

INTRODUCCIÓN.

1. EL ICTUS.

Un ictus es un síndrome, una condición clínica, que surge como consecuencia de un deterioro brusco de una función cerebral focal resultado, a su vez, de una alteración en los vasos cerebrales. Esa alteración vascular puede ser bien una ruptura de un vaso cerebral con extravasación de sangre (ictus hemorrágico) o bien una oclusión vascular que condiciona la falta de aporte sanguíneo en una parte del cerebro (ictus isquémico). En el caso del ictus isquémico, la falta de aporte de sangre será consecuencia de trombosis o embolismos o disminución del flujo sanguíneo, por enfermedades de los vasos cerebrales (arteriales o venosos), del corazón o de la sangre.

El ictus constituye un problema de salud pública de primer orden. Es la segunda causa más frecuente de muerte en el mundo (tras la cardiopatía isquémica), y la primera causa específica de muerte en España en las mujeres (Alvaro et al. 2009; Suarez et al. 2009). A pesar de ser una enfermedad de personas mayores, es el quinto trastorno que más frecuentemente condiciona años de vida perdidos, una de las principales responsables de discapacidad en el adulto y el origen del consumo de grandes recursos sanitarios y sociales (Lopez et al. 2006).

Para el conjunto de los ictus, los riesgos de morir en los 7 días y en los 30 días siguientes a un primer ictus son alrededor de un 10% y un 20% respectivamente. Los pacientes con ictus hemorrágicos, como se verá después, tienen una mayor mortalidad. Globalmente, a los 6 meses de un ictus sólo alrededor de un 45% de pacientes son independientes (Dennis et al. 1993; Warlow et al. 2003). Pero predecir *a priori*, si un paciente que acaba de sufrir un ictus, sobrevivirá o no, y en qué situación funcional, es actualmente difícil (especialmente cuando se evalúa a los pacientes en los primeros momentos, que es en los que han de tomarse decisiones y medidas de significativo alcance). El pronóstico está vinculado a una gran cantidad de variables (Castillo 1999; Weimar et al. 2002; Muir et al. 2006) clínicas, analíticas, de imagen, de manejo, etc. Incluso utilizando protocolos amplios y bien validados, estos sólo explican alrededor de un 50% de las variaciones que se dan en la situación funcional final (Weimar et al. 2002; Weimar et al. 2004).

1.1. Ictus isquémico

1.1.1. Clasificación temporal: Ataque isquémico transitorio, infarto cerebral.

El cerebro, aunque sólo constituye un 2% del peso corporal, requiere mucha energía: alrededor de un 20% de la tasa metabólica en reposo de un individuo para el mantenimiento básico de su función (Attwell and Laughlin 2001). Aproximadamente un 75% de la energía se destina a los procesos de señalización y sólo un 25% para el resto de funciones celulares. El cerebro es absolutamente dependiente de un metabolismo energético oxidativo para su integridad estructural y funcional. Incluso a su máxima actividad la glucólisis anaerobia, no puede proveer más que una mínima porción de la energía requerida. Puesto que la cantidad de oxígeno almacenado en el cerebro es extremadamente pequeña en comparación con la tasa de utilización del mismo, el cerebro requiere un aporte continuo del mismo procedente de la circulación. (McKenna et al. 2006). No es extraño, por tanto, que si ocurre una falta de aporte sanguíneo y la perfusión no se recupera pronto, se produzca precozmente un daño tisular establecido.

No obstante, a veces, si la isquemia es breve y se restablece pronto la perfusión cerebral, la disfunción neurológica secundaria termina pasándose, constituyendo un episodio clínico recortado con recuperación completa de los síntomas y signos. Estos episodios se denominan ataques isquémicos transitorios (AIT). En los años 60, se estableció un límite temporal arbitrario definiendo como AIT los cuadros clínicos secundarios a isquemia cerebral focal que duraban menos de 24 horas (Albers et al. 2002). Sin embargo, esta idea se ha redefinido en la actualidad por varias razones: i. La mayoría de los episodios de isquemia cerebral transitoria duran mucho menos; el 60% duran menos de una hora, el 71% menos de dos y sólo un 14% duran más de 6 horas (Cucchiara et al. 2006). ii. Menos de uno de cada 6 pacientes en los que el AIT dura una hora se habrá resuelto antes de 24 horas (Levy 1988). iii. Si nos fijamos en el tejido, es frecuente que episodios breves de isquemia cerebral, aún resolviéndose funcionalmente, hayan condicionado un pequeño daño tisular, obviado clínicamente por una rápida compensación por otros lados. Las recientes técnicas de resonancia magnética con imágenes potenciadas en difusión (DWI) nos han mostrado que alrededor de un 30% de los AIT que duran menos de una hora muestran

alteraciones en la señal en las imágenes de difusión. Una vez que el episodio dura más de 6 horas es bastante probable que haya un pequeño infarto subyacente (Easton et al. 2009).

Actualmente se considera AIT, de una forma conceptualmente más simple, como un episodio de disfunción neurológica causada por isquemia cerebral focal, espinal o retiniana que no condiciona un infarto (Easton et al. 2009). Desde un punto de vista práctico, lo más importante de un AIT es que es la expresión clínica de un problema vascular subyacente que supone un riesgo de isquemia cerebral recurrente. Por tanto, es una oportunidad que no debería desperdiciarse para diagnosticar ese trastorno subyacente (habitualmente una vasculopatía aterotrombótica o una cardiopatía embolígena) y para establecer medidas de prevención secundaria que eviten un infarto establecido subsiguiente.

1.1.2. Clasificación topográfica.

De una forma muy básica, la anatomía vascular cerebral puede ser descrita como dos sistemas principales: el sistema anterior, dependiente de las arterias carótidas, y el sistema posterior, dependiente de las vertebrales. Las vertebrales se unen en la arteria basilar y ambos sistemas (anterior y posterior) se conectan en el polígono de Willis. El polígono de Willis se forma por un par de arterias comunicantes posteriores y una arteria comunicante anterior que ponen en contacto las principales arterias intracraneales (arterias cerebrales anteriores y medias – de las carótidas intracraneales – y las arterias cerebrales posteriores – de la basilar -). Dada la ausencia de un sistema valvular en el polígono de Willis, el flujo sanguíneo a través del círculo puede cambiar de sentido según las necesidades. No obstante, ha de tenerse en cuenta que un círculo de Willis completamente desarrollado, con comunicante anterior y comunicantes posteriores plenamente funcionales, se encuentra en alrededor del 30% de la población (Hoksbergen et al. 2000).

Para cada uno de estos dos sistemas arteriales principales descritos hay 3 componentes: el formado por las arterias cervicales extracraneales, el formado por las arterias intracraneales principales y el formado por las pequeñas arterias y arteriolas perforantes, superficiales y profundas. Las arterias extracraneales (por ejemplo, la carótida común) tiene una estructura trilaminar (íntima, media y adventicia) y actúan

como vasos de capacitancia. El número de posibilidades anastomóticas entre ellas es pequeño y puede haber variaciones fisiológicas en la anatomía de su origen del arco aórtico. Las arterias intracraneales principales (por ejemplo la arteria cerebral media) tienen potencialmente posibilidades de conexión bien en la base a través del polígono de Willis o, también, en la superficie del cerebro por arterias comunicantes piales. Por último, las arterias perforantes (por ejemplo las lenticuloestriadas) son arterias pequeñas con un diámetro entre 100 y 400 μm . predominantemente arterias terminales con poco potencial anastomótico y, fundamentalmente, vasos de resistencia.

Por tanto, topográficamente se pueden distinguir infartos en parte o todo el territorio de una de las arterias principales (llamados *infartos territoriales*) que, a su vez, pueden ser del territorio anterior (*carotídeo*) o del territorio posterior (*vertebro-basilar*). Por otro lado estarían los infartos pequeños, de localización profunda, por oclusión de las pequeñas arterias perforantes (*infartos lacunares*).

Fuera de esta clasificación topográfica quedaría la isquemia cerebral consecuencia de un obstáculo al flujo por una trombosis venosa cerebral, algo que es relativamente poco frecuente: 0,5% de los ictus (Boussier and Ferro 2007). Y, a mitad de camino entre lo topográfico y lo fisiopatológico, se podría distinguir un tipo más de infarto cuyo significado y naturaleza no siempre es fácil de establecer: son los llamados infartos de territorio frontera o infartos de último prado. Una combinación de una estenosis de alto grado en una arteria principal con una situación hemodinámica de bajo flujo con disminución de la presión de perfusión asociada a hipotensión arterial sistémica daría lugar a infartos situados en los territorios limítrofes entre las principales arterias intracraneales.

A pesar de la variabilidad de los patrones vasculares, la estimación de las arterias responsables del aporte sanguíneo a la zona infartada ayuda a interpretar adecuadamente la relevancia de los resultados de las investigaciones y de los posibles tratamientos preventivos posteriores (Warlow 2007).

1.1.3. Clasificación etiológica.

Además de la confirmación de la naturaleza del ictus (isquémico vs. hemorrágico) y la estimación de su topografía, la clasificación quizás más importante

es la de su etiología pues ésta condiciona fuertemente cosas tales como el pronóstico, los riesgos posteriores de recurrencia y las medidas de prevención secundaria (Sacco et al. 1991; Petty et al. 2000; Kolominsky-Rabas et al. 2001; Rothwell et al. 2003; Lovett et al. 2004). En los años 90 la clasificación TOAST se convirtió en un sistema de clasificación etiológica ampliamente utilizado (Adams et al. 1993). Recientemente, ha sido refinado incluyendo nuevos conocimientos y técnicas de estudio (Ay et al. 2005) pero mantiene las mismas grandes 5 categorías etiológicas:

1. Infartos por arteriosclerosis de grandes arterias.
2. Infartos por embolismo de origen cardiaco / aórtico.
3. Infartos por enfermedad de las pequeñas arterias.
4. Infartos por un conjunto heterogéneo de "otras causas".
5. Infartos de causa indeterminada.

Cada categoría etiológica puede dividirse, en función del peso de las pruebas, en infartos por esa causa de tipo: evidente, probable o posible.

Así, por ejemplo, se establece que un infarto es por arteriosclerosis "evidente" cuando se registra que existe una alteración arteriosclerosa de la arteria clínicamente relevante (extracraneal o intracraneal grande) que ocluye o estenosa su luz en $\geq 50\%$ y no hay infarto agudo en otros territorios vasculares diferentes del que corresponde a la arteria en cuestión. En cambio, sería sólo posible si la afectación arteriosclerosa de la arteria relevante es leve ($< 50\%$) con datos de su inestabilidad por dos AIT previos.

Las potenciales fuentes de embolismos de origen cardioaórtico agrupados según lo más o menos evidente de su riesgo de ictus se exponen en la Tabla I.

Tabla I: Fuentes de embolismo cerebral de origen cardioaórtico.

A. De alto riesgo primario de infarto cerebral

Fuentes de embolismo de origen trombótico

Trombo en aurícula izquierda.
Trombo ventricular izquierdo.
Fibrilación auricular.
Fibrilación auricular paroxística.
Síndrome del seno enfermo.
Flutter auricular sostenido.
Infarto de miocardio reciente (menos de 1 mes)
Valvulopatía mitral aórtica o mitral.
Bioprótesis y válvulas mecánicas
Infarto de miocardio crónico junto con FE < 28%
Insuficiencia cardiaca congestiva con FE < 30%
Miocardiopatía dilatada
Endocarditis trombótica no bacteriana

Fuentes de embolismo de origen no predominantemente trombótico

Endocarditis infecciosa.
Fibroelastoma papilar
Mixoma auricular izquierdo.

B. De riesgo primario de infarto cerebral bajo o incierto

Fuentes cardiacas

Calcificación del anillo mitral.
Foramen oval permeable
Aneurisma del septo auricular.
Aneurisma septal atrial y FOP
Aneurisma ventricular izquierdo sin trombo
“Humo” ecográfico auricular izquierdo (sin estenosis mitral o FA)

Fuentes aórticas

Ateroma complicado en la aorta ascendente o arco proximal.

El grupo de los infartos por enfermedad de pequeño vaso incluiría infartos pequeños (< 20 mm en Resonancia Magnética Nuclear de difusión; < 15 mm en fase crónica), localizados en los territorios de las pequeñas arterias perforantes del tronco del encéfalo o de la región de los ganglios de la base y manifestados, preferentemente, por los llamados síndromes lacunares.

La categoría de infartos por “otras causas” incluye un grupo heterogéneo, difícil de subdividir, de causas menos frecuentes tales como disecciones arteriales, enfermedades inflamatorias o infecciosas de las arterias, trastornos de las plaquetas o del sistema de la hemostasia, arteriopatías de base genética (por ejemplo, el CADASIL: leucoencefalopatía e infartos subcorticales por arteriopatía cerebral autosómica dominante), causas iatrogénicas (procedimientos endovasculares, cirugía cardiaca o arterial), etc.

El grupo de infartos de causa indeterminada incluiría aquellos con presencia de más de una causa evidente que hace imposible atribuir una única responsabilidad, aquellos con causa indeterminada por un estudio insuficiente y aquellos de causa desconocida (criptogénicos).

La clasificación TOAST se expone en la Tabla II (Ay et al. 2005).

Tabla II. Clasificación TOAST.		
Mecanismos de ictus	Nivel de confianza	Criterios
Arteriosclerosis de arterias grandes		
	Evidente	1. Alteración vascular juzgada como debida a arteriosclerosis con estenosis (reducción $\geq 50\%$ del diámetro) u oclusión en las arterias extracraneales o intracraneales clínicamente relevantes y 2. Ausencia de infarto <u>agudo</u> en territorios vasculares distintos a los correspondientes a la arteria estenosada u ocluida.
	Probable	1. Historia previa en el mes anterior de uno o mas episodios de Amaurosis fugax, AIT o ictus en el territorio de la arteria relevante, afectada por arteriosclerosis o 2. Evidencia de estenosis casi oclusiva u oclusión no crónica juzgada por arteriosclerosis en la arteria extracraneal o intracraneal clínicamente relevante (excepto para las a. vertebrales) o 3. Presencia de infartos en territorios de último prado o multiples infartos separados en el tiempo sólo en el

		territorio de la arteria afecta
	Posible	<p>1. Presencia de una placa arteriosclerótica que protuye en la luz causando una estenosis leve (< 50%) en una arteria extracraneal o intracraneal clínicamente relevante e historia previa de dos o más amaurosis fugax, AIT o ictus en el territorio tributario de la arteria afecta, con al menos uno de los acontecimientos, en el mes previo o</p> <p>2. Evidencia de arteriosclerosis de grandes arterias en ausencia de una investigación completa de otros mecanismos.</p>
Embolismo Cardioaórtico		
	Evidente	Presencia de una fuente cardíaca de alto riesgo de embolismo cerebral
	Probable	<p>Pruebas de embolismo sistémico o</p> <p>Presencia de múltiples infartos que han ocurrido próximos en el tiempo tanto en la circulación anterior derecha e izquierda o tanto en la circulación anterior y posterior en ausencia de estenosis casi oclusiva u oclusión de los vasos tributarios; otras enfermedades que pueden causar lesiones isquémicas multifocales tales como vasculitis, vasculopatías, trastornos hemodinámicos y hemostáticos no deben estar presentes.</p>
	Posible	<p>Presencia de una afectación cardíaca con riesgo bajo o incierto de embolismo cerebral (ver tabla 2) o</p> <p>Existencia de causas evidentes de embolismo de origen cardio aórtico en ausencia de una completa investigación de otros mecanismos</p>
Oclusión de arteria pequeña		
	Evidente	Pruebas de imagen de un único infarto agudo clínicamente compatible, de diámetro mayor inferior a 20 mm, situado en los territorios de arterias perforantes de ganglios basales o tronco en ausencia de alteración en la arteria matriz que da origen a esas perforantes (ateroma focal, disección del vaso, vasculitis, vasoespasmo, etc).
	Probable	Presencia de AIT lacunares típicos en la semana previa
	Posible	<p>Síndrome lacunar clásico en ausencia de imagen suficientemente sensible para detectar infartos pequeños o</p> <p>Pruebas contundentes de oclusión de arteria pequeña en ausencia de una investigación completa de otros</p>

		mecanismos.
Otros mecanismos		
	Evidente	Presencia de una enfermedad específica diferente de las previas que afecta a las arterias cerebrales clínicamente apropiadas.
	Probable	Existencia de un proceso específico que ha ocurrido en clara y estrecha relación con el inicio del infarto cerebral como disección arterial, cirugía cardíaca o arteria o intervenciones cardiovasculares.
	Posible	Existencia de pruebas evidentes de un proceso causal diferente de los habituales en ausencia de un estudio diagnóstico completo de los mismos.
Causa indeterminada		
	Desconocida (inexistencia de criterios de causa evidente ni posible previos)	Embolismo criptogénico 1. Interrupción angiográfica abrupta consistente con coágulo en arterias intracraneales por otro lado aparentemente normales o 2. Pruebas de imagen de recanalización completa de una arteria previamente ocluida o 3. Presencia de múltiples infartos agudos estrechamente relacionados en el tiempo sin anomalía detectables en los vasos relevantes. Otros infartos criptogénicos: Aquellos que no cumplen criterios de embolismo criptogénico. Evaluación incompleta: Ausencia de estudios diagnósticos que, a juicio del examinador, habrían sido esenciales para descubrir la causa.
	Inclasificados	Presencia de más de un mecanismo evidente con, o bien criterios de probabilidad para cada uno de ellos, o ausencia de criterios de probabilidad que permitan establecer una única causa.

1.1.4. Neuropatología del infarto cerebral

En las primeras horas de un infarto, macroscópicamente es poco lo que se puede apreciar. La parte cerebral afectada tarda horas en poderse apreciar pálida, blanda y tumefacta y días en adquirir una consistencia gelatinosa y friable con un límite definido con el tejido normal adyacente.

Los cambios microscópicos son más precoces. La secuencia de cambios microscópicos en un infarto cerebral incluye microvacuolas en las neuronas

(mitocondrias tumefactas), vacuolización perineural (procesos astrocíticos tumefactos), incremento de la eosinofilia de citoplasma neuronal, desaparición de los cuerpos de Nissl, núcleos picnóticos y desaparición de los nucléolos (Kalimo et al. 1982). Según pasan las horas se apreciarán, fundamentalmente, los cambios patológicos en las células correspondientes a la necrosis (ver más adelante, en apartado de apoptosis) junto con el aumento progresivo de la migración de neutrófilos. Las células fagocíticas son evidentes al llegar las 48 horas y pasan a ser el tipo celular predominante en las 2-3 semanas siguientes. Los macrófagos se llenan de productos de degradación de la mielina y/o sangre. A medida que pasa el tiempo se establece un proceso de licuefacción y fagocitosis. Los astrocitos de los bordes aumentan, se dividen y desarrollan una amplia red de extensiones protoplásmicas. Ese proceso de licuefacción y eliminación del tejido afectado deja una cavidad llena de líquido con una pared formada por una densa trama de fibras gliales (Robbins et al. 1994).

1.1.5. Mecanismos bioquímicos del daño hipóxico-isquémico cerebral.

En el ictus isquémico, al final, por alguna de las causas revisadas, por alguno de los distintos mecanismos de oclusión, en alguna de las localizaciones, con compensaciones mejores o peores, el resultado es una zona de tejido cerebral en isquemia con la consecuente alteración de una o varias funciones cerebrales focales.

La muerte celular en la isquemia cerebral es posiblemente el resultado de una compleja maraña de fenómenos bioquímicos interrelacionados que incluyen excitotoxicidad, acidosis, ondas de despolarización peri-infarto, estrés oxidativo, inflamación y mecanismos apoptóticos.

Excitotoxicidad.

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador en el SNC. Se conoce como excitotoxicidad a la muerte neuronal asociada con la sobre-estimulación de los receptores de glutamato. Los receptores del glutamato se clasifican en dos grandes grupos:

- ✓ Ionotrópicos (canales catiónicos operados por ligandos): Son los receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico (AMPA) y Kainato (KA). Los NMDA, son permeables a Na^+ y Ca^{2+} , mientras que los AMPA y KA son principalmente permeables a Na^+ (Monaghan et al. 1989).
- ✓ Metabotrópicos (acoplados a proteínas G): Se clasifican en Grupo I (mGluR 1 y 5), Grupo II (mGluR 2 y 3) y Grupo III (mGluR 4, 6, 7 y 8) (Kew and Kemp 2005)

La falta de aporte de oxígeno que conlleva la isquemia condiciona una imposibilidad para la síntesis de ATP. La caída de ATP impide la función de la bomba iónica Na^+/K^+ de la membrana celular. Esto provoca la despolarización de la membrana con liberación de K^+ al espacio extracelular y entrada de Na^+ al interior de la célula (Caplan 2000). El fallo energético también determina el fallo de las bombas iónicas que mantienen baja la concentración intracelular de Ca^{2+} , provocando una elevación de las concentraciones intracelulares del mismo, hecho que es central en la isquemia (Broughton et al. 2009).

Pero lo que ahora interesa resaltar es que la despolarización de membrana y la acumulación de Na^+ intracelular llevan a un fallo de los transportadores de glutamato Na^+ -dependientes que, en condiciones fisiológicas, consiguen mantener baja la concentración sináptica de glutamato. El incremento del glutamato sináptico estimula los receptores NMDA, permeables al Ca^{2+} , lo que exacerba la sobrecarga intracelular del mismo. A la vez, los receptores AMPA, normalmente poco permeables al Ca^{2+} , incrementan su permeabilidad al mismo hasta 18 veces en situación de isquemia (Olney 1969). La estimulación de los receptores metabotrópicos también puede contribuir a la excitotoxicidad. Por ejemplo, la estimulación de mGluR1 (que se expresa en neuronas GABAérgicas) inhibe la liberación del neurotransmisor inhibidor ácido gamma-aminobutírico (GABA) y mGluR5, conectado física y funcionalmente con los receptores NMDA, amplifica la activación de los mismos (Pellegrini-Giampietro 2003)

La elevación del Ca^{2+} intracelular activa muchas proteínas efectoras dependientes del catión. Algunas de ellas son: proteasas, fosfolipasas, endonucleasas, calpaínas, etc. (Edvinsson et al. 2002). Esta actividad catalítica (sin posibilidad de resíntesis ante la falta de ATP) llevaría a la necrosis de estructuras celulares esenciales (Doyle et al. 2008).

Acidosis.

Uno de los elementos neuroquímicos característicos del metabolismo anaerobio que determina la isquemia es la acidosis. Los protones disociados activan canales iónicos que son permeables al Ca^{2+} y que exacerban, aún más, la entrada de Ca^{2+} por un fenómeno independiente del glutamato (Simon 2006) (Pignataro et al. 2007). La hiperglucemia, en un entorno de isquemia, incrementa el lactato disminuyendo aún más el pH, lo que acentuaría aún más el fenómeno.

Además, la acidosis inhibe la fosforilación oxidativa (Hillered et al. 1985), contribuyendo a la depleción energética, favorece la edematización celular, aumenta la concentración de Ca^{2+} libre intracelular al liberarlo de su unión a proteínas (Folbergrova et al. 1990), contribuye a la lesión endotelial y a la alteración secundaria de la microcirculación y libera Fe^{2+} de su unión a proteínas en depósitos intracelulares lo que facilita la formación de radicales libres (Lipscomb et al. 1998).

Despolarizaciones peri-infarto.

Son ondas de despolarización con las características de las ondas de depresión cortical propagada: ondas de actividad electro-química auto-propagadas que progresan a través de la corteza condicionando despolarización celular, depresión de la actividad eléctrica, incremento de la liberación del glutamato y pérdida de los gradientes de membrana iónicos (Gonzalez et al. 1992). Aunque en el cerebro perfundido normalmente estas ondas de despolarización no conducen a la muerte celular, en las zonas de penumbra, parecen estar asociados a un aumento del daño isquémico (Fabricius et al. 2006). Se piensa que las despolarizaciones repetidas podrían, en una situación de isquemia parcial, llevar a la acumulación de un nivel de calcio intracelular crítico que disparase el proceso de muerte celular (Doyle et al. 2008).

Estrés oxidativo

Se puede definir como la situación en la que las sustancias oxidantes exceden patológicamente, sobrepasando la capacidad de las defensas antioxidantes celulares, condicionando con ello daño en el organismo. En la isquemia distintos mecanismos

pueden llevar a la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS) tales como la sobrecarga de Ca^{2+} , la inhibición mitocondrial o la inflamación.

Así, el anión superóxido se puede generar por acción de enzimas como la xantina oxidasa, cuya actividad depende de la calpaína, una de las proteasas que activa la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular (Won et al. 2002). Otro mecanismo sería el relacionado con el óxido nítrico, un radical libre altamente difusible, de corta vida media, sintetizado por las óxido nítrico sintasas (NOS) que, en condiciones fisiológicas, funciona como un importante segundo mensajero (Moncada and Bolanos 2006). En la isquemia hay un incremento de las NOS (nNOS y eNOS) y, en fases más tardías, de la iNOS en células gliales y en los neutrófilos que infiltran el tejido. La nNOS se localiza en la proximidad del receptor NMDA gracias a la interacción de ambos con la proteína PSD95, que actúa como puente. Así, la entrada de Ca^{2+} a través del receptor NMDA activa la NOS neuronal. La excesiva producción de óxido nítrico resulta tóxica tanto por sí misma como por su combinación con otras ROS como el anión superóxido para formar peroxinitrito, compuesto muy lábil que se descompone rápidamente para rendir, entre otros compuestos, radicales hidroxilo (Bolanos et al. 2009) (Moro et al. 2005) (Almeida and Bolanos 2001 676).

Por otro lado, la acumulación de Ca^{2+} en la mitocondria desacopla la cadena transportadora de electrones y colapsa el potencial de membrana mitocondrial, de manera que se acumulan electrones libres en la mitocondria. La reacción de estos con el oxígeno, especialmente tras la reperusión, produciría anión superóxido. Este, con la superóxido dismutasa da lugar a H_2O_2 , sustancia poco reactiva pero con capacidad oxidante. El anión superóxido, por otro lado, puede reaccionar en presencia de hierro dando lugar a radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) (reacción de Fenton) (Kowaltowski et al. 2009).

Los radicales libres producirían muerte neuronal a través de un conjunto de mecanismos que implican la pérdida de la carga energética celular, la peroxidación de lípidos y proteínas, la nitración de proteínas y el daño del ADN, entre otros (Arundine and Tymianski 2004; Kowaltowski et al. 2009). Debe resaltarse que, además, el estrés oxidativo y/o nitrosativo puede causar la muerte neuronal por necrosis cuando es intenso, pero también por apoptosis cuando es moderado (Almeida and Bolanos 2001; Diaz-Hernandez et al. 2007)

La participación del estrés oxidativo en el daño neuronal isquémico queda patente también en los efectos del Nrf2 (*Nuclear factor erythroid-related factor 2*).

Éste es un factor de transcripción que regula un conjunto de genes antioxidantes que actúan sinérgicamente para eliminar ROS a través de reacciones enzimáticas secuenciales (Nguyen et al. 2009). Distintos estudios experimentales han mostrado que el incremento de la actividad Nrf2 reduce el daño cerebral isquémico (Shih et al. 2005; Johnson et al. 2008).

Inflamación

La inflamación contribuye al daño cerebral relacionado con el ictus. Sin embargo, el efecto individual de cada componente de la cascada inflamatoria puede ser más o menos beneficioso o perjudicial, en función del momento, de la magnitud y de si el componente inflamatorio activa o no vías neuroprotectoras (Doyle et al. 2008).

Los ictus determinan neutrofilia, linfocitopenia y aumento del número de monocitos circulantes (Ross et al. 2007). Tras un infarto cerebral, se acumulan los neutrófilos en el área dañada, primero en los capilares; posteriormente hay transmigración en el tejido cerebral, proceso facilitado por la alteración de la barrera hemato-encefálica. El proceso de reclutamiento de neutrófilos podría contribuir al daño isquémico por el bloqueo de la microcirculación (Huang et al. 2006), por liberación de radicales libres y de enzimas proteolíticas.

Hay abundante información sobre las modificaciones de los componentes humorales de la inflamación. Las citocinas relacionadas con el ictus isquémico agudo más estudiadas son el TNF- α , las interleucinas 1 β , 6, 20, 10 y TGF- β . Mientras IL 1 β y TNF- α parecen exacerbar el daño cerebral isquémico, TGF- β e IL-10 podrían ser neuroprotectoras (Spera et al. 1998; Zhu et al. 2002b).

Las moléculas de adhesión celular se mantienen sobreexpresadas varios días tras el ictus, como resultado del efecto de las citocinas. Las moléculas de adhesión celular intervienen en la adhesión y migración de leucocitos. Selectinas (especialmente E y P) y la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) preceden a la invasión de neutrófilos en el cerebro.

Las metaloproteinasas de matriz (MMP) son una familia de enzimas proteolíticas responsables del remodelamiento de la matriz extracelular. La expresión de MMPs en el cerebro normal es mínima, pero se activan en el cerebro en respuesta

al daño isquémico, especialmente MMP2 y 9 (Montaner et al. 2001; Castillo et al. 2009). Estudios experimentales sugieren que la ruptura de la barrera hematoencefálica es el resultado de la activación de MMPs (Asahi et al. 2001) con la repercusión que ello tendría en los fenómenos de edema y eventual transformación hemorrágica de los infartos cerebrales.

El daño cerebral intenso altera la función de las células de respuesta inmune, innata y adaptativa, en una inmunodepresión sistémica que podría tener que ver con la facilidad para las infecciones de los pacientes tras un ictus. Una respuesta inmunomoduladora que se ha postulado que buscaría prevenir de reacciones autoinmunes contra antígenos del sistema nervioso central expuestos con la agresión isquémica (Meisel et al. 2005) y en la que tendrían un papel crucial los linfocitos T reguladores (Liesz et al. 2009)

Apoptosis

Debido al papel central que tiene este epígrafe para el presente trabajo de investigación, se desarrollará de forma amplia más adelante.

1.2. Ictus hemorrágico.

Una hemorragia intracerebral (HIC) consiste en la brusca extravasación de sangre en una zona del parénquima cerebral, como consecuencia de una alteración en el árbol vascular. Constituye un 10-15% del total de los ictus (Qureshi et al. 2009). La localización del sangrado en el interior del parénquima la distingue de otras hemorragias intracraneales, que no se considerarán aquí por no afectar de la misma forma al tejido cerebral: hemorragia subaracnoidea, subdural y epidural.

Es una enfermedad grave. En conjunto, la tasa de mortalidad al mes de una HIC se sitúa cerca del 50% (Lovelock et al. 2007; Sacco et al. 2009), pero existen bastantes diferencias según la localización, el volumen de sangre extravasado, la edad del paciente y la intensidad de la afectación inicial. Además, los que sobreviven tienen un gran riesgo de secuelas, con solo un 20% de los pacientes a los 6 meses

funcionalmente independientes (Sacco et al. 1994). La incidencia ajustada en la población caucásica es de 0,16/1000 habitantes y año (IC 95%: 0,12 – 0,20) (Lovelock et al. 2007). Es mayor en poblaciones de raza afro americana, en hispanos (Broderick et al. 1992; Bruno et al. 1996) y en poblaciones asiáticas (Sacco et al. 1994). Su incidencia aumenta con la edad, aunque la tasa de incremento no es tan alta como en el infarto cerebral (Ariesen et al. 2003). La edad media de presentación es a los 76 años.

1.2.1. Etiología

La mayoría de las HIC aparecen “espontáneas”, es decir, no como consecuencia directa e inmediata de una causa concreta, sino como expresión de una ruptura espontánea, eso sí, de arterias previamente dañadas de forma crónica. Estas son las hemorragias intracerebrales **primarias**. Las dos arteriopatías subyacentes más frecuentes en las HIC primarias son la arteriopatía hipertensiva y la angiopatía amiloide.

En cambio se consideran hemorragias intracerebrales **secundarias** a circunstancias más directas las que surgen por:

- ✓ Malformaciones vasculares.
- ✓ Traumatismos.
- ✓ Coagulopatías.
- ✓ Conversión hemorrágica de un infarto.
- ✓ Neoplasias intracraneales.
- ✓ Cocaína o drogas simpáicomiméticas.
- ✓ Trombosis de senos venosos cerebrales.
- ✓ Vasculitis del SNC

1.2.2. Clasificación topográfica

Existe un acuerdo básico en distinguir dos grupos de HIC según la localización del hematoma.

- ✓ Las HIC **profundas**. Aquí se incluirían las localizadas en los núcleos grises profundos de los hemisferios cerebrales: lenticular, caudado y tálamo.

Además, las hemorragias en el tronco y las del cerebelo, al asentar en territorios tributarios del mismo tipo de arterias, se suelen relacionar con estas HIC profundas. El hecho de que ocurran en zonas que son territorio de distribución de las arterias perforantes de pequeño tamaño, su fuerte asociación con la hipertensión arterial (HTA) y su aparición en pacientes relativamente más jóvenes sugiere que comparten mecanismos patogénicos. Estos, estarían vinculados a las alteraciones patológicas de ese tipo de arterias consecutivas a la hipertensión arterial, alteraciones que son comunes a las que subyacen en los infartos de pequeño vaso (lacunares). Según ésta hipótesis, la lipohialinosis de esas arterias podría llevar en unos casos a infartos lacunares y, en otros, a hemorragias profundas (Fisher 1971).

- ✓ Las hemorragias **lobulares**: Este otro gran grupo topográfico agruparía a las que aparecen en la sustancia blanca subcortical de los lóbulos cerebrales. En este grupo es menos prevalente la HTA y más prevalente, como arteriopatía subyacente, la angiopatía amiloide (Juveta and Kase 2006).

1.2.3. Neuropatología

En lo que respecta a la neuropatología de las hemorragias intracerebrales asociadas a hipertensión y localizadas en los ganglios de la base, los dos hallazgos fundamentales en las arterias alteradas son la necrosis fibrinoide y los aneurismas miliares de Charcot Buchard.

- ✓ La necrosis fibrinoide consiste en la existencia de segmentos de pared de las arteriolas (subintimal o en toda la capa media) con un depósito de material amorfo, eosinofílico, que tiñe para fibrina. Se considera que es el resultado del daño de la pared como consecuencia de la insudación de proteínas plasmáticas (Rosenblum 2008). Aunque no exclusivo, si aparece fuertemente vinculado a la hipertensión arterial. El término es equivalente al utilizado por Fisher (Fisher 1971) de lipohialinosis, que aquí no se utilizará para evitar confusión con la hialinización, otro fenómeno morfológico sólo parecido (material amorfo, eosinofílico pero que no tiñe para fibrina sino que parece un material más amorfo, fluido y con colágeno), fenómeno que es más ubicuo y menos específico. Las arteriolas cerebrales, especialmente las perforantes,

parecen más susceptibles a desarrollar degeneración (necrosis) fibrinoide por HTA que otras arteriolas (Feigin and Prose 1959).

- ✓ Los aneurismas miliares de Charcot Buchard, descritos hace más de 100 años, son aneurismas diminutos que surgen en arteriolas cuyo diámetro es generalmente < 300 microns (Cole and Yates 1967). Su papel en la génesis de las hemorragias cerebrales continua aún siendo discutido pues, no siempre aparecen ni parece claro que sean siempre el punto sangrado. Posiblemente sean una de las posibles formas de evolucionar una pared con necrosis fibrinoide, pero no siempre necesariamente el punto de sangrado.

En lo que respecta a la neuropatología de las hemorragias más superficiales, lobulares, no vinculadas a hipertensión el hallazgo más significativo es, como se dijo más arriba, la vasculopatía que resulta del depósito de proteínas fibrilares amiloideas en las paredes de los vasos cerebrales y meníngeos: angiopatía amiloide cerebral (AAC). La variedad más frecuente de AAC es la enfermedad esporádica consistente en el depósito de proteína amiloide A β , resultado de la escisión de la proteína transmembrana precursora de A β (APP). Esta, está codificada en el cromosoma 21 y se expresa en las células endoteliales, pericitos, células musculares lisas y células de la adventicia de los vasos sanguíneos. El depósito de proteína A β ocurre, sobre todo, en las arterias pequeñas y de mediano calibre del cerebro y en arterias leptomeníngeas, siendo raro en capilares y venas. La afectación por AAC es rara en tálamo, ganglios de la base y sustancia blanca profunda (Xu et al. 2003). Esta distribución posiblemente condicione la localización lobular de las hemorragias por esta vasculopatía. Las paredes de las arterias afectas están engrosadas por el depósito de amiloide amorfo, intensamente eosinofílico, Rojo Congo positivo y birrefringente. El depósito es, sobre todo, en la capa media y adventicia. Se asumen como pasos en la patogénesis del trastorno que el depósito y acumulación de amiloide llevaría a la destrucción de las células musculares lisas, con ello a la dilatación de la arteria y alteración de la barrera hematoencefálica que, a su vez, facilitaría el paso de proteínas plasmáticas a la pared del vaso, el desarrollo de necrosis fibrinoide y finalmente, con esto, se facilitarían la ruptura (Mandybur 1986).

Independientemente de la causa de la arteriopatía subyacente, a partir de la ruptura abrupta de una arteria o de una arteriola se produce el sangrado. El punto de sangrado principal lleva a la acumulación de sangre que en parte destruye el tejido local, en parte desplaza y en parte diseca. Secciones histológicas seriadas muestran

que hay varios puntos de sangrado, algunos en los márgenes del hematoma, con lo que se diferencian el punto primario de puntos secundarios de sangrado (Fisher 1971). Se interpreta que, en su expansión, el hematoma facilita el desarrollo de nuevos puntos de sangrado de menor tamaño. Los puntos de sangrado aparecen como un agregado de plaquetas mezcladas y rodeadas por fibrina (globos de fibrina) (Rosenblum 2008). La agregación plaquetaria se acompaña de la activación de las proteínas de la coagulación y la formación de coágulos de fibrina (al principio no retraído, que luego se retrae, proceso que *in vitro* dura 4 horas (Hayman et al. 1989). La mayor parte del suero queda en la matriz del coágulo. Un poco forma una banda de líquido proteináceo alrededor (Enzmann et al. 1981; Takasugi et al. 1985). Por otro lado también se activa el sistema fibrinolítico. Los hematíes tienen hemoglobina que se va transformando en desoxihemoglobina y metahemoglobina (Enzmann et al. 1981).

Después de horas o días, se desarrolla un edema extracelular en la periferia del hematoma, este edema se cree que es de tipo vasogénico. Además, en la periferia se organiza un infiltrado de polinucleares que alcanza el máximo a los 4 días y se continúa con la llegada de microglia que se transformará en macrófagos cargados de los productos residuales. En fases más avanzadas hay proliferación de astrocitos en la periferia. Una vez completado el proceso de reabsorción y reparación, los astrocitos son reemplazados por abundantes fibrillas gliales (Lindsberg et al. 2010).

1.3. Apoptosis e ictus.

1.3.1. Apoptosis: conceptos básicos.

Se emplea el término apoptosis para definir un proceso celular, genéticamente controlado, por el que las células inducen su propia muerte en respuesta a una serie de estímulos. Lo distintivo de la apoptosis está en el control que las células ejercen sobre el propio proceso de muerte. En la necrosis, en cambio, las células sufren el efecto del insulto como sujetos pasivos y, en general, no tienen control sobre el proceso. Se suele equiparar la apoptosis con el concepto amplio de muerte celular programada. No obstante, cada vez está más respaldada la idea de que existen otras formas de muerte celular programada distintas de la apoptosis, como es la autofagia

(Bredesen et al. 2006). Podría ser que necrosis y apoptosis representen las formas visibles más extremas de un continuum de formas de muerte celular en el cual lo distintivo sería el grado de control que alcanza a desempeñar la célula sobre el propio proceso de su muerte (Banasiak et al. 2000).

La apoptosis es muchas veces un proceso fisiológico. Es una manera de eliminarse células de una forma controlada para minimizar el riesgo de trastornos y daños en las células vecinas (Taylor et al. 2008). El número de células en los organismos multicelulares complejos está estrechamente regulado, no solo mediante el control de la tasa de división celular sino también por el control de la tasa de muerte celular. Si la célula no debe mantenerse, se activa el programa intracelular de muerte, de ahí el frecuente término de “suicidio celular”. Así, por ejemplo, los mamíferos nacen con un exceso de neuronas de forma que, tras el nacimiento, se ha de eliminar casi hasta un 50% de las mismas para ajustarlas a las células diana que requieren inervación (Oppenheim 1991). En un adulto humano sano, millones de células mueren cada hora en la médula ósea o en el intestino equilibrando su producción continua. Además, esta forma de muerte celular programada es una forma de defensa para eliminar de una forma más segura células potencialmente peligrosas: células infectadas por virus (limitando la extensión del virus) o células con mutaciones potencialmente vinculadas a una proliferación celular incontrolada (cancerosa).

Durante estas décadas la utilización del término en la literatura científica ha aumentado de forma exponencial pero no siempre ajustándose a los mismos criterios de definición. Esto ha desdibujado su significado e introducido una variabilidad añadida que dificulta entender la realidad de los resultados de los estudios que evalúan este concepto en las enfermedades humanas (Graeber and Moran 2002). De ahí que, para juzgar acertadamente lo que realmente está probado sobre la apoptosis en el ictus, sea necesario volver unos pasos atrás y ver una serie de conceptos básicos sobre la apoptosis.

Observaciones de muerte celular fisiológica en la metamorfosis de los anfibios ya habían sido realizadas en el siglo XIX y el término de muerte celular programada fue utilizado en 1964 por Lockshin y colaboradores al describir el patrón aparentemente predeterminado por el que las células morían durante el desarrollo de un insecto (Zakeri 2008). Sin embargo, fue J Kerr en 1972 quien acuñó el término apoptosis y

estableció la primera descripción histológica sistematizada (Kerr et al. 1972). Por tanto, su primera definición operativa fue, en origen, morfológica.

¿Y qué cambia morfológicamente? La célula se redondea y retrae de las vecinas (se pierden las uniones célula a célula) y el citoplasma parece laxo con unas protuberancias anchas en la superficie. La cromatina se condensa y el núcleo se fragmenta. Aunque más sutil morfológicamente, hay también una fragmentación de las mitocondrias y otros orgánulos celulares. Finalmente, las protuberancias del citoplasma se cierran haciendo que la célula se divida en pequeños fragmentos rodeados de membrana (cuerpos apoptóticos) que son retirados por fagocitosis sin provocar una respuesta inflamatoria (Kerr et al. 1972). En la necrosis, en cambio, hay una ruptura de la integridad de la membrana, tumefacción y desintegración de las organelas citoplasmáticas, incluyendo la mitocondria, dispersión de los ribosomas y dilatación, fragmentación y vesiculación de las cisternas del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi (Clarke et al. 1998). Al derramarse el contenido celular en el espacio extracelular con frecuencia la necrosis induce una respuesta inflamatoria.

Estos cambios morfológicos de la apoptosis se corresponden a nivel del proteoma con un proceso de proteólisis restringida de cientos de proteínas. Este proceso se lleva a cabo por unas cisteín aspartil proteasas llamadas caspasas. Estas caspasas vendrían a ser una especie de agentes especializados para una demolición organizada de la célula sin daños a las células vecinas. Estas proteasas están presentes en las células sanas como precursores inactivos (zimógenos) (Pop and Salvesen 2009).

Se distinguen dos grupos de caspasas: iniciadoras y efectoras. Las iniciadoras activan a las efectoras y éstas, en cambio, escinden otras proteínas. Se consideran iniciadoras las caspasas 8, 9 y 10. Las principales efectoras son las 3, 6 y 7 (Sastry and Rao 2000; Green 2005). No todas las caspasas participan en la apoptosis. Por ejemplo, caspasas 1, 4, 5 y 12 están más involucradas en la regulación de las citocinas inflamatorias (Luthi and Martin 2007).

Como resultado de su actividad se producen entre otros fenómenos:

- ✓ Fragmentación de constituyentes del citoesqueleto, como microfilamentos de actina y proteínas asociadas a la misma.
- ✓ Desintegración de la lámina nuclear.
- ✓ Desmantelamiento de los sitios de adhesión.

- ✓ Activación de cinasas que fosforilan las histonas para la condensación de la cromatina.
- ✓ Modificación de factores de transcripción, factores iniciadores de la traducción y proteínas ribosomales.
- ✓ Fragmentación de orgánulos celulares.

Al final la célula se divide en cuerpos apoptóticos proceso que se supone que facilita la eliminación ordenada y sin ruptura de las membranas plasmáticas por parte de los fagocitos. A pesar de la importancia de la fagocitosis, el cómo las células apoptóticas coordinan su reconocimiento por los fagocitos no está claro. El mejor ejemplo de ligando para los fagocitos es la fosfatidil serina, fosfolípido de membrana que normalmente está confinado a la cara interna de la membrana plasmática, pero que se trasloca al exterior en respuesta a los estímulos proapoptóticos donde induce la fagocitosis (Martin et al. 1995; Martin et al. 2009).

De hecho, la apoptosis es un proceso activo de la célula, que precisa energía y, por tanto, dependiente de que exista un metabolismo energético funcional en esa célula que ha sido destinada a morir (Nicotera et al. 2000).

1.3.2. Mecanismos moleculares de la apoptosis

La activación bioquímica de la apoptosis clásica ocurre a través de dos rutas principales, son las llamadas vías extrínseca e intrínseca. La vía extrínseca se origina con la activación de unos receptores celulares (como el Fas) y condiciona la activación de las caspasas iniciadoras 8 ó 10 (Salvesen and Dixit). La vía intrínseca se origina con la liberación mitocondrial de citocromo c y la activación de la caspasa iniciadora 9 (Esquema I). Una tercera vía, peor caracterizada (esencialmente una segunda vía intrínseca), se origina en el retículo endoplásmico (Bredesen et al. 2006).

Como se introducía previamente, la vía extrínseca comienza tras la unión de proteínas extracelulares de señalización a unos receptores de la superficie celular denominados receptores de muerte celular. Pertenecen a la familia de receptores TNF (*Tumor necrosis factor*; que incluye el propio receptor TNF y el receptor de muerte Fas). Los ligandos pertenecen a la familia de proteínas de señalización de TNF. Una vez

que se produce la unión del ligando a su receptor, esto condiciona que se recluten unas proteínas adaptadoras, que, a su vez, reclutan las procaspasas. El conjunto forma el complejo de señalización de inducción de muerte (DISC: death inducing signalin complex) que condiciona la activación de las caspasas iniciadoras (caspasa 8 y 10) quienes, a su vez, en una cascada descendente, activarán las efectoras. Debe tenerse en cuenta que, en determinadas circunstancias, la activación de los receptores de muerte celular activan otras vías intracelulares distintas (como es la vía NFκB).

La vía intrínseca, en cambio, depende de la liberación al citosol de proteínas mitocondriales del espacio intermembrana. Una de las proteínas cruciales en esta ruta es el citocromo *c*, proteína soluble de la cadena transportadora de electrones que, cuando se libera al citosol tiene una acción distinta: se une a APAF1 (*apoptotic protease activating factor 1*). Al hacerlo oligomeriza a un heptámero que recluta la procaspasa 9, activándola y formando el apoptosoma (Zou et al. 1999). La caspasa 9 activa inicia la cascada de señalización que activa las caspasas efectoras (caspasas 3 y 7), lo que culmina en la muerte celular por apoptosis (Esquema I).

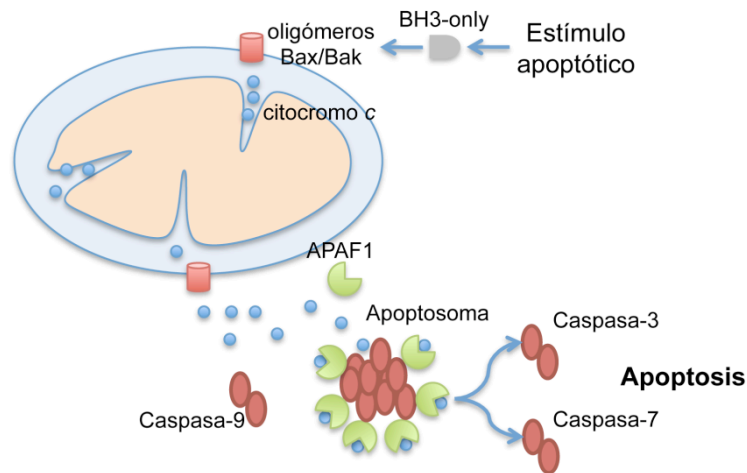
1.3.3. Regulación de la apoptosis

La apoptosis está estrechamente regulada, lo cual es lógico de cara a asegurar que la célula sólo se mata cuando es pertinente. Uno de los principales sistemas reguladores es el relacionado con la familia de proteínas Bcl2. Estas proteínas contienen uno o más dominios BH (*Bcl-2 homology*) que son esenciales para las interacciones heterodiméricas entre ellas (Chittenden 2002; Chipuk et al. 2010).

Las proteínas Bcl2 de los mamíferos actúan, sobre todo, en la vía intrínseca controlando la liberación de proteínas mitocondriales en el citosol. Hay proteínas Bcl2 proapoptóticas y antiapoptóticas y el balance entre las actividades de estas dos clases determina si la célula vive o se activa la vía intrínseca. Las antiapoptóticas como la propia Bcl2 (el miembro fundador de la familia) y Bcl-X_L (*Bcl-2-like*) previenen la apoptosis uniéndose e inhibiendo a las proapoptóticas, bien en el citosol o en la superficie externa de la membrana mitocondrial (Chipuk et al. 2010).

Las proteínas proapoptóticas consisten en dos subfamilias: proteínas BH dominios 1-3, como Bax (*Bcl-2-associated X protein*) y Bak (*Bcl-2 antagonist/killer*) y proteínas BH3-only, como Bim (*Bcl-2-interacting mediator of cell death*) and Bid (*BH3-*

interacting-domain death agonist). Las segundas neutralizan a las antiapoptóticas y activan a las primeras, que se agregan en oligómeros y forman poros en la membrana externa mitocondrial, lo que induce la liberación de moléculas proapoptóticas, como es el citocromo *c*, que inicia la activación de la vía de las caspasas y la muerte celular por apoptosis (Schuler et al. 2000; Galonek and Hardwick 2006; Ghiotto et al. 2010).



Esquema I. Vía intrínseca de la apoptosis. Tras un estímulo apoptótico, las proteínas BH3-only activan Bax o Bak, que se agregan formando oligómeros en la membrana externa mitocondrial. Esta permeabilización permite la salida de citocromo *c* del espacio intermembrana al citosol. El citocromo *c* se une a APAF1, induciendo su heptamerización y unión a la procaspasa 9 (apoptosoma). La caspasa 9 activada por el apoptosoma procesa y activa las caspasas efectoras (caspasa 3 y 7).

1.3.4. Identificación de la apoptosis en infartos y hemorragias intracerebrales.

Aparte de la detección de los cambios citológicos descritos como característicos de la muerte por apoptosis, se han ideado otros procedimientos que tratan de identificar este tipo de muerte celular. Uno de ellos se basa en el hecho de que en la apoptosis, junto con la fragmentación de la cromatina, se generan múltiples fragmentos de ADN con extremos 3'-hidroxilo, libres. La desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) es una enzima que cataliza la incorporación de nucleótidos al ADN. Utilizándola junto con nucleótidos de deoxiuridina trifosfato marcados con fluorescencia, estos se unirán en los puntos con hebras de ADN roto que dejen expuestos estos extremos 3'-hidroxilo y permitirán marcar el ADN fragmentado. Esta técnica de tinción se denomina TUNEL (*TdT-dUDP biotin Nick end labeling*) y se utiliza

como forma de detección sensible de ADN fragmentado, asumiendo muchas veces que esto es específico de la muerte por apoptosis. Sin embargo, hay evidencias de que el marcaje con la técnica TUNEL no es completamente específica, así, daño del ADN por estrés oxidativo también puede ser TUNEL⁺ (Sun 1990; Stadelmann et al. 1998; Graeber and Moran 2002).

Hay una gran cantidad de literatura científica acerca del papel de la apoptosis en la isquemia cerebral (Doyle et al. 2008; Harraz et al. 2008; Bolanos et al. 2009). Lo llamativo es que, desde un punto de vista puramente morfológico (que fue como primero se caracterizó esta forma de muerte celular) los hallazgos que apoyen la importancia de la muerte por apoptosis no son muy significativos. El hallazgo patológico fundamental es la necrosis y tan solo se han descrito cambios consistentes con apoptosis cuando la isquemia es transitoria o poco intensa (Graham and Chen 2001). Sin embargo, utilizando técnicas del tipo TUNEL, numerosos estudios han detectado fragmentación del ADN inter-nucleosomal en modelos de isquemia cerebral (Li et al. 1995; Charriaut-Marlangue et al. 1996; Chen et al. 1997; Doyle et al. 2008), especialmente en las partes periféricas sugestivas de tratarse de las “áreas de penumbra” (Sairanen et al. 2006). Especialmente significativo quizás sean los hallazgos relacionados con la expresión y actividad de los genes que regulan la apoptosis. En conjunto las evidencias señalan que en la isquemia hay una alteración de la expresión génica de caspasas y de proteínas de la familia Bcl-2 y que la manipulación de dichos genes (mediante transgénicos, vectores virales, etc.) puede cambiar, al menos en parte, la magnitud de las neuronas que mueren tras el insulto isquémico (Chen et al. 1998; Graham and Chen 2001), lo cual apoya el papel de los mecanismos de muerte celular programada en la isquemia.

Otros autores, en cambio, plantean que este tipo de muerte celular es un proceso “activo” que requiere energía por lo que podría ocurrir que los mecanismos apoptóticos se inicien pero no haya energía suficiente para continuarlos (Benchoua et al. 2001) con lo que la apoptosis podría tener sólo que ver con una pequeña proporción de la muerte celular en la zona de penumbra o en neuronas reperfundidas, sin magnitud suficiente como para tener una repercusión funcional en el pronóstico de los pacientes.

En cuanto a las hemorragias intracerebrales, utilizando técnicas de TUNEL y de histoquímica para detección de caspasa 3 hay estudios experimentales que han

encontrado que la mayoría de las células que mueren en un hematoma intracerebral (salvo las del centro del hematoma) son neuronas TUNEL⁺ (Gong et al. 2001). Incluso hay evidencias histológicas en pacientes con HIC sometidos a cirugía que sugieren que una proporción importante de la muerte celular mostraba las características TUNEL⁺ (Qureshi et al. 2003). Con las limitaciones inherentes a la técnica ya mencionadas, esto abre la posibilidad a que en las HIC una buena porción de la muerte neuronal sea por proceso apoptótico. Hay también estudios que han encontrado descensos de Fas-soluble (que inhibe la interacción de Fas con su ligando) lo que implicaría una activación del sistema Fas/Fas-L (uno de los receptores de muerte celular de la vía extrínseca) (Delgado et al. 2008). A esto debe añadirse que el pico máximo de muerte celular en los modelos experimentales ocurre de forma tardía (\approx 3 días). Así como el edema inducido por los hematomas, la muerte neuronal tras un HIC podría ser el resultado, al menos en parte, del efecto tóxico de algunos componentes del coágulo (el más estudiado es la trombina) (Lee et al. 1997). Parecería que, al menos teóricamente, salvo en la zona central donde el efecto mecánico es más intenso, en los HIC existe una muerte celular más retardada y más “tóxica”, sin privación energética, en la que encajarían mejor los procesos de muerte celular programada.

2. PROTEÍNA SUPRESORA TUMORAL P53.

La proteína p53, codificada por el gen supresor tumoral *Tp53*, es un factor de transcripción que regula importantes procesos celulares, tales como el control del ciclo celular, la apoptosis y el mantenimiento de la estabilidad genética. Todos ellos resaltan el papel fundamental de esta proteína en la protección del organismo contra las consecuencias del daño celular y el riesgo de cáncer (Junttila and Evan 2009).

Los niveles intracelulares de p53 están finamente regulados, ya que de ello va a depender su actividad funcional. Así, p53 tiene una vida media muy corta (15-20 minutos) y se expresa, constitutivamente, en niveles casi indetectables en la mayoría de células, incluidas las neuronas (Soussi 2000).

La interacción de p53 con la E3 ubiquitina proteína ligasa MDM2 (*murine double minute-2*), o su homólogo en humanos HDM2, regula la degradación rápida y

continuada de la proteína (Michael and Oren 2003). En el núcleo, HDM2/MDM2 se une al extremo amino-terminal de p53 y dirige la translocación de la proteína desde el núcleo hacia el citoplasma donde es degradada por el proteosoma (Prives and Hall 1999). Los mecanismos moleculares que median la acumulación de p53 en condiciones de estrés celular incluyen la acetilación y fosforilación de p53, la interferencia con el sistema HDM2/MDM2 o la inhibición de la actividad proteosómica (Culmsee and Mattson 2005).

Cuando acontece alguna circunstancia anormal se bloquea la degradación de p53 y aumenta su concentración. De hecho, p53 es una pieza maestra en la regulación de la muerte celular por apoptosis (Schmitt et al. 2002). Entre los mecanismos moleculares más clásicamente estudiados está la unión al ADN para inducir la transcripción de p21, que bloquea la actividad quinasa de los complejos Cdk (quinasas dependientes de ciclinas) impidiendo que la célula entre en fase S del ciclo y, por tanto, la replicación del ADN (Polager and Ginsberg 2009).

Parece, además, que muchas de sus funciones podrían ejercerse por su papel de factor de transcripción de otras proteínas. Así la transcripción de Bax está regulada por p53 (Okuno et al. 2004; Niizuma et al. 2009). Otro ejemplo es PUMA (*p53-up-regulated modulator of apoptosis*). PUMA es inducida por p53, de hecho, fue originalmente identificada como una diana directa de p53 con dos posibles sitios de unión (Nakano and Vousden 2001). PUMA es un potente inductor de apoptosis a través de una vía dependiente de la mitocondria (Yu et al. 2001) interactuando con proteínas de la familia Bcl2 pro y antiapoptóticas, induciendo también la liberación de citocromo c (Chen et al. 2005). Otra vía más es PIDD (*p53-induced protein with a death domain*). Se trata de otra proteína transcripcionalmente inducida por p53, uno de cuyos fragmentos tras autoproteólisis (PIDD-CC) es capaz de interactuar con la caspasa 2 formando un complejo proteico (PIDDsoma) que regula la apoptosis inducida por estrés (Tinel and Tschopp 2004).

Sin embargo, los mecanismos de actuación de p53 son complejos y no se limitan a su actividad como factor regulador de la expresión de genes. Hay evidencias de que p53 puede inducir apoptosis por mecanismos independientes a su actividad transcripcional. Así, en respuesta a ciertos estímulos de muerte, en algunos tipos celulares, una fracción de p53 estabilizada traslocaría a la mitocondria formando complejos con las proteínas antiapoptóticas Bcl-XL y Bcl-2, condicionando

directamente la liberación de citocromo c y activación de caspasas (Mihara et al. 2003; Endo et al. 2006). Esta respuesta apoptótica serviría para acelerar y amplificar la respuesta mediada por transcripción, en principio más lenta (Erster et al. 2004).

Hay, incluso, evidencias que ligan p53 con el estrés oxidativo. Los genes diana de p53 aparecen inducidos en muestras de células sometidas a estrés oxidativo (Han et al. 2008), y la sobreexpresión de “scavengers” específicos como la SOD1 (superóxido dismutasa1), inhibe la elevación de p53 tras isquemia experimental (Saito et al. 2005). A la inversa, los animales mutantes en el gen de la SOD1 ($SOD1^{-/-}$ y $SOD1^{-/+}$) muestran mayor susceptibilidad a la muerte neuronal por apoptosis tras la isquemia (Kawase et al. 1999).

En resumen, cuando concurren condiciones de estrés celular tales como el estrés genotóxico, la hipoxia/isquemia o la activación oncogénica, se produce la estabilización y activación de p53 y, como resultado final, la parada del ciclo celular, senescencia y/o apoptosis, dependiendo del contexto celular (Jin and Levine 2001; Culmsee and Mattson 2005). Para el caso concreto de la isquemia cerebral, p53 se acumula y activa rápidamente, lo que supone que se iniciaría la apoptosis, tanto en la región isquémica como en la zona de penumbra (Crumrine et al. 1994; Saito et al. 2005; Luo et al. 2009).

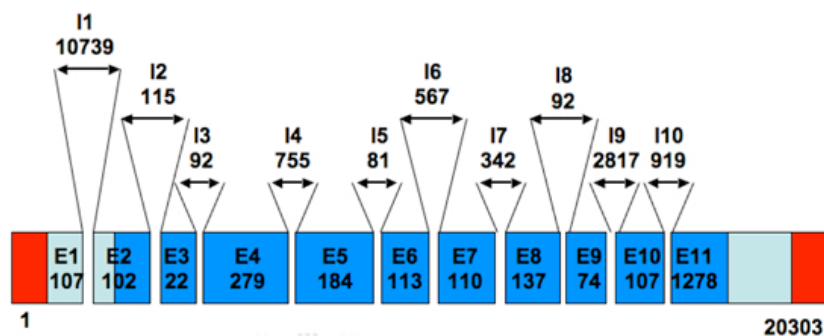
Por tanto, si en una determinada condición la muerte celular por apoptosis es un hecho fundamental, las eventuales variaciones funcionales de p53, dado su papel central en este proceso, pueden resultar también claves.

2.1. Polimorfismos en el gen *Tp53*

Clásicamente el término polimorfismo se ha usado para definir a aquellas mutaciones que aparecen con una frecuencia < 1% en la población. Entre los polimorfismos se incluyen los SNP (*single nucleotide polymorphism*), que origina como resultado de la mutación de una sola base, y los STR (*short tandem repeat*), que se producen como resultado de una inserción o delección de una sección del ADN. Los SNP que se localizan en regiones codificantes, al producir variaciones de aminoácidos, pueden originar una proteína variante (variante polimórfica) y causar cambios del fenotipo (Sunyaev et al. 2001).

De todos los genes supresores de tumores, pocos hay tan importantes como el gen *Tp53*. Considerado como el gen más frecuentemente mutado en el cáncer, se estima que está inactivado por mutación en alrededor del 50% de los tumores humanos (Murphy 2006). En esas circunstancias, mantener una variación en este gen prevalente en la población, una mutación que además pueda tener trascendencia funcional, en principio puede resultar sorprendente.

El gen *Tp53* está constituido por 393 codones distribuidos en 11 exones que ocupan cerca de 20.000 bp (pares de bases) en el brazo corto del cromosoma 17 (Esquema II).



Esquema II. Organización del gen *Tp53*. La longitud de los exones (E) e intrones (I) se expresa en pares de bases. La transcripción comienza en el exón 2.

En el gen *Tp53* se han identificado polimorfismos tanto en los exones como en los intrones. Entre los más frecuentes están los polimorfismos en el exón 4 (concretamente en el codón 72) y en el intrón 3 (Whibley et al. 2009).

En el intrón 3 de *Tp53* se ha encontrado una inserción de 16 bp en el nucleótido 11.951 de la secuencia del gen, correspondiente a la repetición exacta de 16 bp (5'-GGGCTGGG+GACCTGGA-GGGCTGGG+GACCTGGA-GGGCTGGG-3', inserción en rojo) (Lazar et al. 1993). Este polimorfismo (*Ins16bp*, rs59758982) es el único polimorfismo intrónico que se ha asociado con un incremento en el riesgo de padecer ciertos cánceres (Wang-Gohrke et al. 1999; Costa et al. 2008; Whibley et al. 2009). Sin embargo, su proximidad con el polimorfismo en el codón 72 del exón 4 se ha sugerido que podría ser la responsable de la asociación entre este alelo y el cáncer (Whibley et al. 2009).

En el exón 4 se han descrito polimorfismos en el codón 72, que describimos en detalle abajo, y en el codón 47. Este último, muy infrecuente, resulta de la sustitución de la base C por T en la posición 1 del codón 47 y se describió, únicamente, en la población de origen africano (Felley-Bosco et al. 1993). Además, hay polimorfismos en otros genes distintos pero fuertemente relacionados con la actividad de p53. Por ejemplo, polimorfismos en el intrón 1 del gen *MDM2* o polimorfismos en los elementos de respuesta de los genes diana de p53. De estos últimos falta todavía información sobre su eventual impacto en la capacidad de respuesta de p53 (Murphy 2006). Pero, ya sólo con los primeros, que sí tienen traducción funcional, esta prevalencia de polimorfismos ha de implicar la existencia de una presión selectiva (Hughes and Yeager 1998) de forma que se obtenga alguna ventaja evolutiva por otro lado que compense sus riesgos.

El cDNA que codifica p53 fue sintetizado en 1983 (Matlashewski et al. 1984). Poco después se identificaba una de las variaciones de su secuencia de aminoácidos. El sitio polimórfico que nos interesa, específico de humanos, está situado en el exón 4, codón 72 del gen *Tp53* (polimorfismo *Arg72Pro*, rs1042522). Así, el codón 72 contiene bien **CC**, que codifica un residuo de prolina (Pro) y da lugar a la variante p53-Pro, o bien **CG**, que codifica una arginina (Arg), sintetizándose la variante p53-Arg (Pietsch et al. 2006). El polimorfismo afecta a un dominio rico en prolina de la proteína, que parece esencial para la función de la misma (Walker and Levine 1996; Sakamuro et al. 1997; Murphy 2006).

En 1994 Beckman y colaboradores detectaban las variaciones estadísticamente significativas en la frecuencia alélica entre diferentes grupos étnicos, sosteniendo que la frecuencia del alelo *Pro* se incrementaba de acuerdo con la proximidad al ecuador (Beckman et al. 1994). Estudios posteriores mostraron que había diferencias en la función de la proteína, dependientes de esa variación génica. Así, la variante p53-Arg tenía una mayor capacidad de inducir apoptosis en linfocitos y líneas tumorales superior a la variante p53-Pro (Bonafe et al. 2002; Dumont et al. 2003; Bonafe et al. 2004). De hecho, se ha relacionado el polimorfismo *Arg72Pro* con la edad de comienzo, progresión y supervivencia en diferentes tipos de cáncer. Sin embargo, hasta el momento no ha habido unanimidad en los resultados (Murphy 2006; Whibley et al. 2009). Esta diferente actividad apoptótica asentaba en una mayor facilidad para pasar al citoplasma e interactuar con la mitocondria (Dumont et al. 2003). Esto

sugería que el polimorfismo afectaría fundamentalmente a la capacidad de inducir apoptosis, no dependiente de sus efectos transcripcionales.

Una de las hipótesis barajadas para explicar la prevalencia del polimorfismo se basa en que p53-Pro estaría vinculado a pieles con más melanina y que más rápidamente oscurecen tras la exposición al sol. De esta forma esta variante habría sido seleccionada en las zonas próximas al ecuador donde esa melanina protegería de la fotólisis del folato y hace menos necesaria unos mecanismos apoptóticos muy sensibles. En cambio, en las zonas alejada al ecuador se habría seleccionado la variante p53-Arg, premiando la absorción de vitamina D por pieles claras sobre la evitación de la fotólisis del folato (ya que la luz es menos intensa) y precisando, a cambio, mecanismos apoptóticos más sensibles (McGregor et al. 2002).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

1. HIPÓTESIS.

De la patología y patogenia del ictus, tanto isquémico como hemorrágico, se infiere la importancia de conocer los mecanismos por los cuales se produce la muerte celular en estos pacientes. Éste puede constituir un punto clave para entender mejor el proceso y, a la vez, poder identificar potenciales nuevas dianas terapéuticas.

Especialmente en los infartos (menos claro en las hemorragias) parece que el mecanismo dominante de muerte neuronal sería la necrosis. Sin embargo, existen evidencias de que, sobre todo en las llamadas “zonas de penumbra” o en relación con el destino de neuronas tras la reperusión, la muerte neuronal por apoptosis podría ser importante. Cosa distinta es si el alcance de este fenómeno es de magnitud suficiente como para suponer que pueda tener una repercusión significativa en la situación funcional final de los pacientes.

Si la apoptosis fuese suficientemente importante, la función de una proteína tan determinante para ella como p53, también lo sería. De lo cual se deduciría que polimorfismos en el gen que la codifica con efecto en la actividad apoptótica de la proteína, también lo serían.

De entre la complejidad de mecanismos por los que puede intervenir p53 en la apoptosis, en una situación como la isquemia de privación energética, parece más lógico que tengan especial importancia los mecanismos relacionados con la disfunción mitocondrial.

Por tanto las hipótesis subyacentes al presente trabajo se pueden esquematizar de la siguiente manera:

- ✓ Los mecanismos de muerte celular programada son de suficiente importancia como para condicionar la magnitud del daño cerebral y situación funcional de los pacientes (pronóstico).
- ✓ Una diferente capacidad apoptótica condicionada por el polimorfismo del exón 4, codón 72 del gen *Tp53*, tiene repercusión en el pronóstico de los pacientes.

- ✓ Los mecanismos moleculares por los que una p53 con mayor actividad apoptótica condiciona una mayor muerte neuronal en la isquemia tienen más que ver con la disfunción mitocondrial.

2. OBJETIVOS.

Nuestros **objetivos generales han sido:**

1. Investigar el polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* como eventual biomarcador genético del pronóstico del ictus.
2. Investigar los mecanismos moleculares que median la diferente actividad apoptótica de las variantes polimórficas de p53, p53-Arg y p53-Pro, en las neuronas.

Como **objetivos específicos**, nos hemos propuesto:

- ✓ Realizar un estudio observacional, prospectivo, de dos cohortes de pacientes, una de pacientes con ictus isquémico y otra con ictus hemorrágico. En ellas realizar un análisis principal para ver si el polimorfismo en el exón 4, codón 72 (*Arg72Pro*) del gen *Tp53*, se mantiene como predictor independiente de mal pronóstico funcional en un análisis de regresión multivariante.
- ✓ Además, en estas cohortes, realizar unos análisis secundarios para ver si el polimorfismo es predictor independiente de otras variables respuesta secundarias: Deterioro neurológico precoz y volumen de la lesión (para los infartos) y volumen residual y volumen del edema perihematoma (para las hemorragias).
- ✓ Incluir, en esas mismas cohortes, el análisis de la relación entre el polimorfismo en el intrón 3 (*Ins16bp*) del gen *Tp53* y el pronóstico funcional tras el ictus, con objeto de controlar una eventual relación por desequilibrio de ligamiento con el genotipo de este locus cercano.
- ✓ Estudiar la actividad apoptótica de las variantes polimórficas de p53, p53-Arg y p53-Pro, en neuronas corticales en cultivo primario. Con este objetivo pretendemos asentar que esa eventual vinculación entre el polimorfismo

Arg72Pro de *Tp53* y el pronóstico funcional está relacionada con una diferente actividad apoptótica.

- ✓ Identificar los mecanismos moleculares responsables de la diferente actividad apoptótica de las variantes polimórficas p53-Arg y p53-Pro, haciendo especial hincapié en una posible interacción con la mitocondria.

MATERIAL Y MÉTODOS.

1. ESTUDIO CLÍNICO.

Se ha realizado un estudio prospectivo observacional en pacientes con hemorragia intracerebral (HIC) y pacientes con infarto cerebral ingresados en el Hospital Universitario de Santiago de Compostela durante 2006-2008. Dicho estudio se enmarca en el contexto de colaboración propiciado por la Red de Investigación Cooperativa Neurovascular (RENEVAS), integrada por 22 grupos de diferentes comunidades del Estado.

1.1. Población de pacientes.

Se reclutaron *dos cohortes* hospitalarias de pacientes, una de pacientes ingresados por HIC y otra de pacientes ingresados por infarto cerebral, en el Hospital Universitario de Santiago de Compostela sin conocimiento previo de la hipótesis de partida ni de los resultados experimentales.

Los datos correspondientes a los pacientes fueron recogidos de forma *prospectiva* e incluidos en una base de datos. La información recogida incluía datos demográficos, factores de riesgo vascular, datos de presentación clínica, temperatura, tensión arterial, marcadores inflamatorios, magnitud del daño neurológico (recogido mediante la escala de ictus del National Institute of Health: NIHSS) (Wityk et al. 1994), parámetros de laboratorio y situación funcional a los 3 meses. Para la cohorte de infartos cerebrales además se recogió específicamente información sobre volumen del infarto, etiología y deterioro neurológico precoz. Para la de HIC se recogió información sobre las variables topografía de la hemorragia, volumen al inicio, volumen del edema, etiología y extensión ventricular.

El *criterio para su inclusión* en la muestra fue el de pacientes consecutivos que ingresaron en el Servicio de Neurología por un infarto o una HIC espontánea, no traumática, de menos de 12 horas desde el inicio de los síntomas (o desde el inicio del sueño, en aquellos de presentación al despertar), previamente independientes.

De la cohorte de pacientes con infarto cerebral, se excluyeron 65 pacientes tratados con activador de plasminógeno tisular recombinante (r-tPA), 33 que

participaron en ensayos clínicos y 28 pacientes con enfermedades sistémicas graves. De los pacientes detectados con HIC se excluyeron 16 con anomalías cerebrales subyacentes (3 malformaciones arteriovenosas y 13 con tumores) y 9 pacientes con enfermedades sistémicas graves. Veinticuatro pacientes rehusaron participar y 36 se perdieron durante el seguimiento. Al final, se incluyeron en las cohortes un total de 408 pacientes con ictus isquémico y 128 con hemorragia intracerebral.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético y se solicitó consentimiento informado a los pacientes o sus familiares.

1.2. Variables clínicas.

Los pacientes fueron ingresados en la Unidad de Ictus del Hospital Universitario de Santiago de Compostela en la fase aguda y su manejo diagnóstico y terapéutico se ajustó a las guías *ad hoc* publicadas por el Grupo de Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología (Neurología 2004).

La etiología de los infartos se asignó con arreglo a las categorías de la clasificación TOAST (Adams et al. 1993). Los grupos etiológicos para las HIC fueron: Hipertensivas, por Angiopatía Amiloide, por Anticoagulación e Indeterminada. En cuanto a los grupos topográficos se clasificaron en: Profundos, Lobulares, Cerebelosos, del Tronco Encéfalo y Primariamente intraventriculares.

La cuantificación del defecto neurológico mediante la NIHSS se realizó por neurólogos con certificación acreditativa de dicha formación.

Se consideró deterioro neurológico precoz a un empeoramiento en 4 o más puntos en el valor de la NIHSS en las primeras 48 horas tras el ictus.

En cuanto a las medidas de los volúmenes, para los infartos se realizaron estudios de TC en el momento del ingreso y entre 4-7 días después. El volumen del infarto se estableció en el 2º estudio de TC por la fórmula $0,5 \times A \times B \times C$, donde A y B son los diámetros perpendiculares más grandes y C el grosor. En las HIC se realizaron estudios de TC al ingreso, entre las 48 y 72 horas del mismo y un tercer estudio a los 3 meses \pm 15 días. El volumen del hematoma se estableció en el primer TC. El volumen del edema peri-hematoma se determinó en el 2º TC: volumen total – volumen del

hematoma. El volumen residual de la lesión dejada por la HIC se estableció en este 3er TC, siempre por la misma fórmula. Todas las medidas se realizaron por un único radiólogo independiente, “ciego” para los datos clínicos de los pacientes y los resultados de laboratorio.

La variable dependiente (variable resultado) principal fue la situación funcional a los 3 meses. La cuantificación del estado funcional se realizó mediante la escala de Rankin modificada (Rankin-m, Tabla III) (Wolfe et al. 1991). Se categorizó considerando mal pronóstico aquellos con puntuaciones > 2 (buen pronóstico si puntuación fue de 2 o inferior).

Tabla III. Escala de Rankin modificada (Rankin-m).

Rankin-m		%
0	Sin síntomas	
1	Sin incapacidad importante	Capaz de realizar sus actividades y obligaciones habituales.
2	Incapacidad leve	Incapaz de realizar algunas de sus actividades previas, pero capaz de velar por sus intereses y asuntos sin ayuda.
3	Incapacidad moderada	Síntomas que restringen significativamente su estilo de vida o impiden su subsistencia totalmente autónoma.
4	Incapacidad moderadamente severa	Síntomas que impiden claramente su subsistencia independiente aunque sin necesidad de atención continua.
5	Incapacidad severa	Totalmente dependiente, necesitando asistencia constante día y noche.
6	Muerte	

Para los análisis secundarios, se evaluaron como variables respuesta, para los infartos cerebrales, la proporción de pacientes con deterioro neurológico precoz y el volumen del infarto en el 2º TC. Para las HIC se valoraron, además de la variable principal, el volumen del edema perihematoma y el volumen de la lesión residual final en el 3º TC.

1.3. Genotipado de los polimorfismos de *Tp53*.

Los polimorfismos en el intrón 3 (*Ins16bp*; rs59758982) y en el exón 4 (*Arg72Pro*; rs1042522) del gen *Tp53* se genotiparon mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Lazar et al. 1993) (Matlashewski et al. 1987). En el caso del polimorfismo

Arg72Pro, la discriminación alélica se llevó a cabo mediante RFLP (*restriction fragment length polymorphisms*), que consiste en el análisis del tamaño de los fragmentos generados tras la digestión del DNA con endonucleasas de restricción.

Las muestras de DNA procedente de la sangre de los pacientes se amplificaron por PCR en un termociclador automático (Mastercycler Pro, Eppendorf Ibérica, San Sebastián de los Reyes, Madrid, España). Las PCRs se realizaron en un volumen final de 25 µL que contenían 250 ng de DNA genómico, MgCl₂ 1,5 mM, desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 100 mM, 15 pmol de cada oligonucleótido cebador (sentido y anti-sentido) y 0,5 U de la Taq polymerase (Promega®, Promega Biotech Ibérica, Alcobendas, Madrid, España). Las condiciones experimentales de las PCRs fueron similares, ajustándose en cada caso la temperatura de anillamiento específica para cada pareja de cebadores: 1 x (95°C, 5 min), 35 x (95°C, 30 seg; 62°C ó 56°C, 30 seg; 72°C, 30 seg), 1 x (72°C, 10 min).

Posteriormente, los fragmentos amplificados mediante PCR se separaron por su tamaño mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 3 - 4% (Gibco BRL Life Technologies, California, USA). La electroforésis se llevó a cabo en tampón TBE 1X (Tris-HCl 0,044 M, H₃BO₃ 0,044 M, EDTA 1,0 mM, pH 8,3) a 120 voltios, durante 30 minutos. Como marcador del peso molecular se utilizó DNA del fago ΦX-174 previamente cortado con la endonucleasa *HaeIII*, lo que genera una mezcla de once fragmentos de DNA de diferente tamaño (1,353 - 0,072 Kb). Para monitorizar la migración del DNA en el gel se incluyeron dos colorantes en el tampón de carga: xileno-cianol y azul de bromofenol.

Tras la electroforesis, los fragmentos amplificados se visualizaron en el gel de agarosa utilizando bromuro de etidio (0.1µg/ml), que actúa intercalándose entre las bases nitrogenadas del DNA y emitiendo fluorescencia al ser expuesto a la luz UV (254 nm). Los resultados obtenidos fueron almacenados mediante un sistema de fotografía digital (Kodak DC40) acoplado a un programa informático de tratamiento de imagen.

1.3.1. Polimorfismo en el intrón 3 de Tp53 (Ins16bp; rs59758982).

En el intrón 3 del gen Tp53 existe un polimorfismo que consiste en la inserción de una secuencia de 16 bp (ACCTGGAGGGCTGGGG). El polimorfismo se analizó

mediante la amplificación por PCR de un fragmento de 268 bp que contiene la secuencia polimorfa (Lazar et al. 1993). Los oligonucleótidos cebadores utilizados fueron:

Oligonucleótido sentido: 5'-ATGGGACTGACTTTCTGCTCTT-3'

Oligonucleótido anti-sentido: 5'-CTGGCATTCTGGGAGCTTCA-3'

La temperatura de anillamiento utilizada en la PCR fue de 62°C.

Para la discriminación alélica del polimorfismo del intrón 3 no es necesaria la digestión del producto de la PCR con endonucleasas de restricción, basta con la electroforesis horizontal del fragmento amplificado en geles de agarosa al 4%.

Los dos alelos posibles del polimorfismo *Ins16bp* generan tres genotipos diferentes, como se muestra en la Figura A:

Homocigotos No inserción de 16 bp (*No Ins/No Ins*): fragmento de 268 bp.

Homocigotos Inserción de 16 bp (*Ins/Ins*): fragmento de 252 bp.

Heterocigotos (*No Ins/Ins*): fragmentos de 268 y 252 bp.

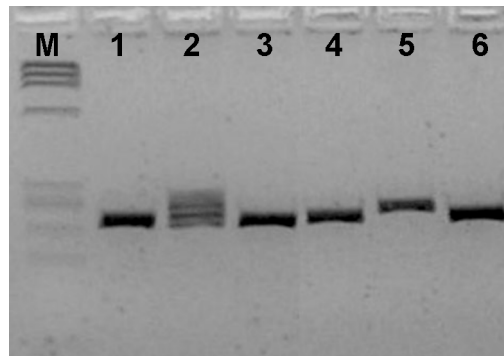


Figura A. Electroforesis en gel de agarosa al 4% de los fragmentos amplificados por PCR del intrón 3 de *Tp53*. Los carriles 1, 3, 4 y 6 corresponden a pacientes homocigotos *No Ins/No Ins*; el carril 5 a paciente homocigoto *Ins/Ins*; y el carril 2 a paciente heterocigoto (*No Ins/Ins*). M: marcador de tamaño molecular.

1.3.2. Polimorfismo del codón 72 de *Tp53* (*Arg72Pro*, *(rs1042522)*).

En el exón 4 del gen *Tp53* se ha descrito un sitio polimórfico específico de humanos (*Arg72Pro*; *rs1042522*). Así, el codón 72 de *Tp53* contienen bien CCC, que codifica un residuo de prolina y da lugar a la variante polimórfica p53-Pro, o bien CGC, que codifica una arginina y se sintetiza la variante p53-Arg (Pietsch et al. 2006).

El análisis del polimorfismo se realizó mediante amplificación por PCR de un fragmento de 291 bp del exón 4 (Matlashewski et al. 1987), utilizándose los oligonucleótidos cebadores:

Oligonucleótido sentido: 5'-TCTACAGTCCCCCTTGCCGT-3'

Oligonucleótido anti-sentido: 5'-CTGACCGTGCAAGTCACAGA-3'

La temperatura de anillamiento utilizada en la PCR fue de 56°C.

El producto de la PCR fue digerido con la enzima de restricción *BstUI* (*Bsh1236I*, Fermentas Life Sciences, Burlington, Ontario, Canadá) que reconoce el sitio de corte generado en la secuencia por el cambio de Citosina por Guanina. Los fragmentos generados tras la digestión a 37°C se separaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 3%, generando tres genotipos diferentes (Figura B):

Homocigotos de prolina (*Pro/Pro*): fragmento de 291 bp.

Homocigotos de arginina (*Arg/Arg*): fragmentos de 165 y 126 bp.

Heterocigotos (*Arg/Pro*): fragmentos de 291, 165 y 126 bp.

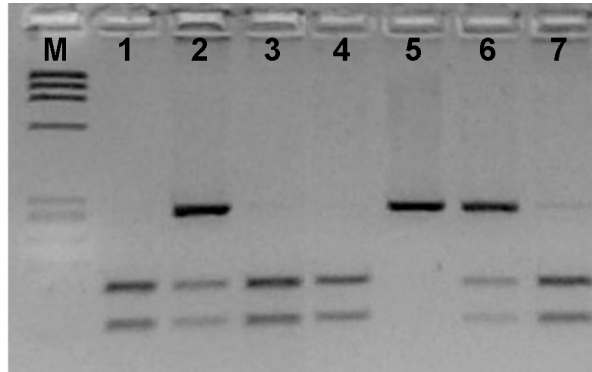


Figura B. Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los fragmentos amplificados por PCR del codón 72 de *Tp53* y digeridos con *BstUI*. Los carriles 1, 3, 4 y 7 corresponden a pacientes homocigotos Arg/Arg; el carril 5 a paciente homocigoto Pro/Pro; y el carril 2 a paciente heterocigoto (Arg/Pro). M: marcador de tamaño molecular.

2. ESTUDIO EXPERIMENTAL.

2.1. Cultivos primarios de neuronas de corteza de rata.

Para llevar a cabo los objetivos relativos al estudio de la diferente actividad apoptótica de las variantes polimórficas de p53 (p53-Arg y p53-Pro), se prepararon cultivos de neuronas corticales utilizando ratas gestantes albinas de la raza Wistar, criadas y suministradas por el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

Para la realización del cultivo primario de neuronas se utilizaron fetos de rata de 16 días de gestación (Almeida and Medina 1998). Las ratas gestantes se anestesiaron con éter etílico, se sacrificaron mediante dislocación cervical y se extrajeron los fetos rápidamente mediante histerectomía.

Los fetos se trasladaron a una cabina de flujo laminar (TC48, Gelaire Flow Laboratories, McLean, Virginia, USA) para garantizar las condiciones de esterilidad en el cultivo. Tras la extracción de los dos hemisferios cerebrales, se depositaron en una placa Petri de poliestireno (Nunc, Roskilde, Dinamarca) con la solución de disgregación (NaCl 116 mM, KCl 5,40 mM, NaH₂PO₄ 1,01 mM, MgSO₄ 1,50 mM, NaHCO₃ 26 mM, glucosa 4 mM, rojo fenol 10 mg/l, albúmina 0,3% p/v y DNAsa tipo I 20 µg/ml, pH 7,2). Tras 4 minutos de sedimentación en un tubo de 50 ml (BD Falcon, Bedford, MA, USA),

se retiró el sobrenadante y el tejido se resuspendió suavemente en la solución de tripsinización (solución de disgregación suplementada con tripsina 0,025% p/v). La tripsinización del tejido se realizó a 37°C durante 15 minutos, agitando suavemente cada 3 ó 4 minutos. La digestión se detuvo mediante la adición de suero fetal de ternera (FCS; Roche Diagnostics, Heidelberg, Alemania) a una concentración final del 10% (v/v).

Tras centrifugar (500 x g, 5 min), el sedimento se resuspendió en la solución de disgregación y se hizo pasar varias veces a través de una pipeta Pasteur siliconada. La suspensión celular se dejó reposar durante 4 minutos y el sobrenadante, que contenía las células disociadas, se recogió cuidadosamente en un tubo de 50 ml. Finalmente, se centrifugó (500 x g, 5 min) y el sedimento se resuspendió en 20 ml del medio de cultivo, compuesto por DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Sigma, Barcelona, España) suplementado con FCS a una concentración final del 10% (v/v). El número total de células vivas se determinó mediante el recuento celular en una alícuota de 10 µl de la suspensión celular, que se mezcló con 80 µl de azul de tripano (Sigma) al 0,2% (v/v), utilizándose una cámara cuenta glóbulos de Neubauer (Zeiss, Oberkochen, Alemania) y un microscopio de contraste de fases (Wilovert II pH, Helmut Hund GMBH, Wetzlar, Alemania).

Las células se sembraron a una densidad de $2,5 \cdot 10^5$ células/cm² en medio de cultivo en placas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Dinamarca), previamente recubiertas con poli-D-Lisina 10 µg/ml (Sigma). Las placas se mantuvieron en un incubador (Thermo Forma 310, Thermo Forma, Ohio, EEUU) termostaticado a 37°C, con una atmósfera saturada de vapor de agua, compuesta por un 95% de aire y un 5% de CO₂.

A los 2 días de cultivo, el medio se cambió por DMEM suplementado con suero de caballo (HS; Sigma) al 5% (v/v), glucosa (Sigma) 20 mM y arabinósido de citosina (Sigma) 10 µM, para impedir la proliferación de células no neuronales. Las células se utilizaron a los 5-6 días de cultivo. Bajo estas condiciones, los cultivos neuronales mostraron una pureza aproximada del 95% (Figura C), determinada mediante inmunorreacción con el marcador neuronal Map-2 (Almeida et al. 2005).

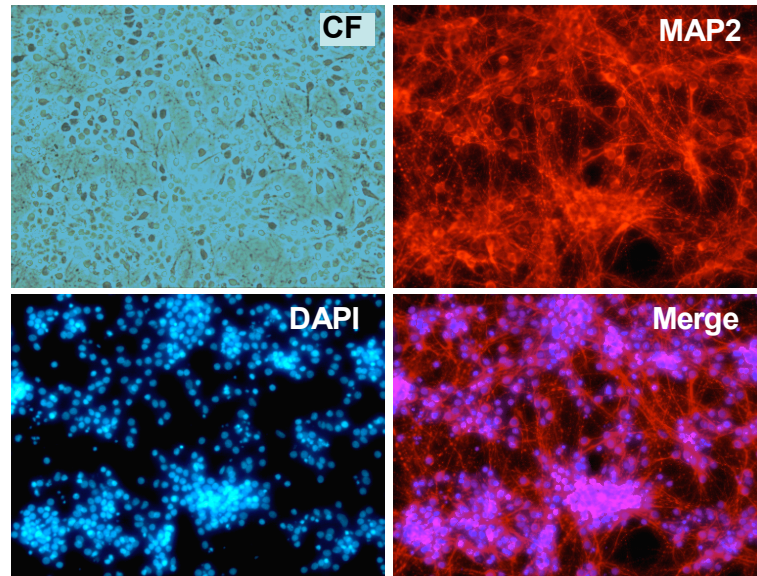


Figura C. Neuronas corticales en cultivo primario. Microfotografías de neuronas corticales de 6 días in vitro, donde se muestra la pureza del cultivo (95%), determinada mediante inmunorreacción con el marcador neuronal Map-2 (CF: contraste de fases).

2.2. Transfecciones celulares.

La expresión de las variantes polimórficas del gen humano de *Tp53*, p53-Arg o p53-Pro, se realizó mediante transfección de las neuronas con los plásmidos (pIRES2-eGFP; Clontech, BD Biosciences, Madrid) correspondientes (pIRES2-eGFP-p53Arg o pIRES2-eGFP-p53Pro).

En este trabajo realizamos las transfecciones por medio de lipofección, que consiste en la formación de pequeños liposomas que contienen el DNA que queremos introducir en la célula. Para ello, utilizamos el reactivo catiónico Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Madrid, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. En el momento de realizar las transfecciones, las células estaban en un medio carente de antibióticos.

Los plásmidos (pIRES2-eGFP; Clontech, BD Biosciences, Madrid) empleados en este trabajo co-expresaban la variante polimórfica de p53, Arg-p53 (pIRES2-eGFP-p53Arg) o Pro-p53 (pIRES2-eGFP-p53Pro), junto con la proteína verde fluorescente (GFP), para posibilitar la identificación de las neuronas transfectadas. La eficiencia de la transfección se calculó mediante la cuantificación de las células fluorescentes (GFP⁺)

por microscopía de fluorescencia (Leica Microsystems Wetzlar GMBH, Wetzlar, Alemania), que resultó ser de aproximadamente un 7-9% en las neuronas.

La funcionalidad de los plásmidos utilizados se comprobó evaluando la expresión de p53-Arg o p53-Pro, mediante inmunodetección de proteínas (Western Blot). Dada la baja eficiencia de las transfecciones en las neuronas (7-9%), esta comprobación se realizó en la línea celular procedente de riñón de embrión humano 293T (HEK293T), en las que la eficiencia de la transfección fue del 80-90%. Esta línea celular se mantuvo en crecimiento en DMEM suplementado con FCS al 10% (v/v). Veinticuatro horas antes de la transfección, las células se sembraron a una densidad de 10^5 células/cm² en placas de poliestireno recubiertas con poli-D-Lisina (10 µg/ml).

2.3. Análisis de la expresión de proteínas por Western blot.

Para obtener los extractos proteicos, las células se lavaron con PBS y se lisaron en tampón de RIPA (Na₂HPO₄ 12,5 mM, Tritón X-100 1% v/v, SDS 0,1% v/v, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7, suplementado con los inhibidores de proteasas y fosfatasa: aprotinina 10 µg/ml, leupeptina 10 µg/ml, inhibidor de tripsina 10 µg/ml, TLCK 100 µM, TPCK 100 µM, PMSF 100 µM, fenantrolina 1 mM, pestatina 10 µg/ml, NaF 50 mM, Na₃VO₄ 1mM). Los extractos se hirvieron durante 5 minutos, se centrifugaron a 13.000 x g durante 10 minutos y se recogió el sobrenadante. La concentración de proteínas se determinó mediante el sistema BCA (Pierce, Rockford IL, USA).

Las proteínas se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE, 10%), con un marcador de peso molecular (BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder, Invitrogen), utilizando un sistema de electroforesis vertical (Mini Protean-3, Bio-Rad Laboratories, CA, USA).

Posteriormente, las proteínas se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa (Hybond®, GE Healthcare, Uppsala, Suecia), utilizando el sistema Mini-Transblot (Bio-Rad). Tras el bloqueo con leche al 5% (p/v) en TTBS (Tris 20 mM, NaCl 500 mM, Tween-20 al 0.1% v/v, pH 7,5), las membranas se incubaron en la solución de anticuerpos (TTBS suplementado con BSA al 2% p/v) a 4°C, durante toda la noche. Como anticuerpos primarios se utilizaron, según los distintos experimentos,

anti-p53, anti-p21, anti-PARP1 (BD Biosciences), anti-Bax, anti-caspasa 3 activa (Santa Cruz Biotechnology) y anti-GAPDH (Sigma).

Tras lavar las membranas tres veces con TTBS, se incubaron con el correspondiente anticuerpo secundario en TTBS con leche al 2% (p/v), durante 45 minutos. Finalmente, las membranas se incubaron con el reactivo de quimioluminiscencia SuperSignal™ West Dura (Pierce) y se expusieron a una película Kodak XAR-5 (Sigma). Una vez reveladas, las autorradiografías se digitalizaron, utilizando un software para el tratamiento de imágenes (NIH Image, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.4. Determinación de la apoptosis neuronal.

La muerte celular por apoptosis se determinó, mediante citometría de flujo, tras teñir las células con anexina V, conjugada con aloficocianina (APC), y 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (BD Biosciences). El método se basa en la detección de la fosfatidilserina, que en las células apoptóticas se transloca del interior al exterior de la membrana plasmática. La anexina V es una proteína anticoagulante vascular que posee una gran afinidad por la fosfatidilserina. Por ello, unida a un fluorocromo adecuado, permite la identificación de las células apoptóticas tras su unión a la fosfatidilserina localizada en su superficie celular. Sin embargo, la anexina V también es capaz de unirse a la fosfatidilserina en el interior de aquellas células que no tienen intacta su membrana plasmática (consideradas como necróticas). Por ello, junto con la anexina V se utilizó un colorante que se une específicamente al DNA de las células necróticas, el 7-AAD. Las células inmunorreactivas para la anexina V, que mostraron ser negativas para el 7-AAD, se consideraron apoptóticas.

Las neuronas se recolectaron suavemente, mediante incubación con EDTA tetrasódico 1 mM en PBS, y se tiñeron con anexina V-APC y 7-AAD, siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras 15 minutos de incubación, las señales de la GFP (neuronas transfectadas), de la anexina V-APC y del 7-AAD se analizaron en los canales FL1, FL4 Y FL3, respectivamente, de un citómetro de flujo FACScalibur (BD Biosciences), equipado con un haz láser de argón de 15 mW sintonizado a 488 nm, utilizando los programas CellQuest™ y Paint-A-Gate™ PRO (BD Biosciences). Se consideraron células

apoptóticas aquellas anexina V-APC⁺ y 7-AAD⁻ (Figura D). Los resultados se expresaron como porcentaje de neuronas apoptóticas.

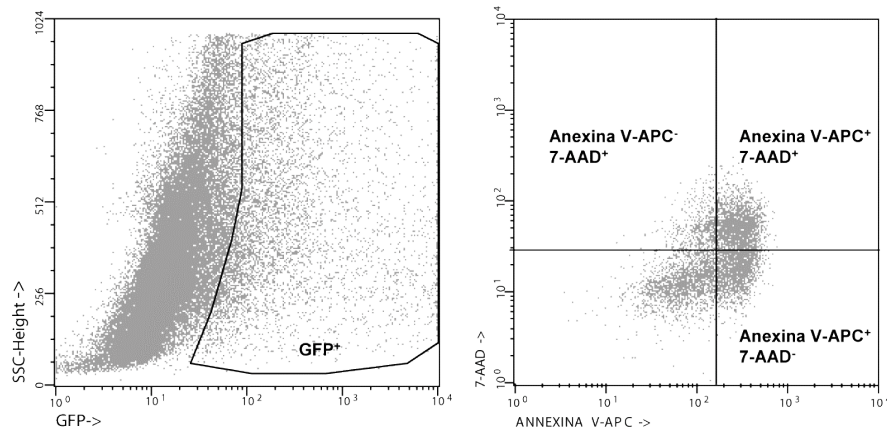


Figura D. Determinación de la apoptosis neuronal mediante citometría de flujo. Las neuronas se tiñeron con Anexina V-APC y 7-AAD y se analizó la apoptosis (Anexina V-APC⁺/7-AAD⁻) en las neuronas GFP⁺, mediante citometría de flujo.

2.5. Tratamientos de las neuronas.

Además de estudiar la diferente capacidad apoptótica de las variantes polimórficas de p53 en distintos momentos cronológicos, se evaluó la susceptibilidad de las neuronas transfectadas con cada variante a estímulos excitotóxicos, como son la estimulación con glutamato o la isquemia experimental *in vitro* (privación de glucosa y oxígeno).

2.5.1. Estimulación de las neuronas con glutamato.

Las neuronas se lavaron con PBS (NaCl 136 mM, KCl 27 mM, NaH₂PO₄ 7,8 mM, KH₂PO₄ 1,7 mM, pH 7,4) y se incubaron en tampón Hank's (NaCl 134,2 mM, KCl 5,26 mM, KH₂PO₄ 0,43 mM, NaHCO₃ 4,09 mM, Na₂HPO₄ 0,33 mM, D-glucosa 5,44 mM, HEPES 20 mM, CaCl₂ 4 mM, pH 7,4), suplementado con glicina (10 μM; Sigma), en ausencia o en presencia de glutamato (100 μM; Sigma), a 37°C. Tras 5 min, se retiró el tampón y se sustituyó por DMEM. Las neuronas se mantuvieron en el incubadora 37°C hasta su recolección para el estudio de la apoptosis neuronal (Delgado-Esteban et al. 2000) (Almeida and Bolanos 2001).

2.5.2. Aplicación de un modelo experimental de isquemia *in vitro* mediante privación de oxígeno y glucosa.

Hemos utilizado un modelo de isquemia experimental *in vitro* anteriormente utilizado por el grupo (Almeida et al. 2002). El protocolo consiste en incubar a las neuronas en DMEM en presencia (normoxia) o en ausencia de glucosa y de oxígeno (isquemia) a 37°C, durante 1 hora. Las células sometidas a isquemia se incubaron en una estufa a 37°C en una atmósfera compuesta por 95% de nitrógeno y 5% de CO₂.

2.6. Determinación de la actividad de la caspasa 3.

La expresión de la caspasa 3 activa se determinó por citometría de flujo, mediante el kit comercial APO ACTIVE 3™ Kit (Bachem, San Carlos, CA, USA). Además, se detectó poli-(ADP-Ribosa)-polimerasa1 (PARP1) procesado mediante citometría de flujo, tras la tinción de las neuronas con el anticuerpo anti-PARP1 procesado conjugado con 3-ficoeritrina (Becton Dickinson Biosciences), que reconoce, específicamente, un dominio de PARP1 de 89 kDa generado como consecuencia de la proteólisis de la proteína causada por la caspasa 3 activa. Las señales de la GFP y la ficoeritrina se analizaron en los canales FL1 y FL3 del citómetro de flujo, respectivamente (Diaz-Hernandez et al. 2007).

2.7. Valoración de la función mitocondrial.

La determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) se realizó en las neuronas transfectadas (GFP⁺) mediante citometría de flujo, siguiendo las instrucciones del kit comercial MitoProbe™ DiIC₁(5) Assay Kit (Molecular Probes Europe BV, Leiden, Holanda). Las neuronas se tiñeron con MitoProbe™ DiIC₁(5), que, dado su carácter catiónico, se acumula en las mitocondrias polarizadas, por lo que su pérdida es un índice de despolarización mitocondrial. Las mismas muestras se incubaron en presencia de carbonil cianuro de 3-clorofenilhidrazona (CCCP, incluido en el kit) que produce la máxima despolarización mitocondrial. Las señales de la GFP y el fluorocromo se analizaron en los canales FL1 y FL4 del citómetro de flujo FACScalibur, respectivamente (Diaz-Hernandez et al. 2007; Herrero-Mendez et al. 2009).

3. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.

En lo relativo a los resultados experimentales, todos los valores se expresaron como media \pm S.E.M. (error estándar de la media) de, al menos, tres experimentos independientes. La significación se determinó mediante análisis de varianza, seguido del test de la menor diferencia significativa de rango múltiple (para comparaciones múltiples) o el test de la *t* de Student (para comparaciones entre dos únicos grupos de valores). En todos los casos, un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

En cuanto a los resultados clínicos se planteó primero un análisis descriptivo mediante porcentajes para las variables categóricas y medias (con desviación estándar) o medianas (cuartiles) para las cuantitativas dependiendo de su distribución normal o no. Se compararon las diferencias de las variables en función del pronóstico a los 3 meses (utilizada como variable de agrupación). Las proporciones se compararon usando test de Chi cuadrado y los test de Student o Mann-Whitney se utilizaron para comparar variables cuantitativas entre grupos. El coeficiente de Pearson o el análisis de Spearman se usaron para las correlaciones bivariantes según la normalidad o no.

Dada la importancia de evaluar que la muestra no estaba sesgada por una distribución estratificada de las variantes polimórficas debidas a un apareamiento no aleatorio, se exploró la frecuencia alélica de las muestras mediante un chi cuadrado con las frecuencias alélicas esperadas por el principio de Hardy Weinberg.

Puesto que el alelo *Pro* ejerce un efecto dominante sobre el *Arg* (Biros et al. 2002; Wu et al. 2002; Bonafe et al. 2004), se realizó una dicotomización tratando los heterocigotos *Arg/Pro* y los homocigotos *Pro/Pro* como una única categoría, que hemos denominado *Pro+*, en contraste con los homocigotos *Arg/Arg* (*Arg+*).

Para estudiar la relación entre el polimorfismo del codón 72 de *Tp53* y el pronóstico funcional se analizó si la variante polimórfica dicotomizada se mantenía como variable predictora en un modelo multivariante de regresión logística binaria. Con la variable mal o buen pronóstico a 3 meses como variable dependiente, se introdujeron como covariables aquellas que en los análisis univariantes hubiesen

mostrado diferencias significativas ($p < 0,05$) junto a otras con significación clínica si se juzgaba pertinente. La introducción de las covariables se realizó mediante un procedimiento hacia delante utilizando el estadístico Wald, para explorar la significación de los coeficientes individuales en el modelo. La posibilidad de colinealidad se analizó para las variables cuantitativas estableciendo la eventual correlación (coeficiente de Pearson). En caso de colinealidad se retuvo en el modelo aquella variable clínicamente más relevante. La calibración del modelo (bondad del ajuste) se analizó mediante los estadísticos R^2 de Cox y Snell y de Nagelkerke, así como con la prueba de Hosmer Lemeshow. El modelo permitió el cálculo de la magnitud de la asociación mediante los correspondientes OR con intervalos de confianza al 95%. En los análisis destinados al estudio de los objetivos secundarios en los que la variable dependiente era cuantitativa (volumen del infarto, volumen de la lesión tras HIC y volumen del edema) se realizaron análisis de regresión lineal múltiple.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático SPSS 15.0 para Windows (SPSS Ibérica, IBM Company).

RESULTADOS.

1. VALOR PRONÓSTICO DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN SUPRESOR TUMORAL TP53 EN EL ICTUS.

Para estudiar la posible asociación entre los polimorfismos en el exón 4, codón 72 (*Arg72Pro*) y en el intrón 3 (*Ins16bp*) de *Tp53* y el estado funcional de los pacientes de ictus se analizaron los resultados de las dos cohortes hospitalarias, una de 408 pacientes con infarto cerebral y otra de 128 pacientes con hemorragia intracerebral.

1.1. Cohorte de pacientes con infarto cerebral.

1.1.1. Análisis descriptivo general.

La media de edad de los 408 pacientes con infarto cerebral fue de $72,8 \pm 12,1$ años. El 59,3% fueron varones.

La distribución de los factores de riesgo se expone en la Tabla 1.

Tabla 1. Distribución de los factores de riesgo en la cohorte de pacientes con ictus isquémico.

Factor de riesgo	N (408)	%
Hipertensión	230	56,4
Hipercolesterolemia	128	31,4
Diabetes	107	26,2
Fibrilación Auricular	76	18,6
Cardiopatía Isquémica	57	14
Tabaquismo	56	13,7
Abuso de alcohol	35	8,6
Ictus previo	55	13,5

Como se muestra en la Tabla 2, la distribución de los grupos etiológicos de los infartos fue: 40,9% de indeterminados, 36,3% de cardioembólicos, 11,3% de lacunares, 9,3% de aterotrombótico y 2,2% de otros.

Tabla 2. Distribución de los grupos etiológicos en la cohorte de pacientes con ictus isquémico.

TOAST	N	%
Cardioembólico	148	36,3
Aterotrombótico	38	9,3
Indeterminado	167	40,9
Lacunar	46	11,3
Otros	9	2,2

La mediana de la puntuación de la escala NIHSS en el momento del ingreso fue de 5 [2,11] y la puntuación de la escala ASPECTS fue de 10 [8,10].

La distribución de las distintas variantes polimórficas en el exón 4, codón 72 (*Arg72Pro*) y en el intrón 3 (*Ins16bp*) de *Tp53* se especifica en la Tabla 3. En ambos polimorfismos, la distribución de frecuencias génicas se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,1$).

Tabla 3. Distribución de los polimorfismos en el codón 72, exón 4 (Arg72Pro) y en el intrón 3 (Ins16bp) de Tp53 en la cohorte de pacientes con ictus isquémico.

<i>Arg72Pro Tp53</i>	N	%	<i>Ins16bp Tp53</i>	N	%
<i>Arg/Arg</i>	235	57,6	<i>No ins/No ins</i>	292	71,6
<i>Arg/Pro</i>	147	36	<i>No ins/ Ins</i>	111	27,2
<i>Pro/Pro</i>	26	6,4	<i>Ins/Ins</i>	5	1,2

En la Tabla 4 se muestra el resto de las variables cuantitativas.

Tabla 4. Variables cuantitativas en la cohorte de pacientes con infarto cerebral.

	<i>N</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Media</i>	<i>SD</i>
TAS	408	92	234	151,5	26,6
TAD	408	44	137	82,7	14,9
TAS (24 horas)	399	79	210	139,4	24,5
TAD (24 horas)	399	47	137	75,9	12,8
TAS (48 horas)	398	83	212	136,7	23,3
TAD (48 horas)	398	40	117	74,9	12,1
Temperatura	408	35,0	38,8	36,3	0,51
Temperatura (24 horas)	399	35,0	39,0	36,4	0,49
Temperatura (48 horas)	401	68	510	136,8	61
Glucemia (mg/dl)	392	68	442	123,2	48,3
Leucocitos x 1000/ml	407	4	20,8	8,6	2,69
Plaquetas x 1000/ml	406	81	934	242,2	86,12
INR	392	0,9	3,3	1,1	0,27
Fibrinógeno (mg/dl)	356	207	1033	482,6	121,9
PCR-us(mg/dl)	325	0,0	57,6	2,94	5,5
Volumen (ml)	399	0	504	31	58,7
NIHSS	408	0	30	6,99	6,38
NIHSS (24 horas)	406	0	28	6,61	6,56
NIHSS (48 horas)	405	0	29	6,21	6,23

TAS, tensión arterial sistólica; TAD, tensión arterial diastólica; INR, “*international normalized ratio*”; PCR-us, proteína C reactiva ultrasensible; NIHSS, “*National Institute of Health stroke scale*”.

Como ya hemos indicado, la cuantificación del estado funcional a los 3 meses tras el infarto cerebral se realizó mediante la escala de Rankin modificada (Rankin-m) (Wolfe et al. 1991). Así, un 39,5% de los pacientes con infarto cerebral (N=161) estaban en la situación definida como mal pronóstico (Rankin-m > 2). La distribución de los distintos estados funcionales de los pacientes con infarto cerebral se resume en la Tabla 5.

Tabla 5. Distribución de los distintos estados funcionales en la cohorte de pacientes con ictus isquémico.

Rankin-m	N	%
0	80	19,6
1	98	24
2	69	16,9
3	52	12,7
4	44	10,8
5	33	8,1
6	32	7,8

1.1.2. Polimorfismo Arg72Pro de Tp53 y pronóstico funcional: Análisis bivalente.

En la Figura 1 se muestra el estado funcional (Rankin-m) a los 3 meses tras el infarto cerebral de los pacientes según los diferentes genotipos del polimorfismo Arg72Pro de Tp53 (Arg/Arg, Arg/Pro y Pro/Pro).

Los valores de Rankin-m resultaron ser significativamente superiores (Mann-Whitney-Wilcoxon test; $p < 0,0001$) en los pacientes que portaban el genotipo Arg/Arg que en los Arg/Pro o Pro/Pro, que resultaron ser similares. En este sentido, se ha descrito que el alelo Pro ejerce un efecto dominante sobre el alelo Arg (Biros et al. 2002; Wu et al. 2002; Bonafe et al. 2004), por lo que hemos agrupado los genotipos que contienen el alelo Pro (Arg/Pro y Pro/Pro) en un único grupo que denominamos Pro+ (Arg+: Arg/Arg). Así, la mediana de los valores de Rankin-m en los pacientes homocigotos para el alelo Arg (grupo Arg+) fue de 3 [1, 5], mientras que en los

pacientes homocigotos o heterocigotos para el alelo *Pro* (grupo Pro+) fue de 1 [0, 2] (Mann-Whitney-Wilcoxon test; $p < 0,0001$) (Figura 1).

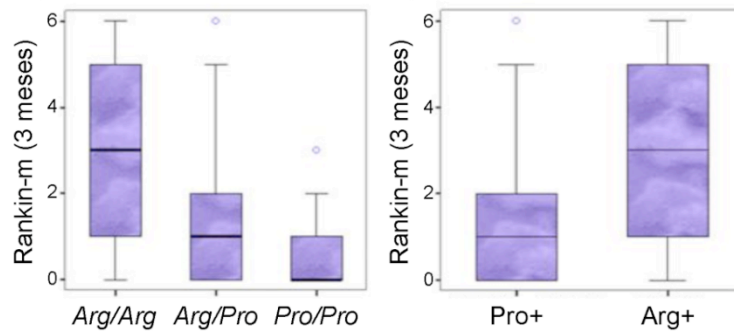


Figura 1. Asociación entre el polimorfismo Arg72Pro de Tp53 y el estado funcional a los 3 meses tras el infarto cerebral. El estado funcional de los pacientes de ictus isquémico se cuantificó mediante la escala de Rankin modificada (Rankin-m). Los valores de Rankin-m son superiores en los pacientes que portan el genotipo *Arg/Arg* que en los *Arg/Pro* o *Pro/Pro*, que resultaron ser similares, por lo que se agruparon. (Pro+: *Arg/Pro* + *Pro/Pro*; Arg+: *Arg/Arg*).

De los 235 pacientes con el genotipo *Arg/Arg*, 131 tuvieron mal pronóstico funcional a los 3 meses (Rankin-m > 2). Sin embargo, de los 173 pacientes que portaban el alelo *Pro* (grupo Pro+), tuvieron mal pronóstico únicamente 30 pacientes (Chi cuadrado 61,5; $p < 0,0001$). Es más, de los 26 pacientes homocigotos *Pro/Pro* que sufrieron un ictus isquémico, ninguno de ellos tuvo mal pronóstico (Figura 2). Por tanto, dentro del grupo de pacientes con mal pronóstico (N = 161), el 81,4% de los pacientes eran homocigotos para el alelo *Arg*.

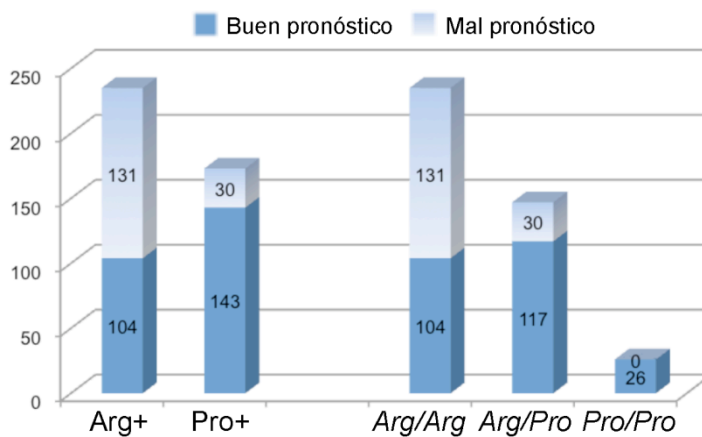


Figura 2. Asociación entre el polimorfismo Arg72Pro de Tp53 y el pronóstico funcional a los 3 meses tras el infarto cerebral. El número de

pacientes con mal pronóstico funcional (Rankin-m > 2) es mayor en el grupo de pacientes con el genotipo *Arg/Arg* (Arg+), que en los pacientes que portan el genotipo *Arg/Pro* o *Pro/Pro* (que se agruparon como Pro+).

A diferencia de lo ocurrido con Arg72Pro, no se encontraron diferencias significativas en los valores de Rankin-m entre los diferentes genotipos del polimorfismo en el intrón 3 de *Tp53* (*No Ins/No Ins*, *No Ins/Ins*, *Ins/Ins*) (figura 3)

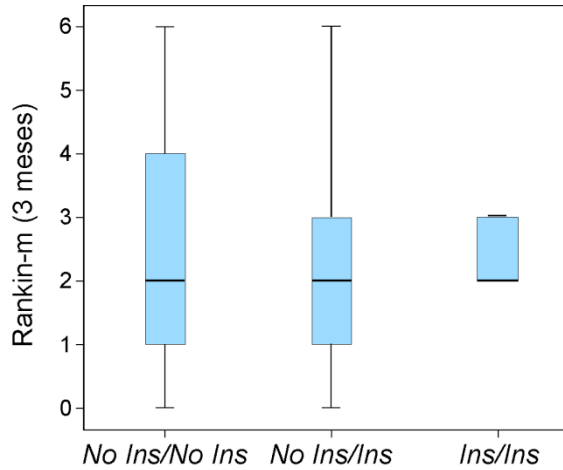


Figura 3. Relación entre el polimorfismo *Ins16bp* de *Tp53* y el estado funcional a los 3 meses tras el infarto cerebral. El estado funcional de los pacientes de ictus isquémico se

cuantificó mediante la escala de Rankin modificada (Rankin-m). Los valores del Rankin-m fueron similares en los tres genotipos del polimorfismo *Ins16bp* de *Tp53*.

1.1.3. Polimorfismo Arg72Pro, volumen del infarto y deterioro neurológico precoz: Análisis bivariantes.

Los datos relativos a las variables utilizadas para los análisis secundarios mostraron que el volumen medio de los infartos en el 2º TC (4º - 7º día) fue de 31,1 ±58,7 ml (N = 399) y que un 10,8% (44) de los pacientes sufrieron deterioro neurológico precoz (DNP, empeoramiento en 4 o más puntos en el valor de la NIHSS en las primeras 48 horas tras el infarto cerebral).

La media del volumen del infarto fue significativamente diferente entre los pacientes con buen y mal pronóstico funcional a los 3 meses. Así, en los primeros el volumen del infarto fue de 10,4 ±16 ml, mientras que en los segundos fue de 58,8 ± 81 (U Mann Whitney 7321,5; p < 0,0001).

En la Figura 4 se muestra la relación entre el volumen medio del infarto y el polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53*. Así, observamos que el volumen de infarto a los 4-7 días del ictus isquémico es significativamente superior (Chi-square test, p<0.0001) en pacientes con el genotipo *Arg/Arg* (39.7 ± 65.9 mL) que los *Arg/Pro* (21.8 ± 48.5 mL) o *Pro/Pro* (6.9 ± 12.0 mL). Cuando los genotipos fueron dicotomizados en Arg+ y Pro+, se

observó que entre los 227 pacientes Arg+ el volumen medio del infarto fue de 39,72 ml \pm 66, mientras que en los Pro+ fue de 19,6 \pm 45 ml (U Mann Whiney 14159,5; $p < 0,0001$).

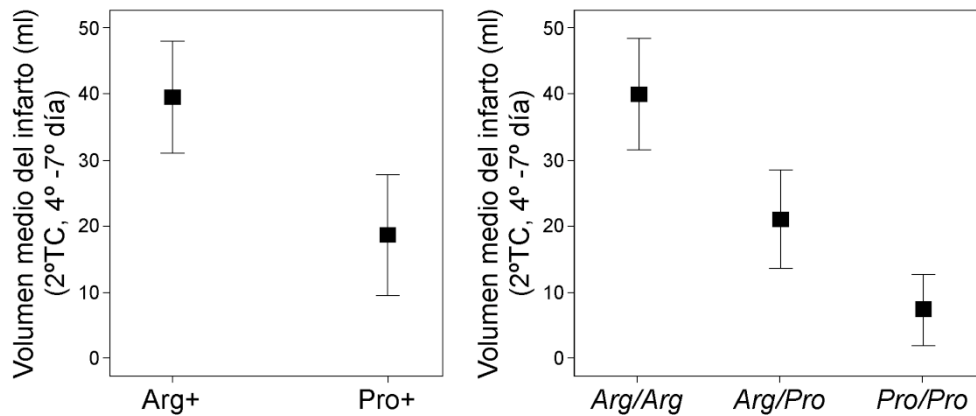


Figura 4. Asociación entre el polimorfismo Arg72Pro de Tp53 y el volumen medio del infarto en el 2° TC (4° - 7° día). El volumen medio del infarto resultó ser significativamente superior en los pacientes con el genotipo Arg/Arg (Arg+), que en los pacientes que portan el genotipo Arg/Pro o Pro/Pro (que se agruparon como Pro+).

El análisis de la variable secundaria, deterioro neurológico precoz, reveló que entre los 161 pacientes con infarto cerebral que sufrieron mal pronóstico, hubo DNP en 40 pacientes (24,8%), mientras que entre los 247 con buen pronóstico hubo DNP en 4 pacientes (1,6%) (Chi cuadrado 54,64; $p < 0,0001$).

Posteriormente, estudiamos la relación bivalente entre el DNP y el polimorfismo Arg72Pro de Tp53 (Figura 5). El estudio mostró que el 17,4% (41 de 235) de los pacientes que portan el genotipo Arg/Arg sufrieron DNP a las 48 horas del ictus, mientras que éste ocurrió únicamente en el 2% (3 de 147) de los pacientes Arg/Pro y en ninguno (0 de 26) de los Pro/Pro (Chi-square test, $p < 0,0001$). Cuando expresamos los datos dicotomizados por genotipo, la frecuencia de DNP fue de un 17,4% (41/235) en los homocigotos para el alelo Arg (Arg+), mientras que en los portadores del alelo Pro (Pro+) fue de un 1,7% (3/173) (Chi cuadrado 25,6; $p < 0,0001$) (Figura 5).

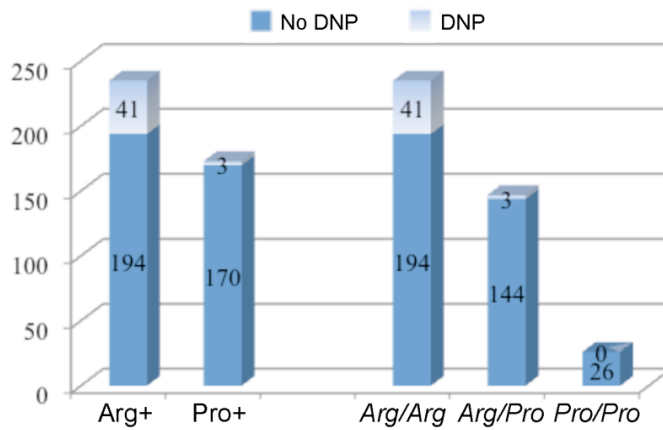


Figura 5. Asociación entre el polimorfismo Arg72Pro de Tp53 y el deterioro neurológico precoz (DNP) a los 3 meses tras el infarto cerebral.

El número de pacientes que sufrieron DNP es mayor en el grupo de pacientes con el genotipo Arg/Arg (Arg+), que en el grupo de pacientes que portan el genotipo Arg/Pro o Pro/Pro (que se agruparon como Pro+). Se consideró DNP al empeoramiento en 4 o más puntos en el valor de la NIHSS en las primeras 48 horas tras el infartocerebral.

En la Tabla 6 se resume un análisis univariante de todas las variables utilizadas en la cohorte de pacientes con ictus isquémico, segregadas según el pronóstico (mal pronóstico: Rankin-m > 2). Los valores se expresan como medias (\pm SD) o porcentajes, excepto el valor de NIHSS que se expresó como mediana [rango intercuartil].

Tabla 6. Análisis univariante de las variables segregadas por el pronóstico en la cohorte de pacientes con ictus isquémico.

	Buen pronóstico N =247	Mal pronóstico N =161	P
Edad, años	70,1 (11,7)	78,8 (9,9)	<0,0001
Varones, %	68,0	46,0	<0,0001
Hipertensión, %	51,1	64,6	0,007
Diabetes, %	27,1	24,8	0,347
Tabaquismo, %	17,4	8,1	0,005
Abuso alcohol, %	9,3	7,5	0,321
Hipercolesterolemia, %	33,2	28,6	0,191
Enfermedad coronaria, %	13,8	14,3	0,496
Fibrilación auricular, %	14,6	24,8	0,007
TAS, mm Hg	148,5 (25,9)	155,6 (28,1)	0,049
TAD, mm Hg	81,7 (3,9)	82,5 (14,7)	0,708
Temperatura, °C	36,3 (0,5)	36,3 (0,5)	0,296
Glucemia, mg/dL	132,7 (60,5)	140,2 (60,6)	<0,0001
Leucocitos, x10 ³ /mL	8,2 (2,4)	9,0 (2,8)	<0,0001
Plaquetas, x10 ³ /mL	231,1 (65,8)	255,3 (70,0)	0,045
INR	1,1 (0,3)	1,1 (0,2)	0,003
Fibrinógeno, mg/dL	452,9 (103,8)	526,9 (130,7)	<0,0001
hs-CRP, mg/dL	1,6 (2,4)	4,6 (7,9)	<0,0001
NIHSS	3 [1, 5]	11 [6, 17]	<0,0001
DNP, %	1,6	24,8	<0,0001
Volumen de infarto, mL	10,4 (16,0)	58,8 (81,1)	<0,0001
TOAST:			0,006
- Cardioembólico, %	30,4	4,3	
- Aterotrombótico, %	10,1	8,1	
- Lacunar, %	15,0	5,6	
- Indeterminado, %	42,1	39,1	
- Otros, %	2,4	1,9	
Arg/Arg	42,1	81,4	<0,0001
Arg/Pro + Pro/Pro, %	57,9	18,6	<0,0001

Los valores son datos clínicos y de imagen de los pacientes en el momento del ingreso. Están expresados como medias (SD) o porcentajes. TAS, tensión arterial sistólica; TAD, tensión arterial diastólica; INR, “international normalized ratio”; PCR-us, proteína C reactiva ultrasensible; NIHSS, “National Institute of Health stroke scale”; DNP, deterioro neurológico precoz.

1.1.4. Análisis multivariante principal: Polimorfismo Arg72Pro y pronóstico funcional.

Cuando se realizó el análisis multivariante, según la metodología expuesta en el apartado Material y Métodos, el modelo incluyó entre las variables independientes vinculadas a mal pronóstico a los tres meses el genotipo Arg/Arg con una OR de 3,425 (IC al 95%: 1,54 – 7,61). El resto de las variables se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Análisis multivariante. Variable respuesta: mal pronóstico a los 3 meses del ictus isquémico.

	B	E.T.	Wald	gl	Sig.	OR	I.C. 95% para OR	
	Inf	Sup	Inf	Sup	Inf	Sup	Inf	Sup
Edad	0,054	0,018	8,847	1	0,003	1,055	1,018	1,093
HTA	0,942	0,422	4,984	1	0,026	2,564	1,122	5,860
Vol Infarto	0,018	0,008	5,243	1	0,022	1,018	1,003	1,033
NIHSS	0,286	0,047	37,339	1	0,000	1,330	1,214	1,458
DNP	2,770	0,874	10,042	1	0,002	15,962	2,877	88,554
Arg/Arg	1,231	0,408	9,121	1	0,003	3,425	1,541	7,615
Constante	-10,414	1,831	32,365	1	0,000	0,000		

DNP: deterioro neurológico precoz; HTA, hipertensión; NIHSS: “National Institute of Health stroke scale” al ingreso; Vol, volumen.

El modelo presentó un R² de Cox y Snell de 0,509 (R² de Nagegelkerke: 0,69). Las frecuencias esperadas por el modelo se ajustaban a las observadas según la prueba de Hosmer y Lemeshow (Chi cuadrado 6,526; p = 0,59).

1.1.5. *Análisis multivariante de las variables respuesta secundarias: Deterioro neurológico precoz y volumen del infarto.*

Así mismo, se realizó un análisis secundario evaluando un modelo de regresión logística para el riesgo de deterioro neurológico precoz como variable dependiente que mostró de nuevo la presencia del genotipo Arg-Arg como variable independiente asociada a ello con un OR de 9,95 (IC al 95%: 2,23 – 44,30).

Tabla 8. Análisis multivariante. Variable respuesta: Deterioro neurológico precoz.

	<i>B</i>	<i>E.T.</i>	<i>Wald</i>	<i>gl</i>	<i>Sig.</i>	<i>OR</i>	<i>I.C. 95,0% para OR</i>	
	<i>Inf</i>	<i>Sup</i>	<i>Inf</i>	<i>Sup</i>	<i>Inf</i>	<i>Sup</i>	<i>Inf</i>	<i>Sup</i>
Edad	0,042	0,021	4,002	1	0,045	1,043	1,001	1,087
Vol Infarto	0,008	0,003	8,449	1	0,004	1,008	1,003	1,014
POLI_CT	2,298	0,762	9,092	1	0,003	9,950	2,235	44,303
Constante	-7,576	1,793	17,856	1	0,000	0,001		

El siguiente análisis secundario fue la elaboración de un modelo de regresión lineal multivariante para el volumen de infarto. Aunque en la comparación univariante el volumen de los infartos es distinto en los pacientes con distintas variantes polimórficas, al ajustarse a la influencia del resto de variables el polimorfismo Arg/Arg no se mantenía como predictor independiente del volumen de infarto.

1.2. Cohorte de pacientes con hemorragia intracerebral.

1.2.1. Análisis descriptivo general.

La media de edad de los 128 pacientes con hemorragia intracerebral (HIC) fue de $71,2 \pm 12,3$ años. El 57,8% (74) varones.

La distribución de los factores de riesgo se expone en la Tabla 9. Así, el 55,5% de los pacientes con HIC padecían hipertensión, el 18,8% diabetes y, el resto, fibrilación auricular, cardiopatía isquémica, tabaquismo, enolismo o ictus previo.

Tabla 9. Distribución de los factores de riesgo en la cohorte de pacientes con hemorragia intracerebral.

Factor de riesgo	N (128)	%
Hipertensión	71	55,5
Diabetes	24	18,8
Tabaquismo	14	10,9
Abuso de alcohol	19	14,8
Cardiopatía Isquémica	10	7,8
Fibrilación Auricular	17	13,3
Ictus previo	19	14,8

La distribución del tipo de causa atribuible a la hemorragia se describe en la Tabla 10.

Tabla 10. Distribución de los grupos etiológicos en la cohorte de pacientes con hemorragia intracerebral.

Etiología	N	%
Hipertensión	76	59,4
Otras	22	17,2
Anticoagulantes	18	14,1
Amiloidea	10	7,8
Malformación arteriovenosa	2	1,6

La localización más frecuente en la cohorte fue la hemisférica profunda (75 pacientes; 58,6%), seguida de la lobular (41 pacientes; 32%). Había 7 pacientes con hemorragia cerebelosa (5,5%), 4 con hemorragias en el tronco del encéfalo (3,1%) y una hemorragia intraventricular primaria.

La mediana de la puntuación de la escala NIHSS en el momento del ingreso de los pacientes con HIC fue de 8 [4,12], con un volumen medio de hemorragia al ingreso de 20,5 ±26,9ml. Un 26,6% (34) de los pacientes de la cohorte tenían extensión ventricular, en un 19,5% de la serie hubo expansión del hematoma (aumento en >33% del volumen hemático entre el primer y segundo TC). Además, hubo deterioro neurológico precoz en un 10,2% (13) de los pacientes.

La distribución de las distintas variantes polimórficas en el exón 4, codón 72 (*Arg72Pro*) y en el intrón 3 (*Ins16bp*) de *Tp53* se especifica en la Tabla 11. En ambos polimorfismos, la distribución de frecuencias génicas se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg ($p>0,1$).

Tabla 11. Distribución de los polimorfismos en el codón 72, exón 4 (Arg72Pro) y en el intrón 3 (Ins16bp) de Tp53 en la cohorte de pacientes con hemorragia intracerebral.

<i>Arg72Pro Tp53</i>	N	%	<i>Ins16bp Tp53</i>	N	%
<i>Arg/Arg</i>	67	52,3%	<i>No ins/No ins</i>	93	72,7
<i>Arg/Pro</i>	54	42,2%	<i>No ins/ Ins</i>	30	23,4
<i>Pro/Pro</i>	7	5,5%	<i>Ins/Ins</i>	5	3,9

La distribución del resto de las variables cuantitativas se expone en la Tabla 12.

Tabla 12. Variables cuantitativas en la cohorte de pacientes con hemorragia intracerebral.

	<i>N</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Media</i>	<i>SD</i>
TAS	128	97	253	163,79	30,153
TAD	128	46	146	89,63	17,306
TAS (24 horas)	128	93	228	150,31	27,087
TAD (24 horas)	128	43	167	82,04	17,116
TAS (48 horas)	128	83	227	146,73	26,438
TAD (48 horas)	128	47	133	79,37	14,509
Temperatura	128	35,0	39,0	36,388	0,6373
Temperatura (24 horas)	128	35,0	38,0	36,557	0,5085
Temperatura (48 horas)	128	6,0	37,8	36,316	2,7477
Glucemia (mg/dl)	128	64	265	126,84	36,755
Leucocitos x 1000/ml	128	1,6	20,4	8,735	2,7353
Plaquetas x 1000/ml	128	14	574	233,30	82,235
INR	128	0,8	3,8	1,145	0,4359
Fibrinógeno (mg/dl)	127	208	801	466,17	117,958
PCR-us(mg/dl)	101	0	39,0	4,551	7,7343
Volumen(ml)	128	1,0	238,0	20,515	26,9838
Volumen (48-72 horas, ml)	127	0	250,0	23,154	30,8999
Vol. edema (48-72 horas, ml)	127	0	150,0	18,078	26,7453
Vol. residual (3 meses, ml)	112	0	79,0	13,946	16,6695
NIHSS	128	0	28	8,59	6,271
NIHSS (24 horas)	128	0	28	8,59	6,541
NIHSS (48 horas)	127	0	26	7,88	6,434
NIHSS (alta)	119	0	20	6,64	5,608

TAS, tensión arterial sistólica; TAD, tensión arterial diastólica; INR, “international normalized ratio”; PCR-us, proteína C reactiva ultrasensible; NIHSS, “National Institute of Health stroke scale”.

La distribución de los distintos estados funcionales de los pacientes con HIC se resume en la Tabla 13. Un 49,2% (N =63) de los pacientes de la cohorte estaban en la situación definida como mal pronóstico funcional (Rankin-m > 2) a los 3 meses del ictus hemorrágico.

Tabla 13. Distribución de los distintos estados funcionales en la cohorte de pacientes con hemorragia intracerebral.

Rankin-m	N	%
0	26	20,3
1	22	17,2
2	17	13,3
3	18	14,1
4	21	16,4
5	9	7
6	15	11,7

1.2.2. Polimorfismo Arg72Pro de Tp53 y pronóstico funcional: Análisis bivalente.

En la Figura 6 se muestra el estado funcional (Rankin-m) a los 3 meses tras el ictus hemorrágico de los pacientes según los diferentes genotipos del polimorfismo Arg72Pro de Tp53 (Arg/Arg, Arg/Pro y Pro/Pro).

Como ya observamos en la cohorte de pacientes con infarto cerebral (Figura 1), los valores de Rankin-m resultaron ser significativamente superiores (Mann-Whitney-Wilcoxon test; $p < 0,0001$) en los pacientes con HIC que portaban el genotipo Arg/Arg que en los Arg/Pro o Pro/Pro, que resultaron ser similares. De hecho, la mediana de los valores de Rankin-m en los pacientes homocigotos para el alelo Arg (Arg+) fue de 4 [3, 5], mientras que en los pacientes homocigotos o heterocigotos para el alelo Pro (Pro+) fue de 1 [0, 2] (Mann-Whitney-Wilcoxon test; $p < 0,0001$).

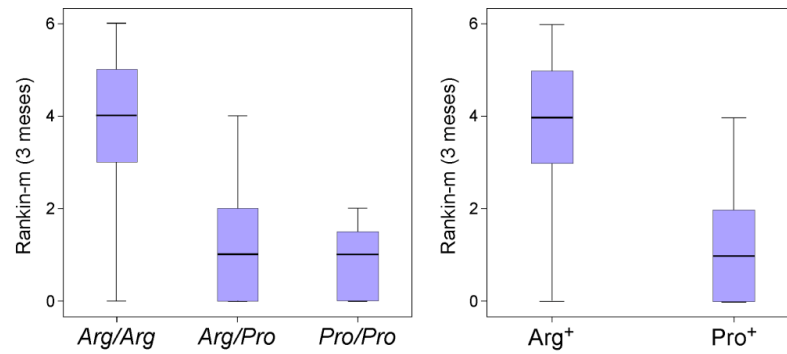


Figura 6. Asociación entre el polimorfismo Arg72Pro de Tp53 y el estado funcional a los 3 meses tras la hemorragia intracerebral. El estado funcional de los pacientes de HIC se cuantificó mediante la escala de Rankin modificada (Rankin-m). Los valores de Rankin-m son superiores en los pacientes que portan el genotipo Arg/Arg que en los Arg/Pro o Pro/Pro, que resultaron ser similares, por lo que se agruparon. (Pro+: Arg/Pro + Pro/Pro; Arg+: Arg/Arg;).

Cuando comparamos la distribución de las variantes alélicas y el buen o mal pronóstico funcional, se observó que de los 67 pacientes con HIC que portaban el genotipo Arg/Arg, 58 (92%) tenían una situación funcional de Rankin-m > 2 (mal pronóstico) a los 3 meses del ictus. Sin embargo, este fenómeno sólo ocurrió en 5 de los 54 pacientes que eran Arg/Pro y en ninguno de los 7 pacientes Pro/Pro. Por tanto, solo 5 de los 61 (7,9%) pacientes que portaban el alelo Pro (Pro+) presentaron mal pronóstico, frente al 92% de los pacientes Arg+ ($p < 0,0001$; Chi cuadrado).

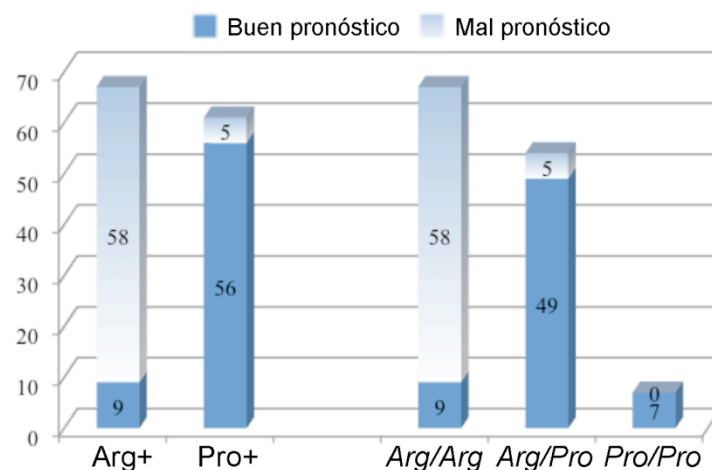


Figura 7. Asociación entre el polimorfismo Arg72Pro de Tp53 y el pronóstico funcional a los 3 meses tras la hemorragia intracerebral. El número de pacientes con mal pronóstico funcional (Rankin-m > 2) es mayor en el grupo de pacientes con el genotipo Arg/Arg (Arg+), que en los pacientes que portan el genotipo Arg/Pro o Pro/Pro (que se agruparon como Pro+).

A diferencia de lo ocurrido con el genotipo del polimorfismo Arg72Pro, no se encontraron diferencias significativas en los valores de Rankin-m entre las distintas variantes alélicas del intrón *Tp53* (*No Ins/NoIns*, *No Ins/Ins*, *Ins/Ins*): ver figura 8.

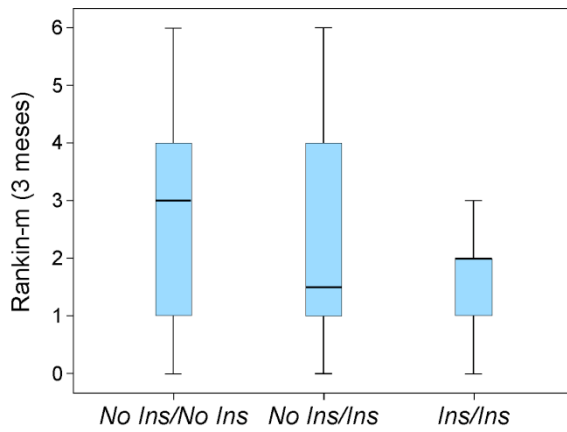


Figura 8. Relación entre el polimorfismo *Ins16bp* de *Tp53* y el estado funcional a los 3 meses tras la hemorragia intracerebral. El estado funcional de los pacientes de ictus hemorrágico se cuantificó mediante la escala de Rankin modificada (Rankin-m). Los valores del Rankin-m fueron similares en los tres genotipos del polimorfismo *Ins16bp* de *Tp53*.

de Rankin modificada (Rankin-m). Los valores del Rankin-m fueron similares en los tres genotipos del polimorfismo *Ins16bp* de *Tp53*.

1.2.3. Polimorfismo Arg72Pro, volumen residual y volumen del edema perihematoma (análisis univariante).

Una de las variables secundarias estudiadas en la cohorte de pacientes con HIC fue el volumen de la lesión residual final en el 3er TC. Los pacientes con el genotipo *Arg/Arg* tenían una media del volumen residual unas 5 veces superior que los pacientes homocigotos *Pro/Pro* o heterocigotos *Arg/Pro* (Figura 9). En los pacientes portadores del alelo *Pro* la media del volumen de la lesión residual fue de $3,4 \pm 4,6$ ml, mientras que en los homocigotos para el alelo *Arg* fue de $24,9 \pm 17,6$ ml ($p < 0,0001$; test de la *t* de Student).

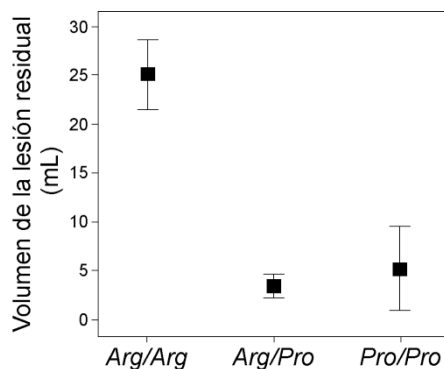


Figura 9. Asociación entre el polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* y el volumen de la lesión residual. La media del volumen de la lesión residual es mayor en el grupo de pacientes con el genotipo *Arg/Arg*, que en los pacientes que portan el genotipo *Arg/Pro* o *Pro/Pro*.

En cuanto a la media del volumen del edema en el TC realizado entre las 48-72 horas tras la HIC, éste fue de $18,1 \text{ ml} \pm 26$. Cuando se estudió la asociación de esta variable con el polimorfismo Arg72Pro se observó que para el subgrupo de pacientes Arg+ (Arg/Arg) la media del volumen del edema fue de $25 \pm 28,6 \text{ ml}$, mientras que para el subgrupo de pacientes Pro+ (Arg/Pro + Pro/Pro) fue de $10,6 \pm 22,5 \text{ ml}$ ($p < 0,0001$ test U de Mann-Whitney).

Ocurriendo esto así para las variables citadas (volumen residual y volumen del edema), en cambio, no encontramos diferencias significativas en el volumen de la lesión al ingreso o a las 48-72 horas en función del genotipo Arg/Arg, Arg/Pro o Pro/Pro (Figura 10).

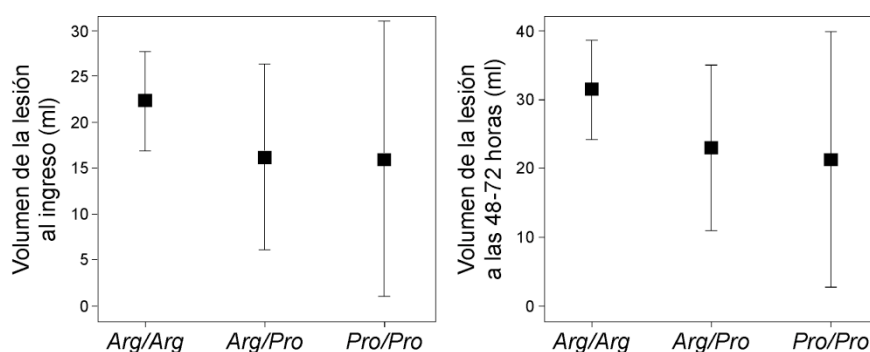


Figura 10. Relación entre el polimorfismo Arg72Pro de Tp53 y el volumen de la lesión al ingreso y a las 48-72 horas tras la hemorragia intracerebral. La media del volumen de la lesión, tanto al ingreso como a las 48-72 horas tras el ictus hemorrágico, no fue diferente en función del polimorfismo Arg72Pro de Tp53.

En la Tabla 14 se expone resumido un análisis univariante de las variables utilizadas en la cohorte de pacientes con HIC, segregadas según el pronóstico (mal pronóstico: Rankin-m > 2). Los valores se expresan como medias (\pm SD) o porcentajes, excepto el valor de NIHSS que se expresó como mediana [rango intercuartílico].

Tabla 14. Análisis univariante de las variables segregadas por el pronóstico en la cohorte de pacientes con ictus hemorrágico.

	Buen pronóstico N =69	Mal pronóstico N=59	p
Edad, años	69,3 (13,6)	76,4 (9,5)	0,009
Varones, %	56,5	59,3	0,445
Hipertension, %	55,1	55,9	0,532
Diabetes, %	10,1	28,8	0,007
Tabaquismo, %	10,1	11,9	0,487
Abuso de alcohol, %	17,4	11,9	0,267
Enfermedad coronaria, %	5,8	10,2	0,278
Fibrilación auricular, %	15,9	10,2	0,244
TAS, mm Hg	154,5 (30,2)	165,9 (28,7)	0,097
TAD, mm Hg	88,6 (17,8)	87,6 (16,8)	0,745
Temperatura, °C	36,3 (0,5)	36,0 (0,8)	0,867
Glucemia, mg/dl	114,5 (28,5)	134,8 (41,8)	0,007
Leucocitos, x 1000/ml	8,3 (2,3)	9,4 (3,3)	0,072
Plaquetas, x 1000/ml	219,8 (52,7)	246,6 (117,1)	0,525
INR	1,2 (0,5)	1,2 (0,5)	0,270
Fibrinógeno, mg/dl	453,8 (120,5)	504,6 (113,7)	0,161
hs-CRP, mg/dl	3,7 (6,8)	5,7 (8,9)	0,083
NIHSS	3 [2,6]	10 [8,15]	<0,0001
Volumen al inicio, ml	11,2 (11,4)	27,5 (37,8)	<0,0001
Volumen de edema, ml	7,5 (12,9)	28,8 (36,0)	<0,0001
Volumen residual, ml	3,8 (5,06)	27,4 (17,2)	<0,0001
DNP, %	0	20,6	<0,0001
Topografía:			0,232
- Cerebelosa %	4,3	6,8	
- Profunda %	65,2	50,8	
- Lobar %	24,6	40,7	
- Tronco del encéfalo %	4,3	1,7	
- Intraventricular, %	1,4	0	
Extensión ventricular, %	14,5	40,7	0,001
Etiología:			0,318
- Hipertensión, %	63,8	54,2	
- Anticoagulantes, %	13,0	15,3	
- Amiloide, %	2,9	10,2	
- Indeterminada, %	19,8	17,0	
Arg/Arg, %	18,8	91,5	<0,0001

Los valores están expresados como medias (SD) o porcentajes. TAS, tensión arterial sistólica; TAD, tensión arterial diastólica; INR, “international normalized ratio”; PCR-us, proteína C reactiva ultrasensible; NIHSS, “National Institute of Health stroke scale”; DNP, deterioro neurológico precoz.

1.2.4. Análisis multivariante principal: Polimorfismo Arg72Pro y pronóstico funcional.

Existió una correlación significativa entre volumen al inicio y volumen de edema (coeficiente de Pearson = 0,744; $p < 0,0001$). Por la colinealidad, en la construcción del modelo de regresión logística se extrajo el volumen de edema manteniendo como covariable el volumen de inicio. El resto de las covariables introducidas fueron: edad, NIHSS al ingreso, existencia de contaminación ventricular, deterioro neurológico precoz, el antecedente de diabetes, la glucemia la ingreso, la temperatura a las 24 horas y el genotipo.

Tabla 15. Análisis multivariante. Variable respuesta: mal pronóstico a los 3 meses del ictus hemorrágico.

	<i>B</i>	<i>E.T.</i>	<i>Wald</i>	<i>gl</i>	<i>Sig.</i>	<i>OR</i>	<i>I.C. 95% para OR</i>	
	<i>Inf</i>	<i>Sup</i>	<i>Inf</i>	<i>Sup</i>	<i>Inf</i>	<i>Sup</i>	<i>Inf</i>	<i>Sup</i>
NIHSS	0,375	0,094	15,762	1	0,000	1,454	1,209	1,750
Arg/Arg	5,770	1,103	27,342	1	0,000	320,52	36,863	2786,891
Constante	-6,451	1,414	20,802	1	0,000	0,002		

NIHSS, "National Institute of Health stroke scale" al ingreso

Como se observa en la Tabla 15, el modelo de regresión logística mantenía como variables predictoras independientes de mal pronóstico la NIHSS al ingreso y el polimorfismo Arg/Arg, de forma que la OR del aumento en la puntuación en la NIHSS fue de 1,45 (IC al 95%: 1,2 – 1,7) y la presencia del polimorfismo Arg/Arg suponía un OR de 320,52 (IC al 95%: 36,8 – 2786,8). La R^2 de Cox y Snell fue de 0,609 (R^2 de Nagelkerke: 0,812). En la prueba de Hosmer Lemeshow, las frecuencias esperadas por el modelo no diferían de las observadas (Chi cuadrado 10; $p = 0,265$) y las pruebas ómnibus sobre los coeficientes del modelo era significativas, mostrando la bondad del ajuste del modelo.

1.2.5. Análisis multivariantes de las variables secundarias: volumen residual y volumen del edema perihematoma.

Se realizó un análisis secundario para evaluar si el polimorfismo se mantenía como variable independiente predictora del volumen residual mediante regresión

lineal múltiple. En la tabla 16 se exponen los resultados. El volumen de sangre al ingreso y la variante Arg de p53 fueron las variables con más significación en la predicción del volumen residual final tras la HIC.

Tabla 16: Analisis multivariante. Variable respuesta: volumen residual de la lesión tras la hemorragia intracerebral

	Coeficientes no estándar		Estándar Beta	t	Sig.	IC 95% para B		Colinealidad	
	B	SD				T	FIV		
Constante	-9,398	3,208		-2,929	0,004	-15,760	-3,036		
Volumen al ingreso	0,527	0,072	0,506	7,374	0,000	0,386	0,669	0,485	2,062
Arg/Arg	16,853	1,717	0,508	9,815	0,000	13,448	20,258	0,855	1,170
NIHSS al ingreso	0,235	0,209	0,078	1,125	0,263	-0,180	0,650	0,472	2,117
Contaminación HIC	2,187	2,102	0,054	1,041	0,300	-1,980	6,354	0,847	1,181
Diabetes	2,325	2,295	0,053	1,013	0,314	-2,227	6,876	0,848	1,179
Leucocitos al ingreso	0,202	0,313	0,033	0,646	0,520	-0,419	0,823	0,863	1,158
Plaquetas al ingreso	0,010	0,010	0,048	0,937	0,351	-0,011	0,030	0,857	1,167

NIHSS, “National Institute of Health stroke scale”; T, tolerancia; FIV, factor de inflación de la varianza.

De manera similar se realizó otro análisis secundario para el volumen del edema. Tras el análisis univariante con respecto a esta variable (coeficientes de correlación de Pearson o Spearman, según su distribución normal o nó) se introdujeron las variables significativas. En el estudio multivariante el genotipo Arg/Arg no mostró asociación independiente con el volumen del edema.

2. MECANISMOS MOLECULARES QUE MEDIAN LA DIFERENTE ACTIVIDAD APOPTÓTICA DE LAS VARIANTES POLIMÓRFICAS P53-ARG Y P53-PRO.

Una vez demostrado que el genotipo *Arg/Arg* está fuertemente asociado a un mal pronóstico funcional en pacientes de ictus, tanto isquémico como hemorrágico, nuestro siguiente objetivo fue investigar los mecanismos moleculares que median dicho fenómeno. Para ello, neuronas de corteza de rata en cultivo primario se transfectaron con un plásmido que expresa, junto con la GFP, la secuencia completa de las variante polimórficas humanas p53-Arg o p53-Pro.

2.1. La variante polimórfica p53-Arg posee una actividad apoptótica mayor que la variante p53-Pro en neuronas.

En primer lugar, comprobamos la funcionalidad de las variantes polimórficas del codón 72 de p53, p53-Arg y p53-Pro, mediante Western blot tras su expresión en células HEK293T. Como se muestra en la Figura 10, el análisis de los extractos proteicos de las células mostró la correcta expresión de p53-Arg y p53-Pro, de manera dependiente del tiempo tras la lipotransfección de las células. Es más, ambas variantes polimórficas inducen de manera similar la expresión de p21 y Bax, conocidas dianas moleculares de p53 (Polager and Ginsberg 2009).

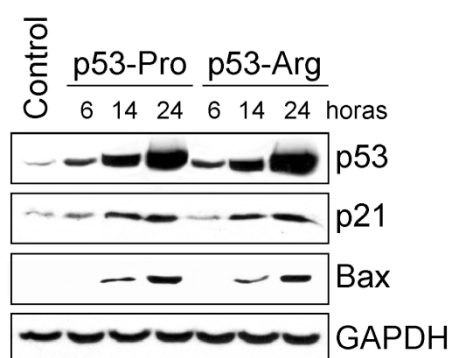


Figura 11. Funcionalidad de las variantes polimórficas del codón 72 de *Tp53*. Las células HEK293 se transfectaron con los plásmidos pIRES2-eGFP (Control), pIRES2-eGFP-p53Arg (p53-Arg) o pIRES2-eGFP-p53Pro (p53-Pro) y se determinó la funcionalidad de los mismos mediante Western

Blot, a los tiempos indicados. Ambas variantes polimórficas poseen la misma actividad transcripcional.

Posteriormente, decidimos estudiar la capacidad de las variantes polimórficas p53-Arg y p53-Pro de inducir la muerte por apoptosis en neuronas corticales. Para tal fin, las neuronas se transfectaron con concentraciones crecientes de los plásmidos pIRES2-eGFP (Control), pIRES2-eGFP-p53Arg (p53-Arg) o pIRES2-eGFP-p53Pro (p53-Pro), lo que permitió la expresión de concentraciones crecientes de las variantes polimórficas. Mediante citometría de flujo se analizó la muerte por apoptosis de las neuronas que expresaban p53-Arg o p53-Pro, identificadas como células GFP⁺, a las 6, 14 ó 24 horas de la transfección.

No se observó ningún efecto significativo sobre la apoptosis neuronal a las 6 horas postransfección. Sin embargo, a las 14 horas, y de manera dependiente de la concentración, la variante p53-Arg, pero no la p53-Pro, incrementó significativamente el porcentaje de neuronas apoptóticas (anexina V⁺/7AAD⁻) (Figura 12).

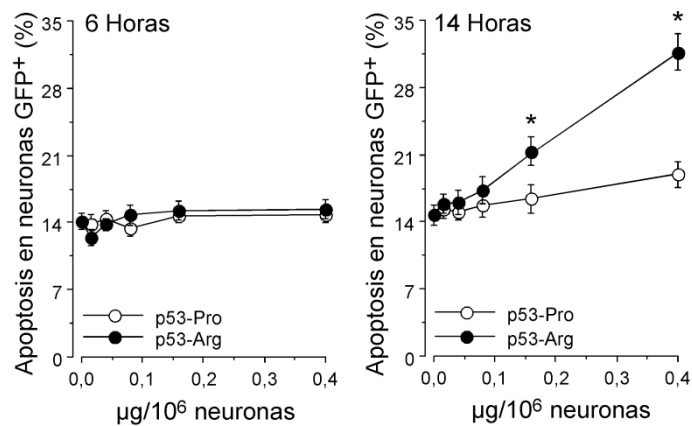


Figura 12. La variante polimórfica p53-Arg induce la apoptosis neuronal de manera dependiente de la concentración y el tiempo. Las neuronas se transfectaron con concentraciones crecientes de los plásmidos pIRES2-eGFP que expresan p53-Arg o p53-Pro y se determinó la apoptosis neuronal, mediante citometría de flujo, en la población de neuronas GFP⁺ (eficientemente transfectadas). Mientras que p53-Pro no afecta a la viabilidad neuronal a las 14 horas postransfección, p53-Arg induce la muerte por apoptosis de manera dependiente de la concentración y el tiempo. *p < 0.05 versus p53-Pro.

Es más, al analizar la supervivencia de las neuronas GFP⁺ (eficientemente transfectadas) mediante microscopía de fluorescencia, observamos que la expresión de p53-Arg (0,4 µg/10⁶ neuronas) produjo una disminución en el número de neuronas fluorescentes, así como la condensación celular y fragmentación de las neuritas, procesos ligados a la muerte por apoptosis (Figura 13).

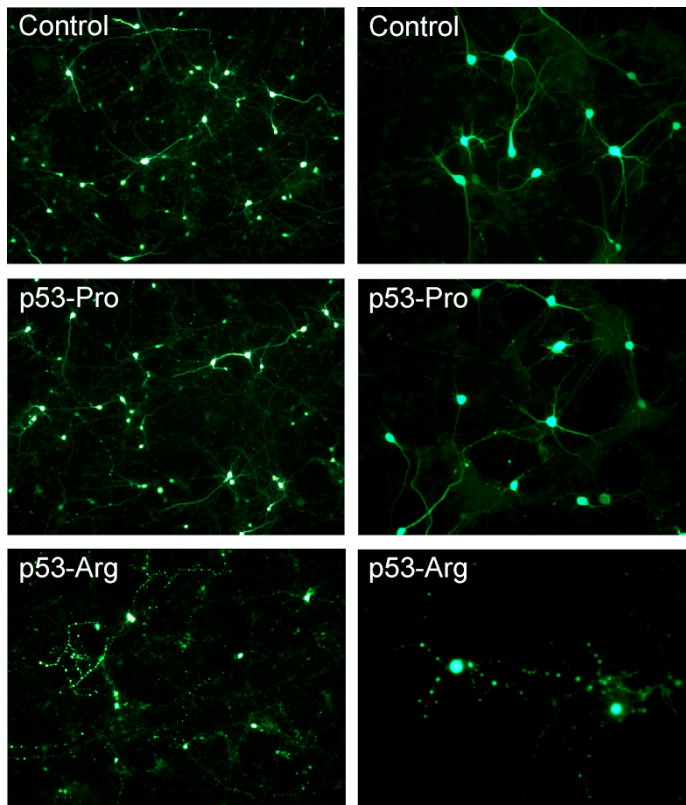


Figura 13. Microfotografías de neuronas que expresan p53-Arg o p53-Pro. Las neuronas se transfectaron con los plásmidos pIRES2-eGFP (Control), pIRES2-eGFP-p53Arg (p53-Arg)

o pIRES2-eGFP-p53Pro (p53-Pro) y se tomaron microfotografías a las 14 horas postransfección (Objetivos: 10X panel izquierdo, 20X panel derecho).

Dado que no habíamos observado ningún efecto de la variante polimórfica p53-Pro sobre la viabilidad neuronal, al menos hasta las 14 horas de la transfección, decidimos estudiar el proceso a tiempos más largos e incrementar la concentración de proteína expresada en las neuronas. De manera similar a lo descrito anteriormente (Figura 14), el estudio a las 24 horas de la transfección reveló que el incremento en la apoptosis neuronal causado por p53-Arg fue significativamente mayor que el causado por p53-Pro. Es más, para producir un efecto similar sobre el porcentaje de neuronas apoptóticas (45-50%), las concentraciones de p53-Pro ($1,6 \mu\text{g}/10^6$ neuronas) debían ser unas 4 veces superiores a las de p53-Arg ($0,4 \mu\text{g}/10^6$ neuronas) (Figura 14).

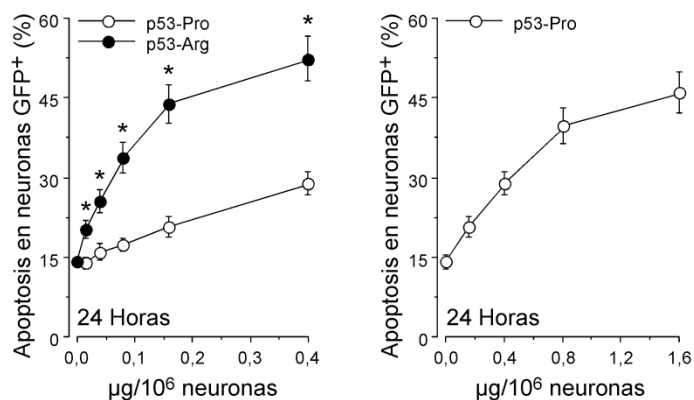


Figura 14. La variante polimórfica p53-Arg es más efectiva en la inducción de la apoptosis neuronal que la variante p53-Pro. Las neuronas se transfectaron con concentraciones crecientes de los plásmidos pIRES2-eGFP que expresan p53-Arg o p53-Pro. Tras 24 horas, se determinó la apoptosis neuronal, mediante citometría de flujo, en la población de neuronas GFP⁺ (eficientemente transfectadas). La variante p53-Arg induce la muerte por apoptosis más eficientemente que p53-Pro. *p < 0.05 versus p53-Pro.

2.2. El efecto de p53-Arg sobre la apoptosis neuronal está mediado por la activación de la caspasa 3.

Es bien conocido que el factor de transcripción p53 induce la apoptosis celular mediante la activación de genes proapoptóticos, como es Bax (Okuno et al. 2004; Niizuma et al. 2009), entre otros. Con objeto de investigar si el efecto de p53-Arg sobre la apoptosis neuronal era debido a una mayor actividad transcripcional, respecto a p53-Pro, las neuronas se incubaron en medio de cultivo que contenía un inhibidor específico de dicha actividad de p53, la pifithrina-alfa (PFT α) (Zhu et al. 2002a).

Como se observa en la Figura 15 (panel izquierdo), PFT α inhibió la actividad transcripcional de ambas variantes polimórficas de manera similar y dependiente de la concentración, a juzgar por el bloqueo en la expresión de Bax. Sin embargo, el inhibidor no previno la apoptosis neuronal causada por p53-Arg a las 14 ó 24 horas de la transfección (Figura 15).

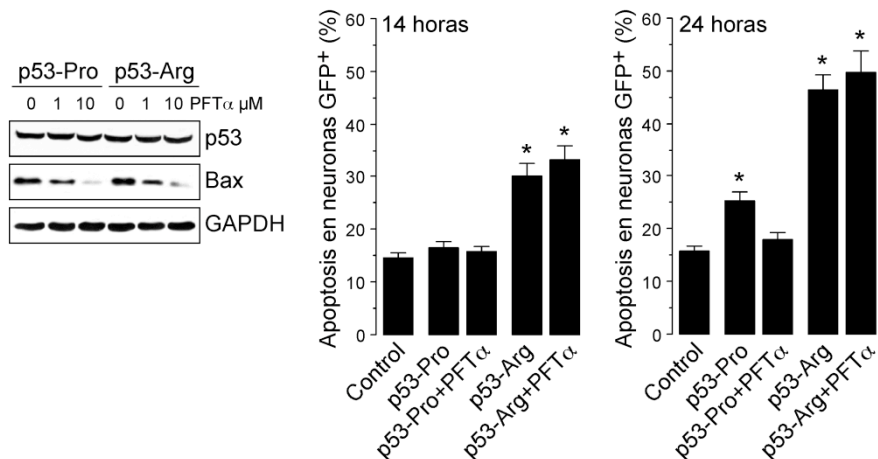


Figura 15. La mayor actividad apoptótica de p53-Arg no está mediada por su actividad transcripcional. Las neuronas se transfectoron con los plásmidos pIRES2-eGFP vacío (Control) o que expresan p53-Arg o p53-Pro y se incubaron en medio de cultivo que contenía PFTα durante 14 ó 24 horas. A estos tiempos, se determinó la apoptosis neuronal, mediante citometría de flujo, en la población de neuronas GFP⁺ (eficientemente transfectadas). PFTα inhibió la actividad transcripcional de ambas variantes polimórficas, de manera dependiente de la concentración (panel izquierdo). Sin embargo, no previno la apoptosis neuronal causada por p53-Arg. *p < 0.05 versus Control.

Como ya hemos indicado, La apoptosis celular ocurre a través de dos rutas principales, la vía extrínseca e intrínseca. Estas vías se activan por diferentes caspasas iniciadoras (2 y 8 para la vía extrínseca, 9 para la vía intrínseca), que confluyen en la activación de la caspasa 3, desencadenando la muerte por apoptosis (Sastry and Rao 2000; Green 2005). Para dilucidar la vía de señalización involucrada en el efecto neurotóxico de p53-Arg, ésta se expresó en las neuronas en presencia de los inhibidores generales y específicos de las diferentes caspasas que se citan en la Figura 16. A las 14 horas de incubación, se determinó la apoptosis en la población de neuronas GFP⁺ por citometría de flujo. La presencia de los inhibidores generales de la vía de activación de las caspasas, ZVADy ZDEVD, previnieron la apoptosis neuronal causada por p53-Arg, alcanzando valores similares al grupo control p53-Pro. De forma similar, la incubación con el inhibidor específico de la caspasa 3 (ZDQMD) o de la caspasa 9 (ZLEHD), previno la neurotoxicidad de p53-Arg. Sin embargo, los inhibidores específicos de la caspasa 2 (VDVAD) y de la caspasa 8 (ZIETD) no fueron capaces de prevenir la apoptosis neuronal acusada por p53-Arg (Figura 16).

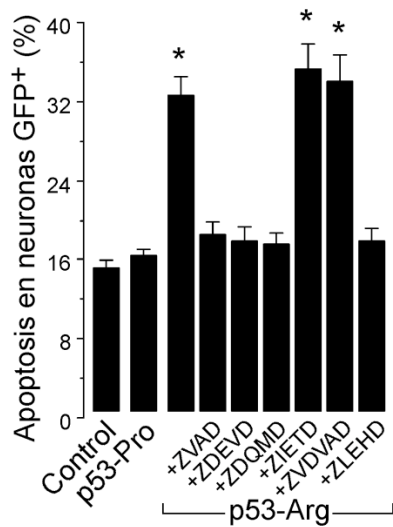


Figura 16. La vía intrínseca de activación de las caspasas media la neurotoxicidad de p53-Arg. Las neuronas se transfectaron con los plásmidos pIRES2-eGFP vacío (Control) que expresan p53-Arg o p53-Pro y se incubaron en medio de cultivo que contenía los inhibidores generales de caspasas (ZVAD y ZDEV) o los específicos de caspasa 3 (ZDQMD), caspasa 2 (VDVAD), caspasa 8 (ZIETD) y caspasa 9 (ZLEHD). Tras 14 horas, se determinó la apoptosis neuronal,

mediante citometría de flujo, en la población de neuronas GFP⁺ (eficientemente transfectadas). La neurotoxicidad de p53-Arg está mediada por la activación de las caspasas 9 y 3. *p < 0.05 versus Control.

A continuación, decidimos comprobar la activación de la caspasa 3 en las neuronas que expresaban p53-Arg mediante el análisis, por citometría de flujo, de la caspasa 3 activa y de un dominio de PARP1 generado como consecuencia de la proteólisis de la proteína causada por la caspasa 3 activa (PARP1 procesado). A las 14 horas de la transfección, p53-Arg incrementó significativamente ($p < 0,05$) la expresión de la caspasa 3 activa y de PARP1 procesado en las neuronas. Sin embargo, dicho efecto no se mimetizó con p53-Pro (Figura 17).

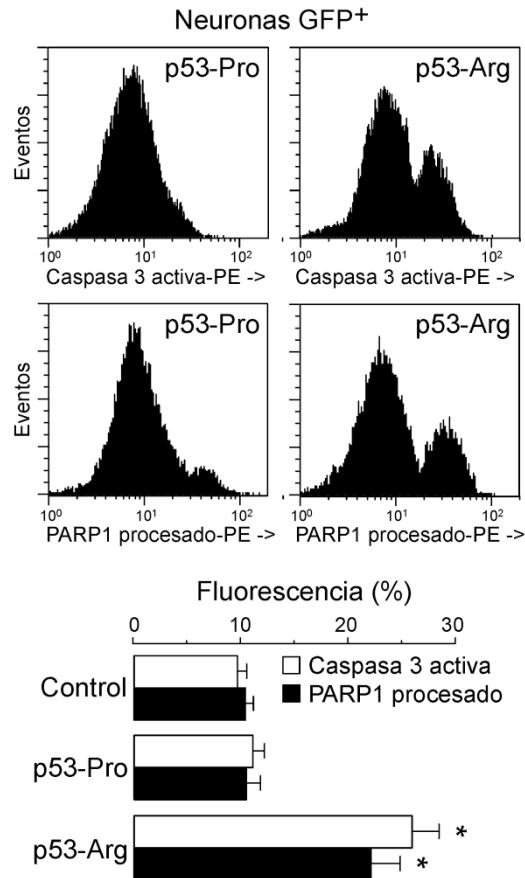


Figura 17. La variante p53-Arg induce la activación de la caspasa 3 en las neuronas. Las neuronas se transfecaron con los plásmidos pIRES2-eGFP vacío (Control) o que expresan p53-Arg o p53-Pro. Tras 14 horas, se determinó la expresión de caspasa 3 activa y PARP1 procesado en la población de neuronas GFP⁺ mediante citometría de flujo apoptosis neuronal.

*p < 0,05 versus Control.

2.3. La variante polimórfica p53-Arg induce la despolarización mitocondrial en las neuronas.

Dado que la activación de la caspasa 9 es un proceso asociado a la liberación de citocromo *c* de la mitocondria, decidimos estudiar el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) en neuronas que expresaban p53-Arg. Para ello, las neuronas se transfecaron con los plásmidos vacío (control) o que expresaban p53-Arg o p53-Pro y, a las 14 horas, se analizó el $\Delta\psi_m$ de las neuronas GFP⁺ mediante citometría de flujo. Como se observa en la Figura 18, p53-Arg disminuyó en un 40% el $\Delta\psi_m$ de las neuronas, respecto al grupo control o p53-Pro, que mostraron valores similares.

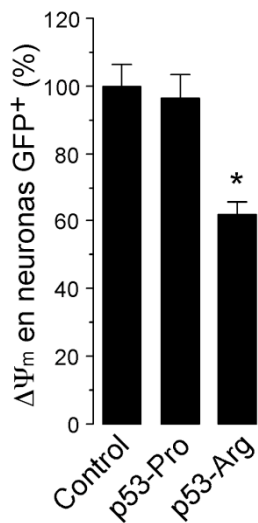


Figura 18. La variante p53-Arg induce la despolarización mitocondrial en las neuronas. Las neuronas se transfectaron con los plásmidos pIRES2-eGFP vacío (Control) o que expresan p53-Arg o p53-Pro. Tras 14 horas, se determinó el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) en la población de neuronas GFP⁺ mediante citometría de flujo apoptosis neuronal.

*p < 0,05 versus Control.

2.4. La variante polimórfica p53-Arg incrementa la susceptibilidad de las neuronas a la excitotoxicidad.

Finalmente, y dado que hemos descrito que el genotipo *Arg/Arg* está fuertemente asociado al mal pronóstico funcional en el ictus, decidimos estudiar si p53-Arg era capaz de modular la susceptibilidad de las neuronas a la excitotoxicidad causada por el glutamato o por la isquemia experimental *in vitro*. Para tal fin, las neuronas se transfectaron con 0,08 $\mu\text{g}/10^6$ neuronas de los plásmidos correspondientes, ya que es la máxima concentración que habíamos comprobado que no produce toxicidad (Figura 12). Tras 14 de transfección, las neuronas se sometieron a los modelos de excitotoxicidad arriba citados.

En las neuronas del grupo Control (pIRES2-eGFP vacío) la apoptosis causada por el glutamato no se observó hasta las 8 horas postestimulación. Dicho efecto se mimetizó en las neuronas que expresaban p53-Pro. Sin embargo, el efecto neurotóxico del glutamato fue mayor en las neuronas que expresaban la variante p53-Arg, de manera que se detectó un incremento en el porcentaje de neuronas apoptóticas a las 4 horas de estimulación con el aminoácido (Figura 19).

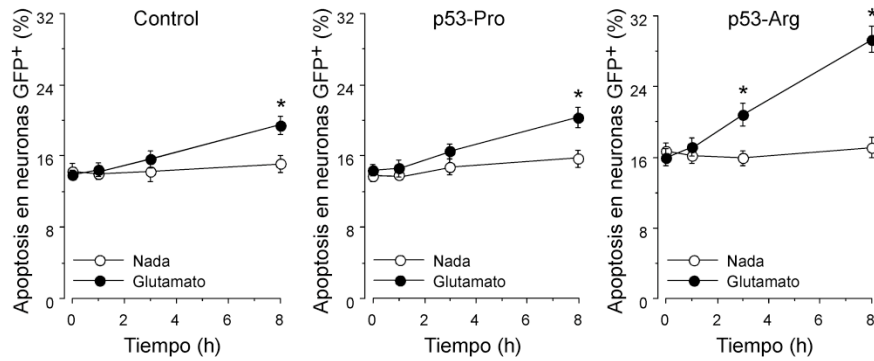


Figura 19. La variante p53-Arg incrementa la susceptibilidad de las neuronas a la excitotoxicidad causada por el glutamato. Las neuronas se transfectaron con los plásmidos pIRES2-eGFP vacío (Control) o que expresan p53-Arg o p53-Pro. Tras 14 horas, se estimularon con glutamato (100 μ M, 5 minutos) y se incubaron en medio de cultivo durante los tiempos indicados en la Figura. La apoptosis se determinó, mediante citometría de flujo, en la población de neuronas GFP⁺. p53-Arg incrementa la susceptibilidad de las neuronas a la toxicidad del glutamato. *p < 0,05 versus Nada (sin glutamato).

El efecto de la isquemia experimental (deprivación de oxígeno y glucosa, 1 hora) sobre la apoptosis neuronal resultó ser el doble en las neuronas que expresaban p53-Arg, que en las neuronas Control y p53-Pro, que respondieron de manera similar al proceso isquémico (Figura 20).

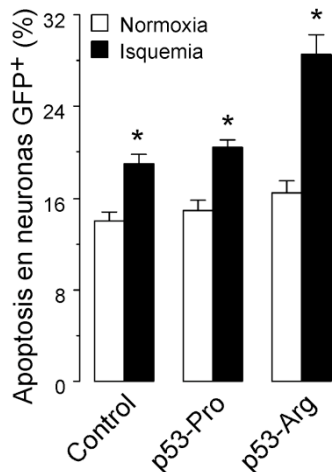


Figura 20. La variante p53-Arg incrementa la susceptibilidad de las neuronas a la isquemia. Las neuronas se transfectaron con los plásmidos pIRES2-eGFP vacío (Control) o que expresan p53-Arg o p53-Pro. Tras 14 horas, se incubaron en presencia (normoxia) o en ausencia (isquemia) de oxígeno y de glucosa, durante 1 hora. La apoptosis se determinó, mediante citometría de flujo, en la población de neuronas GFP⁺. p53-Arg incrementa la susceptibilidad de las neuronas a la isquemia experimental. *p < 0,05 versus Normoxia.

DISCUSIÓN.

El presente trabajo de Tesis Doctoral demuestra que el polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el exón 4, codón 72 de *Tp53* en la forma homocigótica *Arg/Arg* condiciona un peor pronóstico en los pacientes con ictus. Tanto en pacientes con ictus isquémico como en pacientes con ictus hemorrágico, dicho polimorfismo está vinculado, de forma independiente, con una peor situación funcional a los 3 meses del evento. Este trabajo, además, pone de manifiesto que la variante polimórfica p53-Arg determina una mayor muerte neuronal por apoptosis, mediante un mecanismo que implica a la mitocondria como orgánulo diana de la proteína.

Como estudio pronóstico se muestra un nuevo factor. Aunque muchos estudios previos han sugerido distintos factores pronósticos tras un ictus, muchos de ellos no evalúan simultáneamente la globalidad de todos (Weimar et al. 2002). Más aún, incluso contando con todos, no conocemos aún muchos de los mecanismos que determinan las posibles variaciones en el pronóstico tras sufrir un ictus. Así, los modelos pronósticos más amplios y validados no explican más que alrededor de un 50% de la eventual variación pronóstica (Weimar et al. 2004). Entre esos otros posibles factores que puedan desempeñar algún papel, es lógico pensar que puedan estar los genéticos. Estos crearían una situación de susceptibilidad que haría más graves las consecuencias del ictus.

Aunque en el ámbito de los ictus hay estudios de asociación genéticos, tanto de genes candidatos como estudios genómicos (Genomic Wide Association Studies: GWAs), estos se centran fundamentalmente en la función de genes como causa de la aparición de los mismos (Hassan and Markus 2000; Matarin et al. 2007) y, en mucha menor medida, en cómo los factores genéticos influyen en el pronóstico tras su presentación (Martinez-Gonzalez and Sudlow 2006). Tanto en uno como en otro aspecto, la identificación de las asociaciones genéticas sospechadas pocas veces ha sido replicada (Casas et al. 2004). De forma que, aunque parece evidente que hay un componente genético en la aparición de los ictus, la identificación de los genes involucrados permanece indeterminada (Matarin et al. 2009).

Hay distintos tipos de estudios para evaluar la influencia que variaciones genómicas puedan tener en determinados fenotipos patológicos. Uno de ellos es la búsqueda de la influencia de polimorfismos en genes candidatos. Sin embargo, uno de los problemas de los estudios de asociación genética de enfermedades multifactoriales asienta en que la mayoría de los fenotipos morbosos se verán influidos por más de un

rasgo genético. Y en el caso de un fenotipo morboso como es “peor pronóstico”, de la interacción con otros factores genéticos y muchos otros rasgos del propio proceso patogénico. Cuando múltiples factores interaccionan en la patogénesis de un fenotipo, el efecto de cada factor individual depende de la prevalencia relativa de los demás (Rothman and Greenland 2005). Así, si la asociación de un determinado factor genético con el pronóstico dependiese de su combinación con otros factores, y estos no estuvieran igualmente determinados o representados en otra población (la prevalencia de la combinación de los factores fuera menor), ello podría diluir la magnitud del efecto individual del primero (Khoury et al. 1988; Marchini et al. 2005). Puede haber distintas herramientas para asentar la importancia real de una asociación genética. Aparte de intentar evitar los sesgos (de selección o de otro tipo) una de las más importantes es establecer la consistencia de la misma por su replicación en otras poblaciones o por la reunión de distintos resultados (metaanálisis). Pero hay otra más, la plausibilidad biológica de la asociación por su correlato en estudios experimentales (Rebbeck et al. 2004; Khoury et al. 2007). Este es uno de los puntos fuertes del presente trabajo: la combinación de estudio clínico y experimental. Por un lado, el estudio experimental aporta evidencias de los mecanismos que dan plausibilidad biológica a la asociación. A la inversa, el estudio clínico ilustra la magnitud real de un mecanismo (en este caso la apoptosis inducida por p53) en un contexto patológico distinto de aquellos en los que se venía considerando. De esa forma ambos pilares se refuerzan el uno al otro.

El genotipo Arg/Arg condiciona un peor pronóstico en el ictus.

El polimorfismo *Arg72Pro* (rs1042522) en el codón 72 del gen de la proteína tumoral *Tp53* consiste en la sustitución de una guanina (CGC, que codifica prolina) por una citosina (CCC, que codifica arginina) (Pietsch et al. 2006). Este cambio condiciona que se sintetice la variante polimórfica que contiene prolina (p53-Pro) o bien la que contiene arginina (p53-Arg), dentro del dominio rico en prolina que es esencial para la actividad apoptótica de la proteína (Walker and Levine 1996; Sakamuro et al. 1997; Murphy 2006). Así, se ha descrito que la variante p53-Arg tiene una capacidad de inducir apoptosis en células en cultivo y líneas tumorales superior a la variante p53-Pro (Bonafe et al. 2002; Dumont et al. 2003; Bonafe et al. 2004), lo ha llevado a muchos

investigadores a relacionar el polimorfismo *Arg72Pro* con la resistencia al desarrollo neoplásico. Sin embargo, actualmente la ausencia de unanimidad en los resultados, sobre todo *in vitro*, ha hecho poner en duda si esa diferencia en la actividad apoptótica de ambas variantes es universal para todos los tipos celulares e, incluso, su relevancia fisiológica (Pietsch et al. 2006; Whibley et al. 2009)

La función de la apoptosis neuronal en la isquemia cerebral es un tema controvertido (Doyle et al. 2008; Harraz et al. 2008; Bolanos et al. 2009). De hecho, el hallazgo patológico fundamental es la necrosis y tan solo se han descrito cambios consistentes con apoptosis cuando la isquemia es transitoria o poco intensa (Chen et al. 1998; Graham and Chen 2001) o bien en la zona alrededor del núcleo necrótico o área de penumbra isquémica (Charriaut-Marlangue et al. 1996; Graham and Chen 2001; Sairanen et al. 2006; Doyle et al. 2008). Incluso, recientemente se ha sugerido que en la zona isquémica se produce inicialmente la muerte por apoptosis, mientras que la necrosis es el resultado del fallo energético que se produce como consecuencia del alto requerimiento de energía del proceso apoptótico (Benchoua et al. 2001).

En la presente Memoria mostramos que el genotipo *Arg/Arg* condiciona, de manera independiente, un peor pronóstico funcional en los pacientes de ictus isquémico y hemorrágico. Llamativamente, el ser portador homocigoto del alelo *Arg* es, además, uno de los predictores independientes de la existencia de deterioro neurológico precoz en el ictus isquémico y de mayor volumen residual final en la HIC. Estos resultados sugieren que la variante p53-*Arg* desempeña una importante función en el daño cerebral asociado al ictus.

El deterioro neurológico precoz (DNP) aparece en las series publicadas entre un 10 y un 40% de los infartos del territorio anterior (Tei et al. 2000; Arenillas et al. 2002). Parte de las variaciones en la frecuencia observada de este fenómeno pueden descansar en las diferentes formas de definirlo y el periodo de tiempo considerado como precoz (Alawneh et al. 2009). Aunque el establecimiento de un límite temporal pueda aparecer como algo arbitrario, la idea de segregar los empeoramientos de las fases precoces responde a la necesidad de diferenciarlos del empeoramiento que pueden sufrir los pacientes en momentos más tardíos, ya como resultado de complicaciones sistémicas (infecciones o aspiraciones, por ejemplo) o recurrencias y no por la “mala evolución” del propio proceso isquémico. En nuestra serie, un 10,8%

de los pacientes sufrieron DNP (1,6% del subgrupo de pacientes con buen pronóstico y 24,8% del subgrupo de los que tuvieron un mal pronóstico).

Los mecanismos que intervienen en la aparición del fenómeno del DNP son muchos y variados. Parece lógico pensar que, en conjunto, lo que han de determinar es el aumento del volumen inicial de tejido infartado. Por tanto, es muy posible que afecten a las áreas de tejido que inicialmente están situadas en condiciones de penumbra, las áreas donde el flujo sanguíneo está reducido pero sin llegar a un umbral que suponga un daño tisular irreversible. Esta área de penumbra ha recibido una gran atención, pues su protección constituye una evidente diana terapéutica, y es especialmente importante para el presente estudio, ya que es donde más relevancia tendrían los fenómenos de muerte celular programada (Charriaut-Marlangue et al. 1996; Graham and Chen 2001; Sairanen et al. 2006; Doyle et al. 2008).

Muchos de los estudios sobre DNP han evaluado el papel de los mecanismos de carácter hemodinámico. Aquellos que, en una situación de isquemia, pudieran aumentar la caída de la presión de perfusión en la zona, tales como modificaciones en la tensión arterial o en el estado de la circulación colateral (Arenillas et al. 2002; Thomalla et al. 2003). Este tipo de mecanismos agravaría la situación de isquemia haciendo alcanzar el umbral de daño irreversible, incorporando más tejido al necrosado inicialmente. Sin embargo, un registro directo de disminución de la presión de perfusión local en coincidencia con un deterioro neurológico no se ha descrito (Alawneh et al. 2009). Junto a los mecanismos hemodinámicos es muy posible que participen mecanismos de carácter bioquímico. La asociación independiente de los niveles de glutamato en plasma y líquido cefalorraquídeo con el DNP constituye un ejemplo de las evidencias en este sentido (Castillo et al. 1997; Davalos et al. 1997). Las evidencias que ligan la hipertermia o los niveles de citocinas pro-inflamatorias (como la interleucina 6) con el DNP también podrían caer en este tipo de mecanismos más bioquímicos (Vila et al. 2000). Pero debe resaltarse que, en el momento actual, las variables asociadas a DNP que conocemos no predicen con suficiente fiabilidad su aparición (Alawneh et al. 2009), lo cual no hace sino reflejar que la fisiopatología de este fenómeno es muy compleja. Nuestros resultados, mostrando que un polimorfismo que condiciona una mayor apoptosis influye en el DNP y el pronóstico final, constituyen un hallazgo muy interesante en este sentido. Si tenemos en cuenta que la apoptosis en los infartos cerebrales parece significativa en las áreas de penumbra (Charriaut-Marlangue et al. 1996; Graham and Chen 2001; Sairanen et al.

2006; Doyle et al. 2008), el hecho de que las neuronas de estas áreas dispongan de unos sistemas proapoptóticos más “fáciles” (genéticamente condicionados), contribuiría a que se incorporasen con más facilidad al grupo de las neuronas necrosadas a iguales umbrales de daño isquémico. De hecho, cabe sospechar que parte de lo que el polimorfismo *Arg/Arg* explica del riesgo de mal pronóstico estaría mediado por lo que influye en el riesgo de DNP. Si eso fuese así, se podría objetar en el análisis de los resultados de la cohorte, que pudiera existir colinealidad. No obstante, debe recordarse que en los análisis de regresión logística la colinealidad puede artefactar la magnitud de la asociación, pero no el sentido de la misma. Es decir que podría aumentar la magnitud de los OR, pero la asociación de ambas variables con el mal pronóstico permanecería.

Como otras muchas cohortes hospitalarias, la cohorte de infartos aquí presentada tiene una mayor proporción del subtipo de infartos cardioembólicos y una menor de los de pequeño vaso, en comparación con las series de pacientes no hospitalizados (Schulz and Rothwell 2003). Por ejemplo, mientras en nuestra serie los infartos cardioembólicos fueron el 36,3%, en la serie de Oxford OCSF (Bamford et al. 1988) constituyeron el 23,3% (estadístico $z = -4,3822$; $p < 0,005$) y en la de Rochester (Petty et al. 1999) del 29,1% ($z = -2,2533$; $p = 0,02$). Los ictus cardioembólicos tienen un peor pronóstico (Jackson and Sudlow 2005; Lavados et al. 2007) mientras que los infartos de pequeño vaso, por definición, afectan a un pequeño volumen de tejido cerebral. Por tanto, la vinculación del polimorfismo con el mal pronóstico podría aparecer diferente si la distribución de los subtipos de ictus difiriese en otra población. *A priori*, la importancia de los mecanismos apoptóticos sería más significativa en los infartos de tamaño medio o grande.

En cuanto a la cohorte de HIC, llama la atención la magnitud de la asociación entre el genotipo *Arg/Arg* y un peor pronóstico funcional. Aunque las dos cohortes (isquémica y hemorrágica) son independientes, por tanto, no comparables, la existencia de esta fuerte asociación, sugiere que el impacto del polimorfismo es mayor en el caso de las HIC que en los infartos. Este argumento se sumaría a otros tales como el hecho de que el pico de máxima muerte neuronal se produce más tarde en la hemorragia (Lee et al. 1997) o la alta proporción de neuronas TUNEL⁺ en los estudios histológicos (Qureshi et al. 2003), sugiriendo que la muerte neuronal por apoptosis desempeñaría un papel más importante en esta entidad.

Es llamativo que una NIHSS mayor al ingreso sea un factor que, a igualdad del resto, incrementa la probabilidad de mal pronóstico tras una HIC, mientras que la magnitud en el volumen de sangre existente al ingreso pierde su capacidad predictiva cuando se ajusta por la NIHSS y el ser portador de la variante *Arg/Arg*. Es verdad que ha habido estudios en los que el volumen de sangre al ingreso se mantenía como un potente predictor de la morbi-mortalidad de las HIC (Broderick et al. 1993; Davis et al. 2006), pero utilizando como covariables clínicas instrumentos de medidas menos refinados, tales como la escala de coma de Glasgow. Es como si la presencia de la NIHSS como covariable, dada su gran capacidad predictiva, colapsase la independencia del volumen de la hemorragia para marcar el mal pronóstico.

Cuando, dándole la vuelta, miramos en nuestra serie qué variables predicen el volumen residual final de una HIC, vemos que la NIHSS no aparece como marcador independiente, a favor del volumen de sangre inicial y del volumen de edema. Los volúmenes al ingreso son buenos marcadores de los volúmenes de lesión final, pero el defecto neurológico clínico es mejor predictor de la situación funcional. Esta discordancia entre defecto clínico y funcional por un lado, y el volumen de lesión, por otro, puede tener especial interés. Basándose en la importancia del volumen y de su crecimiento, se realizaron ensayos clínicos con sustancias hemostáticas, como el factor VII activado recombinante (rFVIIa). En el primer ensayo, el rFVIIa demostró reducir el crecimiento de los hematomas intracerebrales (Mayer et al. 2005), pero en el segundo (Mayer et al. 2008) ese efecto no se tradujo en una mejoría en la mortalidad ni en la situación funcional.

En nuestro estudio, el ser homocigoto para el alelo *Arg* mantiene su influencia también en el volumen de lesión final. De hecho, su presencia es como si hubiese un mL más de volumen hemático al inicio: coeficiente β estandarizado para volumen al ingreso (mL): 0,412; β estandarizado para *Arg/Arg*: 0,483).

Por otro lado, el volumen del edema perihematoma es mayor en los pacientes con *Arg/Arg*, pero dicha asociación no se mantiene independiente como marcador del volumen perihematoma cuando se ajusta por las demás variables. Según estudios recientes, el edema perihematoma parece depender, fundamentalmente, del volumen inicial del hematoma y no parece tener un efecto independiente en el pronóstico (Arima et al. 2009). Esto haría pensar que los mecanismos apoptóticos vinculados a la variación de p53 no afectarían al pronóstico por el destino del tejido afectado por

edema perihematoma. Sería más lógico inferir que la mayor apoptosis donde tiene importancia es en el “magma” del hematoma donde haría que se recluten más neuronas al contingente de las que pasan a morir. De hecho, en un análisis *a posteriori* de nuestra cohorte, si observamos la modificación porcentual del volumen final en relación con el inicial ($\text{volumen final} - \text{volumen inicial} \times 100 / \text{volumen final}$) observamos que esa modificación fue significativamente mayor en los pacientes *Arg/Arg* (Modificación del volumen en *Arg/Arg* = $25,4\% \pm 53,6$; en *Arg/Pro* = $-296\% \pm 186$; en *Pro/Pro* = -213% ; $p < 0,0002$).

Reuniendo los resultados del efecto del polimorfismo sobre el edema perihematoma (poco), sobre el volumen residual final (mayor) y, especialmente, sobre el pronóstico funcional (muy fuerte), se podría establecer la hipótesis de que el polimorfismo podría condicionar un aumento del volumen de lesión, pero sobre todo, una aumento de las neuronas que mueren por apoptosis en el seno mismo del volumen de la hemorragia, determinando un peor pronóstico final.

Por lo demás, la serie hospitalaria de HIC recogida es semejante a otras publicadas en lo que concierne a sus características demográficas. Con la salvedad, de la proporción de pacientes con consumo importante de alcohol, que parece inferior, si bien la diferencia posiblemente estribe en el criterio operativo utilizado de consumo de alcohol de riesgo (Juvola et al. 1995). Lo que sí presenta es una tasa de mortalidad más baja. Mientras en las series publicadas, la tasa de mortalidad al mes suele estar en torno al 40,4% (mediana; rango de 13,1 – 61) (van Asch et al. 2010), en nuestra serie a los tres meses habían fallecido sólo un 11,7%. Este dato ha de relacionarse con la presencia de una mayor proporción de pacientes independientes a los 3 meses en nuestra serie. Aunque los periodos de tiempo no coinciden, a los tres meses en nuestra serie un 50,8% de los pacientes eran independientes (Rankin-m 0 – 2), cuando otras series describen tasas de pacientes independientes entre el 12 y el 33% al medio año (Bamford et al. 1990; Lavados et al. 2005; Vibo et al. 2007). Este hecho posiblemente refleja sólo la tendencia en las series de pacientes seleccionados en los servicios de Neurología, a reclutar en fases agudas a pacientes menos graves, ya que los más graves tenderán a estar atendidos inicialmente en servicios de cuidados intensivos (Weimar et al. 2002).

Finalmente, es importante resaltar que, en contra de los resultados obtenidos con el polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53*, el polimorfismo *Ins16bp*, localizado en el intrón

3 del mismo gen, no mostró asociación alguna con el pronóstico funcional en los pacientes de ictus. Es más, las frecuencias alélicas de ambos polimorfismos en las cohortes isquémica y hemorrágica son muy similares entre sí y con la evaluada recientemente en la población sana de Europa (Santos et al. 2006; Costa et al. 2008). Estos resultados corroboran la asociación entre el polimorfismo *Arg72Pro* y el pronóstico funcional en pacientes de ictus y descartan que el efecto sea debido a desequilibrio de ligamiento entre ambos polimorfismos.

La interacción de la variante polimórfica p53-Arg con la mitocondria justifica su alta capacidad de inducir apoptosis neuronal.

La existencia de una asociación entre un polimorfismo relacionado con la apoptosis y el pronóstico de los ictus, vuelve a poner sobre la mesa la función que este tipo de muerte celular programada tiene en la patogenia del daño cerebral que ocurre en estos trastornos. Como ya hemos mencionado, la importancia de la apoptosis en los ictus está discutida, especialmente en lo relativo a los ictus isquémicos (Charriaut-Marlangue et al. 1996; Graham and Chen 2001; Sairanen et al. 2006; Doyle et al. 2008). De las inconsistencias de los estudios y del hecho de que la mayor parte de la muerte celular en los infartos cerebrales sea por necrosis, se podría inferir que la muerte celular programada no desempeña un papel significativo en estos trastornos y su impacto en el pronóstico funcional sería escaso. Nuestro estudio, por tanto, iría en contra de esa inferencia. Así, en las zonas alrededor de las porciones tisulares con una mayor necrosis directa, la muerte neuronal por apoptosis desempeñaría un papel primordial. El hecho de que el polimorfismo esté también vinculado, de forma independiente, con el deterioro neurológico precoz en estos pacientes apoya esta afirmación.

Es más, los resultados experimentales que hemos descrito en esta Memoria aportan consistencia a la importancia de apoptosis en el ictus. De hecho, hemos demostrado, por primera vez, que la variante polimórfica p53-Arg posee una mayor capacidad de inducir apoptosis en las neuronas que la variante p53-Pro. Este efecto es independiente de la actividad transcripcional de ambas proteínas, que es muy similar a juzgar por la capacidad de inducir la expresión de Bax. Sin embargo, recientemente se ha descrito en ratas que la administración de un inhibidor específico de la actividad transcripcional de p53, PFT α , mejora sensiblemente la recuperación tras la isquemia cerebral (Luo et al. 2009). Hay que tener en cuenta que este trabajo, y el resto realizados en animales de experimentación, no tienen en cuenta el polimorfismo *Arg72Pro*, ya que es específico de humanos (Pietsch et al. 2006), por lo que debe ser considerado con cautela.

La actividad apoptótica de p53-Arg parece ser consecuencia de la interacción de la proteína con la mitocondria. De hecho, p53-Arg induce la despolarización de la membrana interna mitocondrial y, en consecuencia, activa la vía intrínseca de la ruta

apoptótica en las neuronas. Esta misma vía se ha descrito que es la responsable de la apoptosis neuronal que ocurre en las zonas dañadas del cerebro tras la isquemia experimental (Broughton et al. 2009).

Además, p53-Arg aumenta la susceptibilidad de las neuronas a la isquemia experimental *in vitro* (privación de glucosa y oxígeno) y a la excitotoxicidad causada por el glutamato, modelos en los que, previamente, hemos demostrado que la mitocondria desempeña un papel fundamental (Almeida and Bolanos 2001; Almeida et al. 2002; Maestre et al. 2008).

Todos estos resultados sugieren fuertemente que el polimorfismo *Arg72Pro* contribuye, al menos en parte, a determinar genéticamente la diferente susceptibilidad de las neuronas a la apoptosis asociada al proceso excitotóxico. Por tanto, la variante p53-Arg debería ser considerada como una diana molecular en el desarrollo de nuevas y eficaces estrategias terapéuticas en el ictus.

CONCLUSIONES.

A la vista de los resultados presentados en esta Memoria, hemos obtenido las siguientes **conclusiones**:

1. El polimorfismo en el exón 3, codón 72 del gen supresor tumoral *Tp53* condiciona el pronóstico funcional en pacientes de ictus, tanto isquémico como hemorrágico, lo que le convierte en un factor responsable, al menos en parte, de la variabilidad genética interindividual asociada a dichas patologías.
2. El genotipo *Arg/Arg* esta fuertemente asociado a un peor pronóstico funcional tras el ictus. Es más, la homocigosidad para el alelo *Arg* está asociada al deterioro neurológico precoz tras el infarto o al incremento en el volumen residual tras la hemorragia intracerebral.
3. Ninguno de los pacientes portadores del genotipo *Pro/Pro* sufieron mal pronóstico, deterioro neurológico precoz tras el infarto o incremento en el volumen residual tras la hemorragia intracerebral, lo que asocia a dicho polimorfismo con una mejor capacidad de recuperación funcional tras el ictus.
4. La variante polimórfica p53-Arg posee una capacidad de inducir la apoptosis neuronal superior a la de la variante p53-Pro. Dicho efecto es debido a la activación de la vía apoptótica intrínseca como consecuencia de la interacción de p53-Arg con la mitocondria.
5. La variante p53-Arg aumenta la susceptibilidad de las neuronas a la isquemia experimental *in vitro* y a la excitotoxicidad causada por el glutamato, modelos en los que es bien conocido que la mitocondria desempeña un papel fundamental.

Conclusión final:

En el presente Trabajo, hemos identificado el genotipo *Arg/Arg* como un nuevo y potente biomarcador genético de mal pronóstico funcional, tanto en el infarto cerebral como en la hemorragia intracerebral. Es más, el polimorfismo *Arg72Pro* contribuye, al menos en parte, a determinar genéticamente la diferente susceptibilidad de las neuronas a la apoptosis asociada al proceso isquémico. Por tanto, la variante polimórfica p53-Arg debería ser considerada como una importante

diana molecular en el desarrollo de nuevas y eficaces estrategias terapéuticas en el ictus.

BIBLIOGRAFÍA.

- Adams H. P., Jr., Bendixen B. H., Kappelle L. J., Biller J., Love B. B., Gordon D. L. and Marsh E. E., 3rd (1993) Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* **24**, 35-41.
- Alawneh J. A., Moustafa R. R. and Baron J. C. (2009) Hemodynamic factors and perfusion abnormalities in early neurological deterioration. *Stroke* **40**, e443-450.
- Albers G. W., Caplan L. R., Easton J. D., Fayad P. B., Mohr J. P., Saver J. L. and Sherman D. G. (2002) Transient ischemic attack--proposal for a new definition. *N Eng J Med* **347**, 1713-1716.
- Almeida A. and Medina J. M. (1998) A rapid method for the isolation of metabolically active mitochondria from rat neurons and astrocytes in primary culture. *Brain Res* **2**, 209-214.
- Almeida A. and Bolanos J. P. (2001) A transient inhibition of mitochondrial ATP synthesis by nitric oxide synthase activation triggered apoptosis in primary cortical neurons. *J Neurochem* **77**, 676-690.
- Almeida A., Bolanos J. P. and Moreno S. (2005) Cdh1/Hct1-APC is essential for the survival of postmitotic neurons. *J Neurosci* **25**, 8115-8121.
- Almeida A., Delgado-Esteban M., Bolanos J. P. and Medina J. M. (2002) Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture. *J Neurochem* **81**, 207-217.
- Alvaro L. C., Lopez-Arbeloa P. and Cozar R. (2009) Hospitalizations for acute cerebrovascular accidents and transient ischemic attacks in Spain: temporal stability and spatial heterogeneity, 1998-2003. *Rev Calid Asist* **24**, 16-23.
- Arenillas J. F., Rovira A., Molina C. A., Grive E., Montaner J. and Alvarez-Sabin J. (2002) Prediction of early neurological deterioration using diffusion- and perfusion-weighted imaging in hyperacute middle cerebral artery ischemic stroke. *Stroke* **33**, 2197-2203.
- Ariesen M. J., Claus S. P., Rinkel G. J. and Algra A. (2003) Risk factors for intracerebral hemorrhage in the general population: a systematic review. *Stroke* **34**, 2060-2065.
- Arima H., Wang J. G., Huang Y., Heeley E., Skulina C., Parsons M. W., Peng B., Li Q., Su S., Tao Q. L., Li Y. C., Jiang J. D., Tai L. W., Zhang J. L., Xu E., Cheng Y., Morgenstern L. B., Chalmers J. and Anderson C. S. (2009) Significance of perihematomal edema in acute intracerebral hemorrhage: the INTERACT trial. *Neurology* **73**, 1963-1968.
- Arundine M. and Tymianski M. (2004) Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci* **61**, 657-668.
- Asahi M., Wang X., Mori T., Sumii T., Jung J. C., Moskowitz M. A., Fini M. E. and Lo E. H. (2001) Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* **21**, 7724-7732.
- Attwell D. and Laughlin S. B. (2001) An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 1133-1145.
- Ay H., Furie K. L., Singhal A., Smith W. S., Sorensen A. G. and Koroshetz W. J. (2005) An evidence-based causative classification system for acute ischemic stroke. *Ann Neurol* **58**, 688-697.
- Bamford J., Sandercock P., Dennis M., Burn J. and Warlow C. (1990) A prospective study of acute cerebrovascular disease in the community: the Oxfordshire Community Stroke Project--

1981-86. 2. Incidence, case fatality rates and overall outcome at one year of cerebral infarction, primary intracerebral and subarachnoid haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psych* **53**, 16-22.

Bamford J., Sandercock P., Dennis M., Warlow C., Jones L., McPherson K., Vessey M., Fowler G., Molyneux A., Hughes T. and et al. (1988) A prospective study of acute cerebrovascular disease in the community: the Oxfordshire Community Stroke Project 1981-86. 1. Methodology, demography and incident cases of first-ever stroke. *J Neurol Neurosurg Psych* **51**, 1373-1380.

Banasiak K. J., Xia Y. and Haddad G. G. (2000) Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* **62**, 215-249.

Beckman G., Birgander R., Sjalander A., Saha N., Holmberg P. A., Kivela A. and Beckman L. (1994) Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* **44**, 266-270.

Benchoua A., Guegan C., Couriaud C., Hosseini H., Sampaio N., Morin D. and Onteniente B. (2001) Specific caspase pathways are activated in the two stages of cerebral infarction. *J Neurosci* **21**, 7127-7134.

Biros E., Kohut A., Biros I., Kalina I., Bogyiova E. and Stubna J. (2002) A link between the p53 germ line polymorphisms and white blood cells apoptosis in lung cancer patients. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* **35**, 231-235.

Bolanos J. P., Moro M. A., Lizasoain I. and Almeida A. (2009) Mitochondria and reactive oxygen and nitrogen species in neurological disorders and stroke: Therapeutic implications. *Adv Drug Deliv Rev* **61**, 1299-1315.

Bonafe M., Salvioli S., Barbi C., Mishto M., Trapassi C., Gemelli C., Storci G., Olivieri F., Monti D. and Franceschi C. (2002) p53 codon 72 genotype affects apoptosis by cytosine arabinoside in blood leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **299**, 539-541.

Bonafe M., Salvioli S., Barbi C., Trapassi C., Tocco F., Storci G., Invidia L., Vannini I., Rossi M., Marzi E., Mishto M., Capri M., Olivieri F., Antonicelli R., Memo M., Uberti D., Nacmias B., Sorbi S., Monti D. and Franceschi C. (2004) The different apoptotic potential of the p53 codon 72 alleles increases with age and modulates in vivo ischaemia-induced cell death. *Cell Death Differ* **11**, 962-973.

Bousser M. G. and Ferro J. M. (2007) Cerebral venous thrombosis: an update. *Lancet Neurol* **6**, 162-170.

Bredesen D. E., Rao R. V. and Mehlen P. (2006) Cell death in the nervous system. *Nature* **443**, 796-802.

Broderick J. P., Brott T., Tomsick T., Huster G. and Miller R. (1992) The risk of subarachnoid and intracerebral hemorrhages in blacks as compared with whites. *N Engl J Med* **326**, 733-736.

Broderick J. P., Brott T. G., Duldner J. E., Tomsick T. and Huster G. (1993) Volume of intracerebral hemorrhage. A powerful and easy-to-use predictor of 30-day mortality. *Stroke* **24**, 987-993.

Broughton B. R., Reutens D. C. and Sobey C. G. (2009) Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* **40**, e331-339.

Bruno A., Carter S., Qualls C. and Nolte K. B. (1996) Incidence of spontaneous intracerebral hemorrhage among Hispanics and non-Hispanic whites in New Mexico. *Neurology* **47**, 405-408.

Caplan L. R. (2000) Intracerebral hemorrhage, in *Caplan's stroke. a clinical approach* (Caplan L. R., ed.), pp 383-418. Butterworth-Heinemann, Boston.

- Casas J. P., Hingorani A. D., Bautista L. E. and Sharma P. (2004) Meta-analysis of genetic studies in ischemic stroke: thirty-two genes involving approximately 18,000 cases and 58,000 controls. *Arch Neurol* **61**, 1652-1661.
- Castillo J. (1999) Deteriorating stroke: diagnostic criteria, predictors, mechanisms and treatment. *Cerebrovasc Dis (Basel, Switzerland)* **9 Suppl 3**, 1-8.
- Castillo J., Davalos A. and Noya M. (1997) Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet* **349**, 79-83.
- Castillo J., Alvarez-Sabin J., Martinez-Vila E., Montaner J., Sobrino T. and Vivancos J. (2009) Inflammation markers and prediction of post-stroke vascular disease recurrence: the MITICO study. *J Neurol* **256**, 217-224.
- Charriaut-Marlangue C., Margail I., Represa A., Popovici T., Plotkine M. and Ben-Ari Y. (1996) Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* **16**, 186-194.
- Chen J., Graham S. H., Nakayama M., Zhu R. L., Jin K., Stetler R. A. and Simon R. P. (1997) Apoptosis repressor genes Bcl-2 and Bcl-x-long are expressed in the rat brain following global ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **17**, 2-10.
- Chen J., Nagayama T., Jin K., Stetler R. A., Zhu R. L., Graham S. H. and Simon R. P. (1998) Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci* **18**, 4914-4928.
- Chen L., Willis S. N., Wei A., Smith B. J., Fletcher J. I., Hinds M. G., Colman P. M., Day C. L., Adams J. M. and Huang D. C. (2005) Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular cell* **17**, 393-403.
- Chipuk J. E., Moldoveanu T., Llamb i. F., Parsons M. J. and Green D. R. (2010) The BCL-2 family reunion. *Molecular cell* **37**, 299-310.
- Chittenden T. (2002) BH3 domains: intracellular death-ligands critical for initiating apoptosis. *Cancer cell* **2**, 165-166.
- Clarke P. G., Posada A., Primi M. P. and Castagne V. (1998) Neuronal death in the central nervous system during development. *Biomed Pharmacother* **52**, 356-362.
- Cole F. M. and Yates P. O. (1967) Pseudo-aneurysms in relationship to masive cerebral hemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psych* **30**, 61-66.
- Neurología Comite ad hoc Grupo de Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología (2004) Guidelines for the treatment and diagnosis of stroke. *Barcelona: Prous Science*.
- Costa S., Pinto D., Pereira D., Rodrigues H., Cameselle-Teijeiro J., Medeiros R. and Schmitt F. (2008) Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. *BMC Cancer* **8**, 32.
- Crumrine R. C., Thomas A. L. and Morgan P. F. (1994) Attenuation of p53 expression protects against focal ischemic damage in transgenic mice. *J Cereb Blood Flow Metab* **14**, 887-891.
- Cucchiara B. L., Messe S. R., Taylor R. A., Pacelli J., Maus D., Shah Q. and Kasner S. E. (2006) Is the ABCD score useful for risk stratification of patients with acute transient ischemic attack? *Stroke* **37**, 1710-1714.
- Culmsee C. and Mattson M. P. (2005) p53 in neuronal apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **331**, 761-777.

- Davalos A., Castillo J., Serena J. and Noya M. (1997) Duration of glutamate release after acute ischemic stroke. *Stroke* **28**, 708-710.
- Davis S. M., Broderick J., Hennerici M., Brun N. C., Diringer M. N., Mayer S. A., Begtrup K. and Steiner T. (2006) Hematoma growth is a determinant of mortality and poor outcome after intracerebral hemorrhage. *Neurology* **66**, 1175-1181.
- Delgado P., Cuadrado E., Rosell A., Alvarez-Sabin J., Ortega-Aznar A., Hernandez-Guillamon M., Penalba A., Molina C. A. and Montaner J. (2008) Fas system activation in perihematomal areas after spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* **39**, 1730-1734.
- Delgado-Esteban M., Almeida A. and Bolanos J. P. (2000) D-Glucose prevents glutathione oxidation and mitochondrial damage after glutamate receptor stimulation in rat cortical primary neurons. *J Neurochem* **75**, 1618-1624.
- Dennis M. S., Burn J. P., Sandercock P. A., Bamford J. M., Wade D. T. and Warlow C. P. (1993) Long-term survival after first-ever stroke: the Oxfordshire Community Stroke Project. *Stroke* **24**, 796-800.
- Diaz-Hernandez J. I., Moncada S., Bolanos J. P. and Almeida A. (2007) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects neurons against apoptosis induced by oxidative stress. *Cell Death Differ* **14**, 1211-1221.
- Doyle K. P., Simon R. P. and Stenzel-Poore M. P. (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* **55**, 310-318.
- Dumont P., Leu J. I., Della Pietra A. C., 3rd, George D. L. and Murphy M. (2003) The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* **33**, 357-365.
- Easton J. D., Saver J. L., Albers G. W., Alberts M. J., Chaturvedi S., Feldmann E., Hatsukami T. S., Higashida R. T., Johnston S. C., Kidwell C. S., Lutsep H. L., Miller E. and Sacco R. L. (2009) Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. The American Academy of Neurology affirms the value of this statement as an educational tool for neurologists. *Stroke* **40**, 2276-2293.
- Edvinsson L., Alm R., Shaw D., Rutledge R. Z., Koblan K. S., Longmore J. and Kane S. A. (2002) Effect of the CGRP receptor antagonist BIBN4096BS in human cerebral, coronary and omental arteries and in SK-N-MC cells. *Eur J Pharmacol* **434**, 49-53.
- Endo H., Kamada H., Nito C., Nishi T. and Chan P. H. (2006) Mitochondrial translocation of p53 mediates release of cytochrome c and hippocampal CA1 neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats. *J Neurosci* **26**, 7974-7983.
- Enzmann D. R., Britt R. H., Lyons B. E., Buxton J. L. and Wilson D. A. (1981) Natural history of experimental intracerebral hemorrhage: sonography, computed tomography and neuropathology. *AJNR* **2**, 517-526.
- Erster S., Mihara M., Kim R. H., Petrenko O. and Moll U. M. (2004) In vivo mitochondrial p53 translocation triggers a rapid first wave of cell death in response to DNA damage that can precede p53 target gene activation. *Mol Cell Biol* **24**, 6728-6741.
- Fabricius M., Fuhr S., Bhatia R., Boutelle M., Hashemi P., Strong A. J. and Lauritzen M. (2006) Cortical spreading depression and peri-infarct depolarization in acutely injured human cerebral cortex. *Brain* **129**, 778-790.

- Feigin I. and Prose P. (1959) Hypertensive fibrinoid arteritis of the brain and gross cerebral hemorrhage: a form of "hyalinosis". *Arch Neurol* **1**, 98-110.
- Felley-Bosco E., Weston A., Cawley H. M., Bennett W. P. and Harris C. C. (1993) Functional studies of a germ-line polymorphism at codon 47 within the p53 gene. *Am J Hum Genet* **53**, 752-759.
- Fisher C. M. (1971) Pathological observations in hypertensive cerebral hemorrhage. *J Neuropathol Exp Neurol* **30**, 536-550.
- Folbergrova J., Minamisawa H., Ekholm A. and Siesjo B. K. (1990) Phosphorylase alpha and labile metabolites during anoxia: correlation to membrane fluxes of K⁺ and Ca²⁺. *J Neurochem* **55**, 1690-1696.
- Galonek H. L. and Hardwick J. M. (2006) Upgrading the BCL-2 network. *Nat Cell Biol* **8**, 1317-1319.
- Ghiotto F., Fais F. and Bruno S. (2010) BH3-only proteins: the death-puppeteer's wires. *Cytometry A* **77**, 11-21.
- Gong C., Boulis N., Qian J., Turner D. E., Hoff J. T. and Keep R. F. (2001) Intracerebral hemorrhage-induced neuronal death. *Neurosurgery* **48**, 875-882; discussion 882-873.
- Gonzalez B., Leroux P., Lamacz M., Bodenant C., Balazs R. and Vaudry H. (1992) Somatostatin receptors are expressed by immature cerebellar granule cells: evidence for a direct inhibitory effect of somatostatin on neuroblast activity. *Pro Natl Acad Sci USA* **89**, 9627-9631.
- Graeber M. B. and Moran L. B. (2002) Mechanisms of cell death in neurodegenerative diseases: fashion, fiction, and facts. *Brain Pathol (Zurich, Switzerland)* **12**, 385-390.
- Graham S. H. and Chen J. (2001) Programmed cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 99-109.
- Green D. R. (2005) Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* **121**, 671-674.
- Han E. S., Muller F. L., Perez V. I., Qi W., Liang H., Xi L., Fu C., Doyle E., Hickey M., Cornell J., Epstein C. J., Roberts L. J., Van Remmen H. and Richardson A. (2008) The in vivo gene expression signature of oxidative stress. *Physiol Genomics* **34**, 112-126.
- Harras M. M., Dawson T. M. and Dawson V. L. (2008) Advances in neuronal cell death 2007. *Stroke* **39**, 286-288.
- Hassan A. and Markus H. S. (2000) Genetics and ischaemic stroke. *Brain* **123** (Pt 9), 1784-1812.
- Hayman L. A., Pagani J. J., Kirkpatrick J. B. and Hinck V. C. (1989) Pathophysiology of acute intracerebral and subarachnoid hemorrhage: applications to MR imaging. *AJR* **153**, 135-139.
- Herrero-Mendez A., Almeida A., Fernandez E., Maestre C., Moncada S. and Bolanos J. P. (2009) The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nat Cell Biol* **11**, 747-752.
- Hillered L., Smith M. L. and Siesjo B. K. (1985) Lactic acidosis and recovery of mitochondrial function following forebrain ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **5**, 259-266.
- Hoksbergen A. W., Legemate D. A., Ubbink D. T. and Jacobs M. J. (2000) Collateral variations in circle of willis in atherosclerotic population assessed by means of transcranial color-coded duplex ultrasonography. *Stroke* **31**, 1656-1660.
- Huang J., Upadhyay U. M. and Tamargo R. J. (2006) Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* **66**, 232-245.

- Hughes A. L. and Yeager M. (1998) Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annu Rev Genet* **32**, 415-435.
- Jackson C. and Sudlow C. (2005) Comparing risks of death and recurrent vascular events between lacunar and non-lacunar infarction. *Brain* **128**, 2507-2517.
- Jin S. and Levine A. J. (2001) The p53 functional circuit. *J Cell Sci* **114**, 4139-4140.
- Johnson J. A., Johnson D. A., Kraft A. D., Calkins M. J., Jakel R. J., Vargas M. R. and Chen P. C. (2008) The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann NY Acad Sci* **1147**, 61-69.
- Junttila M. R. and Evan G. I. (2009) p53--a Jack of all trades but master of none. *Nat Rev Cancer* **9**, 821-829.
- Juvela S. and Kase C. S. (2006) Advances in intracerebral hemorrhage management. *Stroke* **37**, 301-304.
- Juvela S., Hillbom M. and Palomaki H. (1995) Risk factors for spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* **26**, 1558-1564.
- Kalimo H., Olsson Y., Paljarvi L. and Soderfeldt B. (1982) Structural changes in brain tissue under hypoxic-ischemic conditions. *J Cereb Blood Flow Metab* **2 Suppl 1**, S19-22.
- Kawase M., Murakami K., Fujimura M., Morita-Fujimura Y., Gasche Y., Kondo T., Scott R. W. and Chan P. H. (1999) Exacerbation of delayed cell injury after transient global ischemia in mutant mice with CuZn superoxide dismutase deficiency. *Stroke* **30**, 1962-1968.
- Kerr J. F., Wyllie A. H. and Currie A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-257.
- Kew J. N. and Kemp J. A. (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology* **179**, 4-29.
- Khoury M. J., Adams M. J., Jr. and Flanders W. D. (1988) An epidemiologic approach to ecogenetics. *Am J Hum Genet* **42**, 89-95.
- Khoury M. J., Little J., Gwinn M. and Ioannidis J. P. (2007) On the synthesis and interpretation of consistent but weak gene-disease associations in the era of genome-wide association studies. *Int J Epidemiol* **36**, 439-445.
- Kolominsky-Rabas P. L., Weber M., Gefeller O., Neundorfer B. and Heuschmann P. U. (2001) Epidemiology of ischemic stroke subtypes according to TOAST criteria: incidence, recurrence, and long-term survival in ischemic stroke subtypes: a population-based study. *Stroke* **2**, 2735-2740.
- Kowaltowski A. J., de Souza-Pinto N. C., Castilho R. F. and Vercesi A. E. (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Rad Biol Med* **47**, 333-343.
- Lavados P. M., Sacks C., Prina L., Escobar A., Tossi C., Araya F., Feuerhake W., Galvez M., Salinas R. and Alvarez G. (2005) Incidence, 30-day case-fatality rate, and prognosis of stroke in Iquique, Chile: a 2-year community-based prospective study (PISCIS project). *Lancet* **365**, 2206-2215.
- Lavados P. M., Sacks C., Prina L., Escobar A., Tossi C., Araya F., Feuerhake W., Galvez M., Salinas R. and Alvarez G. (2007) Incidence, case-fatality rate, and prognosis of ischaemic stroke subtypes in a predominantly Hispanic-Mestizo population in Iquique, Chile (PISCIS project): a community-based incidence study. *Lancet Neurol* **6**, 140-148.
- Lazar V., Hazard F., Bertin F., Janin N., Bellet D. and Bressac B. (1993) Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene. *Oncogene* **8**, 1703-1705.

- Lee K. R., Kawai N., Kim S., Sagher O. and Hoff J. T. (1997) Mechanisms of edema formation after intracerebral hemorrhage: effects of thrombin on cerebral blood flow, blood-brain barrier permeability, and cell survival in a rat model. *J Neurosurg* **86**, 272-278.
- Levy D. E. (1988) How transient are transient ischemic attacks? *Neurology* **38**, 674-677.
- Li Y., Chopp M., Jiang N., Yao F. and Zaloga C. (1995) Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **15**, 389-397.
- Liesz A., Hagmann S., Zschoche C., Adamek J., Zhou W., Sun L., Hug A., Zorn M., Dalpke A., Nawroth P. and Veltkamp R. (2009) The spectrum of systemic immune alterations after murine focal ischemia: immunodepression versus immunomodulation. *Stroke* **40**, 2849-2858.
- Lindsberg P. J., Strbian D. and Karjalainen-Lindsberg M. L. (2010) Mast cells as early responders in the regulation of acute blood-brain barrier changes after cerebral ischemia and hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* **30**, 689-702.
- Lipscomb D. C., Gorman L. G., Traystman R. J. and Hurn P. D. (1998) Low molecular weight iron in cerebral ischemic acidosis in vivo. *Stroke*; **29**, 487-492; discussion 493.
- Lopez A. D., Mathers C. D., Ezzati M., Jamison D. T. and Murray C. J. (2006) Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* **367**, 1747-1757.
- Lovelock C. E., Molyneux A. J. and Rothwell P. M. (2007) Change in incidence and aetiology of intracerebral haemorrhage in Oxfordshire, UK, between 1981 and 2006: a population-based study. *Lancet Neurol* **6**, 487-493.
- Lovett J. K., Coull A. J. and Rothwell P. M. (2004) Early risk of recurrence by subtype of ischemic stroke in population-based incidence studies. *Neurology* **62**, 569-573.
- Luo Y., Kuo C. C., Shen H., Chou J., Greig N. H., Hoffer B. J. and Wang Y. (2009) Delayed treatment with a p53 inhibitor enhances recovery in stroke brain. *Ann Neurol* **65**, 520-530.
- Luthi A. U. and Martin S. J. (2007) The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death Differ* **14**, 641-650.
- Maestre C., Delgado-Esteban M., Gomez-Sanchez J. C., Bolanos J. P. and Almeida A. (2008) Cdk5 phosphorylates Cdh1 and modulates cyclin B1 stability in excitotoxicity. *The EMBO journal* **27**, 2736-2745.
- Mandybur T. I. (1986) Cerebral amyloid angiopathy: the vascular pathology and complications. *J Neuropathol Exp Neurol* **45**, 79-90.
- Marchini J., Donnelly P. and Cardon L. R. (2005) Genome-wide strategies for detecting multiple loci that influence complex diseases. *Nat Genet* **37**, 413-417.
- Martin F. A., Perez-Garijo A. and Morata G. (2009) Apoptosis in Drosophila: compensatory proliferation and undead cells. *Int J Dev Biol* **53**, 1341-1347.
- Martin S. J., Reutelingsperger C. P., McGahon A. J., Rader J. A., van Schie R. C., LaFace D. M. and Green D. R. (1995) Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* **182**, 1545-1556.

- Martinez-Gonzalez N. A. and Sudlow C. L. (2006) Effects of apolipoprotein E genotype on outcome after ischaemic stroke, intracerebral haemorrhage and subarachnoid haemorrhage. *J Neurol Neurosurg Psych* **77**, 1329-1335.
- Matarin M., Brown W. M., Dena H., Britton A., De Vrieze F. W., Brott T. G., Brown R. D., Jr., Worrall B. B., Case L. D., Chanock S. J., Metter E. J., Ferruci L., Gamble D., Hardy J. A., Rich S. S., Singleton A. and Meschia J. F. (2009) Candidate gene polymorphisms for ischemic stroke. *Stroke* **40**, 3436-3442.
- Matarin M., Brown W. M., Scholz S., Simon-Sanchez J., Fung H. C., Hernandez D., Gibbs J. R., De Vrieze F. W., Crews C., Britton A., Langefeld C. D., Brott T. G., Brown R. D., Jr., Worrall B. B., Frankel M., Silliman S., Case L. D., Singleton A., Hardy J. A., Rich S. S. and Meschia J. F. (2007) A genome-wide genotyping study in patients with ischaemic stroke: initial analysis and data release. *Lancet Neurol* **6**, 414-420.
- Matlashewski G., Lamb P., Pim D., Peacock J., Crawford L. and Benchimol S. (1984) Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *The EMBO journal* **3**, 3257-3262.
- Matlashewski G. J., Tuck S., Pim D., Lamb P., Schneider J. and Crawford L. V. (1987) Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* **7**, 961-963.
- Mayer S. A., Brun N. C., Begtrup K., Broderick J., Davis S., Diringer M. N., Skolnick B. E. and Steiner T. (2005) Recombinant activated factor VII for acute intracerebral hemorrhage. *N Eng J Med* **352**, 777-785.
- Mayer S. A., Brun N. C., Begtrup K., Broderick J., Davis S., Diringer M. N., Skolnick B. E. and Steiner T. (2008) Efficacy and safety of recombinant activated factor VII for acute intracerebral hemorrhage. *N Eng J Med* **358**, 2127-2137.
- McGregor J. M., Harwood C. A., Brooks L., Fisher S. A., Kelly D. A., O'Nions J., Young A. R., Suretheran T., Breuer J., Millard T. P., Lewis C. M., Leigh I. M., Storey A. and Crook T. (2002) Relationship between p53 codon 72 polymorphism and susceptibility to sunburn and skin cancer. *J Investigative Dermatology* **119**, 84-90.
- McKenna M. J., Medved I., Goodman C. A., Brown M. J., Bjorksten A. R., Murphy K. T., Petersen A. C., Sostaric S. and Gong X. (2006) N-acetylcysteine attenuates the decline in muscle Na⁺,K⁺-pump activity and delays fatigue during prolonged exercise in humans. *J Physiol* **576**, 279-288.
- Meisel C., Schwab J. M., Prass K., Meisel A. and Dirnagl U. (2005) Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nature reviews* **6**, 775-786.
- Michael D. and Oren M. (2003) The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin Cancer Biol* **13**, 49-58.
- Mihara M., Erster S., Zaika A., Petrenko O., Chittenden T., Pancoska P. and Moll U. M. (2003) p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Molecular cell* **11**, 577-590.
- Monaghan D. T., Bridges R. J. and Cotman C. W. (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu Rev Pharmacol* **29**, 365-402.
- Moncada S. and Bolanos J. P. (2006) Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J Neurochem* **97**, 1676-1689.
- Montaner J., Alvarez-Sabin J., Molina C., Angles A., Abilleira S., Arenillas J., Gonzalez M. A. and Monasterio J. (2001) Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* **32**, 1759-1766.

- Moro M. A., Almeida A., Bolanos J. P. and Lizasoain I. (2005) Mitochondrial respiratory chain and free radical generation in stroke. *Free Rad Biol Med* **39**, 1291-1304.
- Muir K. W., Buchan A., von Kummer R., Rother J. and Baron J. C. (2006) Imaging of acute stroke. *Lancet Neurol* **5**, 755-768.
- Murphy M. E. (2006) Polymorphic variants in the p53 pathway. *Cell Death Differ* **13**, 916-920.
- Nakano K. and Vousden K. H. (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular cell* **7**, 683-694.
- Nguyen T., Nioi P. and Pickett C. B. (2009) The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* **284**, 13291-13295.
- Nicotera P., Leist M., Fava E., Berliocchi L. and Volbracht C. (2000) Energy requirement for caspase activation and neuronal cell death. *Brain Pathol (Zurich, Switzerland)* **10**, 276-282.
- Niizuma K., Endo H. and Chan P. H. (2009) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction as determinants of ischemic neuronal death and survival. *J Neurochem* **109 Suppl 1**, 133-138.
- Okuno S., Saito A., Hayashi T. and Chan P. H. (2004) The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* **24**, 7879-7887.
- Olney J. W. (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science (New York, N.Y)* **164**, 719-721.
- Oppenheim R. W. (1991) Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci* **14**, 453-501.
- Pellegrini-Giampietro D. E. (2003) The distinct role of mGlu1 receptors in post-ischemic neuronal death. *Trends pharmacol* **24**, 461-470.
- Petty G. W., Brown R. D., Jr., Whisnant J. P., Sicks J. D., O'Fallon W. M. and Wiebers D. O. (1999) Ischemic stroke subtypes: a population-based study of incidence and risk factors. *Stroke* **30**, 2513-2516.
- Petty G. W., Brown R. D., Jr., Whisnant J. P., Sicks J. D., O'Fallon W. M. and Wiebers D. O. (2000) Ischemic stroke subtypes : a population-based study of functional outcome, survival, and recurrence. *Stroke* **31**, 1062-1068.
- Pietsch E. C., Humbey O. and Murphy M. E. (2006) Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene* **25**, 1602-1611.
- Pignataro G., Simon R. P. and Xiong Z. G. (2007) Prolonged activation of ASIC1a and the time window for neuroprotection in cerebral ischaemia. *Brain* **130**, 151-158.
- Polager S. and Ginsberg D. (2009) p53 and E2f: partners in life and death. *Nat Rev Cancer* **9**, 738-748.
- Pop C. and Salvesen G. S. (2009) Human caspases: activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem* **284**, 21777-21781.
- Prives C. and Hall P. A. (1999) The p53 pathway. *J Pathol* **187**, 112-126.
- Qureshi A. I., Mendelow A. D. and Hanley D. F. (2009) Intracerebral haemorrhage. *Lancet* **373**, 1632-1644.

- Qureshi A. I., Suri M. F., Ostrow P. T., Kim S. H., Ali Z., Shatla A. A., Guterman L. R. and Hopkins L. N. (2003) Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage. *Neurosurgery* **52**, 1041-1047; discussion 1047-1048.
- Rebeck T. R., Spitz M. and Wu X. (2004) Assessing the function of genetic variants in candidate gene association studies. *Nat Rev Genet* **5**, 589-597.
- Robbins P. D., Yu L. L., Lee M., Stokes B. A., Thomas G. W., Watson P. and Wong G. (1994) Stereotactic biopsy of 100 intracerebral lesions at Sir Charles Gairdner Hospital. *Pathology* **26**, 410-413.
- Rosenblum W. I. (2008) Fibrinoid necrosis of small brain arteries and arterioles and miliary aneurysms as causes of hypertensive hemorrhage: a critical reappraisal. *Acta Neuropathol* **116**, 361-369.
- Ross A. M., Hurn P., Perrin N., Wood L., Carlini W. and Potempa K. (2007) Evidence of the peripheral inflammatory response in patients with transient ischemic attack. *J Stroke Cerebrovasc Dis* **16**, 203-207.
- Rothman K. J. and Greenland S. (2005) Causation and causal inference in epidemiology. *Am J Public Health* **95 Suppl 1**, S144-150.
- Rothwell P. M., Eliasziw M., Gutnikov S. A., Fox A. J., Taylor D. W., Mayberg M. R., Warlow C. P. and Barnett H. J. (2003) Analysis of pooled data from the randomised controlled trials of endarterectomy for symptomatic carotid stenosis. *Lancet* **361**, 107-116.
- Sacco R. L., Shi T., Zamanillo M. C. and Kargman D. E. (1994) Predictors of mortality and recurrence after hospitalized cerebral infarction in an urban community: the Northern Manhattan Stroke Study. *Neurology* **44**, 626-634.
- Sacco S., Marini C., Toni D., Olivieri L. and Carolei A. (2009) Incidence and 10-year survival of intracerebral hemorrhage in a population-based registry. *Stroke* **40**, 394-399.
- Sacco S. E., Whisnant J. P., Broderick J. P., Phillips S. J. and O'Fallon W. M. (1991) Epidemiological characteristics of lacunar infarcts in a population. *Stroke* **22**, 1236-1241.
- Sairanen T., Karjalainen-Lindsberg M. L., Paetau A., Ijas P. and Lindsberg P. J. (2006) Apoptosis dominant in the periinfarct area of human ischaemic stroke--a possible target of antiapoptotic treatments. *Brain* **129**, 189-199.
- Saito A., Hayashi T., Okuno S., Nishi T. and Chan P. H. (2005) Modulation of p53 degradation via MDM2-mediated ubiquitylation and the ubiquitin-proteasome system during reperfusion after stroke: role of oxidative stress. *J Cereb Blood Flow Metab* **25**, 267-280.
- Sakamuro D., Sabbatini P., White E. and Prendergast G. C. (1997) The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* **15**, 887-898.
- Salvesen G. S. and Dixit V. M. (1999) Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 10964-10967.
- Santos A. M., Sousa H., Pinto D., Portela C., Pereira D., Catarino R., Duarte I., Lopes C. and Medeiros R. (2006) Linking TP53 codon 72 and P21 nt590 genotypes to the development of cervical and ovarian cancer. *Eur J Cancer* **42**, 958-963.
- Sastry P. S. and Rao K. S. (2000) Apoptosis and the nervous system. *J Neurochem* **74**, 1-20.
- Schmitt C. A., Fridman J. S., Yang M., Baranov E., Hoffman R. M. and Lowe S. W. (2002) Dissecting p53 tumor suppressor functions in vivo. *Cancer cell* **1**, 289-298.

- Schuler M., Bossy-Wetzel E., Goldstein J. C., Fitzgerald P. and Green D. R. (2000) p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *J Biol Chem* **275**, 7337-7342.
- Schulz U. G. and Rothwell P. M. (2003) Differences in vascular risk factors between etiological subtypes of ischemic stroke: importance of population-based studies. *Stroke* **34**, 2050-2059.
- Shih A. Y., Li P. and Murphy T. H. (2005) A small-molecule-inducible Nrf2-mediated antioxidant response provides effective prophylaxis against cerebral ischemia in vivo. *J Neurosci* **25**, 10321-10335.
- Simon R. P. (2006) Acidotoxicity trumps excitotoxicity in ischemic brain. *Arch Neurol* **63**, 1368-1371.
- Soussi T. (2000) The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann N Y Acad Sci* **910**, 121-137; discussion 137-129.
- Spera P. A., Ellison J. A., Feuerstein G. Z. and Barone F. C. (1998) IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke. *Neurosci Lett* **251**, 189-192.
- Stadelmann C., Bruck W., Bancher C., Jellinger K. and Lassmann H. (1998) Alzheimer disease: DNA fragmentation indicates increased neuronal vulnerability, but not apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol* **57**, 456-464.
- Suarez C., Castillo J., Esmatjes E., Sala J., Cairols M., Montoto C. and Barbera G. (2009) [Cardiovascular complications at 1-year of follow-up in patients with atherothrombosis. On behalf of Spain's REACH Registry]. *Med Clin* **132**, 537-544.
- Sun Y. (1990) Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Rad Biol Med* **8**, 583-599.
- Sunyaev S., Ramensky V., Koch I., Lathe W., 3rd, Kondrashov A. S. and Bork P. (2001) Prediction of deleterious human alleles. *Hum Mol Genet* **10**, 591-597.
- Takasugi S., Ueda S. and Matsumoto K. (1985) Chronological changes in spontaneous intracerebral hematoma--an experimental and clinical study. *Stroke* **16**, 651-658.
- Taylor R. C., Cullen S. P. and Martin S. J. (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 231-241.
- Tei H., Uchiyama S., Ohara K., Kobayashi M., Uchiyama Y. and Fukuzawa M. (2000) Deteriorating ischemic stroke in 4 clinical categories classified by the Oxfordshire Community Stroke Project. *Stroke* **31**, 2049-2054.
- Thomalla G. J., Kucinski T., Schoder V., Fiehler J., Knab R., Zeumer H., Weiller C. and Rother J. (2003) Prediction of malignant middle cerebral artery infarction by early perfusion- and diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Stroke* **34**, 1892-1899.
- Tinel A. and Tschopp J. (2004) The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science (New York, N.Y)* **304**, 843-846.
- van Asch C. J., Luitse M. J., Rinkel G. J., van der Tweel I., Algra A. and Klijn C. J. (2010) Incidence, case fatality, and functional outcome of intracerebral haemorrhage over time, according to age, sex, and ethnic origin: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* **9**, 167-176.
- Vibo R., Korv J. and Roose M. (2007) The Third Stroke Registry in Tartu, Estonia, from 2001 to 2003. *Acta Neurol Scand* **116**, 31-36.
- Vila N., Castillo J., Davalos A. and Chamorro A. (2000) Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* **31**, 2325-2329.

- Walker K. K. and Levine A. J. (1996) Identification of a novel p53 functional domain that is necessary for efficient growth suppression. *Proc Nat Acad Sci USA* **93**, 15335-15340.
- Wang-Gohrke S., Weikel W., Risch H., Vesprini D., Abrahamson J., Lerman C., Godwin A., Moslehi R., Olipade O., Brunet J. S., Stickeler E., Kieback D. G., Kreienberg R., Weber B., Narod S. A. and Runnebaum I. B. (1999) Intron variants of the p53 gene are associated with increased risk for ovarian cancer but not in carriers of BRCA1 or BRCA2 germline mutations. *Br J Cancer* **81**, 179-183.
- Warlow C., C. S., M. D., J. W. and P. S. (2003) Stroke. *Lancet* **362**, 1211-1224.
- Warlow C. P. (2007) Chances and battles in stroke research. *Cerebrovasc Dis (Basel, Switzerland)* **24**, 391-399.
- Weimar C., Ziegler A., Konig I. R. and Diener H. C. (2002) Predicting functional outcome and survival after acute ischemic stroke. *J Neurol* **249**, 888-895.
- Weimar C., Konig I. R., Kraywinkel K., Ziegler A. and Diener H. C. (2004) Age and National Institutes of Health Stroke Scale Score within 6 hours after onset are accurate predictors of outcome after cerebral ischemia: development and external validation of prognostic models. *Stroke* **35**, 158-162.
- Whibley C., Pharoah P. D. and Hollstein M. (2009) p53 polymorphisms: cancer implications. *Nat Rev Cancer* **9**, 95-107.
- Wityk R. J., Pessin M. S., Kaplan R. F. and Caplan L. R. (1994) Serial assessment of acute stroke using the NIH Stroke Scale. *Stroke* **25**, 362-365.
- Wolfe C. D., Taub N. A., Woodrow E. J. and Burney P. G. (1991) Assessment of scales of disability and handicap for stroke patients. *Stroke* **22**, 1242-1244.
- Won S. J., Kim D. Y. and Gwag B. J. (2002) Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *J Biochem Mol Biol* **35**, 67-86.
- Wu X., Zhao H., Amos C. I., Shete S., Maman N., Hong W. K., Kadlubar F. F. and Spitz M. R. (2002) p53 Genotypes and Haplotypes Associated With Lung Cancer Susceptibility and Ethnicity. *Journal of the National Cancer Institute* **94**, 681-690.
- Xu D., Yang C. and Wang L. (2003) Cerebral amyloid angiopathy in aged Chinese: a clinico-neuropathological study. *Acta Neuropathol* **106**, 89-91.
- Yu J., Zhang L., Hwang P. M., Kinzler K. W. and Vogelstein B. (2001) PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Molecular cell* **7**, 673-682.
- Zakeri Z. (2008) Honoring contributions of Richard A Lockshin to the field of cell death. *Cell death Differ* **15**, 1087-1088.
- Zhu X., Yu Q. S., Cutler R. G., Culmsee C. W., Holloway H. W., Lahiri D. K., Mattson M. P. and Greig N. H. (2002a) Novel p53 inactivators with neuroprotective action: syntheses and pharmacological evaluation of 2-imino-2,3,4,5,6,7-hexahydrobenzothiazole and 2-imino-2,3,4,5,6,7-hexahydrobenzoxazole derivatives. *J Med Chem* **45**, 5090-5097.
- Zhu Y., Yang G. Y., Ahlemeyer B., Pang L., Che X. M., Culmsee C., Klumpp S. and Kriegstein J. (2002b) Transforming growth factor-beta 1 increases bad phosphorylation and protects neurons against damage. *J Neurosci* **22**, 3898-3909.
- Zou H., Li Y., Liu X. and Wang X. (1999) An APAF-1/cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem* **274**, 11549-11556.

