eflujo desde el encéfalo a la sangre (favoreciendo un mecanismo homeostático normal). Con tal fin se emplean moléculas denominados «barrenderos del glutamato plasmático» («blood glutamate scavengers»). Numerosos trabajos en animales han sido publicados y otros continúan en curso (con oxalacetato y piruvato), afortunadamente con resultados prometedores (incluidos modelos en ratas con HSA en los cuales se demostró menor daño a la BHE, menor edema cerebral y mejora clínica)<sup>155-157</sup>.

## 2.8 Despolarización cortical propagada

Descrita por primera vez por el Profesor Aristides Leao (Universidad de Río de Janeiro, 1944) en la corteza de conejos, inicialmente se la interpretó como un artefacto sin interés clínico en animales o humanos. Más recientemente, ha ganado gran interés alrededor del mundo como uno de los mecanismos involucrados en la lesión cerebral en el contexto de la patología aguda, fundamentalmente en HSAa (pero también en otros ACVs, trauma de cráneo, etcétera)<sup>145,158</sup>.

Configura una onda de despolarización neuro-gliial que se propaga a una velocidad de 2-5 mm/minuto y determina una depresión de la actividad espontánea registrada en el EEG (cortical) y potenciales evocados. Se acompaña de un pronunciado flujo de iones y neurotransmisores transmembrana.

Cuando ocurre en tejido sano, se acompaña de vasodilatación e hiperemia y mayor disponibilidad de oxígeno. En modelos animales con injuria encefálica, la hipoxia, hipotensión-isquemia, hipoglicemia, el aumento del potasio extracelular, la depleción del NO y la **Hb libre son capaces de gatillarla**. En estas condiciones, sobreviene **una disfunción microcirculatoria con una isquemia propagada resultante**.

En la HSAa aparece posterior al sangrado y genera una disfunción microcirculatoria con caída de FSC e isquemia (vasoconstricción e hipoperfusión cortical acoplada a la onda despolarizante). Su expresión es máxima entre el 5-7 día de evolución. Sin embargo, ocurre en forma independiente al vasoespasmo clásico de las arterias más proximales<sup>159-161</sup>.

## 2.9 Edema cerebral celular y vasogénico

Se define al edema cerebral (o encefálico) como un aumento del volumen cerebral (o encefálico) debido a la acumulación, focal o difusa, de fluidos (contenido de agua) a nivel del parénquima cerebral (o encefálico), tanto a nivel celular y/o extracelular. Desde un punto de vista práctico, podemos dividir a los mecanismos primarios generadores de edema cerebral en dos: 1) edema iónico o celular por falla de las bombas de membrana, 2) vasogénico por disfunción endotelial y/o lesión de las uniones estrechas de la BHE<sup>162,163</sup>.

El desarrollo y dinámica del edema cerebral en la HSAa, por el momento, no ha sido estudiado en profundidad. Sin embargo, los resultados a la fecha lo colocan en un lugar fisiopatológicamente privilegiado en este escenario, por lo que hoy en día acapara mucha atención alrededor del mundo. El mismo puede ser resultado de numerosos procesos patogénicos que hemos mencionado (neurotoxicidad por los productos de la sangre, isquemia, estrés oxidativo, inflamación, disfunción autorreguladora). Además, también puede por sí mismo, contribuir con mayor injuria secundaria<sup>164-166</sup>.

### 3. Respuesta inmune

Como fue mencionado, uno de los mecanismos centrales en la fisiopatología de la HSAa es la respuesta inflamatoria/inmune. Para explicar los mecanismos inmunes que participan de ella creemos que es necesario, primero, realizar a modo de repaso fundamental una breve y esquemática reseña de la respuesta inmune normal y, en particular en el SNC, para luego abordar los mecanismos inmunes que se desencadenan luego de que la sangre es vertida en el espacio subaracnoideo.

Aclaremos que, para la medicina intensiva y neurointensivismo clínico (nacional, regional e incluso global), el tema de la presente tesis es tan reciente e innovador como poco estudiado y, por lo tanto, desconocido.

#### 3.1 Conceptos generales de respuesta inmune innata y adquirida

El sistema inmune constituye una red interactiva de órganos linfoides, células que se comunican a través de CTQs y otros factores humorales y por contacto directo para orquestrar tipos específicos de respuestas defensivas en el huésped<sup>167,168</sup>.

Aunque su función principal es la inducción de una respuesta inmune para proteger al huésped, no todas las respuestas inmunes son protectoras. Hoy sabemos que la respuesta inmune se encuentra en la base de muchas enfermedades agudas y crónicas no infecciosas (inflamación crónica)<sup>169-172</sup>.

La expansión de la inmunología ha sido extraordinaria durante el siglo XX, y en la presente tesis abordaremos un tema enmarcado dentro de la inmunología no clásica: «injuria encefálica aguda (IEA)».

Desde un punto de vista clásico y en términos muy generales, el sistema inmune puede ser dividido en dos brazos que son responsables de la eliminación de las sustancias derivadas de los patógenos y sustancias no patógenas. Se trata de la inmunidad inmediata o innata y la inmunidad a largo plazo, antígeno-específica o inmunidad adaptativa. Esta es una clásica clasificación de la respuesta inmune, pero hoy en día se conoce que la respuesta inmunitaria innata y la adaptativa están estrechamente relacionadas.

Actualmente, el concepto moderno plantea una visión más fisiológica del reconocimiento, la regulación y su ejecución, considerándose la respuesta del sistema inmunitario-inflamatorio como global y coordinada.

Tras la activación de las células del sistema inmune innato, se producen y liberan mediadores inflamatorios que mediarán en la activación del sistema inmune adaptativo. El funcionamiento del sistema inmune, en su conjunto, resulta en la inflamación local y/o sistémica, que en última instancia tiene como objetivo restaurar la homeostasis<sup>173-176</sup>.

### **Inmunidad Innata**

El **sistema inmune innato** constituye la primera línea de defensa del organismo contra la invasión microbiana, así como de otras amenazas potenciales para el huésped. Es una respuesta inmune rápida, no-específica de antígenos y que no genera memoria inmunológica. Sus funciones esenciales son: la detección de microorganismos y la primera línea de defensa frente a la infección; la regulación de la inflamación limitando su extensión y el daño generado por esta; mantener la homeostasis inmunológica y la activación e instrucción de la respuesta inmune adaptativa. Los principales grupos celulares efectores de este tipo de respuesta son los granulocitos (eosinófilos, basófilos, neutrófilos), monocitos, macrófagos, células naturales killer (NK), entre otros<sup>168,177</sup>.

La inmunidad innata reconoce los antígenos o patógenos a través de una familia de receptores, conocidos como receptores de reconocimiento de patrones (PRRs; Pattern Recognition Receptors).

Son un tipo de receptores que reconocen patrones moleculares específicos asociados a patógenos (PAMPs) tales como virus, bacterias, hongos y parásitos. Además, este tipo de receptores se encuentran involucrados también en la detección de señales peligrosas endógenas gracias al reconocimiento de patrones asociados a peligro (DAMPs). Las principales familias de PRRs son: receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo Nod (NLRs), receptores tipo RIG-I (RLRs), sensores de ADN citosólico (CDS) y receptores lectina tipo C (CLRs). Cuando estos PAMPs o DAMPs son reconocidos por los PRRs, se desencadena una respuesta inmune innata en la que se segregan citoquinas/quimoquinas, se liberan péptidos antimicrobianos y las células fagocíticas son reclutadas<sup>177-179</sup>. Entre ellos destacamos, por su importancia en la HSAa, a la proteína nuclear (no histona) HMGB1 (High Mobility Group Box-1). Se la invoca como una molécula precoz (DAMP) capaz de gatillar la respuesta inflamatoria «estéril»<sup>180</sup>.

### **Neutrófilos**

Son los leucocitos más abundantes en la circulación, aproximadamente representan un 70 % del pool total. La producción de neutrófilos es regulada por una red de citoquinas entre las cuales se destacan la IL-23 liberada por los fagocitos y la IL-17 liberada por los linfocitos T. Esta última, a través del aumento (up-regulation) de G-CSF (granulocyte colony - stimulating factor), estimula la granulopoyesis y la liberación de neutrófilos. Durante la respuesta inflamatoria, la IL-1 también puede estimular la producción de neutrófilos a través del eje IL-17 - G-CSF. Además, los neutrófilos por si mismos también son capaces de estimular su propio reclutamiento. Son capaces de sintetizar y liberar IL-17 y reclutar a las células Th17, quienes producirán más IL-17<sup>181-186</sup>.

Los neutrófilos son activados por citoquinas, DAMP, factores de crecimiento y otros productos derivados del daño tisular. Estos factores aumentan la vida media de los neutrófilos y aseguran su migración e infiltración en el foco inflamatorio a través de un gradiente de concentración de estímulo quimiotáctico.

Dentro de sus funciones principales se reconocen: a) quimiotaxis; b) fagocitosis y degranulación; b) formación de NETs (neutrophil extracellular traps), donde existe liberación de material nuclear (mallas de ADN) en forma de trampas extracelulares que

contienen histonas y proteínas antibacterianas; c) liberación de especies reactivas de oxígeno; d) síntesis y secreción de CTQs y otros factores inflamatorios<sup>168,181,187</sup>. Durante una infección, o cuando se produce daño en un tejido, los neutrófilos se comunican e interactúan con diferentes células del sistema inmune (macrófagos, células Natural Killer, células T y B, «orquestrando» la evolución tanto de la respuesta inmune innata como adaptativa

La existencia de diferentes fenotipos funcionales de neutrófilos es hoy motivo de intensa investigación, debate y controversia científica (concepto de plasticidad). Se ha sugerido la presencia de un fenotipo 1 (clásico) caracterizado por la producción de IL-12 con capacidad de activar a los macrófagos y un fenotipo 2 productor de IL-10, inmunoregulador<sup>181,182</sup>.

### **Monocitos**

Los monocitos son una población de leucocitos que representan entre 2 a 10 % del total de los leucocitos circulantes. Son células multifuncionales con un rol en la homeostasis, defensa inmune y reparación de los tejidos. Durante la inflamación, los monocitos pueden diferenciarse a macrófagos o células dendríticas (DCs; dendritic cells). Los procesos de diferenciación y migración probablemente se encuentran determinados por el medio inflamatorio y los PRRs asociados al patógeno que se encuentren activados. Los monocitos, macrófagos y células dendríticas son células accesorias no-específicas que expresan MHC clase II e interactúan con células-T colaboradoras durante la respuesta inmune<sup>168,188,189</sup>.

Tradicionalmente los monocitos se han dividido en 2 poblaciones según la expresión de CD14 y CD16, con funciones claramente diferenciadas: monocitos tipo 1 o clásicos, que corresponde a la población más numerosa, tienen un papel principalmente fagocítico, y monocitos tipo 2 o no clásicos, que tienen una función proinflamatoria. Sin embargo, en 2010, se estableció una nueva clasificación con 3 subpoblaciones de monocitos: clásicos (CD14<sup>brigh</sup> CD16<sup>-</sup>), intermedios (CD14<sup>brigh</sup> CD16<sup>+</sup>) y no clásicos (CD14<sup>+</sup> CD16<sup>brigh</sup>) con claras diferencias tanto en fenotipo, función y expresión génica como en respuestas a estímulos entre los grupos de monocitos CD16<sup>+</sup>. Los monocitos intermedios se han propuesto como un monocito en transición de monocito clásico a no clásico. En base a sus antígenos de superficie y a su función celular, los monocitos intermedios tienen tanto una función fagocítica y secretan altos niveles de IL-1 $\beta$  y factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ . Estudios recientes indican que los monocitos CD16<sup>+</sup>

(intermedios y no clásicos) que están implicados en procesos inflamatorios e infecciosos, tienen capacidad de secretar moléculas proinflamatorias como IL-6, MMP-9 y CCR2 y presentan gran afinidad por el endotelio activado, siendo los monocitos no clásicos los que tienen mayor actividad inflamatoria y producción de CTQs en respuesta a ligandos de los TLR y los primeros en llegar al lugar de la lesión<sup>190-194</sup>.

### **Macrófagos**

Los macrófagos son células fagocíticas residentes en tejidos linfoides y no-linfoides. Son células cuya función se asocia con una labor de limpieza («barrenderos») ya que son capaces de eliminar material extraño. Los macrófagos están involucrados en homeostasis de tejido, por medio del despeje de células apoptóticas y la producción de factores de crecimiento. Además, están equipados con un amplio rango de PRRs que los hace eficientes en fagocitosis e inducen la producción de citoquinas pro-inflamatorias<sup>194-196</sup>.

Se conoce que los macrófagos humanos expresan altos niveles de receptores TLR2 y TLR4. Se señala que la activación de macrófagos puede involucrar un complejo arreglo de estímulos y programas de expresión, dependientes del microambiente que resulta en un espectro de estados funcionales, produciendo fenotipos polarizados entre la activación clásica (M1) y la activación alternativa (M2). En este sentido, los macrófagos muestran una alta heterogeneidad no solamente debido a sus propias vías de diferenciación terminal intrínseca, sino también en respuesta a estímulos del medio ambiente<sup>195,197,198</sup>. La activación clásica o M1, corresponde a la estimulación de macrófagos mediados por LPS, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, y otros ligandos TLR, conduciendo a un fenotipo pro-inflamatorio, ya que ellos desarrollan una respuesta ante la activación de PRRs y son capaces de secretar grandes cantidades de CTQs pro-inflamatorias tales como TNF $\alpha$ , y también NO. Los marcadores de activación M1 son la expresión iNOS, altos niveles de IL-12 y bajos niveles de producción IL-10. Otras citoquinas secretadas por células M1 incluyen IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-15, IL-18, e IL-23. Los macrófagos M1 expresan altos niveles de MHC, moléculas co-estimuladoras y Fc $\gamma$ R<sup>195,197,198</sup>. La activación alternativa o M2 corresponde a una estimulación de macrófagos dependientes de IL-4 e IL-13, que conduce a un fenotipo antiinflamatorio. Están implicados en respuestas ante infección por parásitos, remodelación de tejido, angiogénesis y progresión tumoral. Exhiben mayor expresión de CTQs tales como IL-10, pero deficiente producción de NO y TNF- $\alpha$ <sup>195,197,198</sup>.

## Células NK

Las células NK (*natural killer*) son los principales linfocitos efectores de la inmunidad innata. Se encuentran en todos los compartimentos inmunes primarios y secundarios, así como también en varias mucosas<sup>194,199</sup>.

Su función efectora está mediada por la producción de citoquinas, especialmente altas cantidades de IFN- $\gamma$ , y actividad citotóxica para eliminar células infectadas o tumorales<sup>194,200,201</sup>.

Las células NK poseen diferentes receptores que les permiten interactuar con las diferentes subpoblaciones celulares, entre los cuales se incluyen: los receptores lectina tipo C, que incluyen: a) el heterodímero NKG2D/CD94 encargado del reconocimiento de la molécula no clásica del complejo mayor de histocompatibilidad, HLA-E5; b) los receptores de citotoxicidad natural (natural cytotoxicity receptors [NCR]), incluyen los receptores activadores NKp30, NKp44 y NKp46 c) los receptores de la familia de las inmunoglobulinas, llamados receptores killer inhibitory receptor (KIR), los cuales pueden ser activadores o inhibidores y reconocen la disminución en la expresión de las moléculas de HLA de clase I, y finalmente, d) el receptor CD16, un receptor Fc del tipo Fc $\gamma$ RIIIA de baja afinidad para la IgG, para el reconocimiento de células opsonizadas con anticuerpos IgG<sup>199-201</sup>.

Bajo condiciones fisiológicas, la actividad de células NK es inhibida a través de la interacción de sus receptores inhibitorios con la molécula MHC clase I (que reconocen como propia). Se asegura así la tolerancia antigénica.

Las células NK pueden además ser activadas por: disminución en la expresión de HLA-I en la superficie de la célula diana, lo que reduce las señales inhibitorias recibidas a través de los receptores KIR; moléculas expresadas en células anormales que son reconocidas por los NCR; células con anticuerpos IgG unidos a la membrana plasmática mediante un mecanismo denominado citotoxicidad celular mediada por anticuerpos; interacción con las DCs, la cual consiste en una comunicación recíproca, debido a que las DCs inducen en las células NK la producción de IFN- $\gamma$ , IL-12 y TNF- $\alpha$ , las que a su vez potencian la maduración de las DCs. Esta interacción también puede ser dependiente de contacto, donde participan receptores como NKp30, TRAIL y CD94-NKG2A. Recientemente, se ha postulado que las células NK requieren de al menos 2 señales que induzcan su activación, provenientes de los diferentes receptores que expresan<sup>199-202</sup>.

Una vez activadas, las células NK citotóxicas liberan perforinas y granzimas, e inducen la lisis de la célula blanco. Otro de los mecanismos de acción de las células NK

es la vía FAS-FASL que conduce a la formación de un complejo de señalización que induce muerte, y activación de caspasas que promueven el proceso apoptótico de células objetivo que expresan FAS. Por otro lado, la activación de las células NK productoras de citoquinas resulta en la secreción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-17, IL-12, proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1)- $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e IL-1B, las cuales amplifican la respuesta inmunitaria<sup>199–203</sup>.

El IFN- $\gamma$  es una de las citoquinas más importantes producidas por las células NK, ya que activa los macrófagos, potencia la fagocitosis e induce la actividad microbicida. Además, las células NK potencian las respuestas tipo Th1 de las células T CD4+, por la inducción de la producción de IL-12 por parte de los macrófagos y DCs. Sin embargo, la activación de las células NK también puede tener como consecuencia la producción de IL-10, regulando negativamente la respuesta del sistema inmunitaria. Aunque este tópico aún no ha sido bien estudiado, demuestra que las células NK tienen una gran influencia sobre la especialización de la respuesta del sistema inmunitario, tanto innata como adaptativa<sup>199–202</sup>.

Las células NK, afectadas por varios microambientes y señales, pueden ser divididas en dos subgrupos funcionales según la expresión de CD56 y CD16 en la superficie: 1) CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> y con baja expresión de receptores KIR, capaces fundamentalmente de producir citoquinas INF- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , IL-10, IL-13, entre otras; 2) CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> con expresión de receptores KIR y especializadas en citotoxicidad (y capacidad negligible de síntesis de citoquinas)<sup>194,199,201</sup>.

### **Células dendríticas**

Las DCs (o dendritic cells) son un grupo diverso de células hematopoyéticas especializadas en el reconocimiento de patógenos. Con excepción de las DCs ganglionares foliculares, que son de origen mesenquimal, las DCs se originan a partir de progenitores hematopoyéticos medulares CD34+ ya sea mieloides o linfoides<sup>204–207</sup>.

Las DCs son potentes células presentadoras de antígeno (APCs: antigen presenting cells) profesionales, que juegan un rol fundamental en la inducción y regulación de respuestas inmunes innatas y adaptativas contra patógenos. Tienen un papel central en la activación de las células T y B y además interactúan directamente con células NK y células NKT<sup>204–207</sup>.

Las DCs son un grupo celular muy heterogéneo, de diferente origen, que si bien todas tienen como función primordial capturar el antígeno, procesarlo y presentarlo, cada

subtipo de DCs presentan marcadores específicos y difieren en su localización en el organismo, vías de migración, función inmunológica y dependencia a infecciones o estímulos inflamatorios para su generación. Durante el desarrollo de una respuesta inmunitaria adaptativa, el fenotipo y función de las DCs juega un papel muy importante tanto en la iniciación de tolerancia, memoria y polarización de la respuesta T <sup>204-207</sup>.

En sangre periférica circulan dos tipos de DCs fenotípica y funcionalmente diferentes que se distinguen por la expresión de CD11c y CD123. Las DCs CD11c<sup>+</sup>CD123<sup>low</sup> se denominan DCs mieloides, mientras que las DCs CD11c<sup>-</sup>CD123<sup>high</sup> se han denominado DCs plasmocitoides. Se diferencian a partir de progenitores hematopoyéticos mieloides y linfoides, respectivamente. En seres humanos, las DCs mieloides pueden derivar de precursores ya comprometidos hacia DCs o bien de precursores del linaje de granulocitos y monocitos. Ambos tipos de DCs difieren en numerosos aspectos, incluyendo su distribución tisular, su producción de citoquinas y los factores de crecimiento necesarios para su diferenciación<sup>204-207</sup>. Las DCs mieloides se pueden dividir en dos subpoblaciones según su expresión de BDCA1 (CD1c) y CD141. Las DC plasmocitoides son importantes en las respuestas inmunes antivirales y en procesos autoinmunes. Constituyen la principal fuente de INF I tras las infecciones. Se ha comprobado la existencia de dos subtipos de DCs plasmocitoides según su expresión de CD2 y con diferencias funcionales<sup>204-207</sup>. Hoy en día, con la utilización de citometría policromática, se pueden caracterizar mejor y más subpoblaciones de DCs en sangre periférica de pacientes y también a nivel tisular.

### **Inmunidad adaptativa**

La **inmunidad adaptativa** (también llamada adquirida o específica) es la respuesta inmune que tiene la habilidad de «aprender y exhibir memoria», ambos conceptos en términos de definir un estado inmune con relación a un antígeno, y frente a la posibilidad de que el sistema inmune esté siendo específicamente tolerante frente al antígeno. La respuesta inmune adaptativa incorpora mecanismos moleculares más específicos que le permiten controlar mejor la amenaza (endógena/exógena). Tiene la característica de ser una respuesta inmune que tiene especificidad, diversidad, memoria, latencia, ser autolimitada y exhibir autotolerancia<sup>167,168,174</sup>.

Se clasifican 2 tipos de respuesta inmune adaptativa: la humoral que protege de microorganismos extracelulares y las toxinas y la respuesta inmune celular que defiende contra microorganismos intracelulares. La respuesta inmune humoral esta mediada por

células B que secretan anticuerpos (inmunoglobulinas) y la inmunidad celular es mediada por células T<sup>167,168,173,208,209</sup>.

### 3.1.1 Respuesta Inmune Humoral

**Las células efectoras de la respuesta inmune humoral son las células o linfocitos B.** Son linfocitos que, si bien son **reconocidas por su capacidad de producir anticuerpos**, también cumplen otras funciones que incluyen la presentación de antígenos y producción de múltiples CTQs<sup>167,168,208,210,211</sup>.

Todas las respuestas inmunes adaptativas ocurren en diferentes pasos: reconocimiento antigénico, activación de linfocitos con la consecuente proliferación y diferenciación en células efectoras y memoria, eliminación del antígeno y defervescencia de la respuesta inmune con producción de células de memoria de larga supervivencia<sup>167,168,212</sup>.

Las células B reconocen el antígeno a través de su receptor de membrana (BCR), lo que conduce a la activación de la célula B. Reconocen antígenos de diferente tipo (sustancias químicas, proteínas, lípidos y polisacáridos). Luego de la activación, las células B proliferan y se diferencian en células plasmáticas que secretan diferentes clases y subclases de inmunoglobulinas. La respuesta humoral para la mayoría de los antígenos proteicos requiere de la cooperación T (cooperación T-B). En estos casos, las células B captan el antígeno proteico, lo procesan y lo presentan en MHC de clase II a las células T CD4<sup>+</sup> cooperadoras. Estas se activan y expresan CD40L, entre otras moléculas co-estimuladoras, y secretan citoquinas que trabajan en forma conjunta para estimular a las células B. Los antígenos polisacáridos y lipídicos gatillan respuestas independientes de células T<sup>208,211,213</sup>.

Los mecanismos efectoras finales de eliminación del antígeno ocurren de diferente manera: neutralización, opsonización, activación del complemento y citotoxicidad dependiente del complemento. Cada subtipo de Ig secretada tiene predominio de algunas de estas funciones (Figura 2)<sup>167,168,208</sup>.

Por otro lado, las células B pueden funcionar como inmunorreguladoras. Las células-B reguladoras son una subpoblación de células B que contribuyen al mantenimiento de la tolerancia y que limitan las respuestas inflamatorias controlando diferentes tipos de células, tales como DCs, macrófagos y células T CD4<sup>+</sup> a través de la producción de IL-

10. La IL-10 favorece la diferenciación de las células T CD4 en células T reguladoras (Treg), que también contribuyen al mantenimiento de la tolerancia y la inhibición de células Th1 y Th17<sup>211,214</sup>.

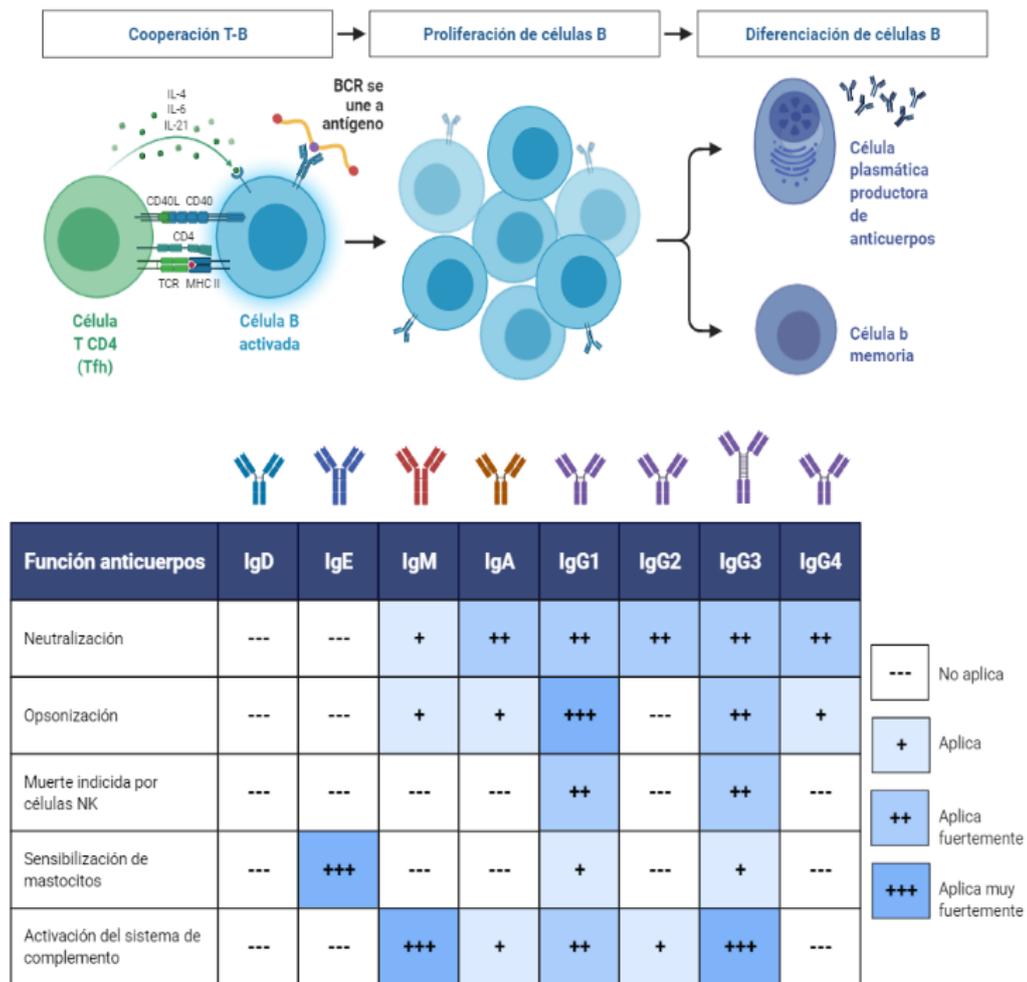


Figura 2. Diferenciación de las células B y funciones efectoras de los anticuerpos.

### 3.1.2 Respuesta Inmune Celular

**Las células efectoras de la respuesta inmune celular son las células T.**

Las células T presentan un receptor de membrana homólogo a las inmunoglobulinas (Ig) conocido como TCR (T-cell receptor). Mediante este receptor, las células T son capaces de identificar una gran variedad de antígenos de forma específica. Sin embargo, a diferencia de las células B, las células T necesitan que el antígeno sea procesado en péptidos cortos (8-30 aminoácidos) y presentados en moléculas del sistema principal de

histocompatibilidad (MHC o HLA), fenómeno conocido como restricción del reconocimiento antigénico<sup>167,168,209,215,216,217</sup>.

Existen dos tipos de moléculas de histocompatibilidad clásicas, denominadas moléculas MHC de clase I (MHC-I) y moléculas MHC de clase II (MHC-II), que presentan a las células T péptidos de origen citosólico y extracelular, respectivamente. Las células T CD8 detectan los péptidos presentados por MHC de clase I. Su función efectora principal es lisar las células que presentan péptidos extraños; por ejemplo, péptidos de un virus presentado en MHC-I por una célula infectada. Las células T CD4+ reconocen péptidos presentados en MHC de clase II. Su función es orquestar las respuestas inmunes y ayudar o estimular que otras células del sistema inmune como células T CD8+, células B y fagocitos funcionen correctamente<sup>168,216,218</sup>.

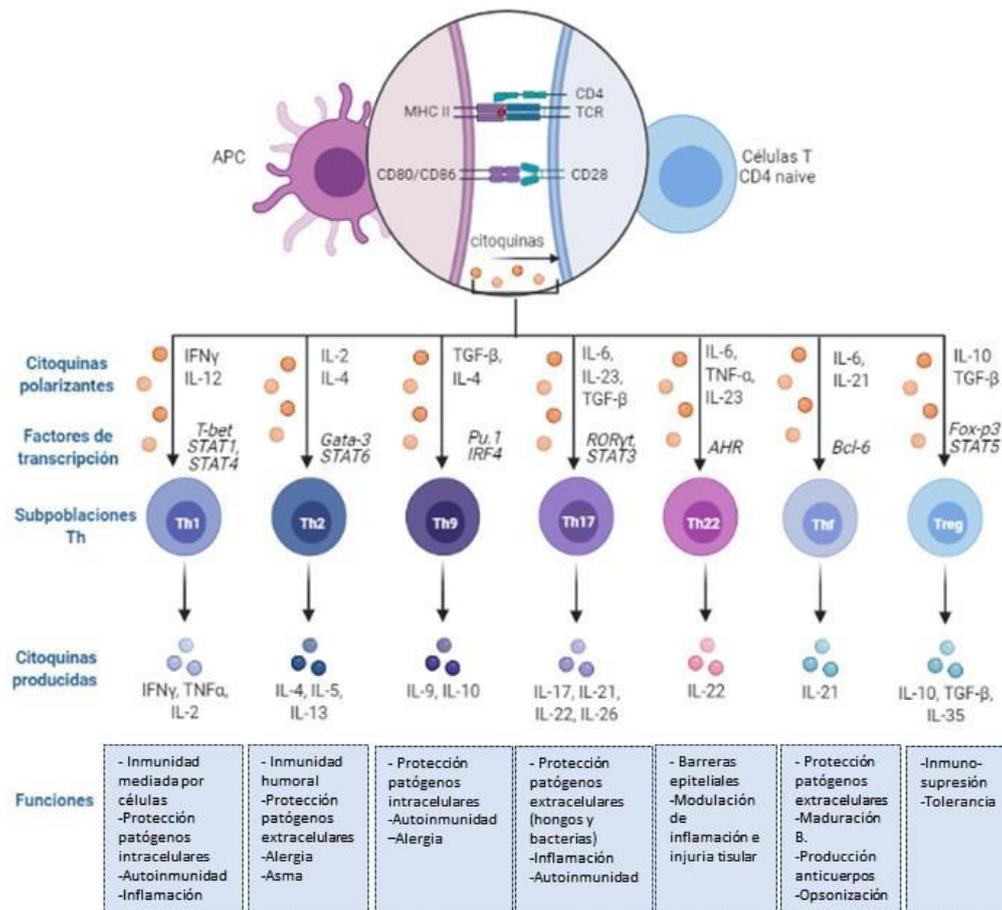
El primer paso en la iniciación de una respuesta inmune ante un antígeno debe involucrar necesariamente la modificación del antígeno, y las células especializadas en esta actividad son denominadas células presentadoras de antígeno (APCs). Cuando, las células T se encuentran con una APC que presente un péptido unido a MHC clase I o II, las células T CD8+ y CD4+ respectivamente comenzarán una serie de mecanismos intracelulares que llevan a la activación celular. La activación de las células T es un proceso dinámico caracterizado por la expresión de genes altamente regulados, específicos de activación, progresión y proliferación del ciclo celular. El reconocimiento exitoso de antígenos desencadena ambas respuestas inmunes, efectoras y de memoria tanto en células T CD4+ como CD8+. Una respuesta inmune efectora incluye células-T CD8+ que eliminan células con antígenos extraños y células T CD4+ que se diferencian entre varias clases de células efectoras, incluyendo aquellas que pueden activar macrófagos, células T CD8 citotóxicas<sup>168,209,216,219</sup>.

Durante el reconocimiento antigénico, el complejo TCR reconoce pequeños péptidos que le han sido presentados en MHC. Debido a la baja afinidad de las reacciones, el reconocimiento de antígenos no es suficiente para activar las células T y se requiere de una segunda señal que se realiza por la interacción con moléculas co-estimuladoras CD80 (B7-1) y CD86 (B7.2) en las APCs, con los receptores CD28 en las células T. La molécula CD28 en las células T es el principal receptor co-estimulador para el envío de segundas señales para la activación de las células T. Otras moléculas accesorias CD40L (expresado en linfocitos activados)-CD40 (expresado en células B, macrófagos y células dendríticas) determinan un aumento de las respuestas de las células T al activar las APC y en células T cooperadoras las activa haciéndolas más potentes, con mayor expresión de moléculas

B7 y secreción de citoquinas como la IL-12. El resultado final de la activación de las células T es un balance entre señales activadoras e inhibitoras. Los receptores inhibidores de la familia del CD28 son el CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 o CD152) y el PD-1 (programmed death 1). CD28 y CTLA-4 reconocen los mismos ligandos, pero presentan efectos funcionales opuestos. PD-1 es un miembro de la superfamilia del CD28 que ofrece señales negativas al interactuar con sus dos ligandos, PD-L1 y PD-L2. PD-1 y sus ligandos se expresan ampliamente y tienen una gran gama de papeles inmunorreguladores en la activación de células T y en la tolerancia, comparado con otros miembros de CD28<sup>216,220,221</sup>.

### **Células T CD4+**

Las células T CD4+ efectoras son funcionalmente heterogéneas y las CTQs que producen son importantes en su función, de tal forma que pueden ser utilizadas para clasificarlos. Mientras que las células T CD4+ cooperadoras naïve producen sobre todo IL-2 al activarse, las células T CD4+ efectoras son capaces de producir un gran número y variedad de citoquinas con diversas actividades biológicas. Esta variación en el patrón de citoquinas y en la actividad biológica permite desencadenar una respuesta inmune diferente y adaptada a cada situación. El proceso de diferenciación desde una célula T CD4+ naïve hasta una célula T CD4+ efectora se denomina polarización. Tras el reconocimiento antigénico, la célula T CD4+ activada pasará por un estado intermedio de diferenciación denominado Th0. El desarrollo de los distintos tipos de respuesta depende de las señales que reciba la célula Th0 en el momento del reconocimiento del antígeno; como, por ejemplo, las citoquinas presentes en el ambiente, la naturaleza del antígeno, la célula polarizadora y la dosis del antígeno. Actualmente se reconocen distintos tipos de células T CD4+ (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Thf y Tregs entre otras) con funciones inmunes particulares (Figura 3)<sup>168,209,216,222</sup>.



**Figura 3.** Características generales de las principales subpoblaciones de células T CD4+. Se muestran las citoquinas necesarias para su polarización/diferenciación, los principales factores de transcripción involucrados en su diferenciación, las citoquinas que producen y las principales funciones en las que participan.

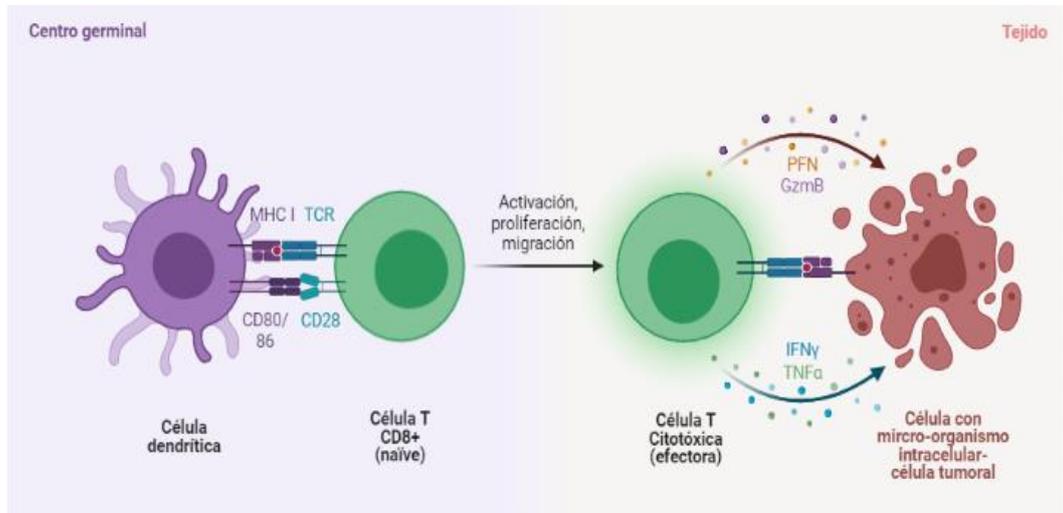
### Células T CD8+

Las células T CD8+ están destinadas a la eliminación de células del huésped infectadas por patógenos intracelulares, mediante citotoxicidad celular directa<sup>168,219</sup>.

Cuando las células T CD8+ reconocen antígenos en MHC de clase I en presencia de interferones tipo I e IL-12, ellas se diferencian en células T CD8+ citotóxicas. Las células T CD8+ citotóxicas eliminan células tumorales o los microorganismos intracelulares, sobre todo al matar a las células infectadas mediante los mecanismos de perforinas/granzimas o FAS/FASL (apoptosis por activación de caspasas)<sup>203,218,223</sup>.

Las principales CTQs producidas durante estos procesos que estimulan la proliferación y supervivencia de las células T citotóxicas incluyen: IFN tipo I, IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, IL-27 e IL-33. Las citoquinas IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , mejoran la presentación de antígeno y median efectos anti-patogénicos, y las citoquinas IL-2 e IFN- $\gamma$ , son requeridas para la

generación de una efectiva inmunidad citotóxica ante la infección y cáncer<sup>218,224,225</sup> (Figura 4).



**Figura 4.** Mecanismo de acción de células T CD8+. Se muestra el reconocimiento antigénico, activación y principales mecanismos efectoras de las células T CD8+.

### 3.2 Citoquinas

Las CTQs, quimioquinas y factores de crecimiento son proteínas que median la señalización entre células y orquestan procesos de crecimiento, proliferación y diferenciación. Cada uno de estos grupos es capaz de promover estados de transición entre las diferentes etapas del ciclo celular, tales como el cambio entre una célula en reposo y una célula que se está dividiendo, pasar de ser una célula no secretora a una célula que produce anticuerpos, o variar la producción de anticuerpos de una clase de isotipo a otro<sup>226,227</sup>.

Las citoquinas son proteínas que juegan un importante rol tanto en la fase inductora como efectora de todas las respuestas inmunes, incluyendo proliferación celular, comunicación intercelular, y muerte celular. Las quimioquinas son pequeñas citoquinas que atraen y reclutan otras células en un área localizada para ejercer sus efectos biológicos. También son conocidas como citoquinas que inician la quimiotaxis de leucocitos. Los factores de crecimiento corresponden a ciertos tipos de citoquinas que actúan sobre células-B y/o células-T, proporcionando señales que, junto con la señal

transmitida por medio del receptor específico de un linfocito, le indica a la célula que se divida, se diferencie o cambie a un nuevo estado<sup>226,227</sup>.

A continuación, en la siguiente Tabla se describen las principales CTQs y sus funciones, especialmente aquellas estudiadas, en mayor o menor profundidad, en HSAa y en el presente proyecto de investigación. Por lo tanto, no se incluyen otras innumerables moléculas (Tabla 2).

<b>Citoquina</b>	<b>Fuente de Producción (principales)</b>	<b>Célula blanco (principales)</b>	<b>Principales funciones</b>
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Macrófagos Monocitos Endotelio, Fibroblastos	Células B y T	Proinflamatoria Activación macrofágica Activación Th17
<b>IL-2</b>	Células Th1 Células NK	Células B y T Células NK	Proliferación de células B y T Proliferación y activación de células NK
<b>IL-4</b>	Célula Th2 Mastocitos, Basófilos	Células B y T Monocitos Macrófagos	Antiinflamatoria Proliferación y activación de células B Estimula la diferenciación Th2 e inhibe Th1
<b>IL-6</b>	Monocitos Macrófagos Células T Endotelio, Fibroblastos	Células B y T Monocitos Macrófagos	Proinflamatoria Proliferación y diferenciación de células T y B Diferenciación Th17
<b>IL-10</b>	Células T reguladoras Células Th2 Células B reguladoras Células Th9 Monocitos, Macrófagos	Células T y B Monocitos Macrófagos Células NK	Antiinflamatoria Inhibición macrofágica Inhibición de la diferenciación Th1 Activación de células B
<b>IL-17</b>	Células Th17, neutrófilos, Celulas T $\gamma\delta$ Células Nk y NKT	Neutrófilos	Proinflamatoria Reclutamiento de neutrófilos Activación de neutrófilos
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Macrófagos Células NK Células T CD4+ Células dendríticas	Endotelio Neutrófilos Hepatocitos	Proinflamatoria Acción sinérgica con la IL-17

			Incremento de la permeabilidad vascular
<b>INF<math>\gamma</math></b>	Células NK y NKT Células Th1, células T CD8+	Macrófagos Células NK Células T	Proinflamatoria Activación macrofágica Activación de células NK Inhibición de la diferenciación Th2
<b>TGF<math>\beta</math></b>	Monocitos Macrófagos Células T	Monocitos Macrófagos Células T y B Epitelio	Antiinflamatoria Inhibe la secreción de CTQ proinflamatorias

**Tabla 2.** Características generales de las principales citoquinas.

### 3.3 Sistema Neuroinmune

La activación de la respuesta inmune frente a los estímulos mencionados previamente (PAMPs o DAMPs) determina la aparición de un proceso inflamatorio cuyo objetivo es eliminar los factores endógenos o exógenos que la desencadenaron, para reestablecer la homeostasia tisular (cicatrización o reparación *ad integrum*).

El potencial destructivo de esta respuesta es de vital importancia para controlar el proceso que la desencadenó, pero puede determinar daño secundario (colateral) a nivel tisular.

Como es previsible, debido a la alta vulnerabilidad conocida del tejido del SNC neuroglial incluida la transmisión sináptica, al microambiente que lo rodea, desde hace años, se señala que a nivel del parénquima la respuesta inmune debe ser **«delicada y eficiente»**, aplicando aquí también una frase de Hipócrates, **«primun non nocere»**. O también se lo reconocía, desde el punto de vista inmune, como **«la terra ignota»** (del latín, «tierra desconocida»); esto relacionado al **dogma del inmunoprivilegio**, que se analizará a continuación<sup>228–231</sup>.

### 3.3.1 Actualización del concepto de inmunoprivilegio del sistema nervioso central

A la luz de la evidencia actual, la mayoría de los investigadores considera a este término engañoso, pero a la vez, está claro que la respuesta inmune del SNC es única (distinta).

El SNC tradicionalmente ha sido reconocido como un sitio «inmune privilegiado», concepto ligado al descubrimiento e investigaciones posteriores sobre la BHE<sup>228,232</sup>. Trabajos de Medawar (1948) indicaban que los implantes de tejido alogénico en el SNC (parénquima) no eran rechazados, o lo eran tardía y débilmente. Se mencionaba que esta escasez de reacción del sistema inmune estaba dada por la dificultad de los linfocitos en acceder al SNC a través de la BHE intacta (rama eferente) y por una carencia de conexión («diálogo») entre el sistema linfático periférico y el SNC (rama aferente)<sup>228,232,233</sup>.

Más recientemente, en los últimos 10 años aproximadamente, a partir de la descripción del sistema glinfático (2012) y vascular linfático cerebral (2015) estas hipótesis han comenzado a ser revisadas en profundidad<sup>230,234–238</sup>. Hoy sabemos que el SNC, desde un punto de vista inmune y su relacionamiento con el sistema inmune periférico, se encuentra **compartimentalizado**. Así reconocemos 3 compartimentos diferentes pero relacionados entre sí:

- parénquima y el líquido intersticial (LInt)
- sistema ventricular con los plexos coroideos (PCor) y el LCR
- espacio subaracnoideo (ESbA) y las meninges

Estos últimos dos compartimentos poseen un comportamiento inmunológico (respuesta innata, adaptativa y conexiones linfáticas) similar a los tejidos periféricos. Por otra parte, **el parénquima propiamente dicho se mantiene «privilegiado»** (menos «expuesto y reactivo» que los anteriores). No permite el pasaje de células inmunes a través de las uniones gliales limitantes astrocitarias, no cuenta con una microglía con capacidad migratoria destacada, capaz de alcanzar los nódulos linfáticos cervicales (NLCs) para presentar antígenos del SNC, y limita su drenaje linfático, principalmente, a pequeñas moléculas solubles<sup>239–241</sup>.

### 3.3.2 Células residentes de la inmunidad innata cerebral

1. Células microgliales
2. Células astrogiales

#### 3.3.2.1 Microglía

Como componente inmune del SNC, la microglía juega un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis-función neuronal (sinapsis, plasticidad, funciones neurocognitivas, aprendizaje y memoria). Se activa ante cualquier evento patológico o pérdida de la homeostasis y tiene la capacidad de liberar una enorme cantidad de moléculas que pueden impactar en los resultados finales del proceso biológico, tales como citoquinas, quimoquinas y factores de crecimiento<sup>242,243</sup>.

Son fagocitos profesionales y pueden interactuar con células infiltrantes para orquestrar la respuesta inmune local<sup>242,244</sup>.

Destacamos algunos roles o funciones como es su participación en el desarrollo de la red y plasticidad neuronales en el cerebro adulto<sup>245-247</sup>:

#### **Heterogeneidad o diversidad microglial**

Diferentes subtipos de microglía han sido descritos desde su conocimiento por Río Hortega. Una forma de diversidad detectada es la expresión de diferentes receptores para distintos neurotransmisores. Dentro de ellos destacamos a los receptores para neurotensina 2, dopamina, endotelina, vasopresina, nicotina, serotonina, GABA, entre otros. Otro tipo de diversidad se refiere a la señalización interna (microglial) del TLR4. Solo algunos subgrupos de microglía liberan TNF $\alpha$  cuando este receptor es activado. Finalmente, cuando se realizó un análisis genómico de microglía que reside en diferentes regiones cerebrales, a diferentes edades, se observa que tiene distintos fenotipos región-específicos<sup>246,248,249</sup>.

#### **Participación de la microglía en neuroprotección-neurorregeneración y neurotoxicidad-injuria**

La activación de la microglía ha sido típicamente considerada un evento «negativo». Sin embargo, más recientemente se ha evidenciado un rol activo neuroprotector *in situ*<sup>245,247</sup>.

Existe evidencia creciente de un efecto antiinflamatorio. Aunque inicialmente liberan moléculas proinflamatorias como la IL-6, seguidamente tiene la capacidad de producir IL-10, promoviendo así una retroalimentación negativa (anti-inflamatoria). Otra citoquina anti-inflamatoria que puede ser producida es el TGF- $\beta$ . Además, puede liberar factores tróficos neuronales, como por ej. EDF1<sup>250-252</sup>.

En modelos animales de ACV isquémico, la depleción de la microglía se acompaña de mayor extensión del área de isquemia/infarto. Sin embargo, en modelos de Esclerosis Múltiple (EM), su menor actividad determina un retraso de la aparición de sintomatología y mejoría clínica. De forma tal que, como ocurre con otros efectores inmunes, su rol proinflamatorio-neuroinjuriante o antiinflamatorio- neuroprotector/neuroreparador varía de una enfermedad a otra, incluso, momento a momento en el curso de una misma patología<sup>250,253,254</sup>.

### 3.3.2.2 Astroцитos

Clásicamente ha predominado el concepto casi dogmático de que la inmunidad innata cerebral depende de la microglía. Incluso, se postuló que para que los astroцитos se activaran la microglía debería ser facilitadora (*microglial priming*). Sin embargo, en las últimas (2) décadas cada vez más se insiste en un rol más protagónico de los astroцитos, la célula glial más abundante del cerebro humano. Distribuida ampliamente, ha sido subvalorada en sus funciones neuroinmunes y homeostáticas cerebrales<sup>255-257</sup>.

Los astroцитos poseen una variedad de receptores que participan de la inmunidad innata, incluidos los TLRs (2 y 4), NODs, PKRs, receptores de manosa, receptores scavenger («barrenderos o carroñeros») y componentes del sistema del complemento; y una vez activados, tienen la capacidad de secretar moléculas solubles inmunomoduladoras tales como: CXCL10, CCL2, IL-6, IL-17 y BAFF. Estas pueden impactar sobre la respuesta inmune innata y adquirida<sup>258-261</sup>.

Especialmente destacamos el rol de los TLRs 2/4. Su activación (ejemplo: LPS en modelos animales) promueve el aumento de la síntesis (upregulation) de CCL2, inducida por TNF $\alpha$ , que se relaciona con el reclutamiento de la microglía y monocitos hacia áreas con injuria cerebral (ej. infección u otras DAMPs). También aumenta la síntesis de CXCL2, inducida por IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$ , que promueve el reclutamiento de neutrófilos<sup>257,260,261</sup>.

Al igual que la microglía, los astrocitos pueden activarse en situaciones tales como infecciones, injuria traumática y enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson, ELA). Esta activación conduce a un cambio de su morfología (hipertrofia), proliferación y producción de mediadores proinflamatorios (*fenotipo «A1»*) tales como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 y quimoquinas CXCL1 y CXCL2 (activas sobre neutrófilos). Sin embargo, los mecanismos responsables de este cambio de estado (quiescente a reactivo-astrogliosis reactiva) permanecen pobremente reconocidos. Recientemente, evidencia preliminar (preclínica) señala al TNF $\alpha$  como uno de los implicados, actuando de forma autócrina/parácrina. En modelos de encefalomiелitis autoinmune aguda, uno de los factores de transcripción (proinflamatorios) más protagónicos es el NF $\kappa$ B<sup>256,257,260</sup>.

Aunque la activación astrocitaria es independiente de la activación de la microglía, esta puede modular la astrocitosis secretando IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e INF $\gamma$ . En contrapartida, los astrocitos activados pueden modular la activación (fenotipos) de macrófagos y microglía (ej. con la secreción de INF $\gamma$  y TNF $\alpha$  estimulan el fenotipo proinflamatorio). Pero también pueden secretar IL-10 y TGF $\beta$  y así derivar, la respuesta monocitaria, hacia un estado menos inflamatorio. Además, también pueden modular de una forma similar a las células T de la inmunidad adquirida, es decir, promover fenotipos pro o anti-inflamatorios (injuriantes o protectores, respectivamente)<sup>257,259,262</sup>.

Aún más desafiante es el hecho que, al igual que otras células efectoras, la activación astrocitaria comprendida dentro del concepto de astrocitosis también puede ser neuro-protectora y neuro-reparadora (*fenotipo «A2»*). De modo tal que su manipulación con fines terapéuticos dependerá, entre otros factores, del timing y entorno (microambiente) biológico predominante. Más estudios son necesarios para poder delinear mejor el verdadero rol de estas células en cerebros sanos y diversas patologías neurológicas (astrogliosis)<sup>255,257,262</sup>.

## 4. Rol de la respuesta inmune sistémica en la HSAa

Desde hace varias décadas (desde los años 70), la respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) ha sido estudiada a nivel clínico en la HSAa, poniendo en evidencia la importancia de la respuesta inmune en la fisiopatología de la enfermedad.

Neil y colaboradores, en 1974, realizaron un interesante estudio que dejaba en evidencia a la leucocitosis/neutrofilia en sangre periférica como un marcador de gravedad

de la HSA. Seguidamente, numerosos estudios replicaron este hallazgo. Recientemente, un metaanálisis (con heterogeneidad entre los 13 estudios incluidos) confirmó la asociación de un pronóstico negativo (mayor morbimortalidad) con la hiperleucocitosis precoz (al ingreso) en pacientes con HSAa. También se ha asociado a la hiperleucocitosis (marcador independiente) con el desarrollo posterior de vasoespasmo e isquemia diferida<sup>263-265</sup>.

Al-Mufti y colaboradores enrolaron 1.067 pacientes en forma prospectiva y analizaron el valor del cociente neutrófilos/linfocitos (NLRatio) al ingreso como predictor de isquemia diferida. Se consideró alto un  $NLR \geq 5.9$ . El 72 % de los pacientes presentó un NLR elevado. En el análisis multivariado, el NLR alto se asoció con pobre grado clínico (H&H altos), aneurismas de la circulación anterior, mayor acumulación de sangre en la tomografía (Fisher  $\geq 3$ ), pérdida de conciencia inicial y raza caucásica. Adicionalmente, en el análisis multivariado el NLR resultó ser predictor de isquemia diferida (mayor aporte del estudio en cuestión). El poder predictivo fue similar al de la escala modificada de Fisher, y mejoró cuando se realizó el análisis del modelo combinado (NLR más escala de Fisher: 63 % de sensibilidad y 53 % de especificidad). Sin embargo, no se asoció significativamente con mayor morbimortalidad<sup>272</sup>.

En 2001, Yoshimoto y colaboradores evidenciaron en pacientes con HSAa que el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS, definido según los criterios del Consenso de 1992<sup>266</sup>) se asociaba con peor grado clínico (escala de Hunt y Hess), mayor cantidad de sangre en la tomografía (escala de Fisher) e hiperglicemia al ingreso (mayor a 200 mg/dL). El desarrollo de SIRS se asoció con un riesgo incrementado de presentar complicaciones neurológicas (vasoespasmo e hidrocefalia) y extraneurológicas (o sistémicas)<sup>267</sup>. En 2008, Dhar y Diringer realizaron un abordaje diferente con el SIRS y estudiaron la carga diaria (SIRS burden) del mismo durante los primeros 4 días. En 276 pacientes con HSAa y sin infección en curso analizaron la frecuencia y predictores del SIRS. Detectaron que más del 50 % lo presentan al ingreso y el 85 % en los primeros 4 días (previo al período de vasoespasmo-isquemia diferida). Los factores que se asociaron con el desarrollo de SIRS fueron la gravedad clínica inicial (escala de la WFNS), la cantidad de sangre por tomografía, aneurismas grandes, mayores cifras de presión arterial y el tratamiento del saco aneurismático por vía quirúrgica (colocación de clips). Todos los pacientes que instalaron vasoespasmo clínico-isquemia diferida habían presentado SIRS. Cuanto mayor fue la carga de SIRS, mayor el riesgo de isquemia diferida. Los resultados del análisis multivariado arrojaron como predictores independientes para el

desarrollo de vasoespasmo clínico a la carga de SIRS, la cantidad de sangre volcada al ESbA (Fisher 3) y el tratamiento quirúrgico del aneurisma. Además, la carga de SIRS resultó ser el predictor independiente más potente (junto a la necesidad de intubación orotraqueal) de malos resultados neurológicos (mayor discapacidad y dependencia) y mortalidad. De hecho, los pacientes que no presentaron SIRS no desarrollaron complicaciones neurológicas o extraneurológicas (subgrupo de pacientes uniformes con buen pronóstico)<sup>268</sup>. Posteriormente, en 2010, Tam y colaboradores encontraron resultados similares. Más del 60 % de los pacientes presentaron SIRS, sobre todo aquellos más graves (pobre grado clínico al ingreso por la escala WFNS). Por otra parte, cuanto mayor la carga de SIRS diaria, peores fueron los resultados de morbimortalidad<sup>269</sup>. A continuación, Claassen y colaboradores (2014), sumaron información respecto al posible papel de la respuesta inflamatoria como desencadenante de crisis epilépticas no convulsivas (CENCs) y malos resultados clínicos. Los pacientes con CENC presentaron una mayor respuesta proinflamatoria, tanto medida a través de indicadores clínicos (carga de SIRS), como también empleando biomarcadores séricos (receptor 1 de TNF $\alpha$  y proteína C reactiva). Vale aquí la pena mencionar que actualmente el control de la respuesta inflamatoria es uno de los objetivos destacados, en intensa investigación, para intentar prevenir y/o mitigar y/o interrumpir la epileptogénesis<sup>270,271</sup>.

## 5. Participación de las células del sistema inmune innato en la HSAa

En comparación con la determinación de mediadores solubles o moleculares (especialmente de las citoquinas), la participación de los efectores inmunes de la respuesta innata y adaptativa ha sido sensiblemente menos estudiada a la fecha.

El reconocimiento de las células (periféricas y residentes) como efectores claves de toda respuesta inmune, ha promovido en los últimos años un incremento drástico del interés científico por caracterizar mejor su rol (neuroinjurante vs neuroprotector/neurorrestaurador) en este complejo escenario clínico. El objetivo final es poder, a través de su manipulación, modular los mecanismos neuroinjurantes y/o neuroprotectores-neurorreparadores y, así, lograr mejorar los resultados clínicos de los pacientes<sup>273,274</sup>.

La infiltración parenquimatosa (cerebral) por parte de los efectores inmunes (celulares) ubicadas (primariamente) en el espacio subaracnoideo y/o ventrículos cerebrales es un punto de mucho interés actualmente. Recordamos que una vez que la BHE pierde su integridad luego de ocurrida la hemorragia en el espacio subaracnoideo, la penetración de mediadores inmunes sobre el parénquima cerebral esta facilitado<sup>240,275</sup>.

La activa participación de la microglía (macrófagos residentes) y los neutrófilos/monocitos infiltrantes (macrófagos periféricos) en la generación y expansión del daño del tejido nervioso central es ya conocido hace décadas<sup>274,276</sup>. Sin embargo, se desconoce el/los momentos/s en los cuales unos u otros tienen mayor protagonismo injuriantes o neuroprotector/neurorreparador. Recientemente, Xu y colaboradores con su modelo de ratones aportaron algunos datos promisorios. Encontraron que la microglía se activaba más precozmente y poseía un papel más temprano que los monocitos infiltrantes. Mientras que la primera ya participaba dentro de las primeras 24 horas del sangrado, los segundos entraban en juego a partir del día 2-3 (similar a lo que ocurre en ACV isquémico en ratones y humanos). Además, la microglía continuaba activándose, cada vez en mayor número, hasta el día 3 (fundamentalmente, pero no exclusivamente, en la cercanía de la sangre acumulada). La explicación para los hallazgos mencionados encuentra su fundamento en modelos experimentales que determinaron la evolución temporal del daño de la BHE<sup>274,277</sup>.

Acerca del papel que desempeñan los neutrófilos en este escenario, Provencio y colaboradores han realizado interesantes aportes. En 2010, reportaron una asociación entre el porcentaje de neutrófilos a nivel de LCR de pacientes con HSAA (n=70) y el desarrollo posterior de vasoespasmo angiográfico. Particularmente, un recuento mayor a 62 % al día 3 posterior al sangrado, resultó ser el mejor valor de corte predictor independiente del desarrollo, a los días, de vasoespasmo con una sensibilidad de 80 % y una especificidad de 58 %. Dado que el incremento de neutrófilos ocurrió antes que el vasoespasmo, los investigadores plantean que estas células tendrían un rol efector y no reactivo. Seguidamente, en 2011, trabajando sobre un modelo murino con ensayos de depleción de granulocitos y monocitos previo al sangrado subaracnoideo, demostraron que la depleción de neutrófilos (60 %) se asociaba con una disminución del desarrollo posterior de vasoespasmo angiográfico y mejoría de la morbilidad (neurocognitiva). Además, evidenciaron una menor activación de la microglía y menor infiltración

neutrófila del parénquima cerebral. Finalmente, en 2016, trabajando con el modelo murino con neutrófilos deplecionados reportaron la mejoría del vasoespasmo y del impacto neurocognitivo (performance cognitiva y memoria espacial a largo plazo) cuando la depleción ocurrió 3 días después del sangrado (no antes). Exploraron la participación de los receptores NMDA en el déficit neurocognitivo diferido estudiando la potenciación (tardía) a largo plazo (long term potentiation - LTP). Plantearon que los neutrófilos (grupo con HSA) pueden a través de la secreción de IL-1 $\beta$  e IL-6, interferir con la LTP. Específicamente, la IL-6 puede modular la actividad del receptor NMDA hipocampal y reducir la entrada de calcio al citoplasma (desde los depósitos intracelulares) inhibiendo la LTP. Respecto al funcionamiento del receptor NMDA, los investigadores encontraron como potencial mecanismo implicado en la mejoría neurocognitiva, un cambio en la composición de las subunidades que conforman el receptor (tetramérico). En el grupo deplecionado al día 3 del sangrado, ocurrió una disminución de la subunidad NR2A y del cociente NR2A/NR2B, hecho ya evaluado en modelos con trauma de cráneo asociado a mejoría de la memoria a largo plazo. Desarrollar fármacos capaces de modular la activación y bloquear la entrada precoz de neutrófilos al espacio subaracnoideo-espacio perivascular-parénquima cerebral es una opción, teóricamente, válida<sup>273,274,278,279</sup>.

Friedrich y colaboradores (2011) agregaron más información al plantear un posible rol injurioso, por parte de los neutrófilos, a nivel de la microcirculación cerebral (menor a 100 $\mu$ m de diámetro, capilares y vénulas). En su modelo experimental de ratas con HSA, observaron infiltración neutrófila ya a los 10 minutos post sangrado (las convierte en las primeras células de sangre periférica reclutadas por la injuria cerebral), tanto a nivel microvascular-endotelial como parenquimatoso (al inicio, mayor a nivel microvascular-endotelial y con el pasar de las horas, invaden el parénquima). Testearon drogas capaces de disminuir la activación neutrófila (PDTC: pyrrolidine dithiocarbamate) o de reducir el número de neutrófilos (vinblastina). En ambos casos, encontraron asociación con menor daño endotelial o parenquimatoso y menor actividad colagenasa. Por lo que los investigadores enfatizaron sobre la participación de los neutrófilos como generadores de daño microvascular precoz (degranulación con liberación de proteasas incluidas colágenas y gelatinasa MMP-9, síntesis de mieloperoxidasa y consumo de NO)<sup>280</sup>.

Más recientemente, Atangana y colaboradores (2017) evidenciaron, en su modelo animal de HSA, la relevancia de los neutrófilos intravasculares y su interacción con el endotelio vascular, como gatillo inicial (previo) de la activación de la microglía y consiguiente daño parenquimatoso. Empleando ratones knockout (KO) para los genes de

las moléculas de adhesión ICAM-1 y P-selectina (cuya expresión se incrementa en los primeros días en modelos HSA), provocaron menor interacción neutrófilo-endotelial (vascular) durante la primera semana de evolución, que resultó en los días siguientes, en una menor acumulación de microglía y muerte neural (disminución de la injuria secundaria por la inflamación cerebral propagada). Concomitantemente, no detectaron la invasión parenquimatosa por linfocitos periféricos.

En resumen, podemos señalar que el tráfico de neutrófilos hacia el parénquima cerebral, junto con la activación de la microglía, forma parte de la iniciación y propagación de la injuria cerebral<sup>281,282</sup>.

Con respecto al **rol de los monocitos**, Szypulka y colaboradores (2010), en su modelo murino de HSA, mostraron un aumento de la infiltración monocitaria a las 24 horas post-sangrado<sup>283</sup>. Además, Gris T y colaboradores (2019) encontraron que la infiltración continuaba hasta el día 2, particularmente para la subpoblación de monocitos clásicos proinflamatorios<sup>278</sup>. Por su parte, Xu Z y colaboradores (2019) demostraron que la activación de la microglía es precoz (primeras 24 horas) y alcanza un máximo al tercer día y que la infiltración del SNC por los monocitos ocurrió a partir del día 3. Más interesante aún es el hecho observado de que la microglía activada secretaba CCL-2 (quimioquina de monocitos) y su síntesis se incrementó a lo largo de los 3 primeros días, siendo máxima al día 3, momento en el cual se detectó la infiltración monocitaria. Coincidentemente, la permeabilidad de la BHE también se incrementó (técnica de azul de Evans) durante este periodo pre-infiltrativo periférico<sup>277</sup>. **Estos resultados ponen en evidencia el rol preponderante de la microglía en orquestar la respuesta inmune encefálica**<sup>274,281,284</sup>.

Belge et al. encontraron que luego de la estimulación *in vitro* con LPS, los monocitos CD16+ (de la sangre periférica) produjeron niveles más elevados de TNF- $\alpha$  (citoquina proinflamatoria) y menores niveles de IL-10 (citoquina anti-inflamatoria)<sup>285</sup>. Numerosos estudios han mostrado que el TNF- $\alpha$  está elevado a nivel del parénquima y LCR de pacientes con HSAa, particularmente en pacientes con resultados clínicos desfavorables<sup>286,287</sup>.

Los monocitos CD16+ podrían ser, luego de la microglía activada precozmente, una fuente más tardía de TNF- $\alpha$  a nivel del LCR/parénquima cerebral de pacientes con HSAa.

Además, los leucocitos mononucleares presentes en el LCR de los pacientes con HSAa pueden sintetizar y secretar endotelina-1. La misma puede acceder fácilmente desde la capa adventicia a la capa muscular de las arterias del polígono de Willis y contribuir, como fue mencionado previamente, con el desarrollo de daño vascular y vasoespasma cerebral<sup>288,289</sup>.

Otro interesante hallazgo revelado por Ma y colaboradores (2015) señala al TLR 4 expresado precozmente en las células mononucleares sanguíneas de pacientes con HSAa, como otro factor implicado en el desarrollo de vasoespasma, isquemia diferida y malos resultados clínicos funcionales. La activación de este receptor promueve la síntesis de varias citoquinas proinflamatorias entre las cuales destacamos la IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6; además ICAM-1 (molécula de adhesión intracelular 1) y MCP-1 (proteína quimotáctica de monocitos 1)<sup>290</sup>. Esta última quimoquina, MCP-1, fue estudiada por Kim y colaboradores, en pacientes con HSAa. El incremento plasmático, detectado solo en los casos más severos, se asoció a peores resultados clínicos (escala modificada de Rankin) y no a vasoespasma. Sin embargo, el aumento a nivel del LCR se asoció con el desarrollo de vasoespasma angiográfico<sup>291</sup>.

Finalmente, Unda y colaboradores (2020), detectaron que el recuento plasmático monocitario total aumentado precozmente (al ingreso), en pacientes con HSAa, se asoció con una mayor gravedad, isquemia cerebral y peores resultados clínicos a corto y largo plazo (12 meses)<sup>292</sup>.

**El papel de las DCs en la HSA ha sido menos estudiado.** Hallazgos preliminares dejan planteado su posible rol en la inmunopatogenia de la HSAa.

Roquilly y colaboradores, en 2013, encontraron una disminución relativa y absoluta de esta subpoblación celular en la sangre periférica de pacientes con HSAa.

Además, la depleción celular se acompañó de una disfunción secretoria (típicamente menor capacidad de secreción) de ciertas citoquinas (TNF $\alpha$ , INF $\gamma$  e IL-12) cuando

algunos los TLRs fueron estimulados (TLR 3, 4, 7/8, 9). Las DCs mieloides disminuyeron su capacidad de secretar TNF $\alpha$  cuando el TLR-3 fue estimulado. Por otra parte, las DCs plasmocitoides disminuyeron su capacidad de secretar TNF $\alpha$  e INF $\gamma$  cuando los TLRs 7/8 fueron estimulados<sup>293</sup>.

En pacientes con stroke isquémico y hemorrágico, Yilmaz y colaboradores publicaron en 2010 interesantes resultados que pueden ayudarnos a comprender, al menos en parte, la cinética de las DCs en este contexto clínico singular. **Los investigadores reportaron un descenso relativo y absoluto de estas células precozmente.** Pero además la depleción fue mayor para los pacientes más graves. Evidenciaron una correlación inversa con la gravedad clínica, medida a través de la escala NIH (NIHSS), y la extensión radiológica. Los pacientes con mayores puntajes (más graves) tenían un mayor descenso de la DCs. En los pacientes que fallecieron, pudieron demostrar en la autopsia que la lesión aguda (infarto o hemorragia) estaba infiltrada por las DCs, fundamentalmente mieloides, y en menor número plasmocitoides. Por otra parte, se distribuían particularmente de forma perivascular o, en menor medida, difusamente<sup>294</sup>.

Finalmente, creemos que es válido mencionar aquí que, al igual que en otros pacientes críticos, esta depleción de DCs puede asociarse a inmunodepresión y mayor riesgo de infecciones y mortalidad<sup>296</sup>.

Toda esta reciente información debe considerarse preliminar dado que, entre otras limitaciones, el número de pacientes enrolados ha sido bajo en todos los estudios analizados.

Con respecto al **rol de las células NK**, en modelos animales con stroke isquémico por oclusión (temporal) de la arteria cerebral media característicamente se observa una disminución de las células NK de la sangre periférica y un aumento de la infiltración (precoz) del parénquima isquémico.

Como integrantes de la respuesta inmune innata, estas células son capaces de responder rápidamente (precozmente y sin previa sensibilización) ante la aparición de una noxa o injuria cerebral en este caso, y atravesar la BHE lesionada, para infiltrar la zona de penumbra e infarto.

Ya a la hora 3 de evolución comienzan a detectarse las mismas infiltrando el parénquima cerebral isquémico y la infiltración es máxima al 3 día. A continuación, a través de mecanismos citolíticos (NK CD56<sup>dim</sup>CD16+ mayoritariamente) o secretando

citoquinas proinflamatorias (principalmente  $\text{INF}\gamma$ ,  $\text{NK CD56}^{\text{bright}}\text{CD16-}$ ), pueden contribuir con la expansión del área lesionada (isquémica o infartada)<sup>297,298</sup>. Destacamos que, en modelos isquémicos, de trauma e inflamatorios, una de las principales quimoquinas para las células NKs es la CX3CL1 (fractalkine), derivada de las neuronas (soluble o transmembrana). Estas, atraídas por esta quimoquina aumentada a nivel de la lesión cerebral, a través de la secreción de  $\text{INF}\gamma$ , estimulan la sobreexpresión de moléculas del MHC-II en DCs que también han infiltrado la lesión, pudiendo estas activar las células de la respuesta adaptativa. Adicionalmente, la CX3CL1 puede también atraer a otras células de la inmunidad innata como por ej. monocitos-macrófagos, que también serán activados por el  $\text{INF-}\gamma$  liberado por las células  $\text{NK CD56}^{\text{bright}}\text{CD16-}$ <sup>297,299</sup>. Sin embargo, el rol de la fractalkine es aún motivo de debate e intensa investigación. Más recientemente, un rol neuroprotector de este eje CX3CL1/CX3R1 estrechamente vinculado a la regulación del estado de activación de la microglía (inmunidad innata local) ha surgido como una vía de interacción celular (NK-microglía-neuronal) a ser manipulada con fines terapéuticos en diversas patologías neurológicas agudas y neurodegenerativas<sup>299-301</sup>.

En pacientes con HSAa, Spitzer y colaboradores (2017) evidenciaron a nivel de LCR un aumento de esta subpoblación citotóxica de células NK activadas ( $\text{CD56}^{\text{dim}}\text{CD16+}$ ,  $\text{CD107a+}$ ) en aquellos pacientes que desarrollaron vasoespasma (DTC), isquemia diferida y peores resultados clínicos funcionales medidos a través de la GSC. Además, característicamente, el mayor recuento de células NK coincidió temporalmente con el inicio del aumento de la velocidad media (DTC) a partir del día 4<sup>302</sup>.

Sin duda, más estudios son necesarios para poder dilucidar la participación de esta subpoblación celular en este complejo escenario clínico.

Otras poblaciones celulares de la respuesta inmune innata con importancia en la HSAa aguda son las células residentes locales.
--

En este sentido, la **microglía** como integrante de la inmunidad innata cumple con diversas funciones (pleiotropismo funcional) que ya fueron mencionadas. Particularmente, en la HSAa, la extravasación de sangre en el espacio subaracnoideo (grupo hemo, oxiHb, leucocitos, plaquetas, trombina) es responsable de una cascada de reacciones inmunitarias que llevan a la producción de varios factores vasoactivos y

pro/antiinflamatorio, tanto a nivel local como sistémico, los cuales se han asociado con el desarrollo de lesiones inflamatorias a nivel de SNC<sup>117,274,303</sup>.

En un microambiente proinflamatorio, el fenotipo M1 predominará (activación clásica), por lo cual se liberará mayor cantidad de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$ , RL y NO. Más células microgliales e inmunes serán reclutadas desde la sangre, por lo que la expansión del daño continuará. En contrapartida, el fenotipo M2 (comprende la activación alternativa y la inactivación adquirida), tiene propiedades eminentemente neurotróficas (IGF -1), neuroreparadoras y antiinflamatorias y ve favorecido su expresión en ambientes con IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$  y fagocitosis de células apoptóticas<sup>246,304</sup>. Surge aquí un interesante target terapéutico potencial que es la modulación del fenotipo (switch o viraje M1 a M2), dado que sabemos que la simple depleción de la microglía genera mayor daño y peores resultados clínicos<sup>281,305</sup>.

## 6. Participación de las células del sistema inmune adquirido en la HSAa

Sin duda alguna, ha sido francamente menos investigada a la fecha. Sin embargo, en los últimos años han comenzado a publicarse resultados que la plantean como otra fuente de células inmunes patogénicamente involucradas en este escenario clínico complejo

La infiltración linfocitaria a nivel del espacio subaracnoideo es un hecho comprobado en estudios preclínicos. Al igual que ocurre con otras células inmunes, su rol neuroprotector/neuroreparador o neurotóxico/injuriante, depende al menos parcialmente, del fenotipo predominante que se activa y expande<sup>306,307</sup>. **Así, el fenotipo Th1 es injuriante mientras que el fenotipo Th2 es antiinflamatorio, neurotrófico y neuroreparador.** Además, otras subpoblaciones celulares como las células Th17 y Treg, también se han explorado insuficientemente al momento actual<sup>306-308</sup>. De modo tal que, aun cuando los avances han sido sustanciales, la inmunopatogenia en stroke, incluida la HSAa, es aún motivo de intensa investigación<sup>274</sup>.

Específicamente en HSA, Kubota y colaboradores (1993) fueron los primeros en analizar el timing y cuantificar las subpoblaciones linfocitarias (por citometría de flujo) que infiltraron el espacio subaracnoideo en un modelo animal (ratas) de HSA<sup>309</sup>.

El pico de aparición de células T (supresoras y citotóxicas) a nivel del espacio subaracnoideo ocurrió al día 2 luego del sangrado inicial (simultáneamente con la aparición de macrófagos<sup>274,309</sup>).

Becker y colaboradores, en su modelo animal (ratas) con isquemia cerebral aguda por oclusión arterial, encontraron que la subpoblación Th1 determinaba una mayor extensión del área de isquemia/infarto, mientras que la subpoblación Th2 realizaba lo contrario<sup>310,311</sup>.

Conocido lo anterior, Ayer y colaboradores (2013) diseñaron un modelo experimental en ratas con HSA a los efectos de testear la simvastatina (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors), cuyo efecto conocido, entre varios muy atractivos desde un punto de vista neuroprotector (pleiotropismo), es su capacidad de inducir una respuesta inmune Th2. Los investigadores encontraron, con dosis altas, efectivamente un viraje de la subpoblación de linfocitos T (en el espacio subaracnoideo y parénquima cerebral tanto a nivel cortical como del tronco encefálico) hacia fenotipo Th2, que se acompañó de un aumento concomitante de la expresión del factor antiinflamatorio/neurotrófico TGF- $\beta$ 1 y disminución de la expresión de la citoquina proinflamatoria/proapoptótica - piroptótica IL-1 $\beta$ <sup>312</sup>.

Respecto a la investigación clínica, pocos trabajos a la fecha han estudiado profundamente la participación de la respuesta inmune adaptativa, subpoblaciones celulares y estados de activación de estas<sup>274</sup>.

Los pioneros fueron Mathiesen y Lefvert (1996) quienes en su proyecto estudiaron en pacientes con HSAa (n=10) las subpoblaciones linfocitarias a nivel del LCR ventricular y sangre periférica (células T CD4+, CD8+, NK, y células B). **Entre los hallazgos más interesantes destacaron la diferente composición celular de ambos compartimentos (LCR y sangre periférica), hecho que refleja que las células encontradas a nivel del LCR no son la mera expresión del vertido de la sangre al espacio subaracnoideo-ventricular, sino que los investigadores plantearon una proliferación/reclutamiento celular intratecal regulada localmente.** Además, reportaron que los 3 pacientes que presentaron déficit isquémico diferido tuvieron un incremento relativo significativo de células CD8 a nivel del LCR (hecho que no ocurrió en los restantes 7 que no desarrollaron isquemia diferida). Basados en este resultado,

postularon una posible participación de las células T CD8+ en la base etiopatogénica de la isquemia diferida<sup>313</sup>.

Más recientemente, Jiang y colaboradores (2017), analizaron en 27 pacientes con HSAa las subpoblaciones de leucocitos y linfocitos, y el perfil de citoquinas en sangre periférica. El tratamiento del aneurisma se realizó únicamente por vía quirúrgica y dentro de las 24 horas del sangrado. La primera muestra se obtuvo en el preoperatorio y posteriormente hasta el día 6 del postoperatorio. Detectaron que el porcentaje de células CD3, CD8, CD4, NKT, Treg estaba significativamente disminuido y los niveles de IL-2, IL-4 e INF $\gamma$  significativamente aumentado un día después de la cirugía respecto al preoperatorio. Por el contrario, las células NK, NKG2D y B se incrementaron, mientras que los niveles de IL-10 descendieron. Al evaluar sus resultados en función del pronóstico, los investigadores encontraron que, excepto por las células B, los pacientes que tuvieron mejor evolución clínica, tenían las demás subpoblaciones celulares (CD3, CD4, CD8, NK, NKT, NKG2D y Treg) relativamente más elevadas con respecto al grupo con resultados desfavorables (porcentaje previo contra sexto día de postoperatorio). De manera que los investigadores plantearon la posibilidad de la existencia de un deterioro profundo de la función inmune post HSAa en pacientes candidatos a neurocirugía precoz, y la misma fue significativamente diferente según la evolución clínica posterior. Respecto a las citoquinas, señalaron 2 fases, una precoz pro-inflamatoria caracterizada por el aumento mencionado, y otra tardía, que se inicia alrededor del sexto día cuando la IL-10 recupera su nivel<sup>314</sup>.

## 7. Citoquinas y otras moléculas biológicamente activas estrechamente relacionadas en HSAa

Entre las moléculas más estudiadas que participan en la respuesta inmune locorregional (neuroinflamación) y sistémica (respuesta inflamatoria sistémica) en modelos preclínicos y pacientes con HSAa aguda, se destacan las CTQs. A continuación, mostraremos la evidencia científica en este punto y, otras moléculas involucradas, serán destacadas fundamentalmente, por su relación con las primeras.

De acuerdo con la evidencia actual, basada en estudios preclínicos y clínicos, numerosas CTQs están implicadas en la patogenia del daño tisular y expansión de la lesión secundaria tanto en la IEP como en la IED.

Pero también son varias las CTQs que están involucradas, en mayor o menor medida, en la reparación y plasticidad neuronal. De forma tal que, en un sentido o en otro (proinflamatorio o antiinflamatorio), las mismas influyen en última instancia sobre los resultados clínicos finales de nuestros pacientes. De ahí que numerosos grupos de investigadores trabajan hoy en día procurando encontrar «la molécula» (o la vía de señalización) a ser modulada (estimulada o inhibida) en un determinado momento (y no en otro) post sangrado.

Su concentración ha sido medida en tres compartimentos<sup>315</sup>:

- 1) **Suero o plasma**
- 2) **LCR:** ventricular, cisternal o lumbar. Aporta información global.
- 3) **Parénquima cerebral:** a través de de la utilización de microdiálisis cerebral (MDC) (para moléculas con PM<100 kDa; CTQs 20-30 kDa): aporta información regional, circundante al catéter (puede colocarse en un área normal o patológica).

Los niveles de CTQs a nivel clínico se han relacionan fundamentalmente con tres variables clínicas de particular interés: a) isquemia/infarto diferida/o, b) morbilidad motora funcional e independencia, morbilidad mnésica-neurocognitiva y disejcutiva, c) mortalidad. Otros puntos de interés son: d) el vasoespasmo propiamente dicho (estrechamiento arterial, no implica necesariamente repercusión sobre el parénquima cerebral) y, e) la hidrocefalia sin resolución espontánea con necesidad de implantación de shunt ventrículo - peritoneal.

Los estudios publicados se realizaron en su amplia mayoría en los pacientes más graves (H&H IV-V) dado que son los pacientes en los cuales se les coloca catéteres intraparenquimatosos para monitoreo de PIC, presión tisular de oxígeno y/o MDC y emplazamiento de catéteres intraventriculares y/o lumbares para la extracción controlada de LCR<sup>286,315</sup>.

## 7.1 Evidencia disponible para las citoquinas Proinflamatorias/Th1/Th2/Th17/Treg en HSAa

Dos hechos relevantes, varias veces reportados a la fecha, analizados en el metaanálisis de Wu y colaboradores (2016), son la asociación de niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 significativamente elevados en el LCR de los pacientes en comparación con los controles y, en pacientes que desarrollan vasoespasmos (DTC), contra los que no lo padecen<sup>286</sup>.

Además, en el mismo metaanálisis se evidenció una correlación directa entre la severidad clínica (H&H) y la concentración en LCR para ambas CTQs<sup>286</sup>. Con menor evidencia, pero también reportado, es la asociación con pobres resultados de morbilidad<sup>315</sup>.

Schiefecker y colaboradores detectaron peores resultados clínicos (a los 3 meses del ictus) en pacientes con mayor concentración parenquimatosa de IL-6 (MDC)<sup>316</sup>. Graetz y colaboradores evidenciaron mayores niveles sistémicos y cerebrales (MDC y LCR) de IL-6 en pacientes que tuvieron HIC<sup>110</sup>. Hecho que también se observó en el metaanálisis de Zeiler y colaboradores<sup>315</sup>.

En cuanto a la asociación con vasoespasmos (definido por la reducción del diámetro arterial o aumento de las velocidades en el DTC), tanto la IL-6 como el TNF- $\alpha$  medidos por MDC se asociaron significativamente con su aparición. Sin embargo, los resultados son indefinidos respecto a la isquemia diferida<sup>286,315,317</sup>.

Cuando se emplea MDC, la concentración de CTQs es mayor en zonas circundantes al sangrado y menor en zonas distantes (aunque siempre mayor a la concentración de los controles (sanos)<sup>315</sup>.

Por otra parte, la determinación de TNFR-1 (receptor de TNF), IL-1Ra e IL-6 en suero y no a nivel del LCR, se asoció con el desarrollo de SIRS y disfunción orgánica múltiple. Además de la producción sistémica, también se planteó como **posible el pasaje desde el intersticio cerebral y/o el LCR hacia la sangre y posterior circulación sistémica de mediadores inflamatorios generados a nivel intracraneano**.

Por otra parte, el **rol de la IL-1 $\beta$  y el antagonista del receptor IL-1 (IL-1Ra) han sido mejor caracterizados, particularmente en HSAa**<sup>382,383,384</sup>. Se han descrito algunos efectos deletéreos de la IL-1 en este escenario tales como lesión de la BHE, aumento de la secreción de endotelina-1, vasoespasmos, aumento del edema cerebral, hipertensión intracraneana e isquemia cerebral precoz y diferida. Muchos de los cuales son potenciados

por el aumento de la IL-6 estimulado por la IL-1. Vale la pena aquí destacar los ensayos clínicos realizados con IL-1Ra administrado por vía parenteral (subcutánea). Ya culminada con éxito la fase II (farmacocinética y seguridad) hace poco, actualmente se encuentra en marcha la fase III que estará reclutando 1000 pacientes hasta octubre de 2022 (<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03249207>). Por el momento sabemos que la administración del antagonista es capaz de reducir significativamente los niveles sanguíneos de IL-6, proteína C reactiva y fibrinógeno. Pero, además, su farmacocinética con las dosis administradas determinó una concentración plasmática predecible, segura y bien tolerada<sup>385</sup>.

**La información disponible para otras citoquinas (IL-2, IL-4, IL-10, IL-17A) es aún más escasa en cantidad y calidad.** Especialmente en lo que refiere a sus niveles en el parénquima cerebral, seguramente debido al alto costo y baja disponibilidad de los equipos de MDC (comparado con su medición en sangre o LCR). También es aún insuficiente la información acerca del impacto de sus niveles (en cualquier compartimento) con otros resultados primarios de significativo interés clínico a saber: pronóstico funcional y neurocognitivo, hidrocefalia crónica y dependencia de derivación ventrículo-peritoneal, evolución del tejido y atrofia cerebral, entre otros mencionados<sup>315</sup>.

La IL-17 ha captado atención en modelos animales y pacientes con stroke (isquémico y hemorrágico) más recientemente.

Secretada fundamentalmente, pero no exclusivamente por las células Th17 (no reportado en HSAa), se le reconoce un efecto proinflamatorio. Una de sus funciones principales es el reclutamiento de neutrófilos hacia el sitio de la injuria. Pero, además, actúa sobre un amplio panel de células, y las estimula a secretar potentes mediadores de la inflamación como IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 y quimoquinas. Coulibaly y colaboradores (2020) publicaron interesantes resultados sobre el rol antes mencionado. Estudiaron el LCR de 10 pacientes y de animales (ratones) con HSA. En ambos casos observaron un aumento de la concentración de la IL-17. A continuación, inhibieron (usando el agonista inverso GSK805) el factor maestro de transcripción de la IL-17 —RAR-Related Orphan Receptor Gamma T— logrando así suprimir el reclutamiento meníngeo de los neutrófilos. Además, detectaron a las células mieloides (en particular los propios neutrófilos) ubicadas a nivel del espacio subaracnoideo como una fuente común de IL-17, hecho que sugiere un estímulo quimiotáctico autócrino de dicha citoquina<sup>184</sup>.

Chaudhry y colaboradores (2017) investigaron por primera vez el rol del eje IL-23/IL-17 en 80 pacientes con HSAa. Ambas citoquinas estaban aumentadas significativamente a nivel plasmático (primera semana post sangrado) en comparación con un grupo control. La IL-23, secretada por monocitos y DCs, tiene un papel distinguido en la maduración del fenotipo Th17 y amplificación de la secreción de IL-17. De forma intrigante, el grupo de pacientes que recibió tratamiento endovascular (coils) del aneurisma presentó menores niveles de IL-23 que los operados (clips). Por otra parte, la IL-17 se elevó más en los pacientes más graves (H&H IV-V) y descendió en los pacientes con infartos cerebrales diferidos. Ninguna de las dos citoquinas se asoció con los resultados clínicos medidos de forma dicotomizada (bueno o malo) con las escalas GOS extendida o Rankin modificada<sup>342</sup>.

La IL-10, es otra citoquina insuficientemente estudiada en este escenario clínico particular<sup>354</sup>.

En modelos animales, la administración sistémica de IL-10 mejora la recuperación neurológica y atenúa significativamente la respuesta proinflamatoria<sup>386</sup>. Pero en contrapartida, evidencia preliminar indica que sus niveles elevados pueden favorecer el desarrollo ulterior de infecciones<sup>387</sup>.

Otras citoquinas como la IL-2 y el INF $\gamma$  (Th1) e IL-4 (Th2) no han recibido atención hasta la fecha<sup>315</sup>.

En un estudio pequeño conformado por pacientes con hemorragia intracerebral espontánea y HSAa, los niveles elevados de IL-4 a nivel del LCR (precoz) se asociaron a menor mortalidad<sup>320</sup>.

# **CAPÍTULO 2. Objetivos y preguntas de investigación**

## **2.1 Objetivos Generales**

1. Profundizar en el estudio de las vías etiopatogénicas involucradas en la injuria encefálica precoz y diferida en HSAa aguda. Especialmente, profundizar en el conocimiento del rol de la respuesta inmune locorregional y sistémica.

2. Posicionar a la Citometría de Flujo en Medicina Intensiva en Uruguay como una técnica para la valoración clínica de la respuesta inmune en diversos escenarios clínicos donde se presume la participación del sistema inmune y la inflamación.

## **2.2 Objetivos específicos**

1. Evaluar la respuesta inmune en la fase aguda de la HSAa a través del estudio de poblaciones celulares de la respuesta inmune innata y adaptativa y determinación de citoquinas tanto a nivel de la sangre periférica como del LCR.
2. Conocer los cambios en la respuesta inmune innata y adaptativa según la técnica seleccionada para el tratamiento del saco aneurismático: «coils o clips».
3. Estudiar la respuesta inmune innata y adaptativa en función de variables clínico-imagenológicas de severidad de la HSAa:
  - Gravedad clínica al ingreso a la unidad de cuidados intensivos valorada a través de la escala de Hunt y Hess.
  - Cantidad de sangre a nivel intracraneano valorada a través de la escala tomográfica de Fisher.

- Desarrollo o no de vasoespasmo evaluado a través del doppler transcraneano seriado.
  - Mortalidad en la Unidad de Cuidados Intensivos.
4. Profundizar en el conocimiento de la interacción (crosstalk) de la respuesta inmune neuro-sistémica. Analizar y comparar de forma seriada las poblaciones y subpoblaciones celulares, su estado de activación y niveles de citoquinas a nivel del LCR respecto a la sangre periférica.

## 2.3 Preguntas de investigación

A pesar de los grandes avances en neurociencia, la HSAA continúa presentado actualmente elevada morbi-mortalidad. Esto se atribuye en parte al conocimiento parcial de los mecanismos fisiopatológicos y etiopatogénicos desencadenados por el vertido brusco de sangre en el espacio subaracnoideo. Como detallamos, la respuesta inmune es uno de los posibles mecanismos etiopatogénicos cuyo rol es intensamente investigado en la actualidad y es objeto de estudio para el desarrollo de estrategias terapéuticas con el objetivo de modularla. Asimismo, es importante conocer el impacto de la neurocirugía y del tratamiento endovascular (embolización aneurismática) sobre la respuesta inmune de forma que sea un elemento más a considerar, a futuro, en el momento de decidir la mejor estrategia terapéutica multimodal (farmacológica y no farmacológica) para cada paciente.

**Teniendo presente la información previa, en la presente tesis se pretendió dar respuesta a las siguientes preguntas:**

- a. ¿Cuáles son los principales efectores inmunes que se ponen en marcha en la fase aguda de la HSAA? ¿Se modifican los mismos en la fase precoz y tardía de la HSAA?
- b. ¿Cómo se modifican dichos efectores en función de la gravedad de la HSAA medida a través de variables clínicas-imagenológicas?
- c. ¿Cómo influye la estrategia terapéutica de sellado aneurismático sobre dichos efectores inmunes?

- d. ¿Es posible identificar algún biomarcador que tenga rol pronóstico tanto como predictor de vasoespasmos o de muerte?
- e. ¿Se reconoce algún efector inmune que amerite profundizar su estudio y el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas al mismo tanto en modelos animales como en estudios clínicos?

# CAPÍTULO 3. Materiales y métodos

## 3.1 Pacientes y controles

Enrolamos prospectivamente una muestra de 39 pacientes que padecieron una HSAa (32 de sexo femenino y 7 de sexo masculino) con una mediana de edad de 51 años (IQR 43-64) desde 2014 a 2018. Todos cursaban las primeras 72 horas del sangrado (día 0) y el tratamiento del saco aneurismático ocurrió en las primeras 24-36 horas del ingreso a la emergencia hospitalaria.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes: edad menor a 18 años, trauma encefalocraneano asociado a la HSAa, encefalopatía hipóxico-isquémica asociada a la HSAa, ausencia de un aneurisma sacular como responsable del sangrado, otra etiología vascular diferente a un aneurisma sacular como fuente del sangrado meníngeo, neoplasia intracraneana, ventriculitis y/o meningitis durante el periodo del estudio (primeros 10 días de evolución), neumonía asociada a la ventilación mecánica y/o bacteriemia durante el periodo del estudio (primeros 10 días de evolución), embarazo, enfermedades previas conocidas con base inflamatoria o autoinmune (incluidos las neoplasias malignas), aquellos pacientes cuyos familiares directos no firmaron el consentimiento informado.

La severidad clínica de la HSAa se evaluó a través de la escala de Hunt & Hess (Anexo 1). Se definió que un paciente tenía buen grado clínico si su escala fue de I, II o III. En cambio, tenía pobre grado clínico, si su escala fue de IV o V. La magnitud del sangrado se evaluó con el uso de la escala tomográfica de Fisher (Anexo 1). Se definió como de bajo riesgo de Vasoespasmos a los valores 1 y 2; por el contrario, se definió como de alto riesgo de Vasoespasmos a los valores 3 y 4. El diagnóstico del saco aneurismático se realizó mediante una Angio - Tomografía o una Angiografía por Sustracción Digital (DSA).

Los pacientes se trataron siguiendo el protocolo clínico-terapéutico de la Cátedra de Medicina Intensiva que incluyó el sellado precoz del saco aneurismático por vía quirúrgica (clips) o endovascular (coils). A todos los pacientes se les realizó monitoreo no invasivo con Doppler Transcraneano (DTC) como método de screening del desarrollo de vasoespasmos cerebral (cada 24-48 horas) desde el ingreso a la Unidad de Cuidados intensivos (UCI) y hasta el día 14 de evolución. El vasoespasmos de la Arteria Cerebral

Media (ACM) y la Arteria Cerebral Anterior (ACA) se diagnosticó cuando la velocidad media (VM) del flujo sanguíneo cerebral (FSC) superó los 120 cm/s y resultó ser 3 veces superior a la VM del FSC a nivel de la Arteria Carótida Interna (extracraneana) ipsilateral (índice de Lindegaard  $> 3$ )<sup>80,321</sup>. A nivel del Tronco Basilar el vasoespasmó se diagnosticó cuando la VM del FSC en la arteria basilar aumentó por encima de 90 cm/s y resultó ser 2 veces superior a la VM del FSC a nivel de las arterias Vertebrales (extracraneanas) (índice de Soustiel  $> 2$ )<sup>322</sup>.

La nimodipina por vía enteral (60 mg cada 4 horas), como profilaxis de la isquemia diferida, se indicó siguiendo las recomendaciones internacionales, a todos los pacientes desde el ingreso y hasta completar 21 días de evolución.

Se incluyeron 56 controles sanos (45 de sexo femenino y 11 de sexo masculino) sin factores de riesgo vascular mayores o enfermedades previas conocidas con base inflamatoria o autoinmune o neoplásica fueron incluidos. A 41 de ellos se les extrajo una muestra de sangre de control. 15 sujetos con diversas patologías benignas que tenían indicación quirúrgica curativa programada (coordinada) y se les realizó anestesia raquídea (mayoritariamente patologías benignas de ovario y hernias inguinales y misceláneas), previo consentimiento informado, se les extrajo muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) con la finalidad de medir la concentración de las citoquinas.

### 3.2 Extracción de las muestras de sangre periférica y líquido cefalorraquídeo

Las muestras de sangre periférica (SP) y LCR de pacientes se extrajeron en forma simultánea (2 mL y 1 mL, respectivamente) en los primeros 6 días de evolución de la HSAA, respetando en todo momento los protocolos confeccionados por la Catedra de Medicina Intensiva en cuanto a la manipulación de catéteres intraarteriales (para monitoreo invasivo de la presión arterial a nivel radial y/o extracción seriada de sangre) y/o intracraneanos o lumbares. Las muestras de LCR se tomaron desde un catéter intraventricular (ventrículos laterales) o cisternal (espacio subaracnoideo encefálico) o lumbar (espacio subaracnoideo medular) que se emplazó con fines de manejo clínico individual siguiendo el protocolo de tratamiento de la Cátedra de Medicina Intensiva y Neurocirugía (para tratamiento de una hidrocefalia aguda, monitoreo de la PIC o

profilaxis del vasoespasma cerebral). Obtuvimos muestras de SP de todos los pacientes enrolados en el estudio y muestras de LCR de 31 pacientes. En aquellos pacientes que no tenían indicación de colocación de un dispositivo intracraneano o lumbar, se obtuvo únicamente muestras seriadas de SP. En ningún caso se dejó el catéter emplazado por razones de investigación únicamente. La decisión clínica de retirar o no un catéter la realizó el equipo médico-quirúrgico actuante.

Las muestras de SP y LCR se extrajeron por parte del personal de la UCI, entrenado y autorizado por la Cátedra de Medicina Intensiva, Piso 14, Hospital de Clínicas.

Las muestras obtenidas en los primeros 3 días (desde el día 0 o día del sangrado) se definieron como muestras representativas de la fase precoz de la HSAa (IEP o early brain injury). En cambio, las muestras obtenidas a partir del día 4 en adelante, se definieron como representativas de la fase tardía de la enfermedad (IET o diferida).

El LCR de los controles se obtuvo al momento que el anestesista emplazó el catéter para la anestesia raquídea indicada por el equipo anestésico-quirúrgico actuante.

Las muestras de SP y LCR que se emplearon para el estudio de las concentraciones de citoquinas se colectaron en tubos sin anticoagulante (tubo seco). La SP y el LCR se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos para obtener el suero y LCR libre de eritrocitos. Estos fueron inmediatamente criopreservados a  $-80^{\circ}$  C hasta el momento del análisis. Para el análisis de las diferentes poblaciones celulares por Citometría de Flujo la SP se extrajo y colocó en tubos con el anticoagulante EDTA y el LCR se colocó en tubos con la solución estabilizante Transfix y anticoagulante EDTA (Cytomark, UK). El recuento absoluto de leucocitos en SP y LCR se realizó de forma automática con el uso de ABX micros 60 (Horiba, Montpellier, France). Las muestras para citometría de flujo se procesaron y adquirieron dentro de las 12 horas de su extracción.

Cinco muestras de LCR fueron conservadas en Transfix y en tubo seco (la misma muestra) y se marcaron y adquirieron en el citómetro con el panel utilizado. Se confirmó que la preservación en Transfix no afectaba la intensidad de fluorescencia de los marcadores utilizados.

En todos los casos las muestras de SP y LCR se obtuvieron en la Unidad de Cuidados Intensivos, posterior al tratamiento del saco aneurismático. No se obtuvieron muestras antes del tratamiento o durante los procedimientos correspondientes (endovascular o neurocirugía).

El llenado de la base de datos con las variables clínicas y los resultados de la citometría de flujo (concentraciones de citoquinas y recuentos celulares) se realizó de

forma independiente. Una vez que se completaron ambas bases de datos, se conformó la base de datos final y el análisis con el cruzamiento de los datos clínicos (escala de H&H, vasoespasmó y mortalidad) y los datos de la respuesta inmune (citoquinas y subpoblaciones celulares).

### 3.3 Análisis por Citometría de Flujo de las subpoblaciones celulares

El estudio de las diferentes poblaciones celulares fue realizado en 2 etapas. Al inicio del proyecto (primeros 12 pacientes) se utilizó un panel de anticuerpos de 4 colores (Figura 5) y se utilizó un citómetro FACS Calibur (BD, Oxford, UK) equipado con dos láseres (uno de argón, 488nm (azul) y el segundo de diodo rojo, 635nm) que permite analizar 4 fluorescencias de forma simultánea y 2 parámetros de dispersión de la luz (SSC y FSC) y se encuentra disponible en el laboratorio de Biología Molecular y Citometría de Flujo (LCBM) en el Departamento Básico de Medicina. Para la adquisición de los datos, se utilizó el software CellQuest (BD). Posteriormente, gracias a la adquisición de un nuevo citómetro en el LCBM se estandarizó un panel de 8 colores (Figura 6) que permitió evaluar con mayor precisión las poblaciones celulares y determinar un mayor número de poblaciones celulares y de variables. En este caso se utilizó un Citómetro FACS Canto II (Becton–Dickinson, Oxford, UK) equipado con 3 láseres (uno de argón, 488nm (azul) y el segundo de diodo rojo, 635nm y el tercero láser violeta, 405nm) que permite analizar 8 fluorescencias de forma simultánea y 2 parámetros de dispersión de la luz (SSC y FSC). El software de adquisición fue el FACSDiva, que incorpora el módulo de control de calidad CST del instrumento, que permite optimizar los voltajes y realizar un control y seguimiento de los parámetros de funcionamiento del instrumento. Para el análisis de los datos se utilizó en todos los casos el software Infinicyt™ (Cytognos, España).

**Figura 5. Panel de anticuerpos de 4 colores**

Tubos (poblaciones a determinar)	Láser azul			Láser rojo
	FITC	PE	PerCP/ PE-Cy5.5-	APC
Neutrófilos/Monocitos	CD16	CD69	CD14	CD64
Células NK y B	CD56	CD16	CD19	CD3
Células T y activación	CD8	CD69	CD3	CD4
Células T (CD28)	CD4	CD28	CD3	

Nota: Los anticuerpos son BD Pharmingen, San Diego, USA

**Figura 6. Panel de anticuerpos de 8 colores**

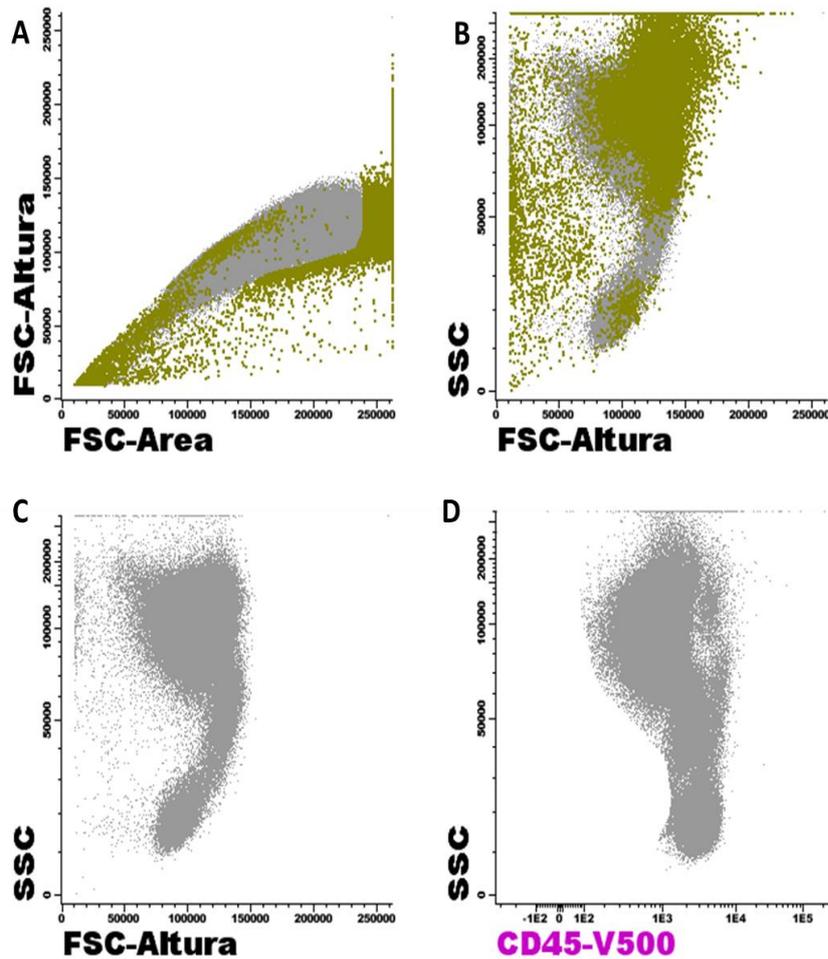
Tubos (poblaciones a determinar)	Láser violeta		Láser azul				Láser rojo	
	V450/BV421	V500	FITC	PE	PerCPCy5.5	PE-Cy7	APC	APC-H7
Neutrófilos/ Monocitos/DC/NK	CD3/CD20/CD19	CD45	CD16	CD56	HLA-DR	CD11c	CD123	CD14
Células T TH1/TH2/TH17/ activación	CD3	HLA-DR	CD45	CD183(CXCR3)	CD4	CD196 (CCR6)	CD38	CD8
Células T reguladoras	CD3	HLA-DR	CD45	CD25	CD4	CD194 (CCR4)	CD127	CD45RO

Nota: Los anticuerpos son BD Pharmingen, San Diego, USA

Las muestras de SP y LCR fueron lavadas y suspendidas en una solución buffer fosfato (PBS: phosphate-buffered saline) e inmunomarcadas durante 15 minutos a temperatura ambiente con los paneles de anticuerpos monoclonales mostrados en las figuras 5 y 6. La concentración óptima de los anticuerpos fue previamente determinada por titulación. Después de la incubación, los eritrocitos fueron lisados con la solución lítica FACS (Becton-Dickinson, San Diego, CA). Posteriormente, se realiza un nuevo lavado y se procede a adquirir los datos en el citómetro.

### Estrategia de gating

Inicialmente se definió la estrategia de gating más apropiada y se guardó dicha estrategia (función del software infinicyt) de forma de que todos los pacientes fueron analizados con la misma estrategia de gating. Previo al análisis de todas las poblaciones celulares se eliminaron los dobletes por FSC-área/FSC-altura y los debris por FSC/SSC (Figura 7).



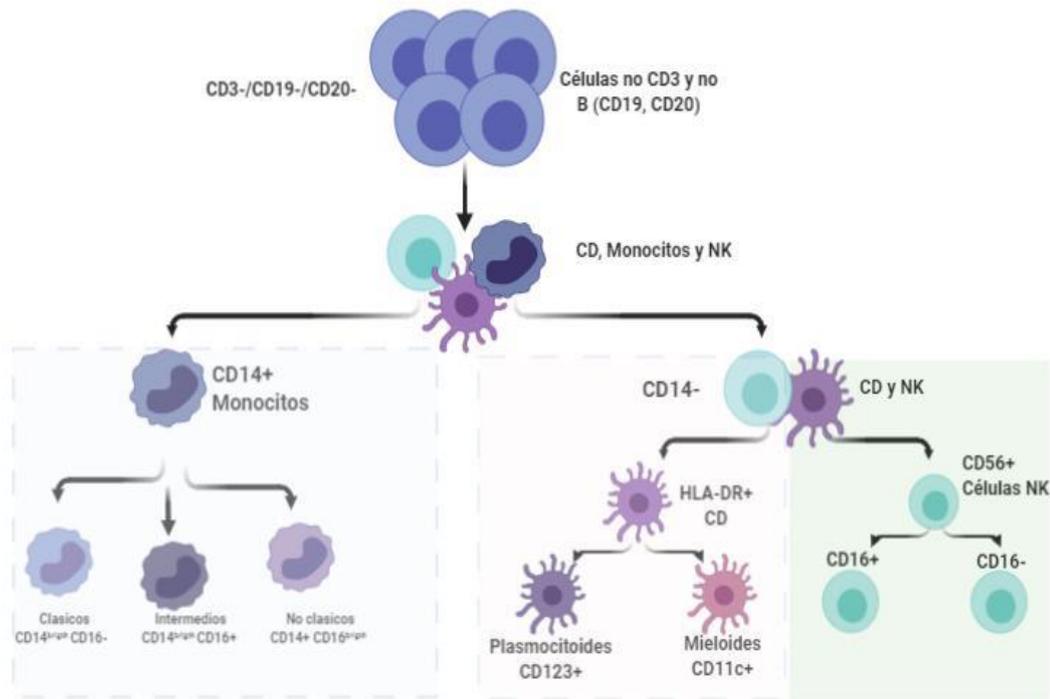
**Figura 7.** Eliminación de dobletes y debris. A modo de ejemplo se muestra la sangre periférica de un paciente representativo. En A y en B se muestra en verde los eventos eliminados para el análisis que corresponden a dobletes y debris. En C y D los eventos a analizar (gris)

### Neutrófilos

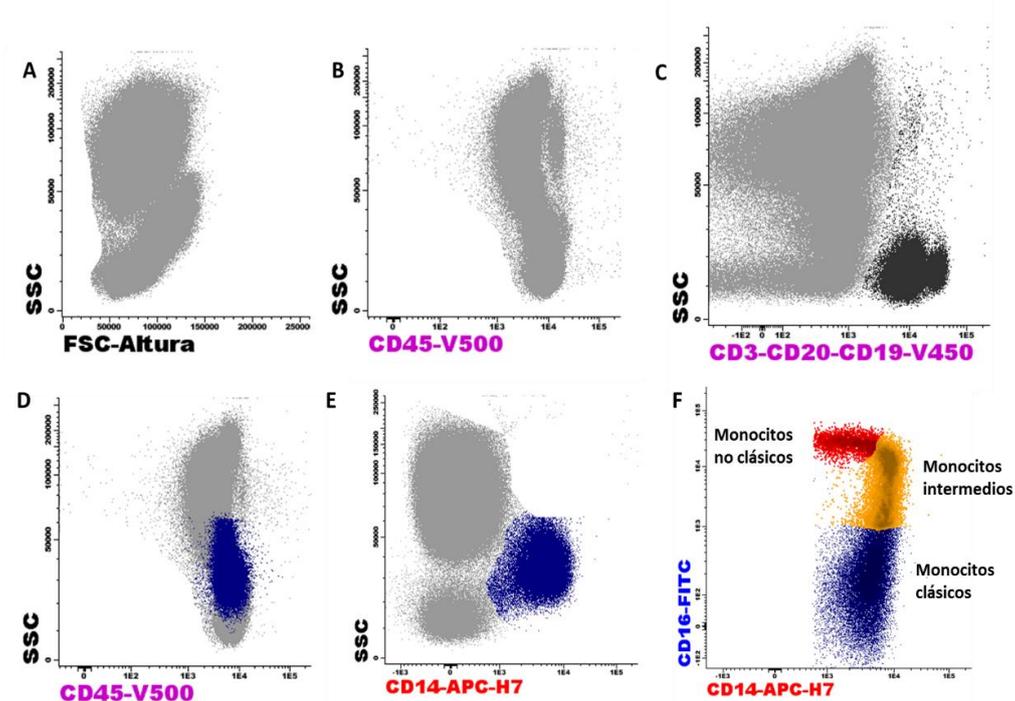
Los neutrófilos fueron seleccionados por SSC/FSC/CD45. La activación fue determinada por CD69 al utilizar el panel de 4 colores y por HLA-DR en el panel de 8 colores.

### Monocitos

Según lo reportado por Maecker y colaboradores (Maecker et al., 2012), los monocitos se definieron por SSC, la ausencia de expresión de CD3- y CD19- y la expresión de CD14. Como se muestra en las figuras 8 y 9 según expresión de CD16 e intensidad de expresión de CD14 se determinaron las 3 poblaciones de monocitos clásicos ( $CD14^{brigh}CD16^{-}$ ), intermedios ( $CD14^{brigh}CD16^{+}$ ), y no clásico ( $CD14^{+}CD16^{brigh}$ ).



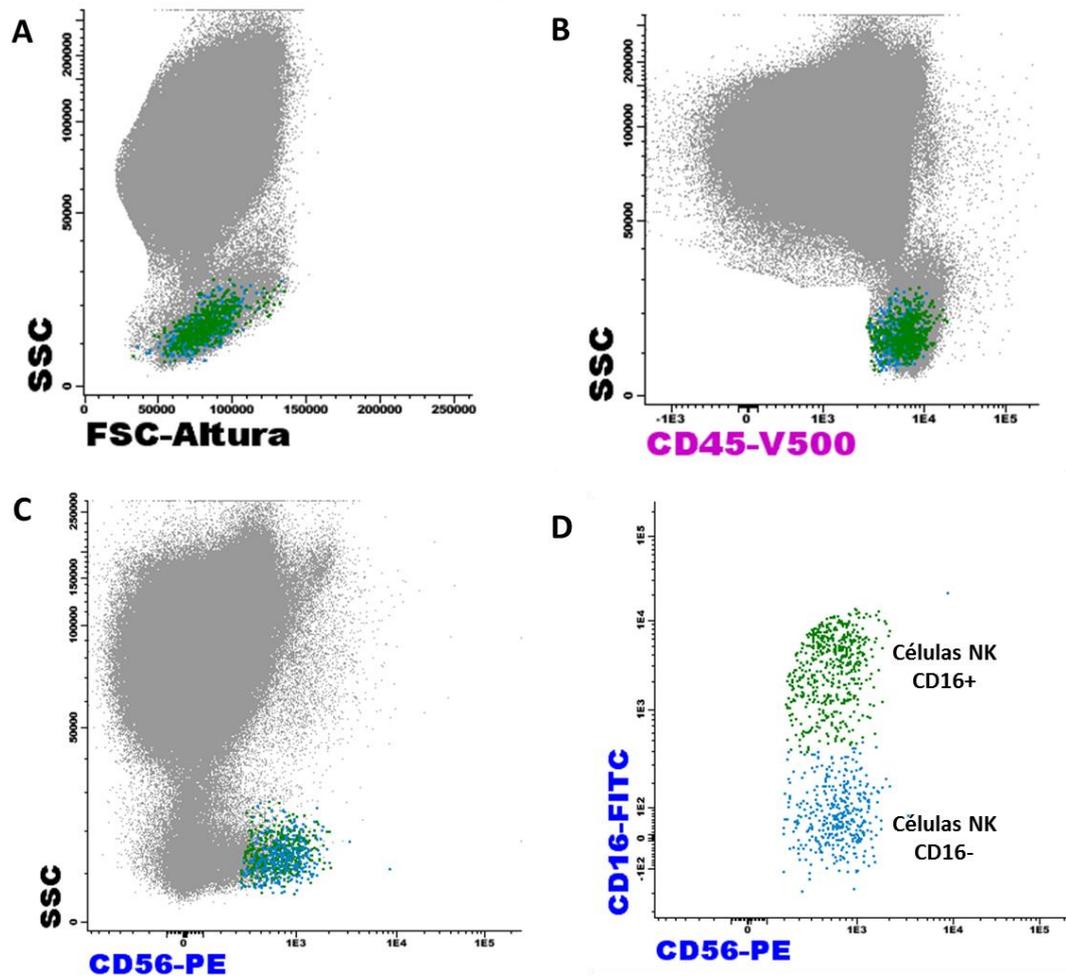
**Figura 8.** Definición de poblaciones de monocitos, células NK y DCs según la expresión de marcadores de superficie.



**Figura 9.** Estrategia de gating de monocitos y subpoblaciones monocitarias. A modo de ejemplo se muestra la sangre periférica de un paciente representativo. A y B se muestra eventos a analizar sin dobletes ni debris. C se eliminan de análisis las células CD3<sup>+</sup> y células B a través del gate SSC CD3/CD19/CD20. D y E se seleccionan los monocitos por CD14 y CD45. F. Según intensidad de expresión de CD14 y CD16 se definen las 3 subpoblaciones monocitarias (clásicos, intermedios y no clásicos).

## Células Natural Killer

Se definieron por SSC, la ausencia de expresión de CD3, CD19 y CD20, y la positividad de CD56 (Figura 10). Como se muestra en la Figura 10 D según expresión de CD16 se determinaron 2 poblaciones de células NK  $CD56^{dim} CD16+$  y  $CD56^{brigh} CD16-$ .

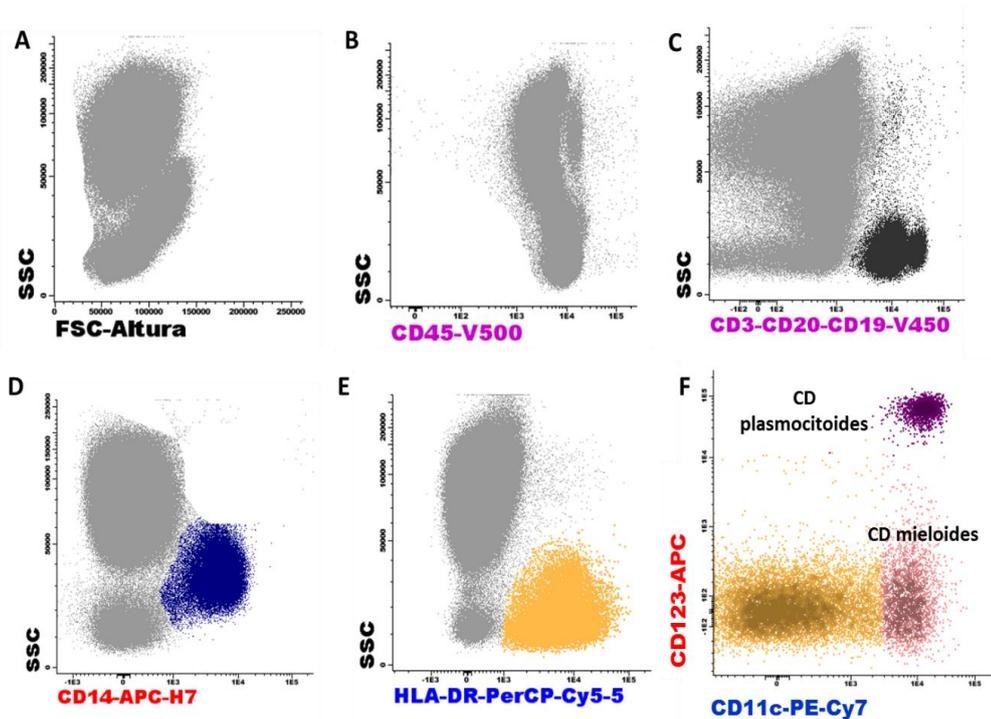


**Figura 10.** Estrategia de gating de células NK. A modo de ejemplo se muestra la sangre periférica de un paciente representativo. Previo a seleccionar las células  $CD56$  negativas se eliminaron los eventos  $CD3+$ ,  $CD19+$   $CD20+$  como se muestra en figura anterior. A y B se muestra FSC/SSC y SSC/CD45. C se muestran células NK  $CD56+$ . D. Se muestran las 2 poblaciones de células NK ( $NK CD56^{dim} CD16+$  y  $CD56^{brigh} CD16-$ )

## Células Dendríticas

Las DCs se definieron según lo reportado por Maecker y colaboradores identificando células  $HLA-DR^{brigh}$  que son negativas para varios marcadores de linaje como  $CD3$  (células T),  $CD14$  (monocitos),  $CD19$  y  $CD20$  (células B) y  $CD56$  (células NK)<sup>323</sup>. Las

DCs se dividieron en las 2 clásicas poblaciones; DCs mieloides basado en la expresión de CD11c y plasmocitoides basado en la expresión de CD123 (Figura 11).



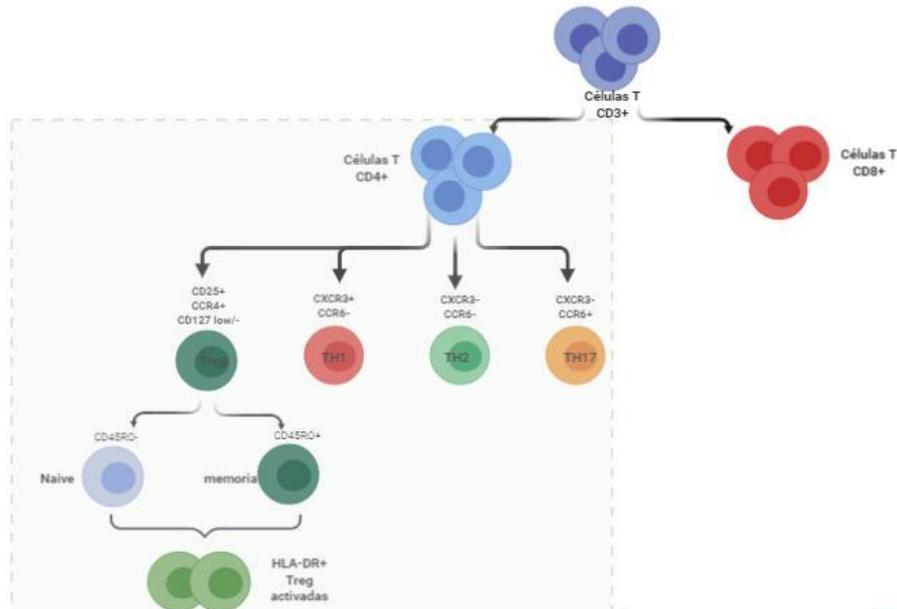
**Figura 11.** Estrategia de gating de DCs. A modo de ejemplo se muestra la sangre periférica de un paciente representativo. A y B se muestra las células a analizar según FSC/SSC y CD45/SSC. C. Se eliminan del análisis los eventos CD3+, CD20+, CD19+. D. Se eliminan del análisis los eventos CD14+. E- Se realiza gate en base a expresión de HLA-DR+. F. Según expresión de CD123 y CD11c se definen las 2 poblaciones de DCs: plasmocitoides (violeta) y mieloides (rosadas).

## Células T

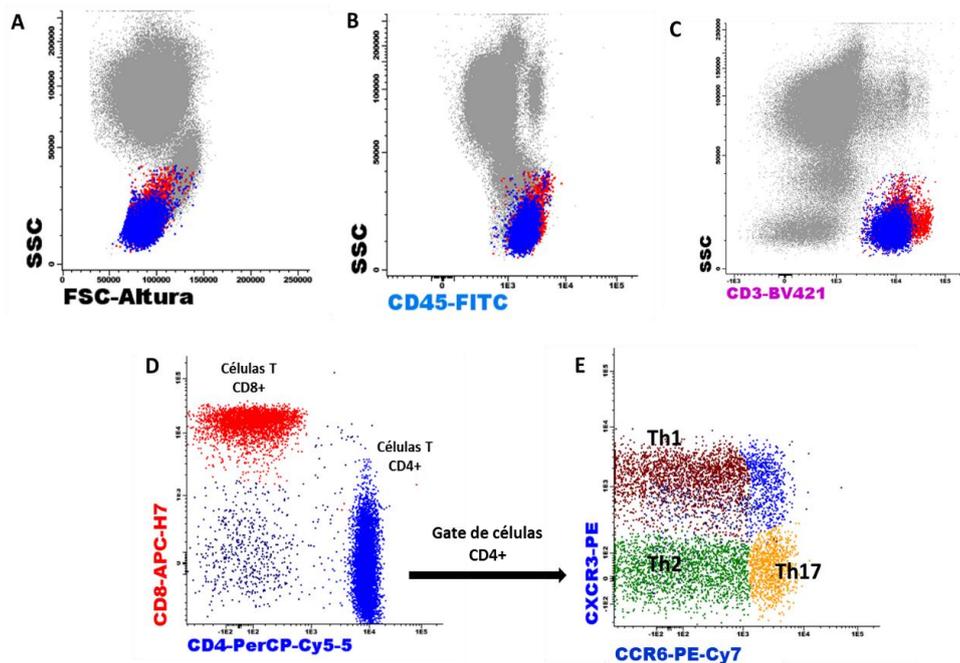
Las células T fueron definidas según SSC, CD3+ y CD45+ y, subsecuentemente, clasificadas según la presencia de CD8 o CD4 en células T CD4+ y CD8+- La activación tanto de células T CD4+ como de CD8+ fue evaluada cuando utilizamos un panel de 4 colores mediante la expresión de CD69 y con el panel de 8 colores mediante la expresión de HLA-DR y CD38.

Según lo reportado por Maecker y colaboradores se definieron subpoblaciones de células T CD4<sup>323</sup>. Las células Th17 se definieron por un SSC bajo, CD45+, CD3+, CD4+, CXCR3- y CCR6+; las células Th1 se definieron por un SSC bajo, CD45+, CD3+, CD4+, CXCR3+ y CCR6-; las células Th2 se definieron por un SSC bajo, CD45+, CD3+, CD4+, CXCR3- y CCR6-; las células Tregs se definieron por un SSC bajo, CD45+, CD3+, CD4+, CCR4+, CD25+ y bajo CD127. Asimismo, se definieron subpoblaciones de

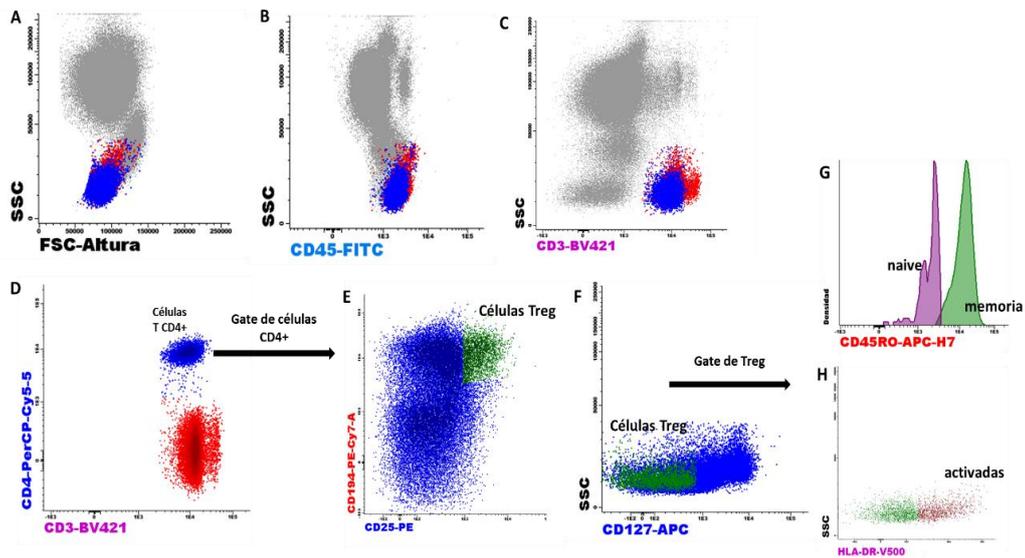
células Treg de memoria y naive según expresión de CD45RO. A su vez se determinó la activación de estas según la expresión de HLA-DR (Figuras 12, 13, 14).



**Figura 12.** Definición de poblaciones de células CD4 según la expresión de marcadores de superficie.



**Figura 13.** Estrategia de gating de subpoblaciones de células T. A modo de ejemplo se muestra la sangre periférica de un paciente representativo. A y B se muestran según FSC/SSC y CD45/SSC. C. Se realiza gate de células T según CD3+. D. se muestran poblaciones de células T CD4+ y CD8+. E. En gate de células T CD4+ se definen las poblaciones de células T Th1, Th2 y Th17.



**Figura 14.** Estrategia de gating de células T reg. A modo de ejemplo se muestra la sangre periférica de un paciente representativo. A y B se muestran según FSC/SSC y CD45/SSC. C. Se realiza gate de células T según CD3+. D. se muestran poblaciones de células T CD4+ y CD8+. E y F. En gate de células T CD4+ se definen las células Treg según expresión de CD194+, CD25+ y CD127-. G se muestran 2 poblaciones de Treg naive y memoria según expresión de CD45RO. H se muestran células Treg activadas mediante expresión de HLA-DR.

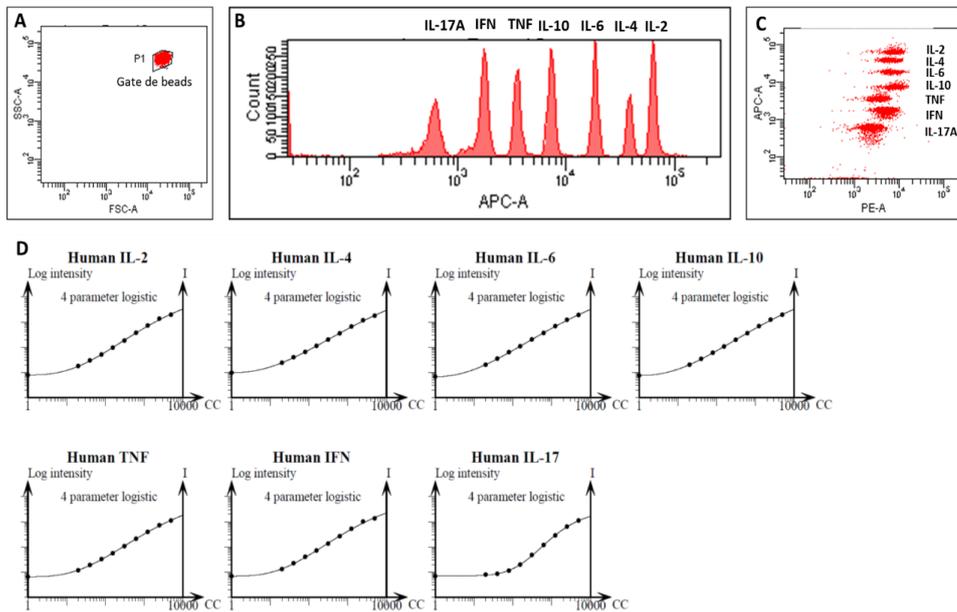
### Células o linfocitos B

Las células B se estudiaron únicamente con el panel de 4 colores. Se definieron según SSC y la expresión de CD19+ y CD3-.

## 3.4 Análisis por Citometría de Flujo de la concentración de citoquinas

La concentración de citoquinas proinflamatorias, Th1, Th2, Treg y Th17 fueron determinadas utilizando el kit BD™ Cytometric Bead Array (CBA, BD Biosciences, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit permite determinar y cuantificar en una única muestra de escaso volumen (25-50 µL de LCR o plasma simultáneamente) un amplio panel de citoquinas. Se determinaron las siguientes citoquinas: IL-1β, IL-6, TNFα, IL-10, IFNγ, IL-12p10, IL-4, IL-17A. Los datos fueron adquiridos en el citómetro FACS Canto-II utilizando el software FACS-DIVA y la planilla de adquisición de datos de CBA-BD. Los datos fueron analizados utilizando el software FCAP Array Software v3.0 (BD). La concentración de cada muestra se calcula en forma automática utilizando

el software contrastando la fluorescencia para cada citoquina en relación a una curva estándar realizada en cada ensayo (Figura 15). El límite de detección del kit mencionado para las citoquinas Th1, Th2, Th17 está entre 10 – 5000 pg/mL. Para la IL-10 la linealidad de la curva standard comienza a 4,5 pg/mL y para la IL-17A a 18,9 pg/mL aproximadamente.



**Figura 15.** Determinación de citoquinas por CBA. A. Se muestra ejemplo de gate de beads que se realiza por FSC/SSC. B. Se muestra las diferentes intensidades de fluorescencia de las beads de cada citoquina en APC. C. A modo de ejemplo una muestra donde se observa la intensidad de fluorescencia en PE que se correlaciona con la concentración. D. Curva standard para cada citoquina.

### 3.5 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizó Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 21 (Chicago, IL, USA). La estadística descriptiva de las variables cualitativas se expresó en porcentajes (frecuencia relativa) y las variables cuantitativas se expresaron como mediana y rango intercuartílico (IQR: interquartile range). La significación estadística de las diferencias encontradas entre las distintas variables se determinó mediante el uso de tests no paramétricos (Chi-cuadrado para variables cualitativas, Mann-Whitney para muestras independientes y Wilcoxon para muestras pareadas). En todos los casos consideraremos significativo un valor de  $p < 0,05$ .

### 3.6 Consideraciones éticas

Se obtuvo consentimiento informado de todos los pacientes o familiares y de los pacientes control o controles sanos. Se explicó los cuidados que se realizaron para la toma de las muestras. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Clínicas de Montevideo, Uruguay, de acuerdo con la declaración de Helsinki.

## CAPÍTULO 4. Resultados

### 4.1 Características demográficas y clínicas generales

Las principales características demográficas y clínicas de los pacientes con HSAa (n=39) y los controles (n total 56, n=41 SP y n=15 LCR) se muestran en la Tabla 3. Del total de pacientes incluidos, se obtuvieron muestras de SP en la etapa precoz en 23 pacientes y en la etapa tardía en 29 pacientes. Por otra parte, las muestras de LCR se recolectaron en la etapa precoz en 15 pacientes y en la etapa tardía en 22 pacientes.

No se evidenciaron diferencias significativas entre pacientes y controles en la distribución por edad y sexo. La franca mayoría de los pacientes enrolados padecían una HSAa severa marcada por los siguientes parámetros: mediana de GCS al ingreso a la unidad de medicina intensiva (UCI) de 8, mediana de H&H de IV y mediana de la Escala de Fisher de 3.

Vasoespasma sonográfico (doppler transcraneano) se detectó en un 61 % de los pacientes (n=24) y la mortalidad global fue de 35.9 % (n=14). No hubo diferencia significativa en la escala de Glasgow (GCS) o la escala de Fisher entre aquellos pacientes que desarrollaron o no vasoespasma en la evolución.

En el 69 % de los pacientes, el aneurisma se trató mediante clipado quirúrgico (n=27). No hubo diferencia significativa respecto a la selección de la vía de tratamiento del aneurisma y el desarrollo posterior de vasoespasma.

**Tabla 3. Características clínicas generales**

	<b>Pacientes</b> (n=39)	<b>Controles</b> (n=56)	<b>Valor p</b>
<b>Edad: mediana (IQR)</b>	51 (43 – 64)	48 (35 – 63)	0.62
<b>Sexo (fem:masc)</b>	4.5:1	4:1	0.51
<b>GCS ingreso UCI: mediana (IQR)</b>	8 (6 - 14)		
<b>H&amp;H: mediana (IQR)</b>	4 (3 – 5)		
<b>Fisher: mediana (IQR)</b>	3 (3 – 4)		
<b>DTC – VSP: n (%)</b>	24 (61.5 %)		
<b>Tratamiento del Aneurisma:</b>			
<b>n coils/clips</b>	12/27		
<b>Mortalidad global UCI: n (%)</b>	14 (35.9)		

IQR: rango intercuartílico; GCS: escala de coma de Glasgow; H&: Hunt y Hess; DTC: doppler transcraneano; VSP: vasoespasmio.

## 4.2 Estudio de la respuesta inmune

### 4.2.1 Leucocitos totales

Como se observa en la Tabla 4 observamos un aumento significativo del recuento absoluto de leucocitos en la SP de los pacientes, tanto en la fase precoz como la tardía, respecto a la SP de los controles ( $p=0.0001$  y  $p=0.0001$ , respectivamente). La variación del recuento absoluto de leucocitos a nivel del LCR de los pacientes entre la fase precoz y la tardía resultó no significativa.

**Tabla 4. Distribución de células de la inmunidad innata en SP y LCR en pacientes con HSA y en SP de controles**

	<b>HSA – fase precoz</b> (mediana (IQR))	<b>HSA– fase tardía</b> (mediana (IQR))	<b>Controles</b> (mediana (IQR))	<b>Valor de p</b>
<b>Leucocitos (/μL)</b>				
SP	13002 (8725-15321)	9832 (7632-14021)	5668 (4712-7852)	0.001
LCR	288 (200-1009)	134 (104-800)		NS
<b>Neutrófilos (/μL)</b>				
SP	9581 (775-11210)	6795 (6243-7897)	3143 (2652-3389)	0.001
LCR	180.0 (72.6-372)	95.8 (30.7-172.0)		NS
<b>Neutrófilos (%)*</b>				
SP	67.9 (55.0-79.50)	69.1 (63.5-80.3)	60.4 (51.0-65.18)	0.002
LCR	45 (23.7-61)	26.1 (11.7-59.7)		NS
<b>Monocitos (/μL)</b>				
SP	674 (426-1012)	536 (374-826)	322 (113-345)	0.013
LCR	24.7 (4.8-57.2)	11.0 (1.7-77.2)		NS
<b>Monocitos (%)*</b>				
SP	5.4 (3.02-7.18)	6.3 (3.8-8.4)	5.12 (2.2-6.5)	NS
LCR	4.9 (1.7-7.9)	3.1 (0.8-11.2)		NS
<b>Células Dendríticas (/μL)</b>				
SP	20.6 (19.7-36.7)	12.4 (13.8-78.3)	18.3 (12.3-40.4)	NS
LCR	1.7 (0.7-5.0)	2.6 (1.1-6.1)		NS
<b>Células Dendríticas (%)*</b>				
SP	0.1 (0.1-0.2)	0.2 (0.1-1.4)	0.6 (0.3-0.7)	0.001
LCR	0.1 (0.1-0.56)	0.3 (0.14-1.34)		NS

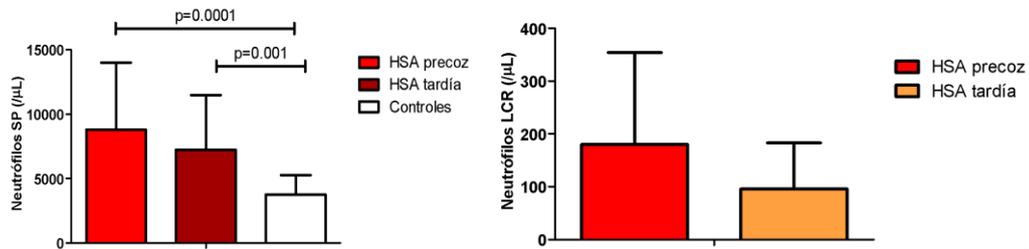
\* Corresponde al % del total de leucocitos.

## 4.2.2 Neutrófilos

Existe aumento de neutrófilos en ambas fases evolutivas de la HSAa aguda grave, con un perfil de activación mayor a nivel del LCR.

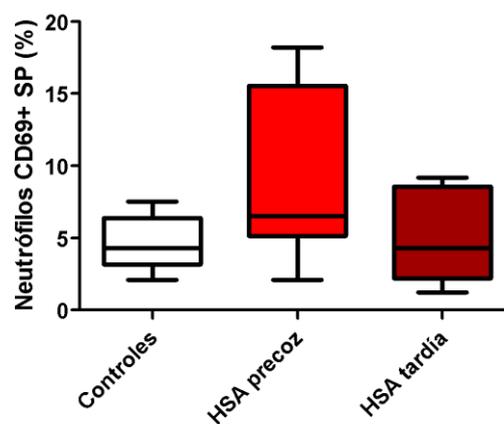
A través de la CF evaluamos el recuento de neutrófilos en SP y LCR en los pacientes y en SP de los controles. Como podemos ver en la Figura 16 y Tabla 4, los neutrófilos están significativamente aumentados en los pacientes respecto a los controles, tanto en la fase

precoz como en la tardía ( $p=0.0001$  y  $p=0.001$ , respectivamente). Además, destacamos que se detectó un importante número de neutrófilos a nivel del LCR de los pacientes, mayor que lo reportado en forma normal. La diferencia entre ambas fases de la HSA (precoz y tardía) no resultó significativa, tanto a nivel de SP como de LCR aunque con una tendencia a presentar mayor recuento de neutrófilos en la fase precoz.



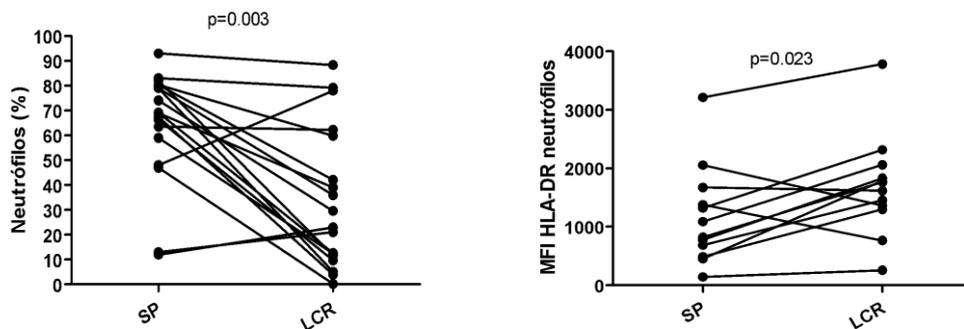
**Figura 16.** *Izquierda:* Recuento absoluto de Neutrófilos en SP de pacientes con HSAa y controles. *Derecha:* Recuento absoluto de Neutrófilos en LCR de pacientes con HSAa. Se grafican medianas  $\pm$  error standard. Se muestra el valor de  $p$  de las diferencias significativas.

A continuación, estudiamos la activación de neutrófilos. Analizamos el porcentaje de neutrófilos en SP que expresaban el antígeno CD69. Se comparó con la SP de los controles. Como se observa en la Figura 17 el porcentaje de neutrófilos CD69+ impresiona ser mayor en la fase aguda de la HSA, aunque esta diferencia no alcanza la significación estadística.



**Figura 17.** **Activación de neutrófilos en SP.** *Porcentaje de neutrófilos con expresión del antígeno CD69 (del total de neutrófilos) en SP de pacientes con HSAa respecto a los controles. Se muestra un diagrama de cajas evidenciando mediana, percentil 25 y 75 (rancho intercuartil) y mínimo y máximo. No se encontraron diferencias estadísticamente.*

Además, se realizó un análisis pareado del porcentaje de neutrófilos en SP y en LCR de los pacientes en muestras tomadas en el mismo momento tanto en fase precoz como tardía (Figura 18). El porcentaje de neutrófilos sobre el total de WBC resultó significativamente menor a nivel de LCR ( $p=0.003$ ). Sin embargo, el estado de activación de los neutrófilos determinado a través de la intensidad media de fluorescencia (MFI) para HLA-DR fue significativamente mayor a nivel del LCR ( $p=0.023$ ). El mismo análisis, pero para CD69, no mostró resultados estadísticamente significativos.



**Figura 18.** Frecuencia y activación de neutrófilos en SP y LCR. *Izquierda:* Porcentaje de neutrófilos en SP vs LCR en los pacientes en un mismo momento evolutivo. Se incluyen pacientes tanto de fase precoz como tardía. Se observa un porcentaje significativamente menor de neutrófilos a nivel del LCR ( $p=0.003$ ). *Derecha:* estado de activación de los neutrófilos a nivel de la SP vs LCR en un mismo momento evolutivo. La MFI para HLA-DR está significativamente aumentada a nivel del LCR ( $p=0.023$ ). Se muestra el valor de  $p$  de las diferencias significativas.

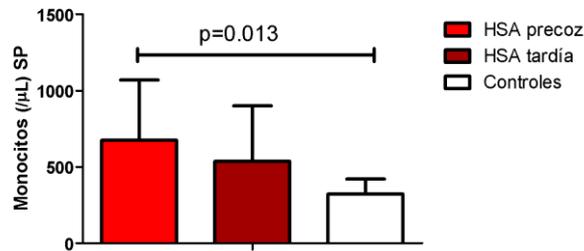
### 4.2.3 Monocitos

Existe un incremento de las diferentes subpoblaciones monocitarias en SP en ambas fases evolutivas de la HSAa aguda grave.

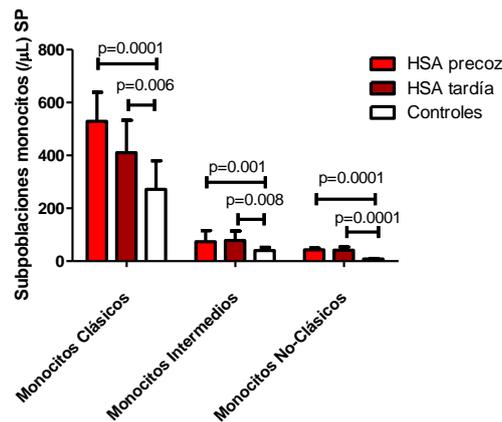
A través de CF evaluamos el recuento de monocitos en SP y LCR en los pacientes y en SP de los controles. Como podemos observar en la Figura 19A el recuento de los monocitos totales se detectó significativamente aumentado a nivel de la SP de los pacientes respecto a la SP de los controles. Si bien existe un aumento tanto en la fase precoz como tardía, este es solo estadísticamente significativo en la fase precoz ( $p=0.013$ ). Sin embargo, cuando analizamos las diferentes subpoblaciones monocitarias, se encontró que el recuento absoluto estaba aumentado para todas las subpoblaciones en ambas fases, en los pacientes respecto a los controles (Figura 19B). Además, destacamos que se detectó un importante número de monocitos a nivel del LCR de los pacientes

(Tabla 4). La diferencia entre ambas fases (precoz y tardía) para monocitos en LCR no resultó estadísticamente significativa (Tabla 4).

A)

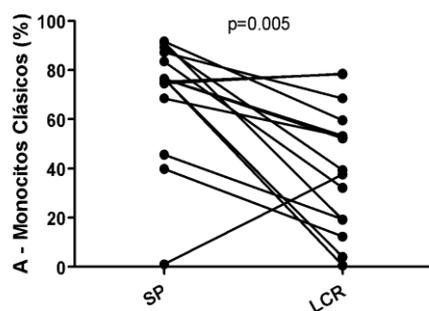


B)

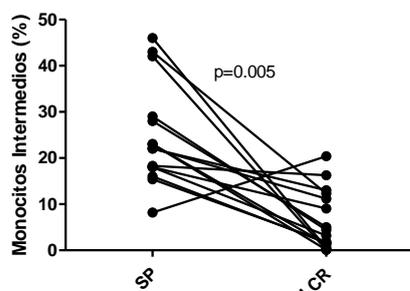


**Figura 19. A.** Recuento absoluto de monocitos en SP de pacientes con HSAa, fases precoz y tardía vs SP de los controles. Se observa un aumento significativo en la SP de la fase precoz respecto a la SP de los controles. Se grafica mediana  $\pm$  error standard. **B.** Recuento absoluto de las subpoblaciones monocitarias a nivel de la SP de pacientes con HSAa, fases precoz y tardía vs SP de los controles. Se observa un aumento significativo para todas las subpoblaciones en la SP de los pacientes en ambas fases respecto a los controles. Se grafica mediana  $\pm$  error standard. Se muestra el valor de *p* de las diferencias significativas.

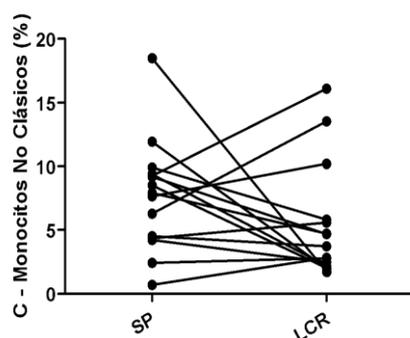
Seguidamente, en la Figura 20, se muestra la comparación pareada, en el mismo momento, del porcentaje de cada una de las subpoblaciones monocitarias a nivel de la SP y del LCR de los pacientes. El porcentaje resultó significativamente menor a nivel del LCR para la subpoblación de monocitos clásicos (Figura 20A) y de monocitos intermedios (Figura 20B) ( $p=0.005$  y  $p=0.005$ , respectivamente). En cambio, el mismo análisis no mostró resultados significativos para la subpoblación de monocitos no clásicos (Figura 20C).



A) Descenso significativo del porcentaje de monocitos clásicos a nivel del LCR respecto a la SP.



B) Descenso significativo del porcentaje de monocitos intermedios a nivel del LCR respecto a la SP.



C) Variación no significativa del porcentaje de monocitos no clásicos a nivel del LCR respecto a la SP.

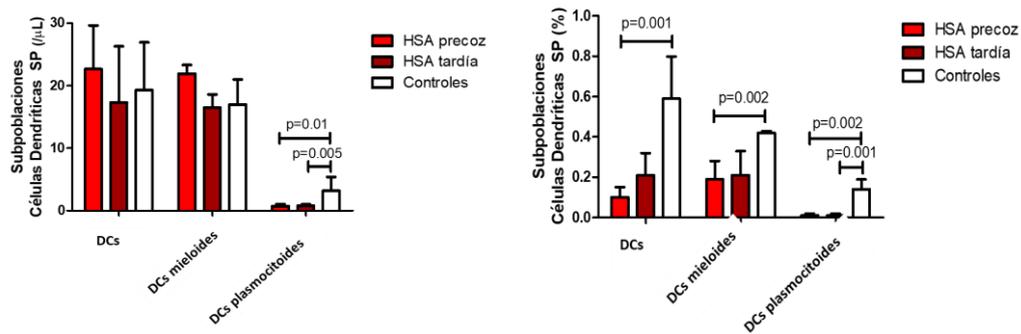
**Figura 20.** Comparación del porcentaje de las subpoblaciones monocitarias (del total de monocitos) en la SP vs el LCR de los pacientes con HSAA. Las muestras comparadas se extrajeron en un mismo momento evolutivo desde el sangrado. Se muestra el valor de p de las diferencias significativas.

#### 4.2.4 Células dendríticas

Existe una disminución de las DCs plasmocitoides en la SP de los pacientes con HSAA aguda grave.

A través de la CF evaluamos el recuento de DCs en SP y LCR en los pacientes y en SP de los controles. Como podemos observar en la Figura 21, se encontró una disminución significativa del recuento absoluto de DCs plasmocitoides en la SP de los pacientes, tanto en la fase precoz como tardía ( $p=0.01$  y  $p=0.005$ , respectivamente), sin diferencias en el recuento absoluto de las DCs mieloides ni totales. A continuación,

podemos observar la comparación de los porcentajes de DCs totales y las subpoblaciones mencionadas. Para el caso de las DCs totales, se objetivó una disminución significativa de su porcentaje tanto en fase precoz como tardía respecto a controles, pero esta diferencia fue solo estadísticamente significativa para la fase precoz ( $p=0.001$ ). Una situación similar se observó para la subpoblación de DCs mieloides ( $p=0.002$ ). En cambio, para la subpoblación de DCs plasmocitoides, se evidenció una disminución significativa en el porcentaje en la SP de los pacientes respecto a la SP de los controles, tanto en la fase precoz como tardía ( $p=0.002$  y  $p=0.001$ , respectivamente).



**Figura 21. Izquierda:** Recuento absoluto de las DCs en la SP de los pacientes vs la SP de los controles. Se observa una disminución significativa de las DCs plasmocitoides tanto en la fase precoz como tardía. **Derecha:** Se observa una disminución relativa (%) significativa de las DCs totales y de las DCs mieloides en la fase precoz. La disminución de las DCs plasmocitoides resultó ser significativa tanto en la fase precoz como la tardía. Se muestra el % en función del recuento de leucocitos totales. Se grafica mediana  $\pm$  error standard. Se muestra el valor de  $p$  de las diferencias significativas.

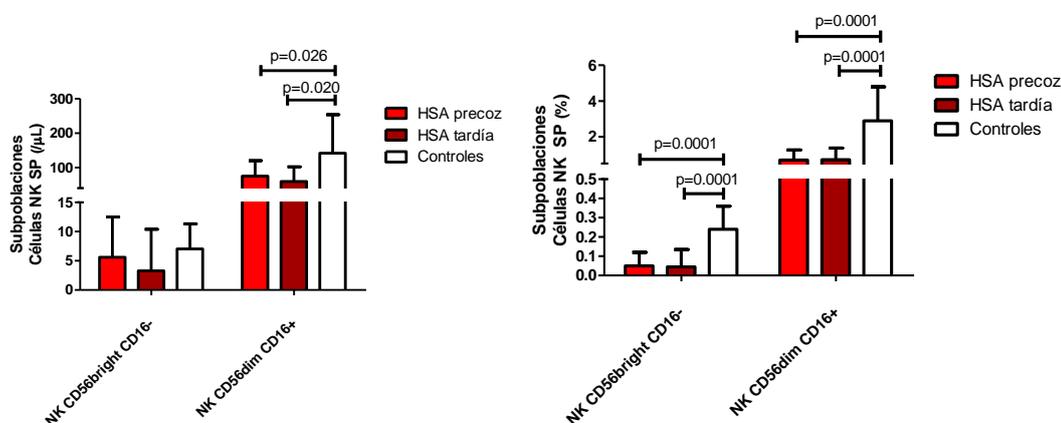
El análisis del LCR no arrojó resultados estadísticamente significativos al comparar la fase precoz respecto a la tardía: DCs totales (0.1 (0.1-0.2) fase precoz y 0.2 (0.1-1.4) fase tardía) y DCs mieloides (0.1 (0.08-0.53) fase precoz y 0.23 (0.1-1.3) fase tardía) y DCs plasmocitoides (0.01 (0.0-0.02) fase precoz y 0.03 (0.01-0.05) fase tardía), respectivamente.

El análisis estadístico de muestras pareadas entre LCR y SP tanto en el momento precoz como el tardío no mostró diferencias significativas.

#### 4.2.5 Células Natural Killer

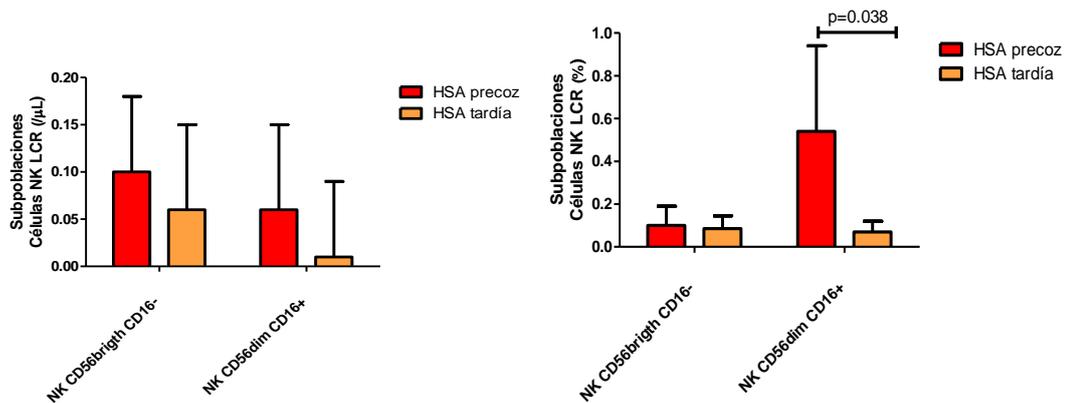
Existe una disminución de las células NK en sangre periférica de pacientes con HSAa aguda grave, con un predominio en LCR de la subpoblación NK CD56<sup>brigh</sup> CD16<sup>-</sup>.

A través de la CF evaluamos el recuento de células NK en SP y LCR en los pacientes y en SP de los controles. Como observamos en la Figura 22, el recuento absoluto de células NK CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> resultó significativamente menor a nivel de la SP de los pacientes, tanto en la fase precoz como tardía ( $p=0.026$  y  $p=0.020$ , respectivamente). Aunque existió una tendencia similar para las células NK CD56<sup>brigh</sup> CD16<sup>-</sup>, la misma no fue estadísticamente significativa. Por otra parte, la disminución relativa de los porcentajes fue significativa para ambas subpoblaciones (NK CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> y CD56<sup>brigh</sup> CD16<sup>-</sup>) a nivel de la SP de los pacientes, tanto en la fase precoz como tardía ( $p=0.0001$  y  $p=0.0001$ ;  $p=0.0001$  y  $p=0.0001$ , respectivamente).



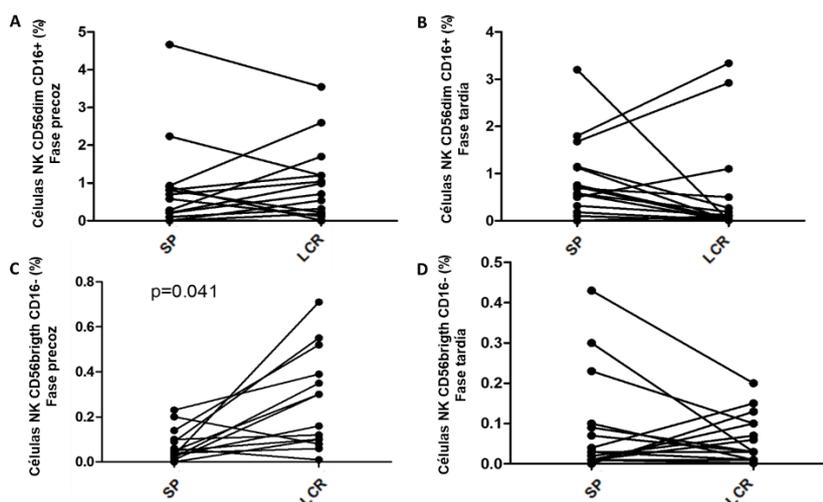
**Figura 22.** *Izquierda:* Recuento absoluto de las células NK en la SP de los pacientes vs la SP de los controles. Se observa una disminución significativa de la subpoblación NK CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> tanto en la fase precoz como la tardía. La subpoblación CD56<sup>brigh</sup> CD16<sup>-</sup> no presentó cambios significativos. *Derecha:* Se observa una disminución relativa (%) significativa para ambas subpoblaciones de células NK tanto en la fase precoz como en la tardía. Se muestra % en función del recuento de leucocitos totales. Se grafica mediana  $\pm$  error standard. Se muestra el valor de  $p$  de las diferencias significativas.

A nivel de LCR, las células NK CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> disminuyeron su porcentaje significativamente entre fase precoz y tardía (0.54 (0.22–1.7) y 0.07 (0.01–0.5) respectivamente,  $p=0.038$ ). El análisis de los valores absolutos no alcanzó la significación estadística. Por otro lado, la subpoblación NK CD56<sup>brigh</sup> CD16<sup>-</sup> no varió significativamente entre ambas fases: (0.1 (0.08–0.5) fase precoz y 0.08 (0.03–0.2) fase tardía). Figura 23



**Figura 23.** *Izquierda:* Recuento absoluto de las células NK en LCR de los pacientes en la fase precoz y tardía. Se observa una disminución de la subpoblación NK CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> y NK CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> al pasar de la fase precoz a la tardía que no alcanzó la significación estadística. *Derecha:* Recuento relativo de las células NK en LCR de los pacientes en la fase precoz y tardía (%). Se observa una disminución significativa de la subpoblación NK CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> en la fase tardía. La subpoblación CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> no presentó cambios significativos. Se muestra % en función del recuento de leucocitos totales. Se grafica mediana  $\pm$  error standard. Se muestra el valor de p de las diferencias significativas.

Como se muestra en la Figura 24, el análisis estadístico de muestras pareadas mostró que la frecuencia de células NK CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> es mayor en LCR que en SP,  $p=0.041$ .



**Figura 24.** Comparación del porcentaje de las subpoblaciones de células NK en función de leucocitos totales en la SP vs el LCR de los pacientes con HSAa. Las muestras comparadas se extrajeron en un mismo momento evolutivo desde el sangrado. Se muestra el valor de p de las diferencias significativas.

#### 4.2.6 Subpoblaciones linfocitarias

Como se observa en la Tabla 5, el recuento absoluto de linfocitos (totales) en la SP de los pacientes respecto a los controles no presentó cambios estadísticamente significativos.

Tampoco resulto significativa la variación a nivel del LCR de los pacientes entre la fase precoz y la tardía. En cambio, se observó una disminución relativa (%) de los linfocitos en la SP de los pacientes tanto en la fase precoz como la tardía, respecto a la SP de los controles ( $p=0.0001$  y  $p=0.00001$ , respectivamente), probablemente en relación con el aumento de granulocitos en estos pacientes. La variación relativa (%) de los linfocitos a nivel del LCR de los pacientes entre ambas fases (precoz y tardía) resultó no significativa.

El cociente CD4/CD8 para todas las comparaciones realizadas entre los pacientes y respecto a los controles no presentó variaciones (Tabla 5).

Respecto al análisis de las células B (Tabla 5), se observó una reducción del porcentaje de células B a nivel de la SP de los pacientes respecto a la SP de los controles en ambas fases (precoz y tardía), pero únicamente fue significativo el descenso relativo en la fase precoz ( $p=0.007$  y  $p=0.067$ , respectivamente). La variación relativa cuando se comparó la SP de los pacientes según la fase evolutiva (precoz vs tardía) y, la SP con el LCR, también en los pacientes, resultó no significativa.

*Tabla 5. Distribución celular de la inmunidad adquirida en SP y LCR en pacientes con HSA y en SP de controles*

	<b>HSA – fase precoz</b> (mediana (IQR))	<b>HSA– fase tardía</b> (mediana (IQR))	<b>Controles</b> (mediana (IQR))	<b>Valor p</b>
<b>Leucocitos (/μL)</b>				
SP	13002 (8725-15321)	9832 (7632-14021)	5668 (4712-7852)	0.001
LCR	288 (200-1009)	134 (104-800)		NS
<b>Linfocitos (/μL)</b>				
SP	1882 (613-2200)	573 (272-717)	1621 (1223-2675)	NS
LCR	14.7 (7.0-48.3)	7.5 (1.8-33.3)		NS
<b>Linfocitos (%)*</b>				
SP	13.6 (7.0-19.8)	7.97 (2.8-8.7)	25.89 (20.9-32.9)	0.001
LCR	5.1 (3.7-8.7)	3.8 (1.85-16.7)		NS
<b>Células B (%)*</b>				
SP	1.5 (0.5-2.7)	1.5 (1.3-2.0)	3.9 (3.2-4.6)	0.003
LCR	0.9 (0.3-1.1)	0.2 (0.1-0.4)		NS
<b>Cociente CD4/CD8</b>				
SP	2.8 (1.6-4.4)	2.3 (1.92-3.7)	1.95 (1.61-3.0)	NS
LCR	2.6 (1.1-3.9)	2.6 (1.8-7.8)		NS

<b>Células CD4+ Th17</b> (% de células T CD4+)				
SP	31.0 (27.6-32.0)	30.9 (25.5-38.0)	11.2 (10.2-14.35)	0.001
LCR	44.5 (31-44.5)	41.0 (32-50.8)		NS
<b>Células CD4+ Treg</b> (% de células T CD4+)				
SP	8.7 (7.6-12.7)	6.2 (1.6-10.7)	9.7 (8.0-10.5)	NS
LCR	0.9 (0.1-6.4)	2.6 (1.6-8.8)		NS
<b>Cociente Th17/Treg</b>				
SP	3.4 (7.8 - 5.28)	5.16 (2.6 - 27.3)	1.14 (1.1 - 1.6)	0.001
LCR	32.8 (6.7 - 309.8)	14.2 (4.5 - 39.2)		NS
<b>Células CD4+ Th1</b> (% de células T CD4+)				
SP	17 (16.3 – 25)	21 (15.8 – 30.5)	19.8 (13.7 – 21)	NS
LCR	11.2 (10.22 - 29.0)	15.50 (11.0 - 32.0)		NS
<b>Células CD4+ Th2</b> (% de células T CD4+)				
SP	30.5 (27 – 34)	26 (21.8 – 32.1)	36.9 (28.4 – 46)	0,038
LCR	31.2 (5.7 - 31.2)	14.65 (7.70 - 33.0)		NS
<b>Cociente Th1/Th2</b>				
SP	0.56 (0.48 – 1.13)	0.81 (0.54 – 1.15)	0.54 (0.32 – 1.16)	NS
LCR	0.72 (0.33 – 5.09)	0.80 (0.33 – 3.30)		NS

\* Corresponde al % del total de leucocitos.

#### 4.2.6.1 Células T CD4+ Th17 y Tregs

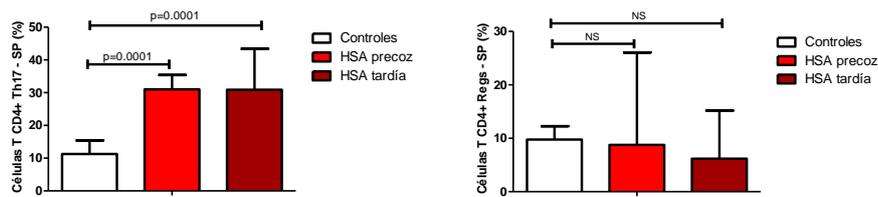
Existe un aumento de células T CD4+ Th17 en SP de pacientes con HSAa con reclutamiento de estas en el LCR.

El recuento relativo (%) de las células Th17 se incrementó significativamente en la SP de los pacientes tanto en la fase precoz como la tardía respecto a la SP de los controles ( $p=0.0001$  y  $p=0.0001$ , respectivamente). Por el contrario, la variación relativa de las células Tregs a nivel de la SP no resultó ser significativa (Figura 25A). Como resultado, al analizar el cociente Th17/Tregs se objetivó un incremento significativo del mismo en ambas fases respecto al cociente de los controles ( $p=0.0001$  y  $p=0.0001$ , respectivamente) (Figura 25C). El análisis realizado en LCR de los pacientes, tanto para células Th17,

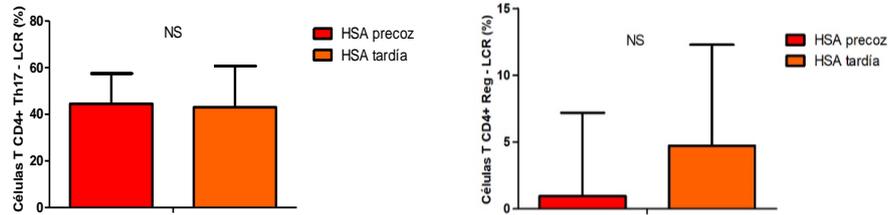
células Tregs y el cociente Th17/Tregs, no arrojó variaciones estadísticamente significativas entre las fases (precoz y tardía) (Figura 25B y C).

El porcentaje de células Th17 a nivel del LCR de los pacientes, tanto en la fase precoz como tardía, se incrementó significativamente respecto a la SP ( $p=0.023$  y  $p=0.021$ , respectivamente). Por otra parte, se detectó un porcentaje menor de células Tregs a nivel del LCR respecto a la SP, tanto en la fase precoz como tardía, pero dicha diferencia no resultó estadísticamente significativa. Se destaca que el cociente Th17/Treg a nivel de LCR es más del doble al observado en sangre periférica.

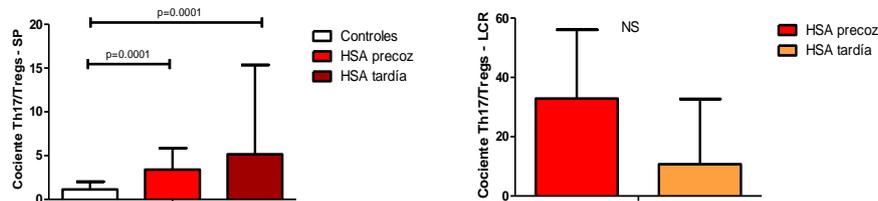
A)



B)

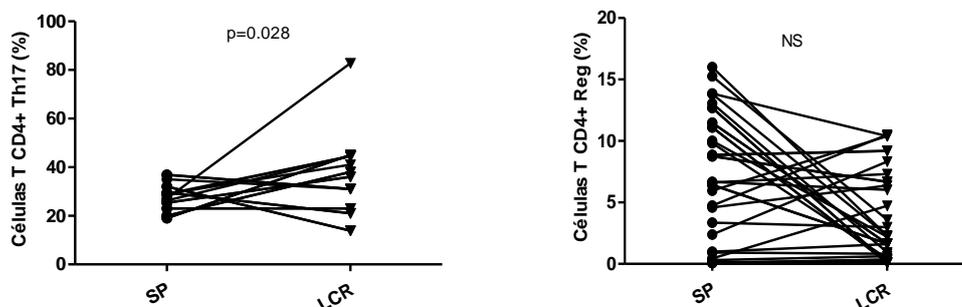


C)



**Figura 25.** Subpoblaciones de células T CD4+ Th17 y Treg en los en SP y LCR en diferentes momentos. **A)** A izquierda se observa el aumento relativo (%) significativo de las células T CD4+ Th17 en la SP de la fase precoz y tardía en los pacientes con HSAa respecto a los controles. A derecha se observa la variación relativa (%) no significativa con tendencia decreciente de las células T CD4+ reguladoras en la SP de los pacientes respecto a los controles. Se muestra % en función de células T CD3+ CD4+. **B)** Variación relativa (%) no significativa de las células T CD4+ Th17 (izquierda) y de las células TCD4+reguladoras (derecha) a nivel del LCR de los pacientes con HSAa al pasar de la fase precoz a la tardía. Se muestra % en función de células T CD3+ CD4+. **C)** A izquierda se observa el aumento significativo del cociente Th17/Tregs en la SP de la fase precoz y tardía en los pacientes con HSAa respecto a los controles. A la derecha se observa la variación no significativa con tendencia decreciente al pasar de la fase precoz a la tardía del cociente Th17/Tregs a nivel del LCR de los pacientes con HSAa. Se grafica mediana  $\pm$  error standard. Se muestra el valor de p de las diferencias significativas.

Cuando se comparó la SP con el LCR de los pacientes (Figura 26) en muestras extraídas simultáneamente en un mismo momento evolutivo (análisis pareado), observamos un incremento significativo del porcentaje de células Th17 a nivel del LCR respecto a la SP ( $p=0.028$ ). Por otro lado, al realizar la misma comparación para el porcentaje de células Tregs, la diferencia no resultó estadísticamente significativa ( $p=0.083$ ).



**Figura 26.** Células T CD4 Th17 y Treg en SP y LCR. **Izquierda:** comparación del % de células T CD4+ Th17 a nivel de la SP y el LCR de los pacientes. Se observa un aumento significativo a nivel del LCR. **Derecha:** comparación del % de células T CD4+ reguladoras a nivel de la SP y el LCR de los pacientes. Se observa una tendencia decreciente no significativa a nivel del LCR. En ambos casos se analizaron muestras extraídas en un mismo momento evolutivo (análisis pareado). Se muestra % en función de células T CD3+ CD4+. Se muestra el valor de p de las diferencias significativas.

#### 4.2.6.2 Células T CD4+ Th1 y Th2

Existe una disminución significativa de la población de células T CD4+ Th2 en SP de pacientes con HSAa con relación a controles.

Finalmente, analizamos las subpoblaciones de células T CD4+ Th1 y Th2. La subpoblación Th1 presentó una disminución estadísticamente no significativa a nivel de la SP de los pacientes en ambas fases respecto a la SP de los controles (Tabla 5). Por el contrario, la subpoblación Th2 presentó una tendencia decreciente más marcada (Tabla 5) a nivel de la SP de los pacientes. En la fase precoz no alcanzó significación estadística ( $p=0.059$ ) pero si lo hizo en la fase tardía ( $p=0.038$ ).

Las variaciones de estas subpoblaciones (Th1, Th2 y cociente Th1/Th2) a nivel del LCR de los pacientes resultaron no significativas. La comparación entre SP y LCR tampoco arrojó resultados estadísticamente significativos.

#### 4.2.6.3 Estado de activación de las células T

Un mayor porcentaje de las células T CD4+ y CD8+ de la SP de los pacientes en la fase precoz expresaban el antígeno de activación CD69+ respecto a los controles.

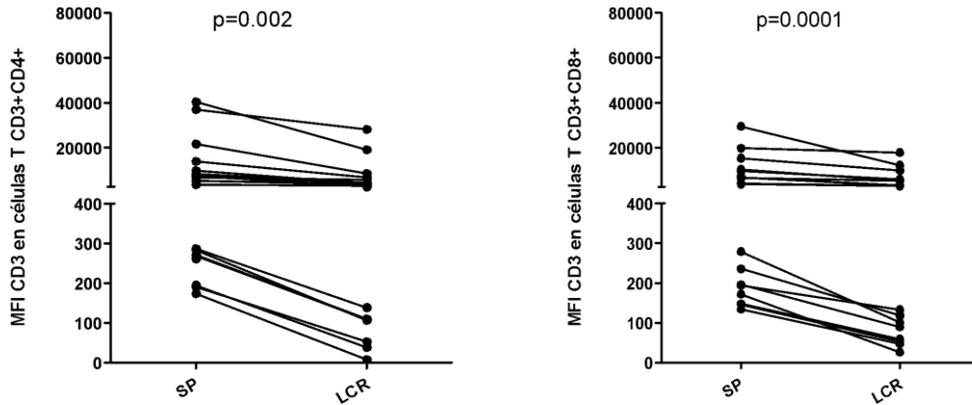
El % CD4+CD69+ en el total de células T CD4+ en la fase precoz (3.0 (2.7 – 5.4)) y en la tardía (3.65 (1.75 – 7.15)) estaba aumentado en la SP de los pacientes respecto a los controles (0.52 (0.3 – 0.98)), pero únicamente en la fase precoz resultó ser estadísticamente significativo ( $p=0.0001$  y NS, respectivamente).

El % CD8+CD69+ / total células T CD8+ en la fase precoz (25.1 (10.0 – 36.2)) y tardía (8.56 (3.9 – 26.0)) estaba aumentado en la SP de los pacientes respecto a los controles (2.16 (1.28 – 2.97)), pero únicamente en la fase precoz resultó ser estadísticamente significativo ( $p=0.000$  y NS, respectivamente).

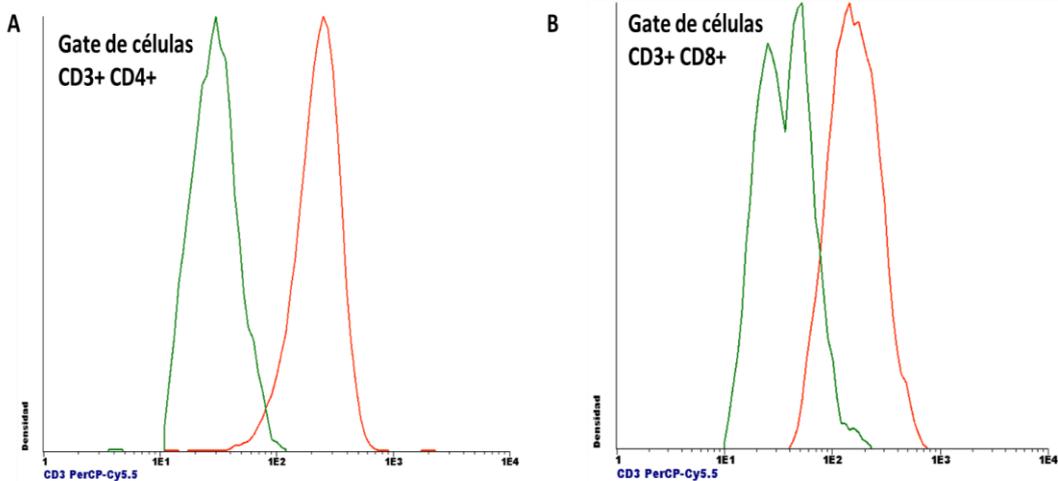
No se observaron diferencias en la expresión de CD28 en células T CD4+ y CD8+ entre la SP de los pacientes y los controles.

Las células T CD4 y CD8 mostraron un estado de activación mayor en LCR en comparación con SP en la fase precoz y tardía medido a través de la expresión de CD3, CD69 y CD28.

Las células T CD4+ y CD8+ mostraron un perfil de activación mayor a nivel de LCR en comparación con SP. Como se muestra en la Figura 27 y 28, las células T CD4+ y CD8+ mostraron una expresión disminuida de CD3 (MFI de CD3) en el LCR en comparación con la SP de los pacientes en la fase precoz de la HSA ( $p=0.002$  y  $p=0.0001$  respectivamente).



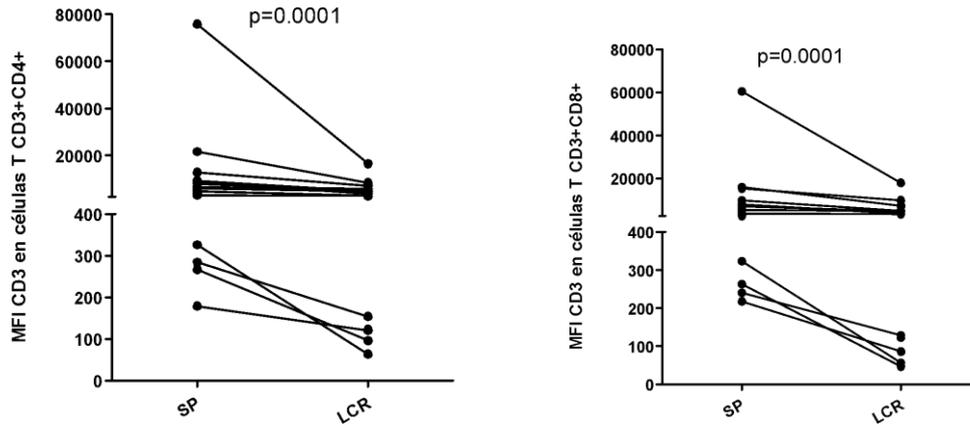
**Figura 27.** Estado de activación de células T en SP vs LCR en pacientes con HSAa en la fase precoz. MFI para el antígeno CD3 en células T CD4+ y CD8+ en ambos compartimentos. Se observa una reducción significativa de la expresión de CD3 a nivel del LCR indicando mayor activación a este nivel. Se muestra el valor de p de las diferencias significativas.



**Figura 28.** Imagen representativa de la expresión de CD3 en células T en un paciente con HSA en la fase precoz. Se muestran histogramas de CD3 de células que se hizo gate en FSC/SSC/CD3/CD4 o CD8. A) Expresión de CD3 en células T CD4+ en sangre periférica (línea roja) y LCR (línea verde). B) Expresión de CD3 en células T CD8+ en sangre periférica (línea roja) y LCR (línea verde).

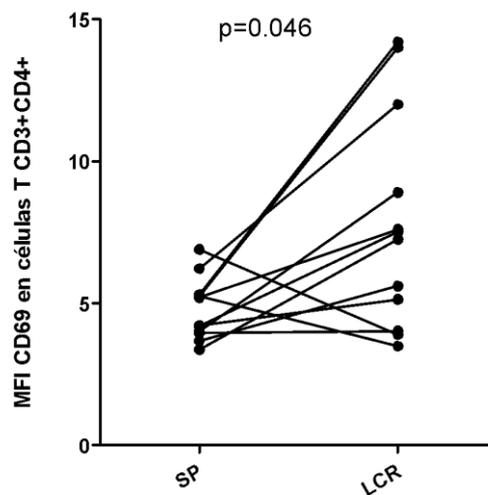
Similar a lo observado en la fase precoz, la expresión de CD3 disminuyó de forma significativa a nivel del LCR en la fase tardía (Figura 29), tanto en células T CD4+ como T CD8+.

La mayor activación de la fase precoz se extendió más allá del día 3 como lo muestran los resultados comentados.

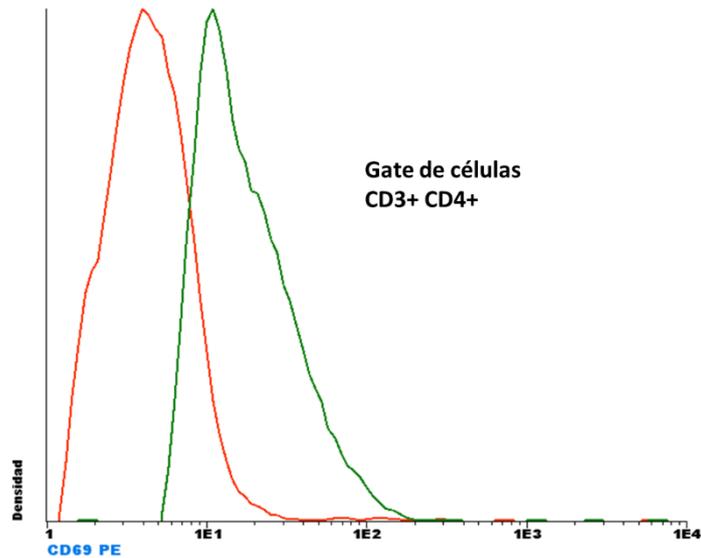


**Figura 29.** Estado de activación de células T en SP vs LCR en pacientes con HSA en la fase tardía. MFI para el antígeno CD3 en células T CD4+ y CD8+ en ambos compartimentos. Se observa una reducción significativa de la expresión de CD3 a nivel del LCR indicando mayor activación a este nivel. Se muestra el valor de p de las diferencias significativas.

Como muestra la Figura 30 y la Figura 31, la expresión de CD69 en las células T CD4+ aumentó significativamente a nivel del LCR con respecto a la SP en la fase precoz de la HSA ( $p=0.046$ ). La variación de la expresión de CD69 en células T CD8+ resultó ser estadísticamente no significativa.

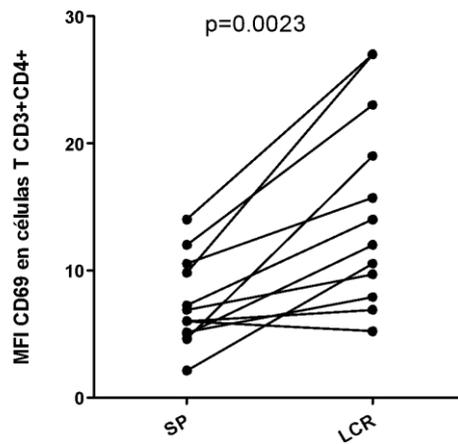


**Figura 30.** Estado de activación de células T CD4+ en SP vs LCR en pacientes con HSAa en la fase precoz. MFI para el antígeno CD69 en células T CD4+ en ambos compartimentos. Se observa un aumento significativo de la expresión de CD69 a nivel del LCR indicando mayor activación a este nivel.



**Figura 31.** Imagen representativa de la expresión de CD69 en células T CD4+ en un paciente con HSA en la fase precoz. Se muestran histograma de CD69 de células que se hizo gate en FSC/SSC/CD3/CD4. Línea roja corresponde a muestra de sangre periférica y la línea verde de LCR.

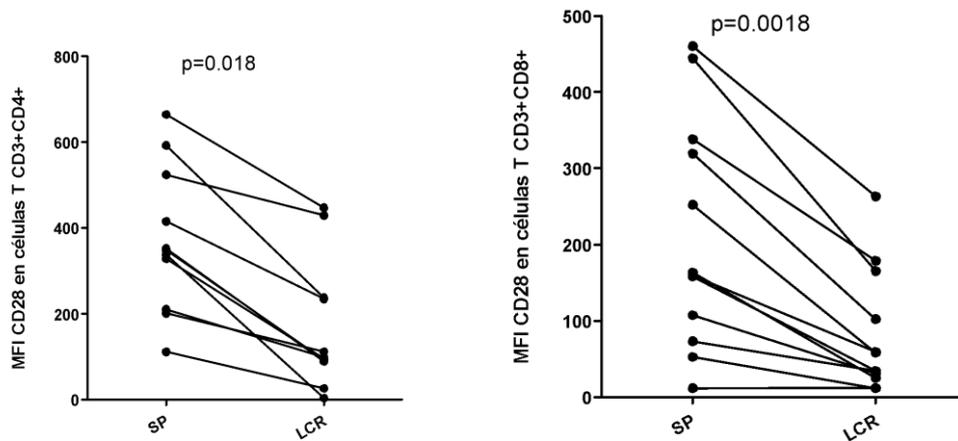
Asimismo, como muestra la Figura 32, la expresión de CD69 en las células T CD4+ permaneció elevada significativamente a nivel del LCR en la fase tardía de los pacientes con HSAa ( $p=0.0023$ ).



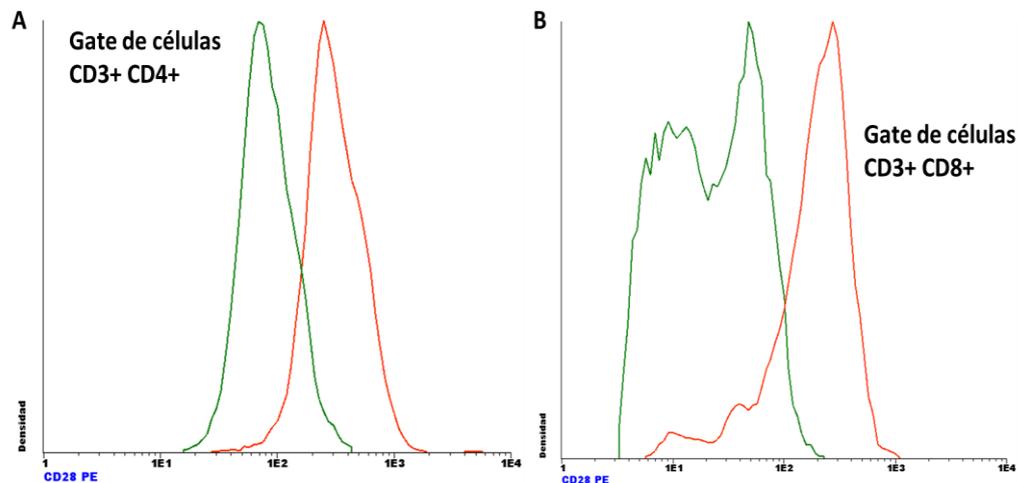
**Figura 32.** Estado de activación de las células T CD4+ en SP vs LCR en pacientes con HSA en la fase tardía. MFI para el antígeno CD69 en células T CD4+ en ambos compartimentos. Se observa un aumento significativo de la expresión de CD69 a nivel del LCR indicando mayor activación a este nivel.

La variación de la expresión de CD69 en células T CD8+ en la fase tardía no resultó significativa.

También estudiamos la molécula CD28 co-estimuladora de células T en células T CD4+ y CD8+. Como se muestra en la Figura 33 y la Figura 34, las células T CD4+ y T CD8+ del LCR expresaron menores niveles de CD28 con respecto a las células T CD4+ y T CD8+ de SP en los pacientes en la fase precoz de la HSA ( $p=0.018$  y  $p=0.0018$ , respectivamente).

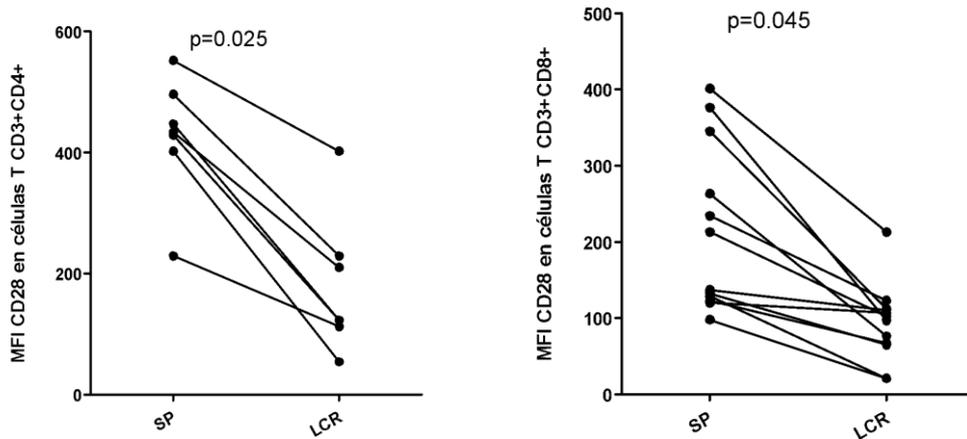


**Figura 33.** Estado de activación de las células T en SP vs LCR en pacientes con HSA en la fase precoz. MFI para el antígeno CD28 en células T CD4+ y CD8+ en ambos compartimentos. Se observa una reducción significativa de la expresión de CD28 a nivel del LCR indicando mayor activación a este nivel. Se muestra el valor de p de las diferencias significativas.



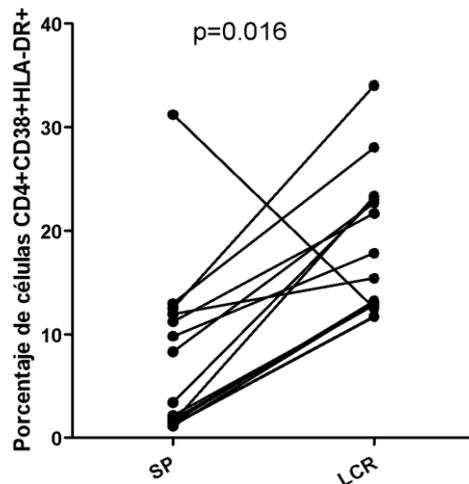
**Figura 34.** Imagen representativa de la expresión de CD28 en células T en un paciente con HSA en la fase precoz. Se muestran histogramas de CD28 de células que se hizo gate en FSC/SSC/CD3/CD4 o CD8. A) Expresión de CD28 en células T CD4+ en sangre periférica (línea roja) y LCR (línea verde). B) Expresión de CD28 en células T CD8+ en sangre periférica (línea roja) y LCR (línea verde).

Asimismo, en la fase tardía de la HSA las células T CD4+ y T CD8+ del LCR expresaron niveles menores de CD28 en comparación con la SP en los pacientes ( $p=0.025$  y  $p=0.045$ , respectivamente), Figura 35.



**Figura 35.** Estado de activación de las células T en SP vs LCR en pacientes con HSAa en la fase tardía. MFI para el antígeno CD28 en células T CD4+ y CD8+ en ambos compartimentos. Se observa una reducción significativa de la expresión de CD28 a nivel del LCR indicando mayor activación a este nivel. Se muestra el valor de  $p$  de las diferencias significativas.

También se evaluó la expresión de HLA-DR y CD38 en células T y se observó una tendencia incremental en el porcentaje de células que expresó HLA-DR a nivel del LCR en la fase precoz de la HSA, pero la misma resultó no fue significativa ( $p=0.066$ ). Si embargo, en la fase tardía de la de HSA, las células T CD4+ expresaron mayores niveles de HLA-DR y CD38 a nivel del LCR (Figura 36), ( $p=0,016$ ). La variación de la expresión del antígeno HLA-DR y CD38 en células T CD8+ no resultó significativa en ninguna de las fases evolutivas.



**Figura 36.** Estado de activación de linfocitos T CD4+ en SP vs LCR en pacientes con HSA en la fase tardía. Porcentaje de células T CD4+ CD38+ HLA - DR+ en el total de células T CD4+ en ambos compartimentos. Se observa un aumento relativo significativo de la expresión a nivel del LCR indicando mayor activación a este nivel. Se muestra el valor de p de las diferencias significativas.

#### 4.2.7 Subpoblaciones celulares y estado de activación según la fase evolutiva, respecto a las variables clínicas de interés

Dentro de todas las variables clínicas medidas consideramos que las de mayor importancia para estudiar si existen diferentes perfiles inmunes son las siguientes:

1. **Técnica seleccionada para el tratamiento del saco aneurismático**
2. **Gravedad clínica según escala de H&H**
3. **Escala tomográfica de Fisher**
4. **Desarrollo de Vasoespasmo**
5. **Mortalidad al alta de la Unidad de Cuidados Intensivos**

##### 4.2.7.1 Técnica seleccionada para el tratamiento del saco aneurismático

Los pacientes tratados con Coils (endovascular) mostraron mayores niveles de leucocitos y monocitos en el LCR en la fase tardía de la HSA con respecto a los que fueron tratados con clips (neurocirugía abierta).

Se evaluaron diferencias clínicas de interés tales como la edad, sexo, la severidad clínica (escala de H&H) y tomográfica (escala de Fisher), el desarrollo de vasoespasmio y mortalidad entre los grupos analizados (coils vs clips), sin observar diferencias estadísticamente significativas.

Las variaciones en los recuentos absolutos y relativos de las diferentes subpoblaciones celulares a nivel de la SP de los pacientes con HSAa, según el tratamiento realizado sobre el aneurisma, no arrojaron diferencias significativas, independientemente de la fase (precoz o tardía) analizada (Tabla 6).

En la Tabla 6 se destacan las principales variaciones encontradas en las diferentes subpoblaciones celulares a nivel del LCR según la etapa evolutiva y la técnica seleccionada para el tratamiento del saco aneurismático. Se observó un recuento absoluto de leucocitos significativamente mayor a nivel de la fase tardía en los pacientes embolizados (coils) respecto a los pacientes operados (clips) ( $p=0.037$ ). A su vez se observó un mayor porcentaje de monocitos en la fase tardía en los pacientes embolizados respecto a los operados ( $p=0.014$ ). No hubo diferencias en la distribución de las subpoblaciones monocitarias entre los grupos.

Con respecto a las células de la inmunidad adaptativa, se detectó una respuesta con una tendencia (sin alcanzar significación estadística) Th1 - Th2 opuesta entre ambas técnicas en el LCR. En los pacientes en los que se optó por un tratamiento endovascular (coils) predominó la respuesta Th2 en la fase precoz y descendió posteriormente, con el consiguiente aumento relativo de la respuesta Th1 en la fase tardía. Lo opuesto ocurrió en los pacientes operados (clips), en los cuales predominó, precozmente, una respuesta Th1 y, luego, en la fase tardía, una respuesta Th2. De forma tal que el cociente Th1/Th2 también marcó estas tendencias opuestas. Aumentó en los pacientes embolizados (coils) y disminuyó en los operados (clips).

Finalmente, también analizamos la dinámica del eje Th17 – Tregs. Se observó un aumento significativo del porcentaje de células Tregs activadas (HLA - DR+) en la fase tardía de los pacientes que recibieron un tratamiento endovascular del aneurisma (coils) respecto al grupo quirúrgico (clips) ( $p=0.006$ ). El porcentaje de células Th17, Tregs y el cociente Th17/Tregs, independientemente de la fase evolutiva analizada, no varió de forma significativa.

**Tabla 6. Poblaciones celulares inmunes en LCR en función de la técnica seleccionada para el tratamiento del saco aneurismático: Coils vs Clips**

<b>Célula</b>	<b>Coils (mediana (IQR))</b>	<b>Clips (mediana (IQR))</b>	<b>Valor p</b>
<b>Leucocitos (/μL)</b>			
LCR Precoz	364 (200 – 1400)	271 (200 – 1090)	NS
Tardío	238 (190 – 856)	127 (102 – 351)	0.037
<b>Neutrófilos (%)*</b>			
LCR Precoz	48.7 (5.2 – 74.8)	43.8 (23.7 – 57.0)	NS
Tardío	17.4 (10.0 – 32.5)	31.9 (12.6 – 62.3)	NS
<b>Monocitos (%)*</b>			
LCR Precoz	4.8 (1.7 – 8.5)	5.9 (1.2 – 7.4)	NS
Tardío	15.2 (11.0 – 18.9)	3.0 (0.9 – 11.2)	0.014
<b>Linfocitos (%)*</b>			
LCR Precoz	2.9 (0.8 – 6.1)	7.9 (3.4 – 10.6)	NS
Tardío	4.6 (2.1 – 24.5)	9.6 (1.8 – 25.33)	NS
<b>Linfocitos (/μL)</b>			
LCR Precoz	18.8 (7.5 – 22.6)	25.1 (13.6 – 37.2)	NS
Tardío	15.2 (6.7-32.6)	12.4 (4.43-24.32)	NS
<b>Cociente CD4/CD8</b>			
LCR Precoz	3.9 (2.4 – 5.6)	2.3 (0.9 – 2.8)	NS
Tardío	2.9 (2.3 – 3.5)	2.4 (1.4 – 4.3)	NS
<b>Células T CD4+Th1 (%) (% de células T CD4+)</b>			
LCR Precoz	11.2 (10.2 – 28.0)	29.0 (10.2 - 39.0)	NS
Tardío	33.5 (24.5 – 36.5)	11.0 (10.0 – 20.0)	NS
<b>Células T CD4+Th2 (%) (% de células T CD4+)</b>			
LCR Precoz	32.7 (31.2 – 39.0)	5.7 (1.3 – 7.7)	0.036
Tardío	9.5 (4.9 – 22.5)	17.0 (6.4 – 33.0)	NS
<b>Cociente Th1/Th2</b>			
LCR Precoz	0.34 (0.33 – 0.72)	5.0 (1.1 – 45.4)	NS
Tardío	3.54 (1.9 – 26.2)	0.79 (0.33 – 1.2)	NS
<b>Células T CD4+ Th17(%) (% de células T CD4+)</b>			
LCR Precoz	44.5 (23.0 – 47.6)	31.0 (21.0 - 44.5)	NS
Tardío	32.0 (31.0 – 36.0)	47.4 (33.0 – 81.0)	NS
<b>Células Tregs (%) (% de células T CD4+)</b>			
LCR Precoz	0.5 (0.3 – 6.4)	0.9 (0.45 – 1.6)	NS
Tardío	6.3 (1.5 – 10.4)	2.3 (1.6 – 6.0)	NS

Células activadas (%)	Tregs	HLA-DR	
LCR Precoz	5.3 (4.0 – 33.0)	25.0 (12.0 – 100.0)	NS
Tardío	77.2 (69.5 – 98.1)	32.0 (18.0 – 43.9)	0.006
Cociente Th17/Tregs			
LCR Precoz	90.1 (3.6 – 197.1)	32.8 (30.8 – 51.7)	NS
Tardío	8.3 (3 – 37.6)	18.7 (6.1 – 51.2)	NS

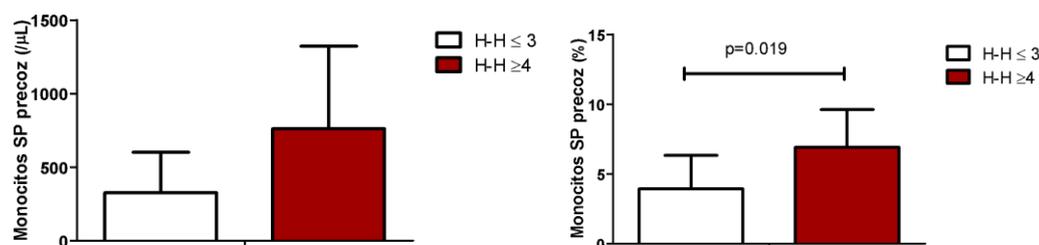
\* Corresponde al % del total de leucocitos.

#### 4.2.7.2 Gravedad clínica según escala de Hunt y Hess

Los pacientes de mayor gravedad según la escala de H&H muestran mayores niveles de monocitos en SP en la fase precoz y de células NK CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> en el LCR en la fase tardía de la HSA.

Variables clínicas de interés tales como la edad, sexo, la severidad tomográfica (escala de Fisher), la técnica seleccionada para el tratamiento del aneurisma, y el desarrollo de vasoespasmó no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados (H&H menor a IV vs IV-V).

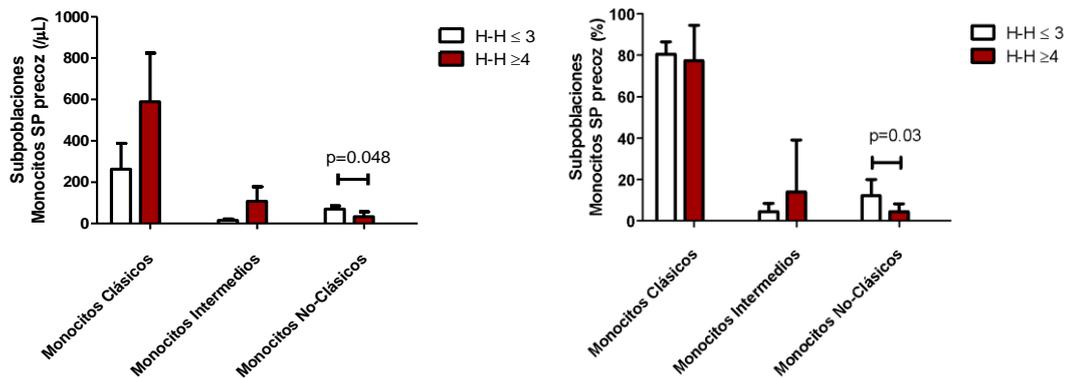
Para esta variable clínica que dicotomiza a los pacientes por gravedad clínica, resultó significativa la diferencia de monocitos (totales) en la SP precoz. Como vemos en la Figura 37, en aquellos pacientes más graves (H&H IV-V) se observó una tendencia a presentar mayores niveles de monocitos en SP sin alcanzar la significación estadística y un aumento significativo del porcentaje de monocitos totales ( $p=0.019$ ).



**Figura 37.** Monocitos en sangre periférica según escala de H&H. Izquierda: tendencia incremental, no significativa, del recuento absoluto de monocitos en la SP de la fase precoz de los pacientes con HSAa más graves con una escala de H&H de IV o V. Derecha: aumento relativo (%) significativo del recuento de monocitos en la SP de la fase precoz

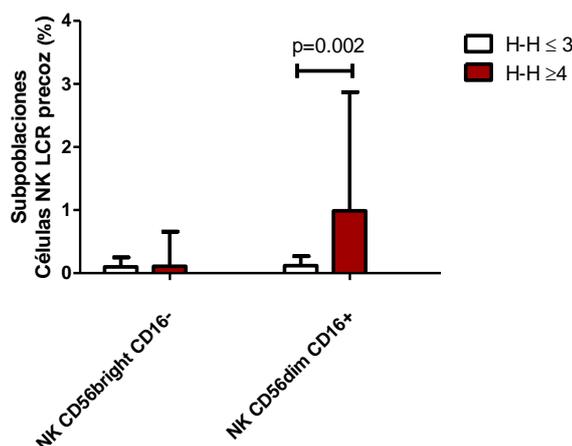
de los pacientes con HSAa más graves con una escala de H&H de IV o V. Se muestra % en función del recuento de leucocitos totales. Se grafica mediana  $\pm$  error standard. Se muestra el valor de p de las diferencias significativas.

Seguidamente, se realizó el estudio de las subpoblaciones monocitarias. Como vemos en la Figura 38, los pacientes más graves (H&H IV-V), en la SP de la fase precoz, presentaron un descenso significativo del porcentaje y del recuento absoluto de la subpoblación de monocitos no clásicos ( $p=0.03$  y  $p=0.048$ , respectivamente). Las demás subpoblaciones monocitarias no variaron de forma significativa en esta u otra etapa, ya sea en SP o LCR.



**Figura 38.** Poblaciones monocitarias en SP según escala de H&H. **Izquierda:** Disminución absoluta significativa de la subpoblación de monocitos no clásicos en la SP de la fase precoz de los pacientes con HSAa más graves con una escala de H&H de IV o V. Se grafica mediana  $\pm$  error standard. **Derecha:** Disminución relativa (%) significativa de la subpoblación de monocitos no clásicos en la SP de la fase precoz de los pacientes con HSAa más graves con una escala de H&H de IV o V. Se muestra el % de las subpoblaciones monocitarias en función de los monocitos totales. Se muestra el valor de p de las diferencias significativas.

Con respecto al análisis del LCR, se detectó en la fase precoz, un aumento significativo del porcentaje las células NK CD56<sup>dim</sup> CD16+ en los pacientes más graves representados por una escala de H&H de IV-V ( $p= 0.002$ ). Figura 39.



**Figura 39.** Poblaciones de células NK en LCR en función de escala de H&H. Aumento relativo (%) significativo de la subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> en el LCR de la fase precoz de los pacientes con HSAa más graves con una escala de H&H de IV o V. La subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> no varió de forma significativa. Se muestra el % en función de leucocitos totales. Se grafica mediana  $\pm$  error standard. Se muestra el valor de p de las diferencias significativas.

El resto de las subpoblaciones celulares y su estado de activación no variaron de forma significativa.

#### 4.2.7.3 Escala tomográfica de Fisher

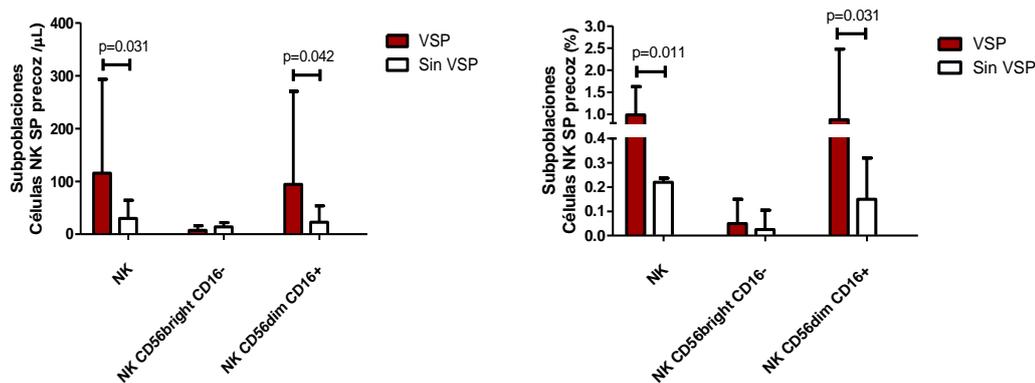
No se pudo realizar el análisis dicotomizado dado que no se enrolaron pacientes con escasa sangre a nivel cisternal (Fisher 1 y 2).

#### 4.2.7.4 Desarrollo de Vasoespasmo

El desarrollo de vasoespasmo se asoció a un incremento de células NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> en SP de la fase precoz de la HSA.

Variables clínicas de interés tales como la edad, sexo, la severidad clínica (escala de H&H) y tomográfica (escala de Fisher), la técnica seleccionada para el tratamiento del aneurisma y la mortalidad no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos analizados (vasoespasmo sí o no).

Como se observa en la Figura 40, en los pacientes que presentaron vasoespasmo se observó en SP un aumento significativo del recuento absoluto y del porcentaje de las células NK totales ( $p=0.031$  y  $p=0.042$  respectivamente) y NK CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> ( $p=0.011$  y  $p=0.031$ , respectivamente).



**Figura 40.** Poblaciones de células NK en SP en la fase precoz en función del desarrollo de vasoespasmo. Aumento significativo del recuento absoluto (izquierda) y relativo (%) (derecha) de las células NK totales y de la subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> a nivel de la SP de la fase precoz de los pacientes con HSAa que desarrollaron vasoespasmo sonográfico. La subpoblación de células CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> no varió de forma significativa. Se muestra % en función de leucocitos totales. Se grafica mediana  $\pm$  error standard. Se muestra el valor de p de las diferencias significativas.

Como se observa en la Tabla 7 no se observaron diferencias significativas en las células de la respuesta inmune adaptativa con el desarrollo o no de vasoespasmo.

**Tabla 7. Distribución celular T CD4<sup>+</sup>, Th17 y Tregs en SP y LCR en pacientes con HSAa según la fase evolutiva y desarrollo de Vasoespasmo**

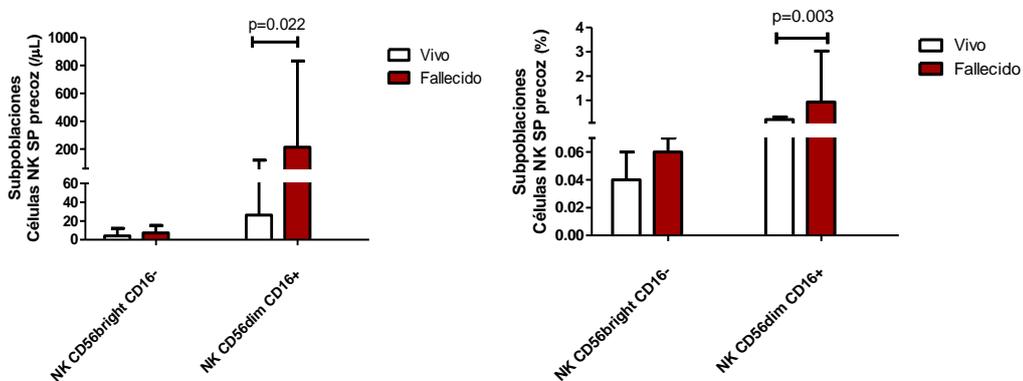
Célula	Vasoespasmo (mediana (IQR))		No vasoespasmo (mediana (IQR))		Valor p	
	Fase precoz	Fase tardía	Fase precoz	Fase tardía	Precoz	Tardía
<b>Células T CD4<sup>+</sup> (%)</b>						
SP	4.5 (2.7-6.7)	3.8 (2.4-7.2)	3.8 (2.7-5.9)	6.1 (5.2-6.2)	NS	NS
LCR	4.9 (2.5-13.0)	5.7 (3.1-12.0)	8.1 (3.6-10.2)	17.6 (2.5-18.9)	NS	NS
<b>Células CD4<sup>+</sup> Th17 (% células T CD4<sup>+</sup>)</b>						
SP	29.3 (27.11-31.0)	32.0 (29.0-35.0)	32.9 (31.5-35.4)	13.2 (12.9-54)	NS	NS
LCR	37.7 (27-63)	39.0 (33.0-47.4)	44.5 (44.5-47.6)	85.4 (83.0-87.0)	NS	NS
<b>Células CD4<sup>+</sup> Treg (% células T CD4<sup>+</sup>)</b>						
SP	5.6 (0.9-8.7)	5.9 (0.9-10.0)	11.9 (10.4-12.8)	6.4 (2.4-11.5)	NS	NS
LCR	6.53 (3.9-6.9)	2.9 (2.2-9.2)	1.0 (0.9-0.14)	1.64 (1.64-1.65)	NS	NS
<b>Cociente Th17/Treg</b>						
SP	5.1 (3.5-27.5)	5.5 (2.9-31.2)	2.9 (2.6-3.2)	2.05 (1.1-22.6)	NS	NS
LCR	5.5 (3.9-29.2)	13.5 (4.3-27.1)	91 (109.8-297.2)	52.0 (51.2-52.8)	NS	NS

#### 4.2.7.5 Mortalidad al alta de la Unidad de Cuidados Intensivos

La mortalidad en UCI se asoció con un incremento de las células NK CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> en sangre periférica en la fase precoz y con un descenso de las células NK CD56<sup>brigh</sup>CD16<sup>-</sup> en la fase tardía de la HSA.

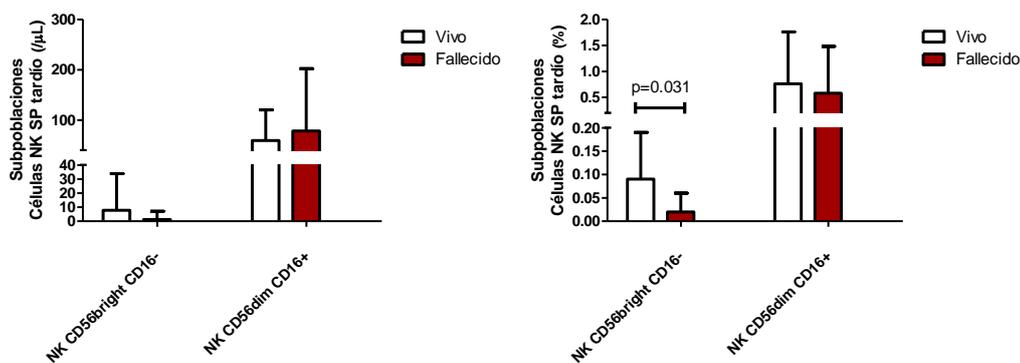
VARIABLES CLÍNICAS DE INTERÉS TALES COMO LA EDAD, SEXO, LA SEVERIDAD TOMOGRÁFICA (ESCALA DE FISHER), LA TÉCNICA SELECCIONADA PARA EL TRATAMIENTO DEL ANEURISMA Y EL DESARROLLO DE VASOESPASMO NO PRESENTARON DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS EN FUNCIÓN DE LA MORTALIDAD EN LA UNIDAD DE CUIDADOS INTENSIVOS (UCI).

Como se observa en la figura 41, se evidenció un aumento significativo del recuento absoluto y porcentaje de células NK CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> a nivel de la SP precoz en aquellos pacientes que fallecieron en UCI respecto a los que sobrevivieron ( $p=0.022$  y  $p=0.033$ , respectivamente).



**Figura 41.** Poblaciones de células NK en SP en la fase precoz en función de la mortalidad en la UCI. Aumento significativo del recuento absoluto (izquierda) y relativo (%) (derecha) de la subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> a nivel de la SP de la fase precoz de los pacientes con HSAa que fallecieron en la UCI. La subpoblación de células CD56<sup>brigh</sup>CD16<sup>-</sup> no varió de forma significativa. Se muestra % en función de leucocitos totales. Se grafica mediana  $\pm$  error standard. Se muestra el valor de p de las diferencias significativas.

Por otra parte, en la fase tardía, a nivel de la SP, únicamente se observó una disminución significativa del porcentaje de células NK CD56<sup>brigh</sup>CD16<sup>-</sup> en aquellos pacientes que fallecieron respecto a los que sobrevivieron ( $p=0.031$ ). Figura 42.



**Figura 42.** Poblaciones de células NK en SP en la fase tardía en función de la mortalidad en la UCI. Disminución significativa del recuento relativo (%) (derecha) de la subpoblación de células CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> a nivel de la SP de la fase tardía de los pacientes con HSAa que fallecieron en la UCI. La subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>+</sup> y no varió de forma significativa. No hubo variación significativa en el recuento absoluto de las subpoblaciones de células NK en la SP de la fase tardía, independientemente de la subpoblación analizada. Se muestra % en función de leucocitos totales. Se grafica mediana ± error standard. Se muestra el valor de p de las diferencias significativas.

El resto de las subpoblaciones celulares y su estado de activación no variaron de forma significativa.

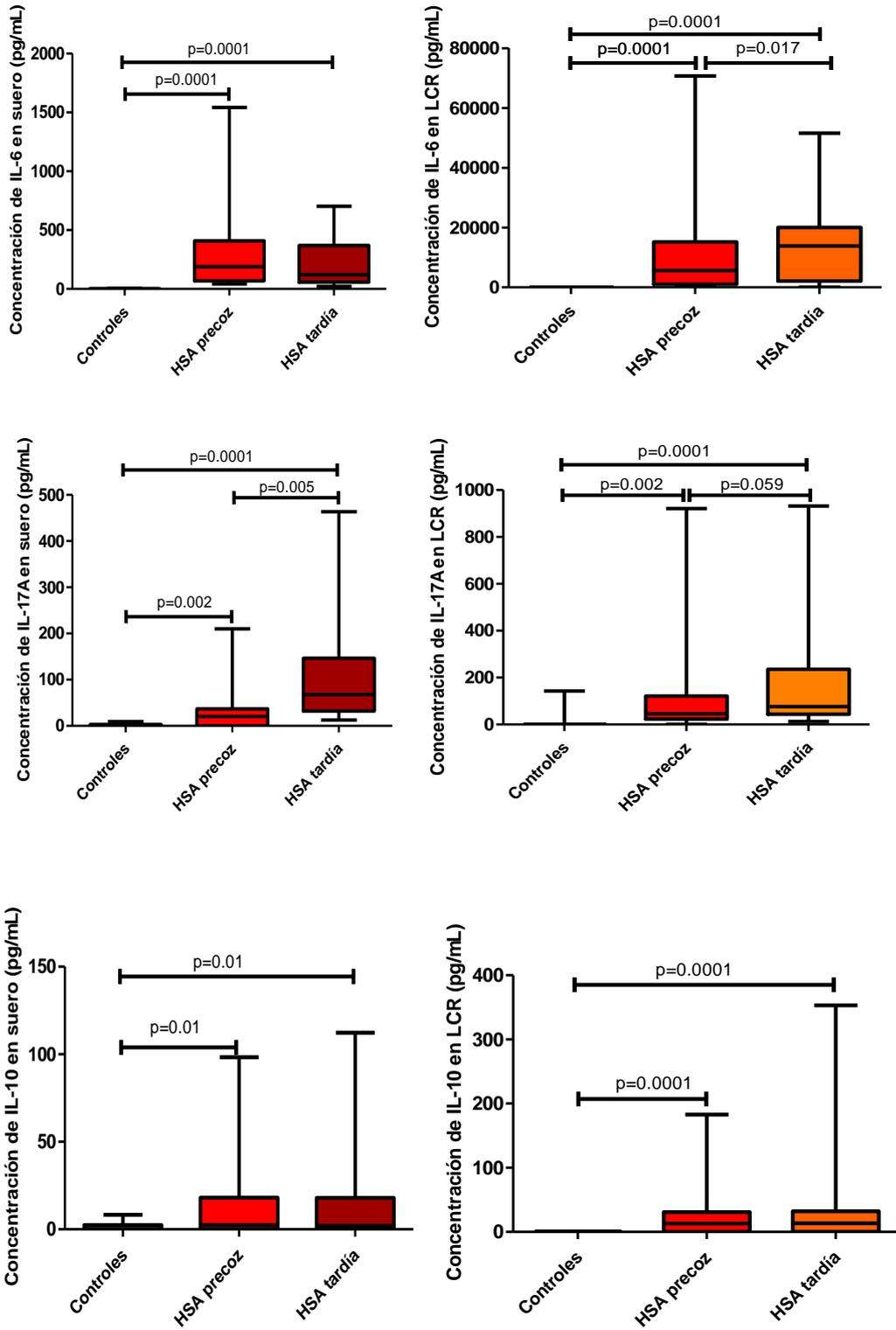
## 4.3 Citoquinas

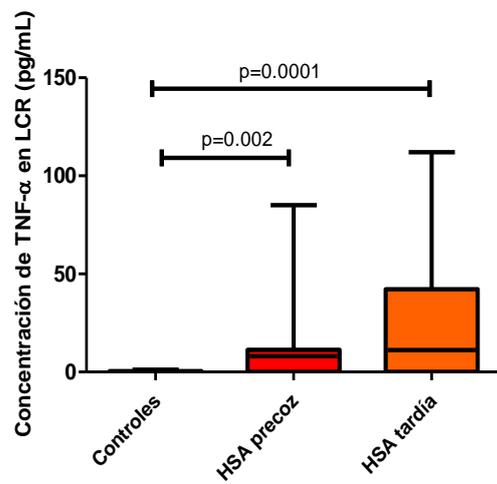
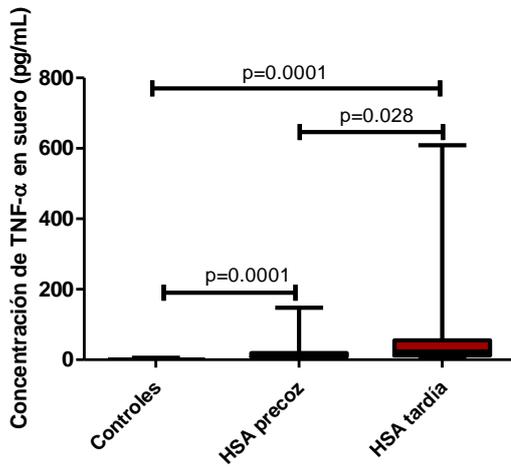
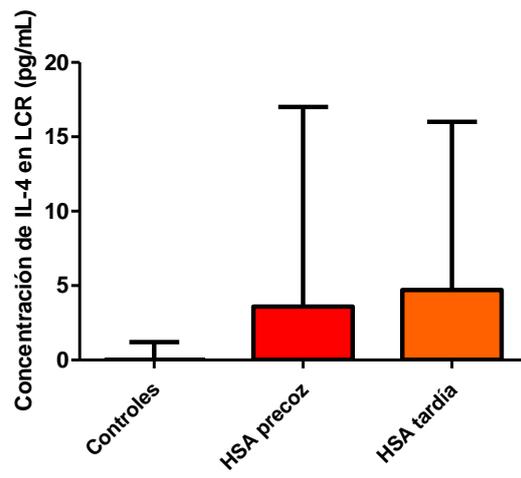
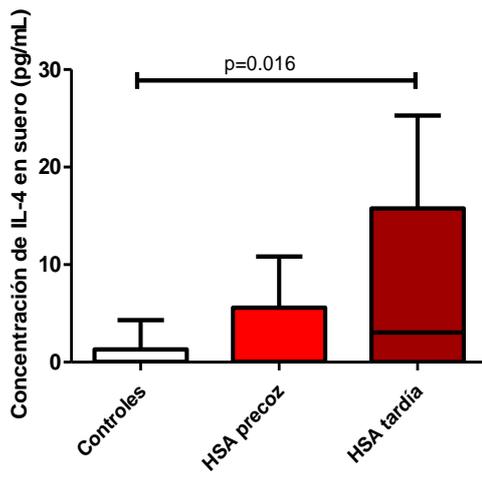
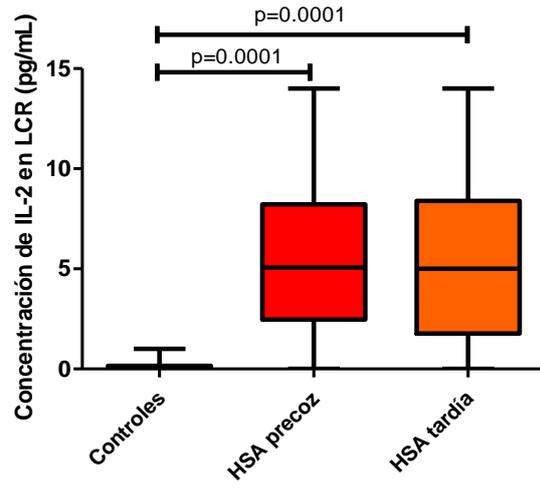
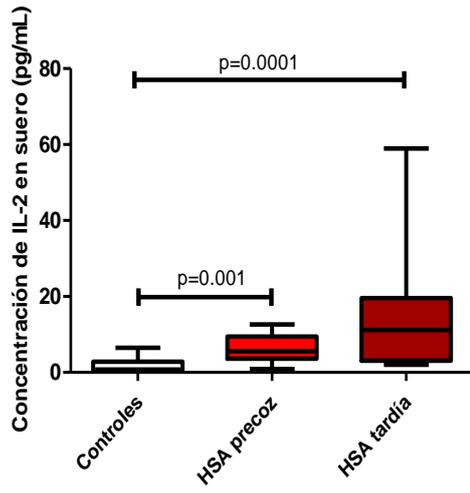
### 4.3.1 Citoquinas en suero y LCR de los pacientes según la fase evolutiva, y en comparación con controles

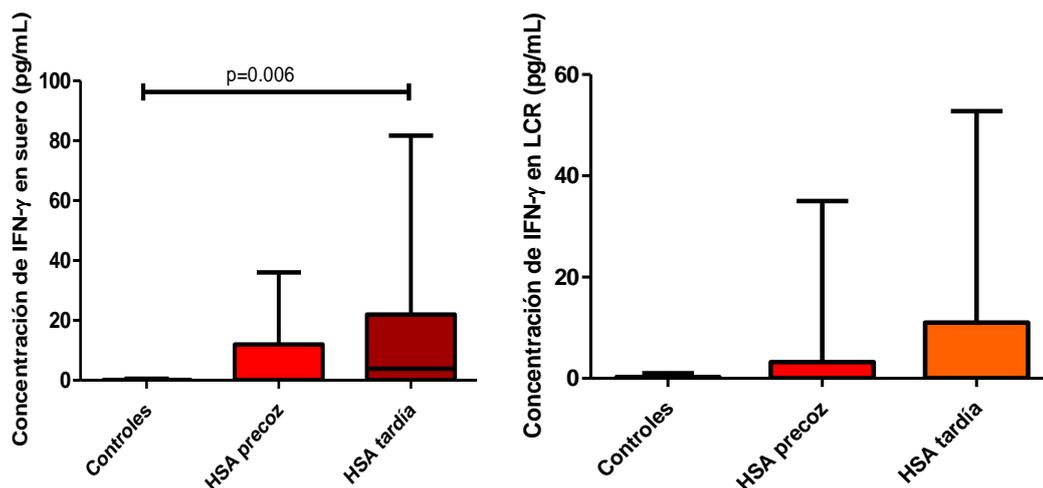
Existe un aumento de las citoquinas proinflamatorias, Th1, Th2, Th17 y reguladoras en suero y LCR tanto en la fase precoz como tardía de la HSAa aguda grave.

Con la finalidad de estudiar el perfil de citoquinas presentes en los pacientes con HSAa, medimos citoquinas proinflamatorias, reguladoras, Th1, Th2 y Th17, en suero y LCR en diferentes momentos evolutivos (fase precoz y tardía) desde el sangrado subaracnoideo, y en suero y LCR de los controles (Figura 43). Encontramos que las concentraciones de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-17A, IL-10 e IL-2 estaban significativamente elevadas tanto a nivel del suero como del LCR, en ambas fases evolutivas (precoz y tardía), respecto al suero y el LCR de los controles. Para IFN- $\gamma$ , aunque también se incrementó su concentración en ambas fases (precoz y tardía) a nivel del suero y el LCR respecto a los controles, únicamente el incremento a nivel del suero en la fase tardía resultó estadísticamente

significativo. Resultados similares observamos para los niveles de IL-4. Sólo el incremento a nivel del suero en la fase tardía alcanzó la significación estadística.







**Figura 43.** Concentración de citoquinas en suero y LCR en fase precoz y tardía de las HSA. **Izquierda:** concentración de citoquinas en suero en pacientes según la fase evolutiva (precoz o tardía) y en los controles. **Derecha:** concentración de citoquinas en LCR en pacientes según la fase evolutiva (precoz o tardía) y en los controles. Tanto en la concentración en suero como LCR se puede observar la comparación en los pacientes según la fase evolutiva (precoz vs tardía) y respecto a los controles. Se grafican en diagramas de cajas mostrando mediana, percentil 25 y 75 (rango intercuartil), mínimo y máximo. Para todos los casos están señalados los resultados estadísticamente significativos.

Además, como vemos en la misma Figura 43, cuando se analizó la tendencia evolutiva de las concentraciones de las citoquinas a nivel del suero (fase precoz y fase tardía), tanto  $TNF\alpha$  como  $IL-17A$  incrementaron de forma significativa su concentración ( $p = 0.028$  y  $p = 0.005$ , respectivamente). Para las restantes citoquinas ( $IL-2$ ,  $IL-4$ ,  $IL-6$ ,  $IL-10$ ,  $INF\gamma$ ), la variación no resultó estadísticamente significativa. Seguidamente, realizamos un análisis similar, pero a nivel del LCR. Las concentraciones de la  $IL-6$  e  $IL-17A$  se incrementaron en la fase tardía pero para la  $IL-17A$  no se alcanzó la significación estadística ( $p = 0.017$  y  $p = 0.059$  respectivamente). Para las restantes citoquinas ( $IL-2$ ,  $IL-4$ ,  $IL-10$ ,  $TNF\alpha$  e  $INF\gamma$ ), la variación no resultó significativa entre ambas fases.

Finalmente, se comparó en los pacientes la concentración de citoquinas, por fase (precoz o tardía), a nivel de suero respecto al LCR. La concentración de  $IL-6$  (Figura 43) resultó ser significativamente mayor a nivel del LCR respecto al suero en ambas fases evolutivas (precoz y tardía) ( $p = 0.001$  y  $p = 0.001$ , respectivamente).

La concentración de  $INF\gamma$ ,  $IL-2$ ,  $TNF\alpha$ ,  $IL-17A$ ,  $IL-4$  e  $IL-10$  no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos compartimentos, independientemente de la fase analizada.

## 4.3.2 Citoquinas en suero y el LCR según la fase evolutiva y las diferentes variables clínicas de interés

Al igual que hicimos con el análisis de las poblaciones celulares inmunes, dentro de todas las variables clínicas medidas consideramos que las de mayor importancia para estudiar si existe diferentes perfiles inmunes fueron las siguientes:

- 1. Técnica seleccionada para el tratamiento del saco aneurismático**
- 2. Gravedad clínica según escala de H&H**
- 3. Escala tomográfica de Fisher**
- 4. Desarrollo de Vasoespasmo**
- 5. Mortalidad al alta de la Unidad de Cuidados Intensivos**

### 4.3.2.1 Técnica seleccionada para el tratamiento del saco aneurismático

Ya sea a nivel de suero como del LCR, las concentraciones de las citoquinas estudiadas no variaron de forma significativa, independientemente de la fase evolutiva analizada.

### 4.3.2.2 Gravedad clínica según escala de Hunt y Hess

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguna citoquina, ya sea a nivel de suero o LCR, e independientemente de la fase evolutiva (precoz o tardía).

### 4.3.2.3 Escala tomográfica de Fisher

No se pudo realizar el análisis dicotomizado dado que no se enrolaron pacientes con escasa sangre a nivel cisternal (Fisher 1 y 2).

### 4.3.2.4 Desarrollo de Vasoespasmo

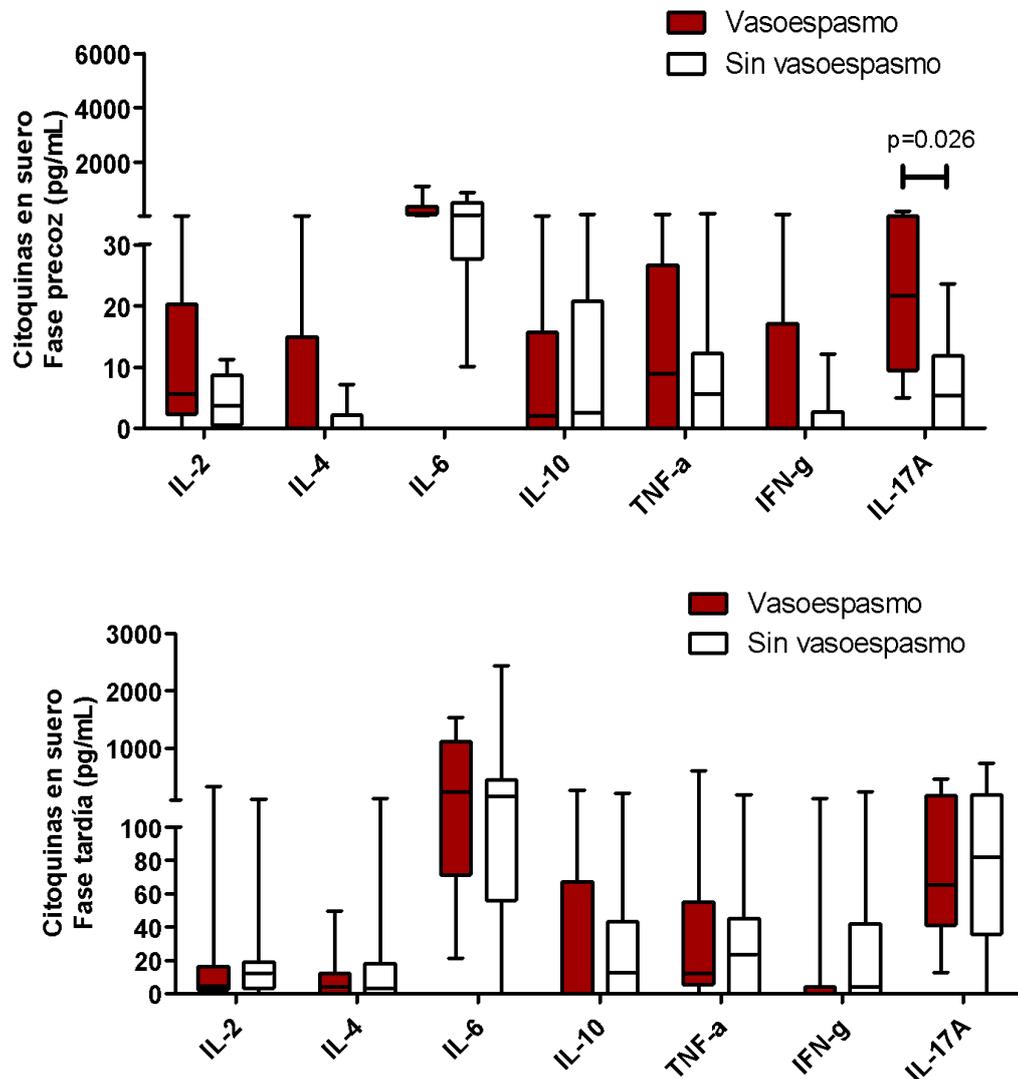
Los pacientes que desarrollaron vasoespasmo tenían un incremento de IL-17A en suero en la fase precoz y en menor medida en la fase tardía de la HSA aguda grave.
--

La concentración precoz en suero de la IL-17A se incrementó significativamente en el subgrupo de pacientes que desarrolló vasoespasmo sonográfico respecto a los que no lo hicieron,  $p=0.026$ . La variación de la concentración en la etapa tardía, aunque también se

elevó en los pacientes que desarrollaron vasoespasmo no alcanzó la significación estadística (Figura 44).

La IL-2, IL4 e INF $\gamma$ , también presentaron una tendencia incremental en su concentración sérica precoz en los pacientes que desarrollaron vasoespasmo, pero la diferencia no resultó estadísticamente significativa. Contrariamente, la IL-10 fue la única que presentó una tendencia decremental de su concentración sérica precoz en los pacientes que desarrollaron vasoespasmo, pero el descenso no resultó significativo. Finalmente, los niveles de TNF $\alpha$  se mantuvieron prácticamente sin cambios. La variación de las concentraciones en la etapa tardía resultó también no significativa (Figura 44).

A nivel del LCR no se encontraron diferencias significativas para ninguna citoquina, independientemente de la fase evolutiva analizada.



**Figura 44.** Concentración de citoquinas en suero en la fase precoz (arriba) y tardía (abajo) en los pacientes con HSAa. En color rojo los pacientes que desarrollaron vasoespasmo y en blanco los que no lo desarrollaron. La concentración

*precoz de la IL-17A se elevó significativamente en los pacientes que en los días subsiguientes presentaron vasoespasmo sonográfico. Se grafican en diagramas de cajas mostrando mediana, percentil 25 y 75 (rancho intercuartil), mínimo y máximo. Para todos los casos están señalados los resultados estadísticamente significativos.*

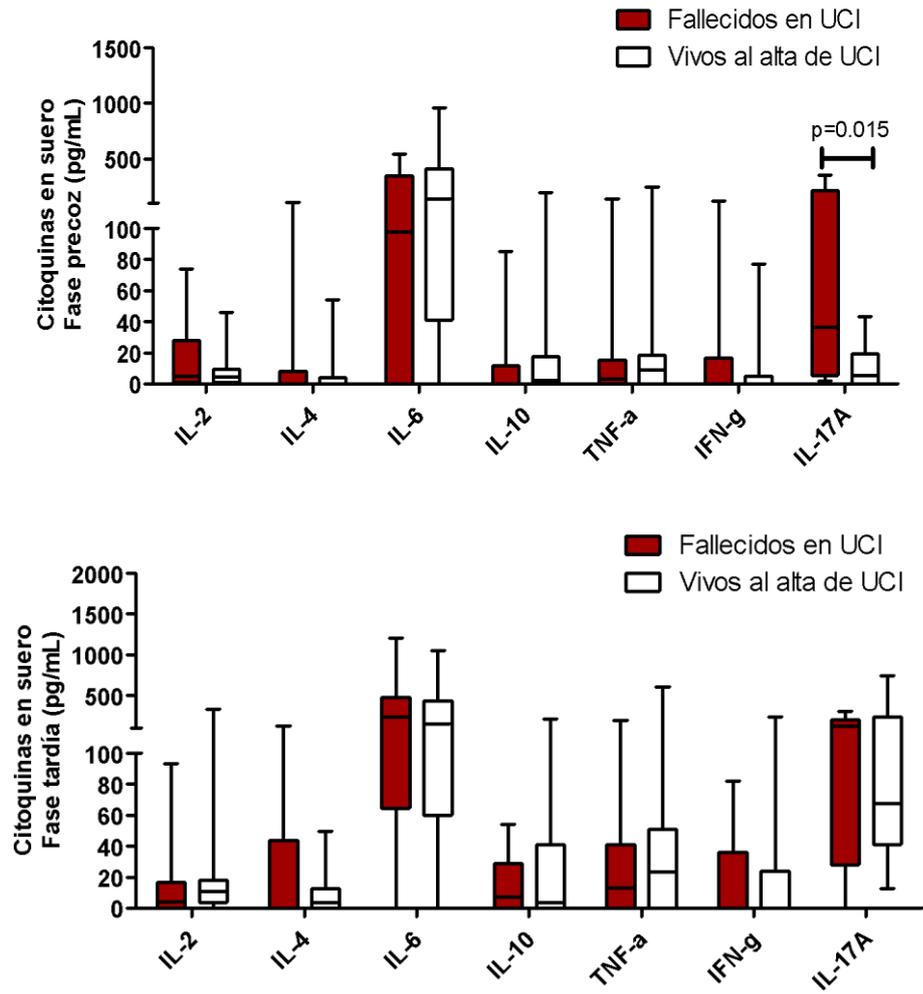
#### 4.3.2.5 Mortalidad al alta de la Unidad de Cuidados Intensivos

Los pacientes que fallecieron en UCI tenían un incremento de IL-17A en suero en la fase precoz y en menor medida en la fase tardía de la HSA aguda grave.

La concentración sérica de IL-17A en la etapa precoz se incrementó significativamente en los pacientes que fallecieron respecto a los que sobrevivieron al alta de UCI ( $p= 0.015$ ). Aunque la variación de la concentración en la etapa tardía presentó también un aumento en los fallecidos respecto a los sobrevivientes, no resultó ser una diferencia estadísticamente significativa (Figura 45).

Aunque otras citoquinas como la IL-2, IL-4 e INF- $\gamma$  también presentaron una clara tendencia incremental de su concentración sérica precoz en los pacientes que fallecieron, la diferencia no resultó estadísticamente significativa. IL-10 mantuvo su concentración sin cambios en ambos subgrupos de pacientes y, finalmente, TNF $\alpha$  descendió su concentración en los pacientes que fallecieron, pero el descenso no tuvo significación estadística. La variación de las concentraciones en la etapa tardía resultó también no significativa.

A nivel del LCR no se encontraron diferencias significativas para ninguna citoquina, independientemente de la fase evolutiva analizada.



**Figura 45.** Concentración de citoquinas en suero en la fase precoz (arriba) y tardía (abajo) en los pacientes con HSAa. En color rojo los pacientes que fallecieron en la UCI y en blanco aquellos que sobrevivieron. La concentración precoz de la IL-17A se elevó significativamente en los pacientes que fallecieron en la UCI. Se grafican en diagramas de cajas mostrando mediana, percentil 25 y 75 (rancho intercuartil), mínimo y máximo. Se señalan los resultados estadísticamente significativos.

# CAPÍTULO 5. Discusión, limitaciones, perspectivas futuras y conclusiones

## 5.1 Discusión

**En este proyecto investigamos sobre el rol de los principales efectores de la respuesta inmune en pacientes con HSAa aguda grave y cómo incide el tratamiento del aneurisma sobre la misma.** Para ello estudiamos un amplio espectro de poblaciones celulares de la respuesta inmune innata (neutrófilos, monocitos, células NK y dendríticas) y adaptativa (linfocitos CD4+ (Th1, Th2, Th17), CD8+, T reguladoras), tanto a nivel de la SP como del LCR de los pacientes con HSAa y la SP de los controles. Hicimos énfasis en el análisis de los cambios relativos de su distribución y estado de activación en función del tiempo transcurrido desde el sangrado subaracnoideo (precoz y tardío). Concomitantemente profundizamos en la cinética de algunas citoquinas estrechamente relacionadas con las poblaciones celulares efectoras mencionadas. Pero, además, incluimos para este caso, la comparación de la concentración de citoquinas a nivel del LCR de individuos seleccionados como controles. Asimismo, comparamos estas variables inmunes con variables clínico-imagenológicas de particular interés en pacientes con HSAa tales como la severidad clínica (H&H), desarrollo de vasoespasmos (DTC), mortalidad en UCI y, finalmente, la técnica seleccionada para tratar el aneurisma (coils - endovascular vs clips – neurocirugía abierta). Aunque inicialmente se planificó comparar también los resultados en función de la cantidad de sangre volcada al espacio subaracnoideo mediante la escala tomográfica de Fisher, no pudimos concretar el análisis dado que no se enrolaron pacientes con escasa cantidad de sangre (Fisher 1 y 2).

En primer lugar, debemos mencionar que, en función de los resultados analizados, hemos enrolado pacientes con una HSAa grave reflejada por un franco predominio de valores en la escala de H&H de IV-V (con neurodeterioro o pobre grado clínico) y valores de la escala de Fisher de 3-4, es decir, con abundante cantidad de sangre a nivel del espacio subaracnoideo y/o sistema ventricular. Como resultado, y de acuerdo con publicaciones internacionales, un alto porcentaje de pacientes desarrolló vasoespasmos (60 %) y/o falleció en la UCI (mortalidad global 36 %) <sup>3,26</sup>. La explicación de estos resultados

se sustenta en dos hechos esperados e interconectados. Por un lado, el CTI del Hospital Universitario, históricamente admite pacientes severamente afectados dado que los pacientes menos graves ingresan al Servicio de Cuidados Intermedios de la Clínica Médica C (no dependiente del servicio de Medicina Intensiva) o se trasladan a centros de menor complejidad. Este hecho conlleva que la mayoría de los pacientes admitidos a nuestro servicio y, posteriormente enrolados en nuestro proyecto, fueron pacientes severamente enfermos a los cuales se les colocó una DVE y/o DL externo para el manejo clínico - asistencial de su HSAa (profilaxis de vasoespasma, hidrocefalia aguda, hipertensión intracraneana)<sup>3,26</sup>.

En segundo lugar, como concepto general, podemos enunciar que, a partir de los resultados obtenidos, y coincidiendo con numerosos investigadores alrededor del mundo, en esta devastadora patología **neuro - sistémica aguda, la respuesta inmune innata y adaptativa juegan un rol destacado tanto en la injuria encefálica precoz como la tardía**. Estamos de acuerdo con los expertos que señalan a la respuesta inmune como un **nexo clave** entre los fenómenos fisiopatológicos que se desencadenan pocos minutos después de la rotura aneurismática y los eventos posteriores (“diferidos”) que tienen como uno de los principales protagonistas a la isquemia<sup>274,324</sup>. Por lo tanto, profundizar en su conocimiento es uno de los caminos a recorrer, no el único, claro está, si nuestro objetivo mayor es poder mejorar los resultados clínicos a corto y largo plazo.

Ahora bien, este proyecto también arrojó otros resultados originales (no publicados previamente) y aquellos que corroboraron información ya publicada por diferentes investigadores en el área.

A nivel de la respuesta inmune innata observamos una clara diferencia en el recuento absoluto y/o relativo de neutrófilos, monocitos y sus subpoblaciones cuando comparamos los pacientes con los controles, pero también cuando comparamos la SP con el LCR en los propios pacientes con HSAa. Por otro lado, demostramos un robusto perfil de activación de estas células inmunes de la respuesta inmune innata.

**En nuestro estudio confirmamos, al igual que otros grupos de investigadores, un incremento significativo del recuento de neutrófilos en la SP y LCR de los pacientes, tanto en la fase precoz como la tardía**<sup>274, 388</sup>. Para estudiar el estado de activación de los neutrófilos medimos el nivel de expresión de CD69 (antígeno de activación muy temprana). Encontramos un aumento no significativo de la expresión de CD69 en los

neutrófilos del LCR comparados con los de la SP en pacientes con HSAa, sugiriendo un estado de activación aumentado de estas células en el compartimiento encefálico. En una segunda etapa, analizamos un mayor número de pacientes, pero esta vez optamos por medir la expresión del antígeno HLA-DR, dado que el mismo es señalado como un marcador más robusto y estable en el tiempo que el primero. **Al comparar la expresión de HLA-DR en SP y LCR observamos un aumento de la expresión del antígeno a nivel del LCR, hecho que indica que los granulocitos reclutados a nivel de LCR demuestran mayor activación dado que se encuentran expuestos a un aluvión de estímulos antigénicos (DAMPs) ya analizados**<sup>18,114,325</sup>.

En su modelo murino, Gris y colaboradores, encontraron un incremento precoz, en las primeras 12-48 horas, de neutrófilos y monocitos reclutados hacia el SNC. Los neutrófilos tienen una reconocida capacidad fagocítica relevante a la hora de eliminar a los eritrocitos vertidos al espacio subaracnoideo y ventrículos cerebrales. Migran desde la circulación al sitio de injuria (encéfalo/meninges) donde ponen en juego sus mecanismos efectores: degranulación, fagocitosis, producción de especies reactivas de oxígenos y formación de NET entre los más relevantes. Adicionalmente, pueden contribuir con la expansión de la injuria encefálica mediante la liberación de potentes factores/citoquinas proinflamatorias<sup>274,278</sup>. Además de estas clásicas funciones, hoy en día se acepta que los neutrófilos son reguladores claves de la respuesta inmune adaptativa; pueden producir citoquinas, que participan en el reclutamiento y activación linfocitaria y en situaciones de inflamación pueden migrar a los ganglios linfáticos y funcionar como células presentadoras de antígeno para células CD4+ y CD8+. Además, existe evidencia que pueden también transferir los antígenos a las células dendríticas residentes nodales (ganglionares) quienes pueden procesar y presentar antígenos a los linfocitos. Asimismo, los neutrófilos pueden activar las células T a través de la formación de NET<sup>181</sup>.

Friedrich y colaboradores en modelos de HSA en ratas demostraron que la depleción de neutrófilos aumenta la sobrevivencia de los animales, confirmando un rol potencialmente injurioso de estas células<sup>274,280</sup>. Si bien nosotros no encontramos asociación de la activación o número de neutrófilos con las variables clínicas seleccionadas, Provencio y colaboradores observaron que la acumulación de neutrófilos a nivel del LCR se asoció al desarrollo de vasoespasmo. Los autores postulan que la actividad incrementada de las enzimas neutrofílicas podría mediar el daño vascular<sup>274,326</sup>.

Por lo tanto, los neutrófilos activados podrían no solo participar en el clearance de sangre subaracnoidea, sino que también podrían ser una fuente importante de citoquinas y otros mecanismos efectores (ej. enzimáticos) que contribuyen con la reacción proinflamatoria sirviendo de nexo con la activación de la inmunidad adaptativa, entre las cuales destacamos a las células Th17.

Por otro lado, observamos un **incremento de los monocitos circulantes en la fase precoz, y más aumentados aún en los pacientes más graves (H&H IV-V)**. Este hecho está en línea con los hallazgos recientes publicados por Unda y colaboradores, quienes evidenciaron que el recuento monocitario total inicial se asoció con mayor gravedad y peores resultados clínicos a corto y largo plazo<sup>292</sup>. El recuento absoluto de todas las subpoblaciones monocitarias (clásico, intermedios y no clásicos) también se detectó elevado de forma significativa, tanto en la fase precoz como la tardía, en la SP de los pacientes respecto a la SP de los controles, pero con un predominio de los monocitos no clásicos en ambas fases evolutivas. Adicionalmente, las poblaciones monocitarias en LCR estaban aumentadas si comparamos con la celularidad monocitaria normal. Observamos un descenso de los monocitos intermedios y clásicos a nivel del LCR en comparación con la SP en los pacientes con HSAA, sin diferencias en la población de monocitos no clásicos. **Esto sugiere que la población monocitaria que se recluta a nivel de LCR es mayoritariamente no clásica**. Además, observamos que los pacientes más graves (H&H IV-V), tienen incrementado el recuento de los monocitos totales en SP pero a predominio de las poblaciones clásicas e intermedias. Sin duda que más investigación es necesaria para poder explicar mejor esta cinética o tráfico monocitario referido.

Como hemos mencionado previamente, los monocitos no clásicos son predominantemente proinflamatorios (secretan citoquinas proinflamatorias: IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-6, entre otras), tienen función como célula presentadora de antígeno, activan a las células T y patrullan la superficie endotelial en búsqueda de zonas lesionadas y, pueden diferenciarse en macrófagos<sup>193,327</sup>. Particularmente, la expresión de CD16+ en monocitos y macrófagos indica activación de estas células y se plantea que tienen una función proinflamatoria basados en la mayor expresión de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-8 y TNF $\alpha$ ) y en la mayor potencia en la presentación de antígenos<sup>328</sup>. Belge et al. encontraron que luego de la estimulación *in vitro* con LPS, los monocitos CD16+ producen niveles más elevados de TNF- $\alpha$  y menores niveles de IL-10<sup>285</sup>. Numerosos

estudios, de forma similar a nuestros resultados, han mostrado que la IL-6 y el TNF- $\alpha$  están elevados en la SP y el LCR de los pacientes con HSAa, particularmente en pacientes con resultados clínicos desfavorables<sup>318,329</sup>. Aunque es sabido que varios tipos celulares pueden secretar estas citoquinas, los monocitos CD16+ podrían ser una fuente importante de IL-6 y TNF- $\alpha$  en la SP y el LCR de los pacientes con HSAa<sup>193,285</sup>. Adicionalmente, se ha publicado que los monocitos CD16+ muestran un nivel más elevado de HLA-DR (Passlick et al., 1989)<sup>190</sup>, y esto sugiere una mayor actividad de célula presentadora de antígeno. Estudios *in vitro* mostraron que los monocitos CD16+ son tres veces más potentes como célula presentadora de antígeno cuando son comparados con los monocitos CD16-<sup>191,330</sup>.

Nuestros datos plantean la posibilidad de que los monocitos proinflamatorios, intermedios y no clásicos, reclutados o infiltrados a nivel del parénquima cerebral y/o LCR de los pacientes con HSAa pueden jugar un rol destacado en la inmunopatogénesis de esta enfermedad que amerite mayor profundidad en su estudio y ser un objetivo terapéutico para explorar.

Cuando analizamos el recuento absoluto y relativo de las DCs a nivel de la SP de los pacientes respecto a los controles, observamos que existe un descenso de DCs plasmocitoides en forma absoluta tanto en la fase precoz como la tardía y existe una disminución de las DCs totales, mieloides y plasmocitoides en forma relativa (%) comparado con controles.

No hay diferencias de estas subpoblaciones entre SP y LCR. Este interesante hecho evidenciado ya por Roquilly y colaboradores en 2013, se acompañó en su trabajo de una disfunción secretoria de ciertas citoquinas (TNF $\alpha$ , INF $\alpha$  e IL-12) cuando algunos de los TLRs fueron estimulados (TLR 3, 4, 7/8, 9). Al igual que los mencionados investigadores, nuestro grupo tampoco observó que esta depleción de DCs se asocie a mayor mortalidad<sup>293</sup>. En pacientes con stroke isquémico y hemorrágico, Yilmaz y colaboradores publicaron en 2010 interesantes e intrigantes resultados que pueden ayudarnos a comprender, al menos en parte, la cinética de estas células en este contexto clínico singular<sup>294</sup>. Los investigadores reportaron un descenso relativo y absoluto de estas células precozmente. Pero, además, la depleción, fue mayor para los pacientes más graves. Evidenciaron una correlación inversa con la gravedad clínica, medida a través del NIHSS,

y la extensión radiológica. Los pacientes con mayores puntajes (más graves) tenían un mayor descenso de DCs. En los pacientes que fallecieron, pudieron demostrar en la autopsia que la lesión aguda (infarto o hemorragia) estaba infiltrada por las DCs, fundamentalmente mieloides, y en menor número plasmocitoides. Por otra parte, se distribuían particularmente de forma perivascular o, en menor medida, difusamente. Una cinética similar (de reclutamiento hacia el tejido lesionado) se ha descrito en pacientes con infarto agudo de miocardio, siendo mayor la depleción plasmática en pacientes con infartos transmurales con supra-desnivel del ST respecto a los subendocárdicos sin ST sobreelevado<sup>295</sup>.

Estos y otros resultados hacen hipotetizar que en nuestros pacientes exista un reclutamiento de DCs, mayormente plasmocitoides, hacia el tejido encefálico.

Por otra parte, creemos que es válido mencionar aquí que, al igual que en otros pacientes críticos, esta depleción de DCs puede asociarse a inmunodepresión y mayor riesgo de infecciones y mortalidad<sup>296</sup>. Para finalizar, señalamos que esta población celular amerita profundizar su estudio con paneles de citometría de flujo de 10 o más colores que incluyan otros marcadores como CD1a, CD141, CD172a, Langerin, CD303, CD304, entre otros, de manera de poder conocer más precisamente las diferentes subpoblaciones celulares (por ej. DCs mieloides en CD1 y CD2) así como su estado de maduración<sup>207</sup>. Asimismo, sería interesante profundizar aún más acerca de esta subpoblación celular en modelos murinos o en necropsias de pacientes a nivel de tejido (cerebro y/o ganglios linfáticos) de forma de conocer el perfil de DCs, su estado maduración y poder predecir su rol en la orquestación de la respuesta inmune.

Con respecto a las poblaciones de células NKs, evidenciamos un descenso relativo del porcentaje de células NK CD56<sup>brigh</sup>CD16- y CD56<sup>dim</sup>CD16+ en la SP de los pacientes respecto a los controles, independientemente de la fase evolutiva (precoz y tardía).

Sin embargo, aunque existió también un descenso absoluto para ambas subpoblaciones, el resultado se mantuvo significativo solo para el recuento de células NK CD56<sup>dim</sup> CD16+. En modelos animales con stroke isquémico por oclusión de la arteria cerebral media, este hecho se ha puesto claramente en evidencia. Como integrantes de la

respuesta inmune innata, estas células son capaces de responder rápidamente ante la aparición de una noxa o injuria cerebral en este caso, y atravesar la BHE lesionada, para infiltrar la zona de penumbra e infarto. Ya a la tercera hora de evolución comienzan a detectarse las mismas infiltrando el parénquima cerebral isquémico y la infiltración es máxima al día 3. A continuación, a través de mecanismos citolíticos (NK CD56<sup>dim</sup>CD16+ mayoritariamente) o secretando citoquinas proinflamatorias (principalmente IFN- $\gamma$ , CD56<sup>brigh</sup>CD16- principalmente), pueden contribuir con la expansión del área lesionada (isquémica o infartada)<sup>298</sup>. Destacamos que, en modelos isquémicos, de trauma e inflamatorios, una de las principales quimioquinas para las células NKs es la CX3CL1 (fractalkine), derivada de las neuronas (soluble o transmembrana). Las mismas, atraídas por esta quimioquina aumentada a nivel de la lesión cerebral, secretan IFN- $\gamma$  y estimulan la sobreexpresión de moléculas del MHC II en DCs que también han infiltrado la lesión (mencionado previamente), pudiendo estas activar, a continuación, a las células de la respuesta adaptativa<sup>297,331</sup>. Adicionalmente, la CX3CL1 (fractalkine) puede también atraer a otras células de la inmunidad innata como por ejemplo, monocitos-macrófagos, que también serán activados por el IFN- $\gamma$  liberado por las células NK CD56<sup>brigh</sup>CD16- (Gan et al., 2014; Meucci et al., 2000; Sheridan and Murphy, n.d.; Shi and Ransohoff, n.d.; Umehara et al., 2001)<sup>298,332,333</sup>. Sin embargo, el rol de la fractalkine es aún motivo de debate e intensa investigación. Mas recientemente, un rol neuroprotector de este eje CX3CL1/CX3R1 estrechamente vinculado a la regulación del estado de activación de la microglía (inmunidad innata local) ha surgido como una vía de interacción celular (NK – microglía – neuronal) a ser manipulada con fines terapéuticos en diversas patologías neurológicas aguda y neurodegenerativas<sup>301,334</sup>.

Por otra parte, los resultados obtenidos cuando analizamos las variables clínicas de interés no fueron menos interesantes.

Específicamente, la subpoblación de células NK CD56<sup>dim</sup> CD16+ estaban aumentadas precozmente a nivel de la SP de los pacientes más graves (H&H IV-V) y en aquellos que desarrollaron vasoespasmo. Además, estaban aumentadas a nivel del LCR en aquellos pacientes que fallecieron. Este aumento no se acompañó, en nuestro trabajo, de un aumento de IFN- $\gamma$ .

En el mismo sentido, Spitzer y colaboradores en 2017 evidenciaron a nivel de LCR un aumento en número y función citotóxica de esta subpoblación de células NK (CD16+, CD107a+) en pacientes que desarrollaron vasoespasmo, isquemia diferida y peores resultados clínicos funcionales. Además, característicamente, el mayor recuento de células NK coincidió temporalmente con el inicio del aumento de la velocidad media del flujo sanguíneo cerebral a nivel de una arteria del polígono de Willis (por Doppler Transcraneal) a partir del día 4. Sin embargo, en contraposición a los resultados mencionados por este grupo, en nuestro caso, esta subpoblación celular descendió a nivel del LCR con el pasar de los días en aquellos pacientes que desarrollaron vasoespasmo. Como explicación, incompleta, por cierto, en primer lugar, debemos mencionar el pequeño número de pacientes estudiados en ambos trabajos. En segundo lugar, la diferente metodología empleada para el diagnóstico de vasoespasmo e isquemia cerebral, más completa en el trabajo de Spitzer y colaboradores<sup>302</sup>. En el primer caso (vasoespasmo) se indicó doppler transcraneano, angio-tomografía y angiografía cerebral. En el segundo caso (isquemia), tomografía de perfusión y resonancia magnética. Y, por último, cabe plantear la posibilidad de una cinética celular distinta, con transmigración celular hacia el parénquima cerebral en nuestros pacientes más graves tanto desde el punto de vista clínico (H&H) como tomográfico (Fisher).

Por otro lado, también estudiamos y encontramos datos interesantes y desafiantes sobre las células de la respuesta inmune adaptativa, hecho bastante menos estudiado y caracterizado que la respuesta inmune innata previamente analizada.

Los linfocitos T son centrales para desarrollar una respuesta inmune sostenida, y son fuente de citoquinas que podrían tener un rol en la injuria encefálica precoz y diferida<sup>335,336</sup>.

Mathiesen y colaboradores (1993) reportaron que los niveles del receptor IL-2 y CD8 soluble estaban aumentados en el LCR de los pacientes con HSA, sugiriendo el rol de la respuesta inmune adaptativa en la patogénesis de la HSA<sup>313</sup>. También ha sido estudiada en otros modelos de IEA tales como el stroke isquémico y la injuria encefálica por isquemia-reperfusión, entre otras patologías neurológicas. Siguiendo un stroke isquémico, las células T se activan, infiltran el cerebro y liberan citoquinas y especies reactivas del oxígeno que probablemente contribuyen con la injuria encefálica.

Adicionalmente, hay evidencia que las células T se acumulan en el cerebro post-isquemia dentro de las pocas horas de iniciada la fase de reperfusión<sup>306,337,338</sup>.

Respecto a nuestros resultados, encontramos una reducción significativa del porcentaje, pero con valores absolutos normales de células T CD4+ y T CD8+ en la SP de los pacientes con HSAa respecto a la SP del grupo control, tanto en la fase precoz como la tardía, probablemente en vinculación al aumento del recuento de neutrófilos descrito anteriormente.

La variación relativa de las células T CD4+ y T CD8+ a nivel de la SP y del LCR de los pacientes, no resultó significativa, cuando se compararon las fases evolutivas (precoz vs tardía).

Pero, particularmente interesante resultó el hecho de que, ambas subpoblaciones de células T, mostraron un estado de activación mayor a nivel de la SP de los pacientes respecto a la SP de los controles y, en los pacientes, mayor estado de activación a nivel del LCR respecto a la SP. Esto estuvo determinado por la disminución en la expresión de CD3, CD28 y un aumento en la expresión de CD69.

La regulación en menos de CD3 de la superficie celular se asocia normalmente con la activación *in vitro* e *in vivo* de las células T. También estudiamos la expresión de la molécula co-estimuladora CD28 en células T CD4+ y T CD8+. Encontramos que las células T CD4+ y CD8+ del LCR expresaban niveles menores de CD28 que las de SP en pacientes con HSAa. CD28 es el único receptor B7 constitutivamente expresado en células T, y provee señales co-estimuladoras, que son requeridas para la activación de las células T. Las células T humanas que han pasado por repetidos ciclos de proliferación inducida por antígeno desarrollan una serie de cambios fenotípicos y funcionales, incluyendo la desaparición de CD28 de la superficie celular. Por tanto, encontrar una expresión disminuida de CD28 o ausente sugiere la presencia de un estado de activación y una respuesta inmune adaptativa crónica<sup>339</sup>. Más aún, se ha reportado que el TNF-  $\alpha$  disminuye la expresión de CD28 en células T<sup>340</sup>. Esto podría relacionarse con el hallazgo de un aumento de monocitos CD14<sup>brigh</sup>CD16+ y el aumento de TNF-  $\alpha$  previamente reportado en estos pacientes.

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que evidencia un perfil de activación temprana en el LCR de las células T CD4+ y T CD8+ de pacientes con HSAa, sugiriendo la participación de la respuesta inmune adaptativa en la inmunopatogénesis de la injuria encefálica postsangrado.

**Además, también encontramos que el porcentaje de células B en SP de los pacientes con HSAa fue más bajo comparado con el grupo control**, pero esto no se acompañó de un incremento relativo ( %) a nivel del LCR respecto a la SP (en los propios pacientes). En otros modelos de enfermedad, por ejemplo, en stroke isquémico, se ha observado que los niveles de linfocitos y otros efectores inmunes en la circulación están reducidos, posiblemente como un mecanismo de protección endógeno que modula y evita una respuesta proinflamatoria (injurante) abrumadora y potencialmente letal<sup>341</sup>.

Seguidamente, como forma de evaluar el perfil de la respuesta predominante de las células T CD4+ estudiamos, a través de la expresión de marcadores de superficie, las distintas subpoblaciones (o fenotipos).

Sin duda alguna, uno de los aportes más interesantes que hemos realizado es haber detectado un aumento significativo de las células Th17 tanto a nivel de la SP como del LCR de los pacientes, tanto en la fase precoz como tardía.

Simultáneamente, las células Treg presentaron un descenso leve no significativo.

**Además, la proporción de células Th17 estaba aumentada a nivel del LCR respecto a la SP en los pacientes. Estos resultados determinan un disbalance proinflamatorio marcado dado por el aumento del cociente Th17/Treg.** Coincidentemente, la determinación de la **concentración de IL-17A mostró niveles aumentados a nivel de la SP y LCR tanto en la fase precoz como tardía.** Pero más interesante aun resultó el hecho de que **la concentración sérica precoz aumentada de esta citoquina, pobremente estudiada en este escenario, se asoció con el desarrollo posterior de vasoespasmo y mortalidad en UCI.** Por lo tanto, a partir de los resultados preliminares que mencionamos, creemos que es oportuno y válido **postular al eje Th17/IL-17A y al disbalance Th17/Treg, como posibles jugadores claves en la inmunopatogénesis de la injuria encefálica precoz y tardía de la HSAa grave.**

Algunos autores ya habían reportado, recientemente, niveles aumentados de la IL-17A a nivel del LCR y la SP de pacientes con HSAa<sup>184,342</sup>. Sin embargo, **nuestros resultados postulan por primera vez en este escenario clínico a las células Th17 como una de las principales fuentes potenciales de esta citoquina**. En este sentido, una de las debilidades de nuestro trabajo es que caracterizamos a las células Th17 por la expresión de marcadores de superficie y no fue posible realizar la detección de citoquinas intracelulares como hecho distintivo de esta población celular. No obstante, debemos plantearnos que, además de las células Th17, existan otras fuentes celulares de IL-17, particularmente los neutrófilos, las células NK y las células T  $\gamma\delta$ <sup>343</sup>.

El eje Th17/Treg logra su equilibrio en cuanto a desarrollo, diferenciación y función trabajando mediante un control inhibitorio mutuo. En presencia de TGF- $\beta$ , las células T CD4+ adoptan un fenotipo regulador o supresor. En contraposición, si además de TGF- $\beta$  existe IL-6 (como en nuestros pacientes), las células T CD4+ se diferencian hacia un fenotipo Th17<sup>344,346-348</sup>. Sin embargo, la plasticidad del eje Th17/Treg es hoy uno de los tópicos más investigados y, en contraposición a los conceptos clásicos, cada vez más sabemos de la existencia de numerosos mecanismos de control del mismo, entre los cuales se destacan: mediadores extracelulares (más allá de IL-6 y TGF- $\beta$  ya mencionadas, también pueden intervenir otras citoquinas tales como IL-1, IL-2, IL-21 y IL-23), modulación de factores de transcripción, la microbiota, el metabolismo celular (vitamina A - TGF- $\beta$ , entre otros) y modificaciones epigenéticas<sup>344</sup>. Por último, vale la pena mencionar los resultados recientes publicados por dos grupos de investigadores en sus respectivos modelos de animales con HSA y pacientes con HSAa. Coulibaly y colaboradores, detectaron que la IL-17 contribuye con el reclutamiento de neutrófilos y, una vez reclutados, estando en el espacio subaracnoideo, secretan más IL-17, promoviendo su propia infiltración de forma autócrina<sup>184</sup>. Y, por su parte, Chaudhry y colaboradores, fueron los primeros en analizar la participación del eje IL-23/IL-17 en pacientes con HSAa (niveles plasmáticos). La IL-23, amplificadora de la respuesta Th17-IL-17, estaba incrementada en los pacientes respecto a los controles. La IL-17, también se elevó y alcanzó su mayor concentración en los pacientes más graves. No se evidenció asociación entre las citoquinas y el desarrollo de isquemia cerebral. Además, se identificó a las células T  $\gamma\delta$  como una fuente de IL-17A y, como ya fue mencionado, esta citoquina promovía el reclutamiento de los neutrófilos, estando implicada la quimoquina CXCL1 secretada por los astrocitos estimulados sinérgicamente por el TNF $\alpha$  y la IL-17A<sup>342</sup>.

En modelos animales de oclusión de la ACM y en estudios post - mortem (autopsias) de cerebros humanos con infartos cerebrales, el aumento de la IL-17 ha sido demostrado<sup>349</sup>. Además, el bloqueo con anticuerpos neutralizantes de la IL-17A conduce a una menor área de isquemia-infarto y menor morbimortalidad en modelos animales<sup>183,343</sup>.

Aun cuando ya sabemos que una de las principales funciones de la IL-17A es estimular el reclutamiento de los neutrófilos hacia el sitio de la injuria -inflamación, el conocimiento acerca del rol de esta citoquina permanece siendo parcial, particularmente en este complejo escenario clínico que estamos analizando. Entre varios aspectos que deberemos profundizar a futuro, es la existencia de evidencia preliminar, proveniente de modelos animales con esclerosis múltiple, que plantean que la IL-17 e IL-22 pueden incrementar la permeabilidad de la BHE y, a continuación, las células Th17 pueden transmigrar eficientemente a través de la BHE y penetrar al parénquima cerebral donde son capaces de generar neurotoxicidad (neuronal) directa<sup>343,350</sup>.

Entre los resultados clínicos más relevantes analizados está el hecho que la elevación de la concentración plasmática precoz de IL-17A se asoció significativamente con el desarrollo ulterior de vasoespasma diagnosticado por DTC seriado.

Sin embargo, dado que nuestros pacientes estaban en su franca mayoría sedados y/o en coma por la propia enfermedad, no pudimos determinar si el vasoespasma provocó isquemia-infarto cerebral con el consiguiente síndrome focal neurológico y/o una caída del GCS global atribuible al mismo. Adicionalmente, como está ya demostrado, la TC de cráneo simple que realizamos a todos los pacientes con diagnóstico de vasoespasma no mostró, en la mayoría de los casos, un área de isquemia precoz o un área hipodensa configurada expresión de un infarto cerebral constituido<sup>114,138,368</sup>. De forma tal que, a futuro, otro abordaje imagenológico con técnicas más sensibles para la detección de isquemia cerebral tales como la RM, la TC con perfusión y/o el PET con O15 marcado<sup>369</sup>, podrán considerarse para explorar si el aumento plasmático precoz de la IL-17A mencionado se asocia solo a vasoespasma (reducción del calibre de un vaso proximal) o si, alternativamente, representa un fenómeno inmune marcador de isquemia cerebral (tisular) determinada por el vasoespasma<sup>114,370,371</sup>.

Un segundo hecho clínico relevante puesto en evidencia por nuestro estudio fue la asociación estadísticamente significativa entre el aumento plasmático precoz de la IL-17A y la mortalidad en UCI.

Aquí debemos considerar que justamente los pacientes más graves en lo neurológico y/o sistémico son los que tienen mayor probabilidad de complicarse con isquemia cerebral (precoz y diferida) y/o con una enfermedad con mayor compromiso sistémico con o sin disfunción orgánica múltiple<sup>26,372-374</sup>. **De forma tal que, la IL-17A, como una de las citoquinas proinflamatorias más prominentes conocidas hoy en día, podría estar implicada y ser un biomarcador, útil al lado de la cama del paciente, de dos fenómenos inmunomediados e interrelacionados marcadores de morbimortalidad.** Pero para poder establecer o no esta interesante utilidad clínica, un mayor número de pacientes con un más amplio espectro de gravedad clínica (leve a severo) deberán ser estudiados.

**Con respecto al rol de las células Treg en la respuesta inflamatoria post – stroke (isquémico), a la luz de la evidencia actual, podemos señalar que tienen eminentemente un rol inmunomodulador neuroprotector**<sup>335,345</sup>. En este sentido, la secreción de IL-10 por estas células se postula como una explicación relevante. En 2009, Liesz y colaboradores, fueron los primeros en demostrar en un modelo experimental de isquemia cerebral aguda en ratones, que **las células Tregs moderan la respuesta proinflamatoria ejercida localmente por la microglía y los linfocitos infiltrantes periféricos, previniendo así la expansión del área de isquemia**<sup>351</sup>. Mas recientemente, Wang y colaboradores, en un modelo de ratas a las cuales provocaron una HSA y transfundieron con células Treg (adoptive Tregs therapy), reportaron también un efecto neuroprotector. Con su experimento pusieron en evidencia que el efecto supresor estuvo ejercido sobre la vía de activación proinflamatoria TLR4/NF- $\kappa$ B<sup>335</sup>.

**En concordancia con publicaciones previas, encontramos que la concentración plasmática y licuoral de la IL-10 estaba aumentada**<sup>352,353</sup>. Esta citoquina, es secretada por un amplio panel de células entre las cuales destacamos los linfocitos B, las DCs, los neutrófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos, las células Tregs, células Th2, Th17, entre otras<sup>354,355</sup>. Su incremento comúnmente acompaña a la elevación de las citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6) y es expresión de uno de los mecanismos contrarreguladores-antinflamatorios-inmunosupresores que procuran limitar el daño tisular del huésped<sup>251,354,356</sup>. En modelos animales de stroke isquémico por oclusión de la

ACM, la IL-10 secretada por linfocitos B infiltrantes (de la zona de infarto y zonas remotas), constituye uno de las neurotrofinas más importantes que justifican un rol neuroprotector - neuroreparador de estas células a través de diversos mecanismos entre los cuales se destacan la promoción de mayor arborización dendrítica, nuevas redes neuronales y mejor neuroplasticidad<sup>357,358</sup>. En contrapartida, también se la postula como una de las citoquinas inmuno-inhibitorias que contribuyen con el desarrollo ulterior de infecciones<sup>352</sup>. En parte, su liberación podría estar mediada por la tormenta simpática-catecolaminérgica y el consiguiente estímulo de los adreno-receptores  $\beta$  monocitarios con una marcada caída de la expresión de HLA – DR en estas células. La modulación, a través del antagonismo  $\beta$  con propanolol, disminuye la secreción de IL-10 y previene las infecciones<sup>359,360</sup>.

**Adicionalmente, exploramos los niveles de otras citoquinas Th1 tales como la IL-2 e IFN- $\gamma$ .** En ambos casos, su concentración se incrementó más a nivel de la SP respecto al LCR, sugiriendo su participación en la respuesta inflamatoria sistémica<sup>315,319,361–364</sup>. **Pero, además, medimos la concentración de la IL-4, representante del fenotipo de células Th2, antiinflamatoria e inmunosupresora.** Su concentración en SP se elevó significativamente en la fase tardía, hecho que pone en evidencia una respuesta inmune contrarreguladora, antiinflamatoria - inmunosupresora, que procura equilibrar el aumento de las vías y mediadores proinflamatorios referidos anteriormente<sup>365–367</sup>.

**Con respecto a los resultados preliminares encontrados durante el análisis de la respuesta inmune celular y la concentración de citoquinas en función de la técnica seleccionada para el tratamiento del aneurisma (“coils vs clips”), los mismos sugieren tendencias opuestas que deberán confirmarse en estudios con mayor número de casos e, idealmente, mayor espectro de gravedad clínica - tomográfica.** Un hecho que consideramos clave a la hora de contextualizar los resultados puntuales encontrados es que reclutamos un grupo homogéneo de pacientes graves, con abundante sangre volcada al espacio subaracnoideo y/o intraventricular. De forma tal que, la propia noxa, gatilló una intensa respuesta inmune por sí misma y, las muestras analizadas, tanto de SP como las de LCR, se extrajeron posterior al procedimiento en todos los casos (ej. concentraciones de citoquinas elevadas desde el comienzo del muestreo). Teniendo presente estas y otras limitaciones que analizaremos, consideramos que, los resultados, esbozan una respuesta inmune celular Th1 – Th2 a nivel del LCR opuesta entre ambos procedimientos. Mientras que en los pacientes tratados por vía endovascular (coils)

predominó en la fase precoz la respuesta Th2-antiinflamatoria- supresora, en los pacientes tratados por vía quirúrgica (clips) predominó la respuesta Th1. En la fase tardía, ocurrió lo contrario. Estos hechos quedaron reflejados en la variación del cociente Th1/Th2 sin lograr diferencias estadísticamente significativas. Adicionalmente, la activación de las células Tregs predominó en la fase tardía en los pacientes embolizados. Sin embargo, estas tendencias en el comportamiento de la respuesta inmune celular no tuvieron traducción (estadísticamente significativa) en las citoquinas secretadas a nivel del LCR.

## 5.2 Limitaciones

Algunas limitaciones de nuestra investigación deben ser mencionadas. Por un lado, enrolamos un número pequeño de pacientes, similar a la mayoría de los estudios publicados dado la baja prevalencia de la enfermedad. Por otro lado, los mismos fueron en su franca mayoría graves, tanto desde el punto de vista clínico como tomográfico. Como mencionáramos con anterioridad, este subgrupo de pacientes son los que requieren mayor monitorización que demanda mayor invasividad y, por lo tanto, permiten a los investigadores emplear los catéteres para obtener muestras cerebrales. En cambio, las muestras de SP están disponibles en prácticamente el 100 % de los casos, hecho que nos da la posibilidad cierta de explorar los resultados de la IL-17A en pacientes con una expresión clínica de menor severidad. Otra limitante en este punto ya mencionada es que el CTI universitario, atiende, por razones logísticas inherentes al hospital, casi exclusivamente pacientes severamente enfermos. Actualmente, el servicio de medicina intensiva se encuentra en fase de expansión. De concretarse, pacientes menos graves podrán ingresar y ser, eventualmente, enrolados.

Las muestras de sangre no se pudieron obtener previo al tratamiento del saco aneurismático. Y las muestras de LCR no se pudieron obtener, en los pacientes operados, inmediatamente antes al clipado aneurismático. Además, es impracticable obtener una muestra de LCR en pacientes candidatos a tratamiento endovascular previo al tratamiento del saco (contraindicación).

Con respecto a la metodología de estudio creemos que es válido mencionar que sería óptimo poder complementar nuestros resultados (basado en la detección de antígenos de superficie) con la determinación, por CF, de citoquinas intracelulares (particularmente IL-17A, pero no exclusivamente) y agregar estudios de funcionalidad *in vitro* sobre todo

en poblaciones celulares que han arrojado interesantes resultados. Aunque la escasa celularidad del LCR configura una limitante, el estudio a partir de muestras de sangre podría realizarse sin inconvenientes.

### 5.3 Perspectivas futuras

Convencidos de que una de nuestras mayores limitantes respecto a los resultados obtenidos con las variables clínicas de interés fue que pudimos estudiar una muestra relativamente pequeña y bastante homogénea de pacientes graves con gran volcado de sangre al espacio subaracnoideo, el camino será implementar estrategias que nos permitan enrolar pacientes con menor severidad clínica (H&H I – III y Fisher 1 – 2). La muestra de LCR en estos casos podría obtenerse al momento que el neurocirujano aborda el saco aneurismático para proceder a su clipado, pero las muestras ulteriores no estarán disponibles dado que estos pacientes no son candidatos a catéteres intraparenquimatosos/intraventriculares o lumbares. Para el caso de pacientes embolizados (tratamiento endovascular), a priori, no podríamos obtener muestras de LCR. Por lo que, otra interesante alternativa a explorar, no invasiva, en conjunto con el Centro Uruguayo De Imagenología Molecular (CUDIM) (actualmente anexo al hospital, con una vía interna de comunicación directa), serían las técnicas imagenológicas de medicina nuclear como el PET (positron emission tomography) con trazadores inflamatorios<sup>375,376</sup>.

Por otro lado, sería importante contar con un modelo animal de HSA ya sea en ratas o ratones donde profundizar el estudio de algunas poblaciones celulares que son necesarias estudiarlas en el parénquima encefálico como por ejemplo células dendríticas, macrófagos y, por supuesto, el sistema glial. Además, nos permitiría contar con un modelo preclínico donde estudiar posibles estrategias terapéuticas inmunomoduladoras.

Con respecto al desarrollo de **estrategias terapéuticas inmunomoduladoras**, hemos mencionado varias con **resultados clínicos no satisfactorios a la fecha**. Fármacos con un reconocido efecto pleiotrópico han fracasado. Sin embargo, el interés científico está intacto y en plena expansión. No sólo para los ACVs hemorrágicos, sino que también para los isquémicos. **El gran desafío es modular la respuesta inmune con una "proyectil mágico" disparado en un momento óptimo (timing) de la enfermedad**. El efecto biológico dual (neuroinjurante vs neuroprotector/neuroreparador) de la franca

mayoría de las moléculas mencionadas aún no ha sido modulado eficazmente. El pasaje desde los resultados experimentales exitosos a nivel del laboratorio, hacia los resultados clínicos favorables al lado de la cama del paciente, por el momento, continúa siendo una mera aspiración científica.

**Si bien existen diferentes dianas a ser moduladas, creemos importante estudiar inicialmente en modelos animales y luego en ensayos clínicos drogas que sean capaces de restaurar el balance Th17/Treg.**

En este sentido, podría ser de interés explorar fármacos que inhiban a la IL-6 como el Tocilizumab. Este es un anticuerpo monoclonal humanizado dirigido contra el receptor de la IL-6. Tiene ya indicación para la enfermedad de Castleman, artritis reumatoide y artritis idiopática juvenil, entre otras enfermedades<sup>377</sup>. Potencialmente, la inhibición de este eje restaure el desbalance Th17/Treg ya que la acción conjunta de TGF- $\beta$  junto a IL-6 es uno de los principales estímulos en la diferenciación de las células Th17<sup>344,347</sup>.

Otra estrategia sería la utilización de drogas dirigidas directamente contra la IL-17. Existen desarrollados varios anticuerpos monoclonales anti-IL-17A (Secukinumab, Ixekizumab, Netakimab), anti IL-17A y F (Bimekizumab) y uno contra el receptor de IL-17 (Brodalumab) que han sido aprobados para el tratamiento de la psoriasis<sup>183,378</sup>.

Existen otros anticuerpos monoclonales que están dirigidas a modular el eje de Th17 como los anticuerpos monoclonales anti-IL23 o IL-12 como Risankizumab (anti-IL-23A), Guselkumab (anti-IL23), Ustekinumab (anti-IL-12/IL-23). La mayoría de ellos han sido aprobados para tratamiento de la psoriasis<sup>379,380</sup>.

Finalmente, la utilización de anticuerpos monoclonales anti-TNF podría tener un rol en inhibir las DCs capaces de estimular la diferenciación de células Th17. Asimismo, se ha demostrado en patologías reumatológicas que el tratamiento con anti-TNF disminuye los niveles de células Th17. Adalimumab (ADA) representa la nueva generación de anticuerpos monoclonales (recombinante humano) anti – TNF $\alpha$  con fuerte actividad antiinflamatoria. Gökhan Toğuşlu y colaboradores investigaron acerca del ADA en un modelo animal (conejos) con HSA y vasoespasmo. El fármaco mostró ser capaz de disminuir la remodelación vascular y la apoptosis endotelial característica del vasoespasmo cerebral post sangrado<sup>381</sup>.

## 5.4 Conclusiones

- ✓ Los resultados analizados sugieren fuertemente la participación de la respuesta inmune innata y adaptativa en la inmunopatogénesis de la HSAa grave. Observamos no solo un reclutamiento y activación de neutrófilos y monocitos a nivel del LCR, sino que, además, las células T CD4+ y CD8+ también estaban activadas a este nivel.
- ✓ Otras poblaciones celulares de la respuesta inmune innata también presentaron variaciones desafiantes que ameritan mayor investigación. Tanto las DCs como las células NK disminuyeron precozmente en la SP de los pacientes con HSAa, evocando una posible migración central (parénquima y/o LCR) a través de una BHE lesionada. Pero típicamente, a nivel de la SP precoz las células NK CD56<sup>dim</sup> CD16+ (más citotóxicas) aumentaron en los pacientes más graves y/o con vasoespasmo y/o que fallecieron.
- ✓ Además, los resultados evidenciaron un desbalance proinflamatorio del eje Th17/Treg con un incremento del cociente en la SP y, concomitante un aumento relativo (%) de las células Th17 a nivel del LCR de los pacientes con HSAa. La IL-6, aumentada a nivel de la SP, pero aún más a nivel del LCR de los pacientes, en conjunto con TGF- $\beta$  puede contribuir con esta selectiva diferenciación hacia Th17. Adicionalmente, la concentración de IL-17A también se elevó en los pacientes, tanto a nivel de la SP como del LCR, particularmente en aquellos que desarrollaron vasoespasmo sonográfico y/o fallecieron en la UCI. Por lo tanto, postulamos a las células Th17 como una de las principales fuentes (eventuales) de esta citoquina (junto a los neutrófilos reclutados y activados). Consecuentemente, proponemos a las IL-17A como un interesante biomarcador precoz de morbimortalidad que deberá ser evaluado en próximos trabajos de investigación.
- ✓ Nuestros resultados preliminares dejan planteada una eventual respuesta celular Th1 – Th2 potencialmente opuesta entre ambas técnicas de tratamiento del saco aneurismático. Existió un predominio precoz Th2 en los pacientes embolizados (coils) y Th1 en los pacientes operados (clips). Lo inverso ocurrió en la fase tardía.

Estas tendencias observadas en los recuentos relativos celulares no determinaron variaciones significativas en las concentraciones de las citoquinas correspondientes.

- ✓ Como era de esperarse, otras citoquinas Th1 – proinflamatorias y Th2 e IL-10 – antiinflamatoria o supresoras, también aumentaron su concentración tanto en SP como el LCR en los pacientes con HSAa, probablemente como efecto contra-regulador, pero no se asociaron significativamente con las variables clínicas de severidad analizadas.

## CAPÍTULO 6. Referencias Bibliográficas

1. Etminan N, Chang HS, Hackenberg K, de Rooij NK, Vergouwen MDI, Rinkel GJE, Algra A. Worldwide Incidence of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage According to Region, Time Period, Blood Pressure, and Smoking Prevalence in the Population: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol.* 76, 588–597 (2019).
2. Johnston, S. C., Selvin, S. & Gress, D. R. The burden, trends, and demographics of mortality from subarachnoid hemorrhage. *Neurology* 50, 1413–1418 (1998).
3. Macdonald, R. L. & Schweizer, T. A. Spontaneous subarachnoid haemorrhage. *The Lancet* vol. 389 655–666 (2017).
4. Grille P, Gallo J, Panzardo H, Vázquez R, Bagnulo H. Hemorragia subaracnoidea en la unidad de cuidados intensivos: análisis de 97 casos clínicos. *Rev Med Uruguay*; 17: 114-118 (2001).
5. Etminan N, Buchholz BA, Dreier R, Bruckner P, Torner JC, Steiger HJ, *et al.* Cerebral Aneurysms: Formation, Progression, and Developmental Chronology. *Transl. Stroke Res.* 5, 167–173 (2014).
6. Fennell, V. S., Kalani, M. Y. S., Atwal, G., Martirosyan, N. L. & Spetzler, R. F. Biology of Saccular Cerebral Aneurysms: A Review of Current Understanding and Future Directions. *Frontiers in Surgery* vol. 3 25 (2016).
7. Gharavi S.M., Tang Y. Cerebral Aneurysm. In: Atlas of Emergency Neurovascular Imaging. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-43654-4\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-030-43654-4_8) (2020).
8. Bashir, A., Mikkelsen, R., Sørensen, L. & Sunde, N. Non-aneurysmal subarachnoid hemorrhage: When is a second angiography indicated? *Neuroradiol. J.* 31, 244–252 (2018).
9. Marder CP, Narla V, Fink JR, Tozer Fink KR. Subarachnoid hemorrhage: beyond aneurysms. *AJR Am J Roentgenol.*;202(1):25-37 (2014).
10. Frösen, J. & Joutel, A. Smooth muscle cells of intracranial vessels: From development to disease. *Cardiovascular Research* vol. 114 501–512 (2018).
11. Mohan, D., Munteanu, V., Coman, T. & Ciurea, A. V. Genetic factors involves in intracranial aneurysms--actualities. *Journal of medicine and life* vol. 8 336–341 (2015).
12. Samuel N, Radovanovic I. Genetic basis of intracranial aneurysm formation and

- rupture: clinical implications in the postgenomic era. *Neurosurg Focus*.;47(1):E10 (2019).
13. Kim, S. T., Brinjikji, W., Lanzino, G. & Kallmes, D. F. Neurovascular manifestations of connective-tissue diseases: A review. *Interv. Neuroradiol.* 22, 624–637 (2016).
  14. Molyneux, A. J. Is screening of relatives for cerebral aneurysms justified? *The Lancet Neurology* vol. 13 343–344 (2014).
  15. Feigin V, Parag V, Lawes CM, Rodgers A, Suh I, Woodward M, *et al*; Asia Pacific Cohort Studies Collaboration. Smoking and elevated blood pressure are the most important risk factors for subarachnoid hemorrhage in the Asia-Pacific region: an overview of 26 cohorts involving 306,620 participants. *Stroke*;36(7):1360-5 (2005).
  16. Andreasen, T. H., Bartek, J., Andresen, M., Springborg, J. B. & Romner, B. Modifiable Risk Factors for Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke* 44, 3607–3612 (2013).
  17. Ghostine S., Colohan A. “Street drugs” and subarachnoid haemorrhage. In: Kırış T., Zhang J.H. (eds) Cerebral Vasospasm. *Acta Neurochirurgica Supplement*, vol 104. Springer, Vienna. [https://doi.org/10.1007/978-3-211-75718-5\\_92](https://doi.org/10.1007/978-3-211-75718-5_92) (2008).
  18. van Lieshout, J. H. *et al.* An introduction to the pathophysiology of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurg. Rev.* 41, 917–930 (2018).
  19. Beck J, Raabe A, Szelenyi A, Berkefeld J, Gerlach R, Setzer M, Seifert V. Sentinel headache and the risk of rebleeding after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*;37(11):2733-7 (2006).
  20. Adkins K, Crago E, Kuo CW, Horowitz M, Sherwood P. Correlation between ED symptoms and clinical outcomes in the patient with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Emerg Nurs.*;38(3):226-33 (2012).
  21. Diringer, M. N. *et al.* Critical Care Management of Patients Following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: Recommendations from the Neurocritical Care Society’s Multidisciplinary Consensus Conference. *Neurocrit Care* 15, 211–240 (2011).
  22. Klimo P Jr, Schmidt RH. Computed tomography grading schemes used to predict cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a historical review. *Neurosurg Focus*;21(3): E5 (2006).
  23. Dubosh, N. M., Bellolio, M. F., Rabinstein, A. A. & Edlow, J. A. Sensitivity of

- Early Brain Computed Tomography to Exclude Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke* 47, 750–755 (2016).
24. Perry, J. J. *et al.* Clinical decision rules to rule out subarachnoid hemorrhage for acute headache. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* 310, 1248–1255 (2013).
  25. Philipp, L. R. *et al.* Comparison between CTA and digital subtraction angiography in the diagnosis of ruptured aneurysms. *Clin. Neurosurg.* 80, 769–777 (2017).
  26. de Oliveira Manoel, A. L. *et al.* The critical care management of poor-grade subarachnoid haemorrhage. *Critical Care* vol. 20 1–19 (2016).
  27. Steiner, T., Juvela, S., Unterberg, A., Jung, C., Forsting, M., Rinkel, G. European stroke organization guidelines for the management of intracranial aneurysms and subarachnoid haemorrhage. *Cerebrovascular Diseases*. S. Karger AG; p. 93–112 (2013).
  28. Carteron, L., Bouzat, P. & Oddo, M. Cerebral microdialysis monitoring to improve individualized neurointensive care therapy: An update of recent clinical data. *Frontiers in Neurology* vol. 8 1 (2017).
  29. Kirkpatrick, P. J., Turner, C. L., Smith, C., Hutchinson, P. J. & Murray, G. D. Simvastatin in aneurysmal subarachnoid haemorrhage (STASH): A multicentre randomised phase 3 trial. *Lancet Neurol.* 13, 666–675 (2014).
  30. Macdonald, R. L. Are statins to be STASHed in subarachnoid haemorrhage? *The Lancet Neurology* vol. 13 639–641 (2014).
  31. Chen, J. *et al.* Atorvastatin reduces cerebral vasospasm and infarction after aneurysmal subarachnoid hemorrhage in elderly Chinese adults. *Aging (Albany, NY)*. 12, 2939–2951 (2020).
  32. Shen, J. *et al.* Efficacy of Statins in Cerebral Vasospasm, Mortality, and Delayed Cerebral Ischemia in Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *World Neurosurg.* 131, e65–e73 (2019).
  33. Mees, S. M. D. *et al.* Magnesium for aneurysmal subarachnoid haemorrhage (MASH-2): A randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 380, 44–49 (2012).
  34. Dorhout Mees, S. M. *et al.* Early Magnesium Treatment after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: Individual Patient Data Meta-Analysis. *Stroke* 46, 3190–3193 (2015).
  35. Macdonald, R. L. *et al.* Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients

- with aneurysmal subarachnoid haemorrhage undergoing surgical clipping: A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial (CONSCIOUS-2). *Lancet Neurol.* 10, 618–625 (2011).
36. MacDonald, R. L. *et al.* Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): Randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial. *Stroke* 39, 3015–3021 (2008).
  37. Macdonald, R. L. *et al.* Randomised trial of clazosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage undergoing surgical clipping (CONSCIOUS-2). in *Acta Neurochirurgica, Supplementum* vol. 115 27–31 (2013).
  38. Cho, S. S., Kim, S. E., Kim, H. C., Kim, W. J. & Jeon, J. P. Clazosentan for Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: An Updated Meta-Analysis with Trial Sequential Analysis. *World Neurosurgery* vol. 123 418-424.e3 (2019).
  39. Fujimura, M. *et al.* Preventive Effect of Clazosentan against Cerebral Vasospasm after Clipping Surgery for Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage in Japanese and Korean Patients. *Cerebrovasc. Dis.* 44, 59–67 (2017).
  40. Zhao, J. *et al.* Effect of fasudil hydrochloride, a protein kinase inhibitor, on cerebral vasospasm and delayed cerebral ischemic symptoms after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: Results of a randomized trial of fasudil hydrochloride versus nimodipine. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. 46, 421–427 (2006).
  41. Suzuki, Y., Shibuya, M., Satoh, S. ichi, Sugimoto, Y. & Takakura, K. A postmarketing surveillance study of fasudil treatment after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Surg. Neurol.* 68, 126–131 (2007).
  42. Liu, G. J. *et al.* Systematic assessment and meta-analysis of the efficacy and safety of fasudil in the treatment of cerebral vasospasm in patients with subarachnoid hemorrhage. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 68, 131–139 (2012).
  43. Wang, H. Y. *et al.* Efficacy of fasudil for the treatment of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A systematic review protocol of randomized controlled trial. *Medicine (Baltimore)*. 98, e16885 (2019).
  44. Zhang S, Wang L, Liu M, Wu B. Tirilazad for aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cochrane Database Syst Rev.*;(2):CD006778 (2010).
  45. Shimada, Y. *et al.* Synergistic induction of heme oxygenase-1 by nicaraven after subarachnoid hemorrhage to prevent delayed cerebral vasospasm. *Eur. J.*

- Pharmacol.* 620, 16–20 (2009).
46. Jain, K. K. Nicaraven for the treatment of cerebral vasospasm in subarachnoid haemorrhage. *Expert Opinion on Investigational Drugs* vol. 9 859–870 (2000).
  47. Wei, S. *et al.* Erythropoietin ameliorates early brain injury after subarachnoid haemorrhage by modulating microglia polarization via the EPOR/JAK2-STAT3 pathway. *Exp. Cell Res.* 361, 342–352 (2017).
  48. Grasso, G., Tomasello, G., Noto, M., Alafaci, C. & Cappello, F. Erythropoietin for the treatment of subarachnoid hemorrhage: A feasible ingredient for a successful medical recipe. *Mol. Med.* 21, 979–987 (2015).
  49. Tseng, M. Y. *et al.* Acute systemic erythropoietin therapy to reduce delayed ischemic deficits following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A Phase II randomized, double-blind, placebo-controlled trial: Clinical article. *J. Neurosurg.* 111, 171–180 (2009).
  50. Springborg, J. B. *et al.* Erythropoietin in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage: A double blind randomised clinical trial. *Acta Neurochir. (Wien)*. 149, 1089–1100 (2007).
  51. Matsuda, N. *et al.* Effect of Cilostazol on Cerebral Vasospasm and Outcome in Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Cerebrovasc. Dis.* 42, 97–105 (2016).
  52. Saber, H. *et al.* Efficacy of Cilostazol in Prevention of Delayed Cerebral Ischemia after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Meta-Analysis. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 27, 2979–2985 (2018).
  53. Simard, J. M. *et al.* Unfractionated heparin: Multitargeted therapy for delayed neurological deficits induced by subarachnoid hemorrhage. *Neurocritical Care* vol. 13 439–449 (2010).
  54. Siironen, J. *et al.* No effect of enoxaparin on outcome of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *J. Neurosurg.* 99, 953–959 (2003).
  55. Hayman EG, Patel AP, James RF, Simard JM. Heparin and Heparin-Derivatives in Post-Subarachnoid Hemorrhage Brain Injury: A Multimodal Therapy for a Multimodal Disease. *Molecules*;22(5):724 (2017).
  56. Gomis, P. *et al.* Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of high-dose methylprednisolone in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* 112, 681–688 (2010).

57. Zhang, Y. P., Shields, L. B. E., Yao, T. L., Dashti, S. R. & Shields, C. B. Intrathecal treatment of cerebral vasospasm. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* vol. 22 1201–1211 (2013).
58. Sasaki, T. *et al.* Urokinase Cisternal Irrigation Therapy for Prevention of Symptomatic Vasospasm After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke* 31, 1256–1262 (2000).
59. Kawamoto S, Tsutsumi K, Yoshikawa G, Shinozaki MH, Yako K, Nagata K, Ueki K. Effectiveness of the head-shaking method combined with cisternal irrigation with urokinase in preventing cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg.* 2004 Feb;100(2):236-43.
60. Committee for Guidelines for Management of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage, Japanese Society on Surgery for Cerebral Stroke. Evidence-based guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. English Edition. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2012;52(6):355-429.
61. Barth, M. *et al.* Effect of nicardipine prolonged-release implants on cerebral vasospasm and clinical outcome after severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A prospective, randomized, double-blind phase IIa study. *Stroke* 38, 330–336 (2007).
62. Schneider, U. C. *et al.* The use of nicardipine prolonged release implants (NPRI) in microsurgical clipping after aneurysmal subarachnoid haemorrhage: Comparison with endovascular treatment. *Acta Neurochir. (Wien).* 153, 2119–2125 (2011).
63. Wolf, S. Rationale for lumbar drains in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Current Opinion in Critical Care* vol. 21 120–126 (2015).
64. Fang, Y. *et al.* The effectiveness of lumbar cerebrospinal fluid drainage in aneurysmal subarachnoid hemorrhage with different bleeding amounts. *Neurosurg. Rev.* 43, 739–747 (2020).
65. Alcalá-Cerra, G. *et al.* Drenaje lumbar externo de líquido cefalorraquídeo en pacientes con hemorragia subaracnoidea aneurismática: revisión sistemática y metaanálisis de estudios controlados. *Neurología* 31, 431–444 (2016).
66. Klimo, P., Kestle, J. R. W., Macdonald, J. D. & Schmidt, R. H. Marked reduction of cerebral vasospasm with lumbar drainage of cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* 100, 215–224 (2004).
67. Park, S., Yang, N. & Seo, E. The Effectiveness of Lumbar Cerebrospinal Fluid

- Drainage to Reduce the Cerebral Vasospasm after Surgical Clipping for Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *J. Korean Neurosurg. Soc.* 57, 167–173 (2015).
68. Jeong HW, Seo JH, Kim ST, Jung CK, Suh SI. Clinical practice guideline for the management of intracranial aneurysms. *Neurointervention.* 2014 Sep;9(2):63-71.
  69. Shao, B. *et al.* Clipping versus Coiling for Ruptured Intracranial Aneurysms: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *World Neurosurg.* 127, e353–e365 (2019).
  70. Wostrack, M. *et al.* Subarachnoid haemorrhage WFNS grade V: Is maximal treatment worthwhile? *Acta Neurochir. (Wien).* 155, 579–586 (2013).
  71. Alam, A., Hana, Z., Jin, Z., Suen, K. C. & Ma, D. Surgery, neuroinflammation and cognitive impairment. *EBioMedicine* vol. 37 547–556 (2018).
  72. Asadullah, K. *et al.* Immunodepression following neurosurgical procedures. *Crit. Care Med.* 23, 1976–1983 (1995).
  73. Zhao, B. *et al.* Aneurysm rebleeding after poor-grade aneurysmal subarachnoid hemorrhage: Predictors and impact on clinical outcomes. *J. Neurol. Sci.* 371, 62–66 (2016).
  74. Baggott, C. D. & Aagaard-Kienitz, B. Cerebral vasospasm. *Neurosurgery Clinics of North America* vol. 25 497–528 (2014).
  75. Wilson, C. D. & Shankar, J. J. S. Diagnosing vasospasm after subarachnoid hemorrhage: CTA and CTP. *Canadian Journal of Neurological Sciences* vol. 41 314–319 (2014).
  76. Kumar, G., Shahripour, R. B. & Harrigan, M. R. Vasospasm on transcranial Doppler is predictive of delayed cerebral ischemia in aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A systematic review and meta-analysis. *J. Neurosurg.* 124, 1257–1264 (2016).
  77. Macdonald RL. Origins of the Concept of Vasospasm. *Stroke*;47(1): e11-5 (2016).
  78. van der Steen, W. E. *et al.* Radiological scales predicting delayed cerebral ischemia in subarachnoid hemorrhage: systematic review and meta-analysis. *Neuroradiology* vol. 61 247–256 (2019).
  79. Frontera, J. A. *et al.* Prediction of symptomatic vasospasm after subarachnoid hemorrhage: The modified Fisher scale. *Neurosurgery* 59, 21–26 (2006).
  80. Inagawa, T. Risk Factors for Cerebral Vasospasm Following Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Review of the Literature. *World Neurosurg.* 85,

- 56–76 (2016).
81. Mijiti, M. *et al.* Incidence and predictors of angiographic vasospasm, symptomatic vasospasm and cerebral infarction in chinese patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *PLoS One* 11, (2016).
  82. Macdonald, R. L. Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage. *Nature Reviews Neurology* vol. 10 44–58 (2014).
  83. Budohoski, K. P. *et al.* The pathophysiology and treatment of delayed cerebral ischaemia following subarachnoid haemorrhage. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* vol. 85 1343–1353 (2014).
  84. Li, K. *et al.* A Review of the Management of Cerebral Vasospasm After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurgery* vol. 126 513–527 (2019).
  85. Spatenkova, V., Bradac, O., De Lacy, P., Skrabalek, P. & Suchomel, P. Dysnatremia as a poor prognostic indicator in patients with acute subarachnoid hemorrhage. in *Journal of Neurosurgical Sciences* vol. 61 371–379 (2017).
  86. Veldeman, M. *et al.* Delayed cerebral ischaemia prevention and treatment after aneurysmal subarachnoid haemorrhage: A systematic review. *British Journal of Anaesthesia* vol. 117 17–40 (2016).
  87. Adami, D. *et al.* Complication rate of intraarterial treatment of severe cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage with nimodipine and percutaneous transluminal balloon angioplasty: Worth the risk? *J. Neuroradiol.* 46, 15–24 (2019).
  88. Suwatcharangkoon, S. *et al.* Medical Treatment Failure for Symptomatic Vasospasm after Subarachnoid Hemorrhage Threatens Long-Term Outcome. *Stroke* 50, 1696–1702 (2019).
  89. Weant, K. A., Ramsey, C. N. & Cook, A. M. Role of intraarterial therapy for cerebral vasospasm secondary to aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Pharmacotherapy* vol. 30 405–417 (2010).
  90. Nieuwkamp, D. J. *et al.* Changes in case fatality of aneurysmal subarachnoid haemorrhage over time, according to age, sex, and region: a meta-analysis. *Lancet Neurol.* 8, 635–642 (2009).
  91. Stienen, M. N. *et al.* Predictors of in-hospital death after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: Analysis of a nationwide database (Swiss SOS [Swiss Study on Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage]). *Stroke* 49, 333–340 (2018).

92. Goldberg, J. *et al.* Survival and outcome after poor-grade aneurysmal subarachnoid hemorrhage in elderly patients. *Stroke* 49, 2883–2889 (2018).
93. Brawanski, N. *et al.* Subarachnoid Hemorrhage in Advanced Age: Comparison of Patients Aged 70–79 Years and 80 Years and Older. *World Neurosurg.* 106, 139–144 (2017).
94. Konczalla, J. *et al.* Aneurysm location as a prognostic outcome factor after subarachnoid hemorrhage (SAH) from ICA- aneurysms: Implication for translational research—from bedside to bench? *World Neurosurg* (2016).
95. Suzuki, Y., Watanabe, A., Wakui, K., Horiuchi, T. & Hongo, K. Results of Clipping Surgery for Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage in Elderly Patients Aged 90 or Older. in *Acta Neurochirurgica, Supplementum* vol. 123 13–16 (2016).
96. Kajikawa, H. *et al.* Cerebral Vasospasm and Hemoglobins —Clinical and Experimental Studies. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. 19, 61–71 (1979).
97. Macdonald, R. L. & Weir, B. K. A. A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke* 22, 971–982 (1991).
98. Toda, N., Shimizu, K. & Ohta, T. Mechanism of cerebral arterial contraction induced by blood constituents. *J. Neurosurg.* 53, 312–322 (1980).
99. White, R. P., Macleod, R. M. & Muhlbauer, M. S. Evaluation of the role hemoglobin in cerebrospinal fluid plays in producing contractions of cerebral arteries. *Surg. Neurol.* 27, 237–242 (1987).
100. Amodio, S., Bouzat, P., Robba, C. & Taccone, F. S. Rethinking brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Critical Care* vol. 24 (2020).
101. Cahill, J. & Zhang, J. H. Subarachnoid hemorrhage: Is it time for a new direction? in *Stroke* vol. 40 S86 (2009).
102. Caner, B., Hou, J., Altay, O., Fuj, M. & Zhang, J. H. Transition of research focus from vasospasm to early brain injury after subarachnoid hemorrhage. in *Journal of Neurochemistry* vol. 123 12–21 (2012).
103. Fujii, M. *et al.* Early Brain Injury, an Evolving Frontier in Subarachnoid Hemorrhage Research. *Translational Stroke Research* vol. 4 432–446 (2013).
104. Topkoru B, Egemen E, Solaroglu I, Zhang JH. Early Brain Injury or Vasospasm? An Overview of Common Mechanisms. *Curr Drug Targets*;18(12):1424-1429 (2017).
105. Sekhon MS, Ainslie PN, Griesdale DE. Clinical pathophysiology of hypoxic

- ischemic brain injury after cardiac arrest: a "two-hit" model. *Crit Care.*;21(1):90 (2017).
106. Plesnila N. Pathophysiological Role of Global Cerebral Ischemia following Subarachnoid Hemorrhage: The Current Experimental Evidence. *Stroke Res Treat.*;2013:651958 (2013).
  107. Sehba FA, Pluta RM, Macdonald RL. Brain injury after transient global cerebral ischemia and subarachnoid hemorrhage. *Stroke Res Treat.*;2013:827154 (2013).
  108. Suwatcharangkoon, S. *et al.* Loss of consciousness at onset of subarachnoid hemorrhage as an important marker of early brain injury. *JAMA Neurol.* 73, 28–35 (2016).
  109. Cossu, G. *et al.* Intracranial pressure and outcome in critically ill patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A systematic review. *Minerva Anestesiologica* vol. 82 684–696 (2016).
  110. Graetz, D. *et al.* High ICP as trigger of proinflammatory IL-6 cytokine activation in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurol. Res.* 32, 728–735 (2010).
  111. Morris, N. A. *et al.* Hunt-Hess 5 subarachnoid haemorrhage presenting with cardiac arrest is associated with larger volume bleeds. *Resuscitation* 123, 71–76 (2018).
  112. Skrifvars MB, Parr MJ. Incidence, predisposing factors, management and survival following cardiac arrest due to subarachnoid haemorrhage: a review of the literature. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.*; 20:75 (2012).
  113. Lanterna, L. A. *et al.* Cerebral watershed hypoperfusion in subarachnoid hemorrhage: Computed tomography perfusion analysis. Clinical article. *J. Neurosurg.* 114, 961–968 (2011).
  114. Frontera, J. A. *et al.* Acute ischaemia after subarachnoid haemorrhage, relationship with early brain injury and impact on outcome: A prospective quantitative MRI study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 86, 71–78 (2015).
  115. Jeon, S. B. *et al.* Hyperoxia may be related to delayed cerebral ischemia and poor outcome after subarachnoid haemorrhage. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 85, 1301–1307 (2014).
  116. Li, Z. *et al.* Blood–brain barrier permeability change and regulation mechanism after subarachnoid hemorrhage. *Metab. Brain Dis.* 30, 597–603 (2015).
  117. Welling, L. C., Welling, M. S., Teixeira, M. J. & Figueiredo, E. G. Neuroinflammation after Subarachnoid Hemorrhage: A Consolidated Theory?

- World Neurosurg.* 85, 8–9 (2016).
118. Garland P, Morton MJ, Haskins W, Zolnourian A, Durnford A, Gaastra B, *et al.* Haemoglobin causes neuronal damage in vivo which is preventable by haptoglobin. *Brain Commun.*;2(1): fcz053 (2020).
  119. Griffithoras, S., Clark, J., Adamides, A. A. & Ziogas, J. The role of haptoglobin and hemopexin in the prevention of delayed cerebral ischaemia after aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a review of current literature. *Neurosurgical Review* vol. 43 1273–1288 (2020).
  120. Clark, J. F. & Sharp, F. R. Bilirubin oxidation products (BOXes) and their role in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* vol. 26 1223–1233 (2006).
  121. Soares, M. P. & Bozza, M. T. Red alert: Labile heme is an alarmin. *Current Opinion in Immunology* vol. 38 94–100 (2016).
  122. Loftspring, M. C., Hansen, C. & Clark, J. F. A novel brain injury mechanism after intracerebral hemorrhage: The interaction between heme products and the immune system. *Med. Hypotheses* 74, 63–66 (2010).
  123. Figueiredo, R. T. *et al.* Characterization of heme as activator of toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 282, 20221–20229 (2007).
  124. Rapoport, R. M. Bilirubin Oxidation Products and Cerebral Vasoconstriction. *Front. Pharmacol.* 9, 303 (2018).
  125. Pluta, R. M. Delayed cerebral vasospasm and nitric oxide: Review, new hypothesis, and proposed treatment. *Pharmacology and Therapeutics* vol. 105 23–56 (2005).
  126. Jung, C. S. *et al.* Association of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase with cerebral vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* 107, 945–950 (2007).
  127. Sehba, F. A. & Bederson, J. B. Nitric Oxide in Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage. in *Early Brain Injury or Cerebral Vasospasm* vol. 110 99–103 (2011).
  128. Jelinek, M., Jurajda, M. & Duris, K. The Role of Oxidative Stress in Early Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage (2020).
  129. Yang, Y., Chen, S. & Zhang, J.-M. The Updated Role of Oxidative Stress in Subarachnoid Hemorrhage. *Curr. Drug Deliv.* 14, (2016).
  130. Fumoto, T. *et al.* The Role of Oxidative Stress in Microvascular Disturbances

- after Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *Transl. Stroke Res.* 10, 684–694 (2019).
131. Ayer, R. E. & Zhang, J. H. Oxidative stress in subarachnoid haemorrhage: Significance in acute brain injury and vasospasm. in *Acta Neurochirurgica, Supplementum* vol. 104 33–41 (2008).
  132. Zimmermann, M. & Seifert, V. Endothelin and subarachnoid hemorrhage: An overview. *Neurosurgery* vol. 43 863–875 (1998).
  133. Kessler, I. M. *et al.* Endothelin-1 levels in plasma and cerebrospinal fluid of patients with cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Surg. Neurol.* 64, (2005).
  134. Desai, D., He, S., Yorio, T., Krishnamoorthy, R. R. & Prasanna, G. Hypoxia augments TNF- $\alpha$ -mediated endothelin-1 release and cell proliferation in human optic nerve head astrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 642–648 (2004).
  135. Alabadi, J. A. *et al.* Impairment of the modulatory role of nitric oxide on the endothelin-1- elicited contraction of cerebral arteries: A pathogenetic factor in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage? *Neurosurgery* 41, 245–253 (1997).
  136. Schupper, A. J., Eagles, M. E., Neifert, S. N., Mocco, J. & Macdonald, R. L. Lessons from the CONSCIOUS-1 Study. *J. Clin. Med.* 9, 2970 (2020).
  137. Wellman, G. C. & Koide, M. Impact of subarachnoid hemorrhage on parenchymal arteriolar function. in *Acta Neurochirurgica, Supplementum* vol. 115 173–177 (2013).
  138. Wagner, M. *et al.* Beyond delayed cerebral vasospasm: Infarct patterns in patients with subarachnoid hemorrhage. in *Clinical Neuroradiology* vol. 23 87–95 (2013).
  139. Wang, C. X., Lin, Y. X., Xie, G. Bin, Shi, J. X. & Zhou, M. L. Constriction and dysfunction of pial arterioles after regional hemorrhage in the subarachnoid space. *Brain Res.* 1601, 85–91 (2015).
  140. Schubert, G. A., Seiz, M., Hegewald, A. A., Manville, J. & Thomé, C. Acute hypoperfusion immediately after subarachnoid hemorrhage: a xenon contrast-enhanced CT study. *J. Neurotrauma* 26, 2225–2231 (2009).
  141. Vergouwen, M. D. I., Ertman, N., Ilodigwe, D. & MacDonald, R. L. Lower incidence of cerebral infarction correlates with improved functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow and*

- Metabolism* vol. 31 1545–1553 (2011).
142. Sehba, F. A., Hou, J., Pluta, R. M. & Zhang, J. H. The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Progress in Neurobiology* vol. 97 14–37 (2012).
  143. Clarke, J. V. *et al.* Microvascular platelet aggregation and thrombosis after subarachnoid hemorrhage: A review and synthesis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* vol. 40 1565–1575 (2020).
  144. Vergouwen, M. D. I., Vermeulen, M., Coert, B. A., Stroes, E. S. G. & Roos, Y. B. W. E. M. Microthrombosis after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: An additional explanation for delayed cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* vol. 28 1761–1770 (2008).
  145. Geraghty, J. R. & Testai, F. D. Delayed Cerebral Ischemia after Subarachnoid Hemorrhage: Beyond Vasospasm and Towards a Multifactorial Pathophysiology. *Current Atherosclerosis Reports* vol. 19 (2017).
  146. Ji, Y., Meng, Q. H. & Wang, Z. G. Changes in the coagulation and fibrinolytic system of patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)*. 54, 457–464 (2014).
  147. Ikeda, K., Asakura, H., Futami, K. & Yamashita, J. Coagulative and fibrinolytic activation in cerebrospinal fluid and plasma after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 41, 344–350 (1997).
  148. Roos, Y. B. W. E. M., Levi, M., Carroll, T. A., Beenen, L. F. M. & Vermeulen, M. Nimodipine increases fibrinolytic activity in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 32, 1860–1862 (2001).
  149. Cossu, G., Messerer, M., Oddo, M. & Daniel, R. T. To look beyond vasospasm in aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *BioMed Research International* vol. 2014 (2014).
  150. Otite, F. *et al.* Impaired Cerebral autoregulation is associated with vasospasm and delayed cerebral ischemia in subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 45, 677–682 (2014).
  151. Budohoski, K. P. *et al.* Cerebral autoregulation after subarachnoid hemorrhage: Comparison of three methods. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 449–456 (2013).
  152. Bai, W. & Zhou, Y.-G. Homeostasis of the Intraparenchymal-Blood Glutamate Concentration Gradient: Maintenance, Imbalance, and Regulation. *Front. Mol. Neurosci.* 10, 400 (2017).

153. Cohen-Kashi-Malina, K., Cooper, I. & Teichberg, V. I. Mechanisms of glutamate efflux at the blood-brain barrier: Involvement of glial cells. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 32, 177–189 (2012).
154. Nilsson, O. G., Säveland, H., Boris-Möller, F., Brandt, L. & Wieloch, T. Increased Levels of Glutamate in Patients with Subarachnoid Haemorrhage as Measured by Intracerebral Microdialysis. *Acta Neurochir. Suppl.* 1996, 45–47 (1996).
155. Boyko, M. *et al.* The Effect of Blood Glutamate Scavengers Oxaloacetate and Pyruvate on Neurological Outcome in a Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage. *Neurotherapeutics* 9, 649–657 (2012).
156. Boyko, M., Gruenbaum, S. E., Gruenbaum, B. F., Shapira, Y. & Zlotnik, A. Brain to blood glutamate scavenging as a novel therapeutic modality: A review. *J. Neural Transm.* 121, 971–979 (2014).
157. Magi, S., Piccirillo, S. & Amoroso, S. The dual face of glutamate: from a neurotoxin to a potential survival factor—metabolic implications in health and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences* vol. 76 1473–1488 (2019).
158. Wainsztein, N. & Rodríguez Lucci, F. Cortical Spreading Depression and Ischemia in Neurocritical Patients. *Neurologic Clinics* vol. 35 655–664 (2017).
159. Dreier, J. P. *et al.* Products of hemolysis in the subarachnoid space inducing spreading ischemia in the cortex and focal necrosis in rats: A model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage? *J. Neurosurg.* 93, 658–666 (2000).
160. Hartings, J. A. *et al.* Subarachnoid blood acutely induces spreading depolarizations and early cortical infarction. *Brain* 140, 2673–2690 (2017).
161. Leng, L. Z., Fink, M. E. & Iadecola, C. Spreading depolarization: A possible new culprit in the delayed cerebral ischemia of subarachnoid hemorrhage. *Archives of Neurology* vol. 68 31–36 (2011).
162. Cook, A. M. *et al.* Guidelines for the Acute Treatment of Cerebral Edema in Neurocritical Care Patients. *Neurocrit. Care* 32, 647–666 (2020).
163. Marmarou, A. A review of progress in understanding the pathophysiology and treatment of brain edema. *Neurosurg Focus* 22, E1 (2007).
164. Rass, V. *et al.* Delayed Resolution of Cerebral Edema Is Associated with Poor Outcome After Nontraumatic Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke* 50, 828–836 (2019).
165. Choi, H. A. *et al.* Quantification of Cerebral Edema After Subarachnoid

- Hemorrhage. *Neurocrit. Care* 25, 64–70 (2016).
166. Claassen, J. *et al.* Global cerebral edema after subarachnoid hemorrhage: Frequency, predictors, and impact on outcome. *Stroke* 33, 1225–1232 (2002).
  167. Parkin, J. & Cohen, B. An overview of the immune system. *Lancet* vol. 357 1777–1789 (2001).
  168. Marshall, J. S., Warrington, R., Watson, W. & Kim, H. L. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy, Asthma and Clinical Immunology* vol. 14 49 (2018).
  169. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* vol. 420 868–874 (2002).
  170. Zhang, Y. & Zhang, Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cellular and Molecular Immunology* vol. 17 807–821 (2020).
  171. Iadecola, C. & Anrather, J. The immunology of stroke: From mechanisms to translation. *Nature Medicine* vol. 17 796–808 (2011).
  172. McKee, C. A. & Lukens, J. R. Emerging roles for the immune system in traumatic brain injury. *Frontiers in Immunology* vol. 7 556 (2016).
  173. Evavold, C. L. & Kagan, J. C. How Inflammasomes Inform Adaptive Immunity. *Journal of Molecular Biology* vol. 430 217–237 (2018).
  174. Ciraci, C., Janczy, J. R., Sutterwala, F. S. & Cassel, S. L. Control of innate and adaptive immunity by the inflammasome. *Microbes Infect.* 14, 1263–1270 (2012).
  175. Medzhitov, R. & Janeway, C. A. Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* vol. 91 295–298 (1997).
  176. Janeway, C. A. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* vol. 54 1–13 (1989).
  177. Medzhitov, R. Pattern Recognition Theory and the Launch of Modern Innate Immunity. *J. Immunol.* 191, 4473–4474 (2013).
  178. Amarante-Mendes, G. P. *et al.* Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. *Frontiers in Immunology* vol. 9 2379 (2018).
  179. Lee, M. S. & Kim, Y.-J. Signaling Pathways Downstream of Pattern-Recognition Receptors and Their Cross Talk. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 447–480 (2007).
  180. Kiiski, H. *et al.* Time-courses of plasma IL-6 and HMGB-1 reflect initial severity of clinical presentation but do not predict poor neurologic outcome following

- subarachnoid hemorrhage. *eNeurologicalSci* 6, 55–62 (2017).
181. Rosales, C. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Frontiers in Physiology* vol. 9 113 (2018).
  182. Summers, C. *et al.* Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends in Immunology* vol. 31 318–324 (2010).
  183. Gelderblom, M. *et al.* Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood* 120, 3793–3802 (2012).
  184. Coulibaly, A. P. *et al.* RAR-Related Orphan Receptor Gamma T (RoR $\gamma$ t)-Related Cytokines Play a Role in Neutrophil Infiltration of the Central Nervous System After Subarachnoid Hemorrhage. *Neurocrit. Care* 33, 140–151 (2020).
  185. Zenobia, C. & Hajishengallis, G. Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontol. 2000* 69, 142–159 (2015).
  186. Schläger, C. *et al.* Effector T-cell trafficking between the leptomeninges and the cerebrospinal fluid. *Nature* 530, 349–353 (2016).
  187. Netea, M. G. *et al.* Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature Reviews Immunology* vol. 20 375–388 (2020).
  188. Ginhoux, F. & Jung, S. Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis. *Nature Reviews Immunology* vol. 14 392–404 (2014).
  189. Medzhitov, R. & Janeway C., J. Advances in immunology: Innate immunity. *N. Engl. J. Med.* 343, 338–344 (2000).
  190. Passlick, B., Flieger, D. & Loms Ziegler-Heitbrock, H. W. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 74, 2527–2534 (1989).
  191. Zawada, A. M. *et al.* Monocyte heterogeneity in human cardiovascular disease. *Immunobiology* 217, 1273–1284 (2012).
  192. Wong, K. L. *et al.* The three human monocyte subsets: Implications for health and disease. *Immunol. Res.* 53, 41–57 (2012).
  193. Boyette LB, Macedo C, Hadi K, Elinoff BD, Walters JT, Ramaswami B, *et al.* Phenotype, function, and differentiation potential of human monocyte subsets. *PLoS One*;12(4): e0176460 (2017).
  194. Guilliams, M. *et al.* Dendritic cells, monocytes and macrophages: A unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews Immunology* vol. 14 571–578 (2014).
  195. Varol, C., Mildner, A. & Jung, S. Macrophages: Development and Tissue

- Specialization. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 643–675 (2015).
196. Aderem, A. & Underhill, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology* vol. 17 593–623 (1999).
  197. Mosser, D. M. & Edwards, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* vol. 8 958–969 (2008).
  198. Malyshev, I. & Malyshev, Y. Current concept and update of the macrophage plasticity concept: Intracellular mechanisms of reprogramming and M3 macrophage ‘switch’ phenotype. *BioMed Research International* vol. 2015 (2015).
  199. Abel, A. M., Yang, C., Thakar, M. S. & Malarkannan, S. Natural killer cells: Development, maturation, and clinical utilization. *Frontiers in Immunology* vol. 9 1 (2018).
  200. Topham, N. J. & Hewitt, E. W. Natural killer cell cytotoxicity: How do they pull the trigger? *Immunology* vol. 128 7–15 (2009).
  201. Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* vol. 22 633–640 (2001).
  202. Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H. G. & Bryceson, Y. T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115, 2167–2176 (2010).
  203. Uzhachenko, R. V. & Shanker, A. CD8+ T Lymphocyte and NK Cell Network: Circuitry in the Cytotoxic Domain of Immunity. *Front. Immunol.* 10, 1906 (2019).
  204. Howard, C. J., Charleston, B., Stephens, S. A., Sopp, P. & Hope, J. C. The role of dendritic cells in shaping the immune response. *Anim. Heal. Res. Rev.* 5, 191–195 (2004).
  205. Obregon, C., Kumar, R., Pascual, M. A., Vassalli, G. & Golshayan, D. Update on dendritic cell-induced immunological and clinical tolerance. *Frontiers in Immunology* vol. 8 1514 (2017).
  206. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. & Mortha, A. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 563–604 (2013).
  207. Collin, M. & Bigley, V. *Human dendritic cell subsets: an update. Immunology* vol. 154 3–20 (2018).
  208. Hoffman, W., Lakkis, F. G. & Chalasani, G. B cells, antibodies, and more. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 11, 137–154 (2016).

209. Taniuchi, I. CD4 Helper and CD8 Cytotoxic T Cell Differentiation. *Annu. Rev. Immunol.* 36, 579–601 (2018).
210. Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M. & Corcoran, L. M. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 160–171 (2015).
211. Bishop, G. A. B cell-T cell interaction: Antigen bridge to antigen presentation. *Nature Reviews Immunology* vol. 16 467 (2016).
212. Kalia V, Sarkar S, Gourley TS, Rouse BT, Ahmed R. Differentiation of memory B and T cells. *Curr Opin Immunol.*;18(3):255-64 (2006).
213. Pioli, P. D. Plasma Cells, the Next Generation: Beyond Antibody Secretion. *Front. Immunol.* 10, 2768 (2019).
214. Mauri, C. & Bosma, A. Immune regulatory function of B cells. *Annual Review of Immunology* vol. 30 221–241 (2012).
215. Okeke, E. B. & Uzonna, J. E. The pivotal role of regulatory T cells in the regulation of innate immune cells. *Frontiers in Immunology* vol. 10 680 (2019).
216. Luckheeram RV, Zhou R, Verma AD, Xia B. CD4<sup>+</sup>T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol.*;2012:925135 (2012).
217. Andersen, M. H., Schrama, D., Thor Straten, P. & Becker, J. C. Cytotoxic T cells. *Journal of Investigative Dermatology* vol. 126 32–41 (2006).
218. Zhang, N. & Bevan, M. J. CD8<sup>+</sup> T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity* vol. 35 161–168 (2011).
219. Mittrücker, H. W., Visekruna, A. & Huber, M. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8<sup>+</sup> T Cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*. 62, 449–458 (2014).
220. Hwang, J. R., Byeon, Y., Kim, D. & Park, S. G. Recent insights of T cell receptor-mediated signaling pathways for T cell activation and development. *Experimental and Molecular Medicine* vol. 52 750–761 (2020).
221. Jin, H.-T., Ahmed, R. & Okazaki, T. Role of PD-1 in Regulating T-Cell Immunity. in *Current topics in microbiology and immunology* vol. 350 17–37 (2010).
222. Zhou, L. *et al.* IL-6 programs TH-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat. Immunol.* 8, 967–974 (2007).
223. Uzhachenko RV, Shanker A. CD8<sup>+</sup> T Lymphocyte and NK Cell Network: Circuitry in the Cytotoxic Domain of Immunity. *Front Immunol.*;10:1906 (2019).
224. Halle, S., Halle, O. & Förster, R. Mechanisms and Dynamics of T Cell-Mediated Cytotoxicity In Vivo. *Trends in Immunology* vol. 38 432–443 (2017).

225. Wang, B. *et al.* Multiple Pathways for Activation of Naive CD8 + T Cells: CD4-Independent Help. *J. Immunol.* 167, 1283–1289 (2001).
226. Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T. & Pennington, D. J. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* vol. 1843 2563–2582 (2014).
227. Holdsworth, S. R. & Can, P. Y. Cytokines: Names and numbers you should care about. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* vol. 10 2243–2254 (2015).
228. Negi, N. & Das, B. K. CNS: Not an immunoprivileged site anymore but a virtual secondary lymphoid organ. *International Reviews of Immunology* vol. 37 57–68 (2018).
229. Carson, M. J., Doose, J. M., Melchior, B., Schmid, C. D. & Ploix, C. C. CNS immune privilege: Hiding in plain sight. *Immunological Reviews* vol. 213 48–65 (2006).
230. Louveau, A. *et al.* Understanding the functions and relationships of the glymphatic system and meningeal lymphatics. *Journal of Clinical Investigation* vol. 127 3210–3219 (2017).
231. Wekerle, H. Immune protection of the brain - Efficient and delicate. in *Journal of Infectious Diseases* vol. 186 (J Infect Dis, 2002).
232. Solomos, A. C. & Rall, G. F. Get It through Your Thick Head: Emerging Principles in Neuroimmunology and Neurovirology Redefine Central Nervous System ‘immune Privilege’. *ACS Chemical Neuroscience* vol. 7 435–441 (2016).
233. MEDAWAR, P. B. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts. *Br. J. Exp. Pathol.* 29, 58–69 (1948).
234. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, *et al.* A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid  $\beta$ . *Sci Transl Med.*;4(147):147ra111 (2012).
235. Iliff, J. J., Goldman, S. A. & Nedergaard, M. Implications of the discovery of brain lymphatic pathways. *The Lancet Neurology* vol. 14 977–979 (2015).
236. Xue Y, Liu X, Koundal S, Constantinou S, Dai F, Santambrogio L, *et al.* In vivo T1 mapping for quantifying glymphatic system transport and cervical lymph node drainage. *Sci Rep*;10(1):14592 (2020).

237. Louveau, A. *et al.* Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 523, 337–341 (2015).
238. Bucchieri, F., Farina, F., Zummo, G. & Cappello, F. Lymphatic vessels of the dura mater: A new discovery? *J. Anat.* 227, 702–703 (2015).
239. Ransohoff, B. E. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 623–635 (2012).
240. Engelhardt, B., Vajkoczy, P. & Weller, R. O. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nature Immunology* vol. 18 123–131 (2017).
241. Sallusto, F. *et al.* T-cell trafficking in the central nervous system. *Immunol. Rev.* 248, 216–227 (2012).
242. Neumann, H. & Wekerle, H. Brain microglia: Watchdogs with pedigree. *Nat. Neurosci.* 16, 253–255 (2013).
243. Tambuyzer, B. R., Ponsaerts, P. & Nouwen, E. J. Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *J. Leukoc. Biol.* 85, 352–370 (2009).
244. Kaur, G., Han, S. J., Yang, I. & Crane, C. Microglia and Central Nervous System Immunity. *Neurosurgery Clinics of North America* vol. 21 43–51 (2010).
245. Masuda, T. & Prinz, M. Microglia: A Unique Versatile Cell in the Central Nervous System. *ACS Chemical Neuroscience* vol. 7 428–434 (2016).
246. Eggen, B. J. L., Raj, D., Hanisch, U. K. & Boddeke, H. W. G. M. Microglial phenotype and adaptation. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* vol. 8 807–823 (2013).
247. Benarroch, E. E. Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury. *Neurology* vol. 81 1079–1088 (2013).
248. Grabert, K. *et al.* Microglial brain regionâ ’dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat. Neurosci.* 19, 504–516 (2016).
249. Crotti, A. & Ransohoff, R. M. Microglial Physiology and Pathophysiology: Insights from Genome-wide Transcriptional Profiling. *Immunity* vol. 44 505–515 (2016).
250. Chen, Z. & Trapp, B. D. Microglia and neuroprotection. *Journal of Neurochemistry* vol. 136 10–17 (2016).
251. Lobo-Silva, D., Carriche, G. M., Castro, A. G., Roque, S. & Saraiva, M. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. *Journal of Neuroinflammation* vol. 13 1–10 (2016).
252. Al-Onaizi, M., Al-Khalifah, A., Qasem, D. & Elali, A. Role of microglia in

- modulating adult neurogenesis in health and neurodegeneration. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 21 1–27 (2020).
253. Hu, X. *et al.* Microglial and macrophage polarization - New prospects for brain repair. *Nature Reviews Neurology* vol. 11 56–64 (2015).
  254. Kofler, J. & Wiley, C. A. Microglia: Key Innate Immune Cells of the Brain. *Toxicologic Pathology* vol. 39 103–114 (2011).
  255. Sofroniew, M. V. & Vinters, H. V. Astrocytes: Biology and pathology. *Acta Neuropathologica* vol. 119 7–35 (2010).
  256. Lana, D., Ugolini, F. & Giovannini, M. G. An Overview on the Differential Interplay Among Neurons-Astrocytes-Microglia in CA1 and CA3 Hippocampus in Hypoxia/Ischemia. *Front. Cell. Neurosci.* 14, 585833 (2020).
  257. Allison Soung and Robyn S. Klein. Astrocytes: Initiators of and Responders to Inflammation, *Glia in Health and Disease*, Tania Spohr, IntechOpen. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/69630> (2019).
  258. Bowman, C. C., Rasley, A., Tranguch, S. L. & Marriott, I. Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia* 43, 281–291 (2003).
  259. Rodgers, K. R., Lin, Y., Langan, T. J., Iwakura, Y. & Chou, R. C. Innate Immune Functions of Astrocytes are Dependent Upon Tumor Necrosis Factor-Alpha. *Sci. Rep.* 10, (2020).
  260. Farina, C., Aloisi, F. & Meinl, E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in Immunology* vol. 28 138–145 (2007).
  261. Li, L., Acioglu, C., Heary, R. F. & Elkabes, S. Role of astroglial toll-like receptors (TLRs) in central nervous system infections, injury and neurodegenerative diseases. *Brain, Behavior, and Immunity* (2020).
  262. Brambilla, R. *et al.* Astrocytes play a key role in EAE pathophysiology by orchestrating in the CNS the inflammatory response of resident and peripheral immune cells and by suppressing remyelination. *Glia* 62, 452–467 (2014).
  263. Krzyżewski, R. M. *et al.* High Leukocyte Count and Risk of Poor Outcome After Subarachnoid Hemorrhage: A Meta-Analysis. *World Neurosurg.* 135, e541–e547 (2020).
  264. Srinivasan, A. *et al.* Impact of Early Leukocytosis and Elevated High-Sensitivity C-Reactive Protein on Delayed Cerebral Ischemia and Neurologic Outcome after Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurg.* 90, 91–95 (2016).
  265. McGirt, M. J. *et al.* Leukocytosis as an independent risk factor for cerebral

- vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* 98, 1222–1226 (2003).
266. Bone, R. C. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. in *Chest* vol. 101 1644–1655 (1992).
267. Yoshimoto, Y., Tanaka, Y. & Hoya, K. Acute systemic inflammatory response syndrome in subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 32, 1989–1993 (2001).
268. Dhar, R. & Diringer, M. N. The burden of the systemic inflammatory response predicts vasospasm and outcome after subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit. Care* 8, 404–412 (2008).
269. Tam, A. K. H. *et al.* Impact of systemic inflammatory response syndrome on vasospasm, cerebral infarction, and outcome after subarachnoid hemorrhage: Exploratory analysis of CONSCIOUS-1 database. *Neurocrit. Care* 13, 182–189 (2010).
270. Claassen, J. *et al.* Nonconvulsive seizures in subarachnoid hemorrhage link inflammation and outcome. *Ann. Neurol.* 75, 771–781 (2014).
271. Ravizza, T. & Vezzani, A. Pharmacological targeting of brain inflammation in epilepsy: Therapeutic perspectives from experimental and clinical studies. *Epilepsia Open* 3, 133–142 (2018).
272. Al-Mufti, F. *et al.* Admission neutrophil-lymphocyte ratio predicts delayed cerebral ischemia following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J. Neurointerv. Surg.* 11, 1135–1140 (2019).
273. Provencio, J. J. & Vora, N. Subarachnoid hemorrhage and inflammation: Bench to bedside and back. *Seminars in Neurology* vol. 25 435–444 (2005).
274. Coulibaly, A. P. & Provencio, J. J. Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: an Overview of Inflammation-Induced Cellular Changes. *Neurotherapeutics* vol. 17 436–445 (2020).
275. Keep, R. F. *et al.* Brain endothelial cell junctions after cerebral hemorrhage: Changes, mechanisms and therapeutic targets. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* vol. 38 1255–1275 (2018).
276. Van Dijk, B. J., Vergouwen, M. D. I., Kelfkens, M. M., Rinkel, G. J. E. & Hol, E. M. Glial cell response after aneurysmal subarachnoid hemorrhage - Functional consequences and clinical implications. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 1862, 492–505 (2016).
277. Xu, Z. *et al.* Resident Microglia Activate before Peripheral Monocyte Infiltration

- and p75NTR Blockade Reduces Microglial Activation and Early Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage. *ACS Chem. Neurosci.* 10, 412–423 (2019).
278. Gris T, Laplante P, Thebault P, Cayrol R, Najjar A, Joannette-Pilon B, Brilliant-Marquis F. *et al*; Canadian Critical Care Translational Biology Group. Innate immunity activation in the early brain injury period following subarachnoid hemorrhage. *J Neuroinflammation*;16(1):253 (2019).
279. Provencio, J. J. *et al*. Neutrophil depletion after subarachnoid hemorrhage improves memory via NMDA receptors. *Brain. Behav. Immun.* 54, 233–242 (2016).
280. Friedrich V, Flores R, Muller A, Bi W, Peerschke EI, Sehba FA. Reduction of neutrophil activity decreases early microvascular injury after subarachnoid haemorrhage. *J Neuroinflammation*; 8:103 (2011).
281. Schneider, U. C. *et al*. Microglia inflict delayed brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neuropathol.* 130, 215–231 (2015).
282. Atangana, E. *et al*. Intravascular Inflammation Triggers Intracerebral Activated Microglia and Contributes to Secondary Brain Injury After Experimental Subarachnoid Hemorrhage (eSAH). *Transl. Stroke Res.* 8, 144–156 (2017).
283. Jedrzejowska-Szypulka, H. *et al*. Interleukin-1 $\beta$ ; Plays a Role in the Activation of Peripheral Leukocytes after Blood-Brain Barrier Rupture in the course of Subarachnoid Hemorrhage. *Curr. Neurovasc. Res.* 7, 39–48 (2010).
284. Schallner, N., Otterbein, L. E. & Hanafy, K. A. Microglia regulate blood clearance in subarachnoid hemorrhage by heme oxygenase-1 The Journal of Clinical Investigation. *J Clin Invest* 125, 2609–2625 (2015).
285. Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, *et al*. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol.*;168(7):3536-42 (2002).
286. Wu, W. *et al*. Elevated IL-6 and TNF- $\alpha$  Levels in Cerebrospinal Fluid of Subarachnoid Hemorrhage Patients. *Mol. Neurobiol.* 53, 3277–3285 (2016).
287. Ma, L. *et al*. Anti-TNF- $\alpha$  antibody attenuates subarachnoid hemorrhage-induced apoptosis in the hypothalamus by inhibiting the activation of Erk. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 14, 525–536 (2018).
288. Fabender, K. *et al*. Endothelin-1 in subarachnoid hemorrhage: An acute-phase reactant produced by cerebrospinal fluid leukocytes. *Stroke* 31, 2971–2975 (2000).

289. Zervas, N. T., Liszczak, T. M., Mayberg, M. R. & Black McL., P. Cerebrospinal fluid may nourish cerebral vessels through pathways in the adventitia that may be analogous to systemic vasa vasorum. *J. Neurosurg.* 56, 475–481 (1982).
290. Ma, C., Zhou, W., Yan, Z., Qu, M. & Bu, X. Toll-like receptor 4 (TLR4) is associated with cerebral vasospasm and delayed cerebral ischemia in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo).* 55, 878–884 (2015).
291. Kim, G. H. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1 predicts outcome and vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* 109, 38–43 (2008).
292. Unda, S. R. *et al.* Peripheral Monocytosis at Admission to Predict Cerebral Infarct and Poor Functional Outcomes in Subarachnoid Hemorrhage Patients. *World Neurosurg.* 138, e523–e529 (2020).
293. Roquilly, A. *et al.* Impaired Blood Dendritic Cell Numbers and Functions after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *PLoS One* 8, (2013).
294. Yilmaz, A. *et al.* Transient decrease in circulating dendritic cell precursors after acute stroke: Potential recruitment into the brain. *Clin. Sci.* 118, 147–157 (2010).
295. Kretzschmar, D. *et al.* Recruitment of circulating dendritic cell precursors into the infarcted myocardium and pro-inflammatory response in acute myocardial infarction. *Clin. Sci.* 123, 387–398 (2012).
296. Grimaldi, D. *et al.* Profound and persistent decrease of circulating dendritic cells is associated with ICU-acquired infection in patients with septic shock. *Intensive Care Med.* 37, 1438–1446 (2011).
297. Chen, C., Ai, Q. Di, Chu, S. F., Zhang, Z. & Chen, N. H. NK cells in cerebral ischemia. *Biomedicine and Pharmacotherapy* vol. 109 547–554 (2019).
298. Gan, Y. *et al.* Ischemic neurons recruit natural killer cells that accelerate brain infarction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2704–2709 (2014).
299. Luo, P., Chu, S. feng, Zhang, Z., Xia, C. yuan & Chen, N. hong. Fractalkine/CX3CR1 is involved in the crosstalk between neuron and glia in neurological diseases. *Brain Research Bulletin* vol. 146 12–21 (2019).
300. Pawelec, P., Ziemka-Nalecz, M., Sypecka, J. & Zalewska, T. The Impact of the CX3CL1/CX3CR1 Axis in Neurological Disorders. *Cells* vol. 9 (2020).
301. Chen, X. *et al.* CX3CL1/CX3CR1 axis attenuates early brain injury via promoting the delivery of exosomal microRNA-124 from neuron to microglia after subarachnoid hemorrhage. *J. Neuroinflammation* 17, 209 (2020).

302. Spitzer, D. *et al.* Activation of Cytotoxic Natural Killer Cells After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurg.* 101, 666-676.e1 (2017).
303. Umekawa, T., Osman, A. M., Han, W., Ikeda, T. & Blomgren, K. Resident microglia, rather than blood-derived macrophages, contribute to the earlier and more pronounced inflammatory reaction in the immature compared with the adult hippocampus after hypoxia-ischemia. *Glia* 63, 2220–2230 (2015).
304. Gertig, U. & Hanisch, U.-K. Microglial diversity by responses and responders. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 101 (2014).
305. Garton, T., Keep, R. F., Hua, Y. & Xi, G. CD163, a Hemoglobin/Haptoglobin Scavenger Receptor, After Intracerebral Hemorrhage: Functions in Microglia/Macrophages Versus Neurons. *Translational Stroke Research* vol. 8 612–616 (2017).
306. Urrea, X., Cervera, Á., Villamor, N., Planas, A. M. & Chamorro, Á. Harms and benefits of lymphocyte subpopulations in patients with acute stroke. *Neuroscience* 158, 1174–1183 (2009).
307. Qin X, Akter F, Qin L, Cheng J, Guo M, Yao S, Jian Z, Liu R, Wu S. Adaptive Immunity Regulation and Cerebral Ischemia. *Front Immunol.*;11:689 (2020).
308. Schäbitz WR. Regulatory T cells in ischemic stroke: helpful or hazardous? *Stroke*;44(8):e84 (2013).
309. Kubota, T. *et al.* The kinetics of lymphocyte subsets and macrophages in subarachnoid space after subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke* 24, 1993–2000 (1993).
310. Becker, K. J. *et al.* Immunologic tolerance to myelin basic protein decreases stroke size after transient focal cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10873–10878 (1997).
311. Gee, J. M., Kalil, A., Thullbery, M. & Becker, K. J. Induction of immunologic tolerance to myelin basic protein prevents central nervous system autoimmunity and improves outcome after stroke. *Stroke* 39, 1575–1582 (2008).
312. Ayer, R. E. *et al.* Statin-induced T-lymphocyte modulation and neuroprotection following experimental subarachnoid hemorrhage. in *Acta Neurochirurgica, Supplementum* vol. 115 259–266 (2013).
313. Mathiesen, T. & Lefvert, A. K. Cerebrospinal fluid and blood lymphocyte subpopulations following subarachnoid haemorrhage. *Br. J. Neurosurg.* 10, 89–92 (1996).

314. Jiang, Y., Zhou, Y., Peng, Y. & Zhang, M. The Quantitative and Functional Changes of Postoperative Peripheral Blood Immune Cell Subsets Relate to Prognosis of Patients with Subarachnoid Hemorrhage: A Preliminary Study. *World Neurosurg.* 108, 206–215 (2017).
315. Zeiler, F. A. *et al.* Cerebrospinal Fluid and Microdialysis Cytokines in Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Scoping Systematic Review. *Front. Neurol.* 8, 1 (2017).
316. Schiefecker, A. J. *et al.* Neuroinflammation is Associated with Brain Extracellular TAU-Protein Release After Spontaneous Subarachnoid Hemorrhage. *Curr. Drug Targets* 18, (2016).
317. Hanafy, K. A. *et al.* Brain interstitial fluid TNF- $\alpha$  after subarachnoid hemorrhage. *J. Neurol. Sci.* 291, 69–73 (2010).
318. Chaudhry, S. R. *et al.* Elevated systemic IL-6 levels in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage is an unspecific marker for post-SAH complications. *Int. J. Mol. Sci.* 18, (2017).
319. Hopkins, S. J. *et al.* Cerebrospinal fluid and plasma cytokines after subarachnoid haemorrhage: CSF interleukin-6 may be an early marker of infection. *J. Neuroinflammation* 9, (2012).
320. Righy, C. *et al.* Hemoglobin metabolism by-products are associated with an inflammatory response in patients with hemorrhagic stroke. *Rev. Bras. Ter. Intensiva* 30, 21–27 (2018).
321. Lindegaard, K. F., Nornes, H., Bakke, S. J., Sorteberg, W. & Nakstad, P. Cerebral vasospasm after subarachnoid haemorrhage investigated by means of transcranial Doppler ultrasound. *Acta Neurochir. Suppl. (Wien).* 42, 81–84 (1988).
322. Soustiel, J. F., Shik, V., Shreiber, R., Tavor, Y. & Goldsher, D. Basilar Vasospasm Diagnosis. *Stroke* 33, 72–78 (2002).
323. Maecker, H. T., McCoy, J. P. & Nussenblatt, R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nature Reviews Immunology* vol. 12 191–200 (2012).
324. Lucke-Wold, B. P. *et al.* Aneurysmal subarachnoid hemorrhage and neuroinflammation: A comprehensive review. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 17 1–17 (2016).
325. Rass, V. & Helbok, R. Early Brain Injury After Poor-Grade Subarachnoid Hemorrhage. *Current Neurology and Neuroscience Reports* vol. 19 (2019).

326. Provencio, J. J. Inflammation in subarachnoid hemorrhage and delayed deterioration associated with vasospasm: A review. in *Acta Neurochirurgica, Supplementum* vol. 115 233–238 (2013).
327. ElAli A, Jean LeBlanc N. The Role of Monocytes in Ischemic Stroke Pathobiology: New Avenues to Explore. *Front Aging Neurosci*; 8:29 (2016).
328. Ziegler-Heitbrock, L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 81, 584–592 (2007).
329. Chou, S. H. Y. *et al.* Early elevation of serum tumor necrosis factor- $\alpha$  is associated with poor outcome in subarachnoid hemorrhage. *J. Investig. Med.* 60, 1054–1058 (2012).
330. Grage-Griebenow, E. *et al.* Identification of a novel dendritic cell-like subset of CD64+ / CD16+ blood monocytes. *Eur. J. Immunol.* 31, 48–56 (2001).
331. Shi, F. D., Ljunggren, H. G., La Cava, A. & Van Kaer, L. Organ-specific features of natural killer cells. *Nature Reviews Immunology* vol. 11 658–671 (2011).
332. Meucci, O., Fatatis, A., Simen, A. A., & Miller, R. J. Expression of CX3CR1 chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), 8075–8080 (2000).
333. Umehara, H., Bloom, E. T., Okazaki, T., Domae, N. & Imai, T. Fractalkine and vascular injury. *Trends in Immunology* vol. 22 602–607 (2001).
334. Lauro, C. *et al.* Fractalkine Modulates Microglia Metabolism in Brain Ischemia. *Front. Cell. Neurosci.* 13, 414 (2019).
335. Wang, Y. *et al.* Adoptive Regulatory T-cell Therapy Attenuates Subarachnoid Hemorrhage-induced Cerebral Inflammation by Suppressing TLR4/NF- $\kappa$ B Signaling Pathway. *Curr. Neurovasc. Res.* 13, 121–126 (2016).
336. Moraes L, Grille S, Morelli P, Mila R, Trias N, *et al.* Immune cells subpopulations in cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Springerplus*; 4:195 (2015).
337. Malone, K., Amu, S., Moore, A. C. & Waeber, C. The immune system and stroke: from current targets to future therapy. *Immunol. Cell Biol.* 97, 5–16 (2019).
338. Planas, A. M. Role of immune cells migrating to the ischemic brain. *Stroke* vol. 49 2261–2267 (2018).
339. Mou, D., Espinosa, J., Lo, D. J. & Kirk, A. D. CD28 negative T cells: Is their loss our gain? *Am. J. Transplant.* 14, 2460–2466 (2014).

340. Maly, K. & Schirmer, M. The story of CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cells revisited: Solved or still ongoing? *J. Immunol. Res.* 2015, (2015).
341. Kim, E. & Cho, S. CNS and peripheral immunity in cerebral ischemia: partition and interaction. *Experimental Neurology* vol. 335 (2021).
342. Chaudhry, S. R. *et al.* Aneurysmal subarachnoid hemorrhage lead to systemic upregulation of IL-23/IL-17 inflammatory axis. *Cytokine* 97, 96–103 (2017).
343. Zhang Q, Liao Y, Liu Z, Dai Y, Li Y, Li Y, Tang Y. Interleukin-17 and ischaemic stroke. *Immunology*;162(2):179-193 (2021).
344. Ren, J. & Li, B. The Functional Stability of FOXP3 and ROR $\gamma$ t in Treg and Th17 and Their Therapeutic Applications. in *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* vol. 107 155–189 (2017).
345. Lei, T.-Y. *et al.* The immune response of T cells and therapeutic targets related to regulating the levels of T helper cells after ischaemic stroke. *J. Neuroinflammation* 18, 25 (2021).
346. Castro, G., Liu, X., Ngo, K., De Leon-Tabaldo, A., Zhao, S., Luna-Roman R, *et al.* ROR $\gamma$ t and ROR $\alpha$  signature genes in human Th17 cells. *PloS one*, 12(8), e0181868 (2017).
347. Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235–238 (2006).
348. Ruan, Q. *et al.* The Th17 immune response is controlled by the Rel-ROR $\gamma$ -ROR $\gamma$ T transcriptional axis. *J. Exp. Med.* 208, 2321–2333 (2011).
349. Li, G. Z. *et al.* Expression of interleukin-17 in ischemic brain tissue. *Scand. J. Immunol.* 62, 481–486 (2005).
350. Kebir, H. *et al.* Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* 13, 1173–1175 (2007).
351. Liesz, A. *et al.* Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat. Med.* 15, 192–199 (2009).
352. Chaudhry SR, Kahlert UD, Kinfe TM, Lamprecht A, Niemelä M, Hänggi D, Muhammad S. Elevated Systemic IL-10 Levels Indicate Immunodepression Leading to Nosocomial Infections after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage (SAH) in patients. *Int J Mol Sci.* 21(5):1569 (2020).
353. Møllergård, P., Åneman, O., Sjögren, F., Säberg, C. & Hillman, J. Differences in cerebral extracellular response of interleukin-1 $\beta$ , interleukin-6, and interleukin-10 after subarachnoid hemorrhage or severe head trauma in humans. *Neurosurgery*

- 68, 12–19 (2011).
354. Garcia JM, Stillings SA, Leclerc JL, Phillips H, Edwards NJ, Robicsek SA, *et al.* Role of Interleukin-10 in Acute Brain Injuries. *Front Neurol.* 8:244 (2017).
355. Saraiva, M. & O’Garra, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology* vol. 10 170–181 (2010).
356. Burmeister, A. R. & Marriott, I. The interleukin-10 family of cytokines and their role in the CNS. *Frontiers in Cellular Neuroscience* vol. 12 458 (2018).
357. Ortega, S. B. *et al.* B cells migrate into remote brain areas and support neurogenesis and functional recovery after focal stroke in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 4983–4993 (2020).
358. Bodhankar S, Chen Y, Vandenbark AA, Murphy SJ, Offner H. Treatment of experimental stroke with IL-10-producing B-cells reduces infarct size and peripheral and CNS inflammation in wild-type B-cell-sufficient mice. *Metab Brain Dis.*;29(1):59-73 (2014).
359. Woiciechowsky, C. *et al.* Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nat. Med.* 4, 808–813 (1998).
360. Woiciechowsky, C., Schöning, B., Lanksch, W. R., Volk, H. D. & Döcke, W. D. Mechanisms of brain-mediated systemic anti-inflammatory syndrome causing immunodepression. *Journal of Molecular Medicine* vol. 77 769–780 (1999).
361. Al-Tamimi YZ, Bhargava D, Orsi NM, Teraifi A, Cummings M, Ekbote UV, *et al.* Compartmentalisation of the inflammatory response following aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Cytokine*; 123:154778 (2019).
362. Malek, T. R. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. *J. Leukoc. Biol.* 74, 961–965 (2003).
363. Ross, S. H. & Cantrell, D. A. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* 36, 411–433 (2018).
364. Sredni-Kenigsbuch, D. Th1/Th2 cytokines in the central nervous system. *Int. J. Neurosci.* 112, 665–703 (2002).
365. Gadani, S. P., Cronk, J. C., Norris, G. T. & Kipnis, J. IL-4 in the Brain: A Cytokine to Remember. *J. Immunol.* 189, 4213–4219 (2012).
366. Heeb, L. E. M., Egholm, C. & Boyman, O. Evolution and function of interleukin-4 receptor signaling in adaptive immunity and neutrophils. *Genes and Immunity* vol. 21 143–149 (2020).

367. Zhu, J. T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production. *Cytokine* vol. 75 14–24 (2015).
368. Ibrahim, G. M., Weidauer, S., Vatter, H., Raabe, A. & MacDonald, R. L. Attributing hypodensities on CT to angiographic vasospasm is not sensitive and unreliable. *Stroke* 43, 109–112 (2012).
369. Wey HY, Desai VR, Duong TQ. A review of current imaging methods used in stroke research. *Neurol Res.*;35(10):1092-102 (2013).
370. De Marchis, G. M. *et al.* Brain Injury Visible on Early MRI After Subarachnoid Hemorrhage Might Predict Neurological Impairment and Functional Outcome. *Neurocrit. Care* 22, 74–81 (2015).
371. Korbakis, G. *et al.* MRI Detection of Cerebral Infarction in Subarachnoid Hemorrhage. *Neurocrit. Care* 24, 428–435 (2016).
372. Salem, R. *et al.* Subarachnoid hemorrhage induces an early and reversible cardiac injury associated with catecholamine release: One-week follow-up study. *Crit. Care* 18, (2014).
373. Rachfalska, N., Putowski, Z. & Krzych, Ł. J. Distant Organ Damage in Acute Brain Injury. *Brain Sci.* 10, 1019 (2020).
374. Vergouwen, M. D. I., Vermeulen, M., De Haan, R. J., Levi, M. & Roos, Y. B. W. E. M. Dihydropyridine calcium antagonists increase fibrinolytic activity: A systematic review. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* vol. 27 1293–1308 (2007).
375. Cherry, S. R. *et al.* Total-body PET: Maximizing sensitivity to create new opportunities for clinical research and patient care. *J. Nucl. Med.* 59, 3–12 (2018).
376. Jain, P. *et al.* Neuroinflammation PET Imaging: *Current Opinion and Future Directions.* 61, 1107–1112 (2020).
377. Tanaka, T., Ogata, A. & Narazaki, M. Tocilizumab: An updated review of its use in the treatment of rheumatoid arthritis and its application for other immune-Mediated diseases. *Clin. Med. Insights Ther.* 5, 33–52 (2013).
378. Wei, M. & Duan, D. Efficacy and safety of monoclonal antibodies targeting interleukin-17 pathway for inflammatory arthritis: A meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Drug Des. Devel. Ther.* 10, 2771–2777 (2016).
379. Jeon, C. *et al.* Monoclonal antibodies inhibiting IL-12, -23, and -17 for the treatment of psoriasis. *Hum. Vaccines Immunother.* 13, 2247–2259 (2017).

380. Frieder, J., Kivelevitch, D., Haugh, I., Watson, I. & Menter, A. Anti-IL-23 and Anti-IL-17 Biologic Agents for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Conditions. *Clin. Pharmacol. Ther.* 103, 88–101 (2018).
381. Toğuşlu, G. *et al.* Ameliorating the effects of adalimumab on rabbits with experimental cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Ulus. Travma ve Acil Cerrahi Derg.* 26, 847–852 (2020).
382. Banwell V, Sena ES, Macleod MR. Systematic review and stratified meta-analysis of the efficacy of interleukin-1 receptor antagonist in animal models of stroke. *J Stroke Cerebrovasc Dis.*;18(4):269-76 (2009).
383. Greenhalgh AD, Galea J, Dénes A, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. Rapid brain penetration of interleukin-1 receptor antagonist in rat cerebral ischaemia: pharmacokinetics, distribution, protection. *Br J Pharmacol.*;160(1):153-9 (2010).
384. Singh N, Hopkins SJ, Hulme S, *et al.* The effect of intravenous interleukin-1 receptor antagonist on inflammatory mediators in cerebrospinal fluid after subarachnoid haemorrhage: a phase II randomised controlled trial. *J Neuroinflammation.*;11:1 (2014).
385. Galea J, Ogungbenro K, Hulme S, Patel H, Scarth S, Hoadley M, *et al.* Reduction of inflammation after administration of interleukin-1 receptor antagonist following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: results of the Subcutaneous Interleukin-1Ra in SAH (SCIL-SAH) study. *J Neurosurg.*;128(2):515-523 (2018).
386. Pérez-de Puig I, Miró F, Salas-Perdomo A, Bonfill-Teixidor E, Ferrer-Ferrer M, Márquez-Kisinousky L, Planas AM. IL-10 deficiency exacerbates the brain inflammatory response to permanent ischemia without preventing resolution of the lesion. *J Cereb Blood Flow Metab.*;33(12):1955-66 (2013).
387. Chaudhry SR, Kahlert UD, Kinfe TM, Lamprecht A, Niemelä M, Hänggi D, Muhammad S. Elevated Systemic IL-10 Levels Indicate Immunodepression Leading to Nosocomial Infections after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage (SAH) in patients. *Int J Mol Sci.*;21(5):1569 (2020).
388. Da Silva, I. R. F., Gomes, J. A., Wachorasman, A., de Freitas, G. R. & Provencio, J. J. Hematologic counts as predictors of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J. Crit. Care* 37, 126-129 (2017).