

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA. DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DE SALAMANCA**



**EL POLIMORFISMO ARG72PRO DE TP53 REGULA LA  
MOVILIZACIÓN DE PRECURSORES ENDOTELIALES Y LA  
REPARACIÓN VASCULAR TRAS LA HEMORRAGIA  
INTRACEREBRAL**

**TESIS DOCTORAL**

María Esther Ramos Araque

2016





## VNiVERSiDAD D SALAMANCA

D<sup>a</sup> Angeles Almeida Parra, Doctora en Farmacia, Investigadora del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca del Hospital Universitario de Salamanca– Universidad de Salamanca y Profesora Asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca

### CERTIFICA

Que el trabajo doctoral realizado bajo su dirección por D<sup>a</sup> María Esther Ramos Araque, titulado “El polimorfismo Arg72Pro de Tp53 regula la movilización de precursores endoteliales y la reparación vascular tras la hemorragia intracerebral”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de doctor por la Universidad de Salamanca y autoriza su presentación.

Y para que así conste, firma la presente certificación en Salamanca, a 1 de julio de 2016.

Fdo. Dra Ángeles Almeida Parra





## VNiVERSiDAD D SALAMANCA

D<sup>a</sup> Cristina Rodríguez González, Doctora en Química, Investigadora del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca del Hospital Universitario de Salamanca

### CERTIFICA

Que el trabajo doctoral realizado bajo su dirección por D<sup>a</sup> María Esther Ramos Araque, titulado “El polimorfismo Arg72Pro de Tp53 regula la movilización de precursores endoteliales y la reparación vascular tras la hemorragia intracerebral”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de doctor por la Universidad de Salamanca y autoriza su presentación.

Y para que así conste, firma la presente certificación en Salamanca, a 1 de julio de 2016.

Fdo. Dra Cristina Rodríguez González





## VNiVERSiDAD D SALAMANCA

D José Carlos Gómez Sánchez, Doctor en Medicina, Neurólogo del Hospital Universitario de Salamanca, Investigador del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca-Hospital Universitario de Salamanca y Profesor Asociado del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca

### CERTIFICA

Que el trabajo doctoral realizado bajo su dirección por D<sup>a</sup> María Esther Ramos Araque, titulado “El polimorfismo Arg72Pro de Tp53 regula la movilización de precursores endoteliales y la reparación vascular tras la hemorragia intracerebral”, reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de doctor por la Universidad de Salamanca y autoriza su presentación.

Y para que así conste, firma la presente certificación en Salamanca, a 1 de julio de 2016.

Fdo. Dr José Carlos Gómez Sánchez





Este trabajo ha sido financiado con subvenciones concedidas por: el Instituto de Salud Carlos III, a través de un contrato Río Hortega (CM14/00096), la Red Temática de Investigación Cooperativa en Enfermedades Cerebrovasculares (INVICTUS) RD12/0014/0007 y el proyecto FIS PI12/00685.



*A Dios*

*A mis padres y hermanos*

*A Sebastián*



## **Agradecimientos**

A la Doctora Ángeles Almeida, por su apoyo durante estos años, por su ánimo y entusiasmo, su orientación constante y la confianza depositada en mí, además de su empeño en mi formación como científica, me considero muy afortunada de trabajar en su equipo.

A la Doctora Cristina Rodríguez, por las innumerables horas dedicadas en mi formación, por sus ideas y correcciones, por su apoyo constante en el laboratorio y fuera de este, y además por su amistad.

Al Doctor José Carlos Gómez, por su empeño en mi formación como neuróloga y como científica, por su generosidad a la hora de compartir conocimientos.

A mis compañeros y amigos de los laboratorios 2.8 y 2.7 del IBFG, gracias por su apoyo constante, por las risas y tantos momentos compartidos.

A mis compañeros de Neurología del Hospital Universitario de Salamanca, por transmitirme tantos conocimientos neurológicos y por su amistad.

A las enfermeras del Hospital Universitario de Salamanca, siempre dispuestas a colaborar en lo que he necesitado.

A los pacientes y sus familiares, pilar fundamental de este trabajo, que espero revierta en beneficio para aliviar sus padecimientos.



## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

**7-AAD:** 7-Amino-actinomicina

**AAC:** Angiopatía Amiloide Cerebral

**ACOs:** Anticoagulantes orales

**Ang-1:** Angiopietina 1

**APC:** Alofocianina

**ApoE:** Apolipoproteína E

**APP:** Proteína Precursora de Amiloide (*Amyloid Precursor Protein*)

**BSA:** Suero de albúmina bovina (*Bovine Serum Albumin*)

**BrdU:** 5-Bromo-2'-desoxiuridina

**CADASIL:** Arteriopatía Cerebral Autosómica con Infartos Cerebrales y Leucoencefalopatía

**c-LDL:** Colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad

**DAPI:** 4,6-Diamino-2-fenilindol

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

**ECA:** Enzima Convertidora de Angiotensina

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**ELISA:** Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzima

**EPCs:** Células progenitoras endoteliales (*Endothelial Progenitor Cells*)

**FITC:** Isotiocianato de fluoresceína

**HIC:** Hemorragia intracerebral

**HIF-1:** Factor inducible por hipoxia-1

**HTA:** Hipertensión arterial

**IB4:** Isolectina-B4

**IL:** interleuquina

**INR:** *International Normalized Ratio*

**KI:** *Knock-in*

**KDR:** *Kinase insert Domain Receptor*

**MAV:** Malformaciones arteriovenosas

**NIHSS:** Escala NIHSS (*National Institute of Health Stroke Scale*)

**OGD:** Privación de oxígeno y glucosa (*Oxygen Glucose Deprivation*)

**PB:** Tampón fosfato

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)

**Rankin-m:** Escala de Rankin modificada

**RFLP:** *Restriction Fragment Length Polymorphism*

**RMN:** Resonancia Magnética Nuclear

**SD:** Desviación estándar (*Standart Deviation*)

**SDF-1 $\alpha$ :** Factor derivado del estroma 1- $\alpha$

**S.E.M:** Error estándar de la media (*Standart Error Media*)

**SNP:** Polimorfismo de nucleótido único (*Single Nucleotide Polymorphism*)

**TAD:** Tensión arterial diastólica

**TAS:** Tensión arterial sistólica

**TC:** Tomografía computarizada

**t-PA:** Activador tisular del plasminógeno

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**TUNEL:** *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyUridine triphosphate-biotin Nick End-Labeling*

**VEGF:** Factor de crecimiento del endotelio vascular (*Vascular Endotelial Growth Factor*)

**VEGFR2:** Receptor 2 de VEGF (también conocido como Flk-1 o KDR)



## **INDICE**



<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL</b> .....	3
1.1. Factores de riesgo .....	4
1.2. Causas .....	5
1.2.1. Hemorragia intracerebral por enfermedad de pequeño vaso.....	6
1.2.2. Hemorragia intracerebral por trastornos de la coagulación, anticoagulantes y tratamiento fibrinolítico .....	7
1.2.3. Hemorragia intracerebral por tumores .....	9
1.2.4. Hemorragia intracerebral por malformaciones vasculares cerebrales .....	9
1.2.5. Hemorragia intracerebral por vasculitis y otras arteriopatías .....	10
1.2.6. Hemorragia intracerebral por sustancias de abuso.....	10
1.3. Distribución anatómica .....	10
1.4. Manifestaciones clínicas .....	12
1.5. Diagnóstico y manejo.....	13
1.6. Características fisiopatológicas de la hemorragia intracerebral .....	15
1.6.1. Proceso fisiopatológico .....	15
1.6.2. Progresión del hematoma .....	15
1.6.3. Mecanismos moleculares del daño cerebral.....	15
<b>2. FENÓMENOS DE REPARACIÓN CEREBRAL</b> .....	19
2.1. Evidencias de neovascularización en el cerebro adulto .....	19
<b>3. CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES E ICTUS</b> .....	21
<b>4. MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES MEDIADA POR FACTORES PROANGIOGÉNICOS</b> .....	24
4.1. Factor derivado de estroma -1 $\alpha$ (SDF-1 $\alpha$ ).....	25
4.2. Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) .....	26
4.3. Angiopoyetina 1 (Ang-1) .....	27
<b>5. VARIABILIDAD GENÉTICA Y RECUPERACIÓN FUNCIONAL TRAS LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL. PAPEL PRONÓSTICO DEL POLIMORFISMO <i>Arg72Pro</i> de <i>Tp53</i></b> .....	28
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	33
HIPÓTESIS .....	35
OBJETIVOS .....	37
MATERIAL Y MÉTODOS.....	39
1. ESTUDIO CLÍNICO.....	41
1.1. Población de pacientes.....	41
1.2. Variables clínicas .....	42
1.3. Genotipado del polimorfismo <i>Arg72Pro</i> de <i>Tp53</i> .....	43
2. ESTUDIO EXPERIMENTAL.....	45
2.1. Modelo experimental de hemorragia intracerebral .....	45
2.2. Análisis de los niveles de células progenitoras circulantes y apoptosis celular mediante citometría de flujo .....	46
2.3. Medida de los niveles séricos de VEGF, Ang-1 y SDF-1 $\alpha$ .....	48
2.4. Cultivos celulares y tratamientos .....	48

2.4.1. Cultivo primario de células endoteliales de cerebro.....	48
2.5. Inmunohistoquímica.....	49
2.5.1. Obtención de muestras.....	49
2.5.2. Inmunofluorescencia.....	50
2.6. Estudio de apoptosis mediante la técnica de TUNEL.....	51
3. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....	51
RESULTADOS.....	53
1. IMPACTO DEL POLIMORFISMO DE <i>Tp53</i> EN LOS NIVELES DE CÉLULAS CD34 <sup>+</sup> CIRCULANTES Y SU VALOR PRONÓSTICO EN LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL.....	55
1.1. Análisis descriptivo general de la cohorte de pacientes con hemorragia intracerebral.....	55
1.2. El polimorfismo <i>Arg72Pro</i> de <i>Tp53</i> condiciona el pronóstico funcional de los pacientes con hemorragia intracerebral.....	58
1.2.1. El polimorfismo <i>Arg72Pro</i> de <i>Tp53</i> condiciona el volumen de lesión, volumen residual y volumen del edema perihematoma.....	59
1.2.2. Análisis multivariante principal: El polimorfismo <i>Arg72Pro</i> de <i>Tp53</i> se asocia al pronóstico funcional a los 3 meses.....	63
1.2.3. El polimorfismo <i>Arg72Pro</i> de <i>Tp53</i> condiciona la recuperación funcional a largo plazo de los pacientes tras la hemorragia intracerebral.....	63
1.3. El polimorfismo <i>Arg72Pro</i> de <i>Tp53</i> regula los niveles circulantes de células progenitoras endoteliales y el pronóstico funcional de los pacientes con hemorragia intracerebral.....	65
1.3.1. El polimorfismo <i>Arg72Pro</i> de <i>Tp53</i> no condiciona la viabilidad de las células progenitoras (CD34 <sup>+</sup> ) circulantes.....	69
1.3.2. El polimorfismo <i>Arg72Pro</i> de <i>Tp53</i> determina la activación y movilización de células progenitoras endoteliales de la médula ósea.....	69
2. INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO <i>Arg72Pro</i> DE <i>Tp53</i> EN LA SUPERVIVENCIA ENDOTELIAL Y LA NEOVASCULARIZACIÓN TRAS LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL.....	71
2.1. Modelo experimental de hemorragia intracerebral en ratones Knock-in <i>Ar72Pro</i> de <i>Tp53</i> ( <i>Klp53</i> ).....	71
2.2. Efecto del polimorfismo <i>Arg72Pro</i> de <i>Tp53</i> sobre la apoptosis celular <i>in vivo</i> .....	72
2.3. Efecto del polimorfismo <i>Arg72Pro</i> de <i>Tp53</i> sobre la movilización de células endoteliales progenitoras en los ratones <i>Klp53</i> tras la hemorragia intracerebral.....	76
2.3.1. Efecto del polimorfismo <i>Arg72Pro</i> de <i>Tp53</i> sobre la liberación de factores proangiogénicos en ratones <i>Kip53</i> .....	77
2.3.2. Recuento de células progenitoras circulantes.....	78
2.4. Diferencias en neovascularización dependientes del genotipo <i>Arg72Pro</i> .....	79
DISCUSIÓN.....	85
CONCLUSIONES.....	93
BIBLIOGRAFIA.....	97

## **INTRODUCCIÓN**



## 1. HEMORRAGIA INTRACEREBRAL

La hemorragia intracerebral (HIC) espontánea consiste en la brusca extravasación de sangre dentro del parénquima cerebral producida por una rotura vascular no traumática. Globalmente, representa entre un 9 a 27% de los ictus (Steiner *et al.*, 2014), aunque esta proporción varía en función del país, la raza, la edad y el sexo (Qureshi *et al.*, 2009). La incidencia en población caucásica es de aproximadamente 15 casos por cada 100.000 habitantes. Se registran más casos en hombres y el riesgo aumenta con la edad (Ikram *et al.*, 2012).

La HIC es la patología vascular cerebral con una mayor tasa de mortalidad, alrededor del 40% al mes (Poon *et al.*, 2015), 50% al año, y a los 5 años aproximadamente un 70%. Además, los pacientes que sobreviven tienen un gran riesgo de padecer secuelas (Poon *et al.*, 2014). De hecho, sólo un 20% de ellos son funcionalmente independientes a los seis meses. Aunque el escenario epidemiológico ha cambiado, la incidencia en las últimas décadas se ha mantenido estable (Wilson *et al.*, 2014). Por todo ello, a día de hoy, la HIC sigue siendo un importante problema sociosanitario (Steiner *et al.*, 2014).

Gracias a las técnicas modernas de neuroimagen se han producido avances notables en la identificación de factores de riesgo. La investigación básica y clínica también ha contribuido a dilucidar mecanismos fisiopatológicos y de daño neuronal. Sin embargo, actualmente no existe ningún tratamiento médico específico y el tratamiento quirúrgico sólo es útil en un bajo porcentaje de casos.

El pronóstico de los pacientes con HIC está vinculado a una gran cantidad de variables clínicas, analíticas, de neuroimagen, de respuesta al tratamiento, etc. (Poon *et al.*, 2014). Aunque se necesitan más datos acerca de las variaciones que se dan en la situación funcional final de los pacientes (van Asch *et al.*, 2010).

## **1.1. Factores de riesgo**

En ausencia de un tratamiento eficaz, muchos estudios recientes se han centrado en el desarrollo de medidas preventivas y en la estratificación de los factores de riesgo en la HIC.

La hipertensión arterial (HTA) se encuentra entre los factores de riesgo más estudiados. Considerado el más importante de todos, la HTA marca un riesgo, al menos dos veces superior de sufrir HIC (O'Donnell *et al.*, 2010; Rodríguez-Yañez *et al.*, 2013). El padecer angiopatía amiloide cerebral (AAC) se considera el segundo factor de riesgo más importante para el desarrollo de HIC, especialmente en pacientes de edad avanzada. El creciente uso de anticoagulantes y la edad de los pacientes ha aumentado la incidencia de las HIC asociada a estos tratamientos (Thanvi *et al.*, 2012). El alcohol y el tabaco son factores de riesgo dosis dependientes para HIC (Zhang *et al.*, 2011; Andersen *et al.*, 2009), afectando a fumadores activos y exfumadores, aunque en menor medida. Se ha encontrado relación entre la diabetes mellitus y el riesgo de padecer HIC (Ariesen *et al.*, 2003). Por otro lado, niveles bajos de colesterol total y colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (c-LDL) pueden favorecer la necrosis de las células musculares lisas de la capa media de las arterias cerebrales o favorecer el desarrollo de microaneurismas (Wang *et al.*, 2013). Sin embargo, en distintos metaanálisis no se encontró asociación del tratamiento con estatinas con un riesgo elevado de HIC (Hackam *et al.*, 2011).

Otros factores emergentes incluyen una dieta poco saludable, el sedentarismo (Zhang *et al.*, 2011) y, presumiblemente, el deterioro de la función renal, aunque este hallazgo no ha sido consistente en todos los estudios (Lee *et al.*, 2010). Valores anormales del índice de masa corporal podrían incrementar el riesgo de HIC, aunque tal vez como marcador de procesos patológicos subyacentes (Biffi *et al.*, 2011). Los microsangrados intracerebrales en secuencia eco de gradiente (T2\*) de Resonancia Magnética (RMN), también emergen como un factor de riesgo preclínico de HIC por ser un marcador de arteriopatía subyacente. Además, se les atribuye un valor predictivo de hemorragias secundarias a anticoagulantes,



aunque aún queda por conocer los resultados de estudios poblacionales (Charidimou *et al.*, 2012; Shoamanesh *et al.*, 2011).

Se han descrito una serie de trastornos genéticos que predisponen a la HIC, como son la AAC familiar debida a mutaciones en el gen de la proteína precursora de amiloide (APP) y la arteriopatía cerebral autosómica dominante (CADASIL) secundaria a mutaciones en el gen Notch3 y, más modestamente, en aquellos que codifican para la enzima convertidora de angiotensina (ECA), factores de la coagulación VII y XIII, interleuquina 6 (IL-6), y los genes ApoH y CR1 (recientemente relacionado con la enfermedad de Alzheimer) (Carpenter *et al.*, 2015). Pero si existe un marcador genético robusto indicativo de un mayor riesgo de padecer HIC es el gen de la apolipoproteína E (ApoE). Concretamente los polimorfismos  $\epsilon 4$  y  $\epsilon 2$  se han asociado con HIC, probablemente en relación con la AAC, por el incremento de depósitos de proteína  $\beta$ -amiloide y la localización del daño, como se verá más adelante (Domingues *et al.*, 2014). Este hecho demuestra que el sustrato genético desempeña un papel sustancial en el riesgo de HIC y presumiblemente en el pronóstico y volumen de hematoma, como sugiere un estudio reciente del Consorcio Internacional de Genética del Ictus (International Stroke Genetics Consortium, ISCG) (Devan *et al.*, 2013).

## **1.2. Causas**

Para la HIC aún no existe una clasificación etiológica establecida, ya que una HIC generalmente es el resultado de factores de riesgo predisponentes y factores precipitantes (Domingues *et al.*, 2014).

Convencionalmente la HIC espontánea se ha clasificado como secundaria cuando se objetivan las causas del sangrado como una neoplasia o malformación arteriovenosa entre otras y primaria cuando no hay una causa subyacente obvia. Debido a los avances en neuroimagen y la correlación con estudios neuropatológicos, actualmente se acepta que los procesos que subyacen a la HIC primaria son enfermedades intrínsecas que afectan a los vasos cerebrales de pequeño calibre (usualmente denominada enfermedad de pequeño vaso). Por lo

tanto, se ha sugerido utilizar el término HIC debida a enfermedad de pequeño vaso en vez de HIC primaria (D Wilson *et al.*, 2014), modificando ligeramente la clasificación tradicional (Tabla 1).

---

**Tabla 1. Principales causas de HIC no traumática**

---

Enfermedad de pequeño vaso:

    Hipertensión arterial

    Angiopatia amiloide cerebral

Enfermedades hematológicas

Anticoagulantes y fibrinolíticos

Tumores

Malformaciones vasculares cerebrales

Arteriopatías inflamatorias infecciosas y no infecciosas

Etanol y drogas simpaticomiméticas

---

### **1.2.1. Hemorragia intracerebral por enfermedad de pequeño vaso**

#### **- Hipertensión arterial**

La HTA es la causa más frecuente de HIC, actualmente representa el 50 a 60% del total de las HIC (Falcone *et al.*, 2013).

La HTA crónica condiciona lesiones vasculares en las arteriolas perforantes (Takebayashi & Kaneko, 1983; Takebayashi, 1985). Estas alteraciones favorecen la obstrucción vascular y pueden dar lugar a infartos lacunares, isquemia de la sustancia blanca periventricular y subcortical profunda (leucoaraiosis), así como ruptura vascular. El papel de la ruptura de microaneurismas como causa de HIC todavía es incierto.

La HTA también puede ocasionar HIC de forma aguda, al incidir sobre pequeñas arteriolas no protegidas por la hipertrofia de sus paredes, como sucede en ciertas

hemorragias producidas por drogas o tras realizar una endarterectomía o una angioplastia (Brott *et al.*, 1986; Wang & Tuhim, 2012)

Dada la fuerte asociación entre HTA y HIC, la elevada prevalencia de HTA, y las múltiples opciones de tratamiento disponibles, el control de la presión arterial se considera la principal estrategia para la prevención de la HIC (Ikram *et al.*, 2012).

### **- Angiopatía Amiloide Cerebral**

La hemorragia por AAC representa aproximadamente el 20% de las HIC espontáneas (Domingues *et al.*, 2014). Su frecuencia aumenta con la edad, siendo muy rara por debajo de 55 años. La AAC se caracteriza por el depósito de material  $\beta$ -amiloide en las paredes de los vasos cerebrales, principalmente vasos corticales y leptomeníngeos de pequeño y mediano calibre.

Aunque el mecanismo por el que la angiopatía amiloide facilita las hemorragias no está bien establecido, podría incluir alteraciones tales como la debilidad de la pared arterial y la asociación con otras anomalías (microaneurismas, degeneración hialina de la pared, necrosis fibrinoide). Es característico en esta entidad la localización lobular, tendencia a la recurrencia, la hemorragia múltiple y la existencia de deterioro cognitivo previo.

### **1.2.2. Hemorragia intracerebral por trastornos de la coagulación, anticoagulantes y tratamiento fibrinolítico**

Las coagulopatías congénitas, como la hemofilia, o adquiridas, como la púrpura trombocitopénica idiopática, son causas infrecuentes de HIC (Wang & Tuhim, 2012).

La HIC es la complicación más temida del tratamiento con anticoagulantes (Hankey, 2014). Debido al creciente uso de estos fármacos y la mayor edad de los pacientes, la incidencia se ha incrementado de forma significativa (Wilson *et al.*, 2016). El desarrollo de nuevos fármacos ha representado un avance importante en

la disminución del riesgo hemorrágico, una de las principales limitaciones de los anticoagulantes clásicos.

El riesgo de HIC asociada a inhibidores dependientes de los factores de vitamina K es del 1-2% anual (hasta 7 a 10 veces mayor que en pacientes que no reciben este tratamiento), el volumen del hematoma suele ser mayor y presenta altas tasas de mortalidad comparado con otras causas de HIC (Flaherty *et al.*, 2007). Suelen producirse en personas de edad avanzada, hipertensas, con AAC y la mayoría ocurren con niveles de INR (*International Normalized Ratio*) en rango terapéutico (Zubkov *et al.*, 2008).

La evidencia actual sugiere que en aquellos pacientes con fibrilación auricular bajo tratamiento con anticoagulantes directos (ACOs), la incidencia de HIC es 50% menor frente a los pacientes en tratamiento con warfarina, con una eficacia similar en la prevención de eventos isquémicos (Ruff *et al.*, 2014). Los datos de HIC asociada a ACOs fuera de los ensayos clínicos aún son limitados y se derivan de estudios de cohorte hospitalaria, aunque han reportado menor volumen de hematoma y mejor pronóstico funcional que los pacientes tratados con warfarina (Hagii *et al.*, 2014; Wilson *et al.*, 2016).

La HIC es una de las complicaciones del tratamiento con fibrinolíticos en la fase aguda del ictus. El activador tisular del plasminógeno (t-PA) presenta tasas de HIC de 6,4% (NINDS rt-PA Stroke Study Group 1995). La trombolisis intraarterial con prouroquinasa se asocia con una tasa de 11% de HIC sintomática precoz y con mal pronóstico (Kase *et al.*, 2001). Los factores asociados a HIC secundaria a fibrinolíticos son: la hiperglucemia, hipertensión arterial, tratamiento previo con aspirina y clopidogrel (Poppe *et al.*, 2009; Butcher *et al.*, 2010).

La leucoaraiosis y la presencia de microhemorragias cerebrales en secuencia T2\* de RMN marcan un mayor riesgo de padecer una HIC secundaria a anticoagulantes o fibrinolíticos (Lovelock *et al.*, 2010; Falcone *et al.*, 2014).

### **1.2.3. Hemorragia intracerebral por tumores**

Las neoplasias representan un porcentaje bajo del total de HIC (Wang & Tuhrim, 2012; Katz & Segal, 2005). La leucemia aguda presenta el mayor riesgo de sangrado (Rogers, 2003), otras causas incluyen metástasis de cáncer de pulmón, melanoma, coriocarcinoma, carcinoma de tiroides, carcinoma de células renales, hepatocarcinoma y tumores cerebrales primarios como el glioblastoma multiforme y oligodendroglioma. Entre los principales mecanismos del sangrado se encuentran: coagulopatías, efectos directos del tumor como necrosis o neovascularización y relacionados con el tratamiento (Rogers, 2003; Katz & Segal, 2005).

### **1.2.4. Hemorragia intracerebral por malformaciones vasculares cerebrales**

En general, los pacientes con HIC debido a malformaciones vasculares tienen mejor pronóstico que los pacientes con una hemorragia espontánea (Domingues *et al.*, 2014). Las malformaciones arteriovenosas (MAV) se manifiestan como HIC hasta en un 50% de los casos. La tasa anual de hemorragias para MAV que no han sangrado es de 2,3-2,8% (Kim *et al.*, 2014; Mohr *et al.*, 2014). Los predictores de HIC recurrente en MAV son sangrado previo, sexo femenino, edad avanzada y características anatómicas como localización profunda y drenaje venoso profundo. En el caso de los cavernomas cerebrales, el riesgo anual de una primera HIC se estima entre 0.4-0.6% (Al-Shahi Salman *et al.*, 2012), tienden a ocurrir a edades tempranas, son de menor volumen que otras malformaciones vasculares cerebrales y producen menos discapacidad (Domingues *et al.*, 2014). Un metaanálisis reciente ha demostrado que la localización en tronco cerebral y la presentación en forma de HIC o con déficits neurológicos focales se asocia de forma independiente con la probabilidad de sangrado a los 5 años del diagnóstico, mientras que la edad, el sexo y la presencia de cavernomas múltiples no aporta información pronóstica, además se ha observado que la incidencia de HIC disminuye con el tiempo en aquellas personas que debutan con HIC (Horne *et al.*, 2016).

### **1.2.5. Hemorragia intracerebral por vasculitis y otras arteriopatías**

Las arteriopatías inflamatorias (vasculitis primarias y secundarias del sistema nervioso central) pueden ser causa de HIC (Memet *et al.*, 2005; Moskowitz *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 1999). Los aneurismas micóticos son una complicación grave de la endocarditis bacteriana; éstos pueden ser únicos o múltiples y suelen localizarse en las ramas terminales de las arterias intracraneales; tienen tendencia a romperse y producir HIC de mal pronóstico, cuya mortalidad oscila entre el 60 y el 90% de los casos.

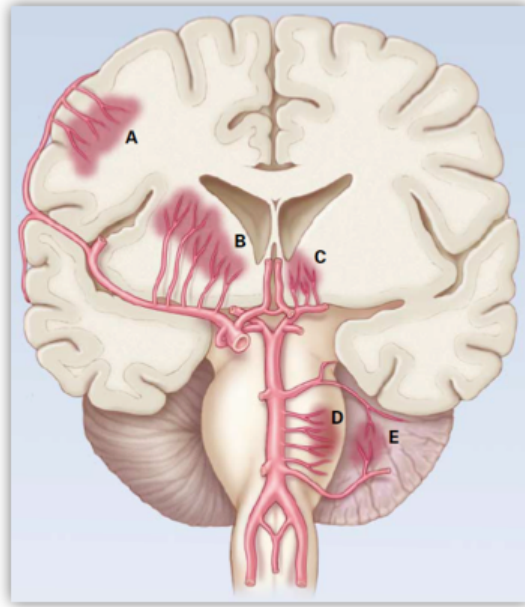
### **1.2.6. Hemorragia intracerebral por sustancias de abuso**

Debido al aumento del consumo de drogas entre la población más joven, la aparición de HIC en menores de 35 años es un problema cada vez más frecuente (Feldmann *et al.*, 2005). Suelen ser drogas con efecto simpaticomimético, estimulantes y alucinógenas (anfetaminas, cocaína, crack, heroína, así como efedrina y fenilpropanolamina, presentes en algunos descongestionantes nasales). Recientemente se han descrito casos de HIC asociada a análogos sintéticos de tetrahidrocannabinol (Rose *et al.*, 2015).

El consumo de alcohol (Zhang *et al.*, 2011) actúa por distintos mecanismos en la producción de HIC: HTA del alcohólico crónico, picos hipertensivos por consumo agudo o por abstinencia, alteración de la coagulación y de la función plaquetaria por afectación hepática y daño endotelial (Fernández-Solà, 2005; Ikram *et al.*, 2012).

## **1.3. Distribución anatómica**

Se estima que aproximadamente el 60% de las HIC se localizan en las regiones profundas de los hemisferios cerebrales (putamen, cápsula interna, caudado y tálamo); un 30% de los hematomas son lobulares y el 10% son infratentoriales (cerebelosos y protuberanciales) (Keep *et al.*, 2012) (Figura 1).



**Figura 1. Localización de las HIC.** (A) Hemorragia intracerebral lobular proveniente de ramas penetrantes corticales de la arteria, cerebral media. (B) Hematoma en ganglios basales originado de ramas ascendentes lenticuloestriadas de la arteria cerebral media. (C) Hemorragia talámica originada de ramas ascendentes tálamogenuculadas de la arteria cerebral posterior. (D) Afectación pontina proveniente de ramas paramedianas de la arteria basilar. (E) Hematoma cerebeloso originado de ramas penetrantes de las arterias cerebelosas (posterior, inferior, anteroinferior o superior) (Qureshi *et al.*, 2001).

Aunque los datos hasta el momento no son concluyentes, sí parece existir una asociación entre la localización de la hemorragia y su etiología. Las hemorragias por HTA suelen ser profundas: putamen (30-50%), sustancia blanca subcortical (30%) y cerebelo (16%). Aquellas producidas por AAC y anticoagulantes suelen ser lobulares (Rodríguez-Yañez *et al.*, 2013; Pezzini *et al.*, 2014). Mientras que la causa más probable de una HIC acompañada de sangre en el espacio subaracnoideo suele ser la rotura de un aneurisma o de una MAV. Las hemorragias cerebrales secundarias a tumores suelen tener un edema perilesional mayor del que cabría esperar por la evolución natural de un hematoma espontáneo y se producen en lugares poco habituales para los hematomas hipertensivos (Rønning *et al.*, 2008; Katz & Segal, 2005).

Adicionalmente, la localización de la hemorragia condiciona el pronóstico y mediatiza la aplicación de tratamientos. Así, las hemorragias pontinas presentan la mayor tasa de mortalidad, mientras que las superficiales son más susceptibles de tratamiento quirúrgico.

#### **1.4. Manifestaciones clínicas**

La presentación clínica de la HIC tiene dos elementos principales: síntomas vinculados a la localización del hematoma y síntomas vinculados al brusco aumento de la presión intracraneal (Qureshi *et al.*, 2001).

La HIC se produce generalmente en vigilia, con la aparición súbita de un déficit neurológico focal que progresa rápidamente en minutos u horas o es máximo desde el inicio.

Las manifestaciones relacionadas con el aumento de la presión intracraneal son cefalea, vómitos y disminución del nivel de conciencia. Durante las primeras 24 horas tras el inicio de los síntomas hasta un 25% de los pacientes presenta disminución del nivel de consciencia debido a la expansión del hematoma. Otro factor implicado en el deterioro del estado neurológico durante las primeras 48 horas tras la hemorragia es el edema cerebral (Keep *et al.*, 2012).

Aquellos pacientes con una HIC supratentorial localizada en putamen, núcleo caudado y tálamo presentarán un déficit sensitivo-motor contralateral cuya severidad variará en función de la afectación o no de la cápsula interna. Los síntomas como afasia, negligencia, hemianopsia y desviación de la mirada pueden ocurrir debido fenómenos de diasquisis córtico-subcortical. Los pacientes con una HIC infratentorial presentarán signos de disfunción de tronco cerebral como trastornos de la mirada, alteraciones en pares craneales y déficit motor contralateral. La ataxia, nistagmo y dismetría son frecuentes cuando existe afectación cerebelosa (Qureshi *et al.*, 2001).



### **1.5. Diagnóstico y manejo**

Hasta ahora no se ha establecido ningún tratamiento médico eficaz, en HIC aguda más allá de la intensificación y coordinación de los cuidados generales en las unidades de ictus y unidades de cuidados intensivos (Xi et al, 2006; Hemphill *et al.*, 2015) y la cirugía ha demostrado ser efectiva sólo en un pequeño porcentaje de casos.

El manejo actual de la HIC incluye el diagnóstico preciso y la predicción de la progresión mediante datos clínicos y de neuroimagen, entre los cuales están: el volumen inicial del hematoma, expansión durante las primeras 24 horas, localización del sangrado, extensión del edema cerebral, edad del paciente y la situación neurológica al ingreso (Qureshi *et al.*, 2001; Senn *et al.*, 2014; Thanvi *et al.*, 2012).

La Tomografía Computarizada (TC) y la RMN permiten identificar la HIC en fase aguda. La TC se considera la técnica de elección por su disponibilidad, menor tiempo de realización y menor coste. Mediante esta prueba se identifica la localización precisa de la hemorragia y la presencia de efecto masa, edema, extensión ventricular y subaracnoidea, lo cual puede dar pistas sobre el diagnóstico etiológico. Además, con la administración de contraste por vía intravenosa se pueden diagnosticar causas secundarias de HIC (Rodríguez-Yañez *et al.*, 2013). La TC además permite realizar el seguimiento de la lesión, ya que en las primeras horas tras la HIC se visualiza un aumento de la densidad en el parénquima cerebral debida a la hemoglobina que contiene la sangre extravasada. En los días siguientes la hemorragia aparece rodeada de un anillo hipodenso, inicialmente debido a la retracción del coágulo, y posteriormente debido a la aparición de edema perihematoma. Al cabo de semanas la densidad elevada inicial de la hemorragia comienza a disminuir, desde la periferia hacia el centro. El estado final de la evolución de la HIC en la TC es la reabsorción completa del tejido hemorrágico, lo que origina una cavidad residual que lo hace indistinguible de un infarto cerebral antiguo. Aproximadamente, en un tercio de los pacientes ocurre el crecimiento del hematoma durante las primeras 24 horas tras la HIC, lo

cual representa un predictor importante de peor pronóstico neurológico (Mracsko & Veltkamp, 2014). El crecimiento del hematoma en la fase aguda se puede cuantificar mediante TC seriadas, en ocasiones alcanza volúmenes de hasta 300% (Demchuk *et al.*, 2012), ocasionando deterioro neurológico y mayor morbi-mortalidad. En la actualidad se pueden emplear técnicas mediante angiografía por TC que permiten detectar un marcador de mayor posibilidad de crecimiento del hematoma en la fase aguda: la extravasación de pequeños focos de contraste (*spot sign*) (Wada *et al.*, 2007), se ha descrito como predictor independiente de la expansión del hematoma (Thompson *et al.*, 2009).

Dado su valor pronóstico durante la fase aguda, resulta de gran utilidad medir el volumen del hematoma. Figura 2.



**Figura 2. Medición del volumen de hematoma.** Se emplea la fórmula:

*Volumen del hematoma = 0,5 x A x B x C, donde A representa el diámetro máximo del hematoma, B la perpendicular de A, y C el número de cortes en los que se visualiza el hematoma multiplicado por el grosor de los cortes sucesivos (Broderick et al., 1993).*

La RMN permite añadir información sobre el momento evolutivo de la HIC. Esta ventaja se debe a las diferentes imágenes que ofrece el catabolismo de la hemoglobina. La secuencia eco de gradiente (T2\*) tiene una alta sensibilidad para la detección de microsangrados. La angiografía por RM (angio-RM) permite la detección de lesiones vasculares asociadas a la HIC.

La arteriografía por sustracción digital puede ser de utilidad cuando existe una alta sospecha de causa secundaria y los estudios no invasivos son negativos.

## **1.6. Características fisiopatológicas de la hemorragia intracerebral**

### **1.6.1. Proceso fisiopatológico**

La HIC ocurre en el parénquima cerebral como consecuencia de la ruptura de pequeñas arterias perforantes procedentes de las arterias cerebrales anterior, media y posterior o basilar. Los cambios degenerativos en las paredes de estos vasos incrementan el riesgo de ruptura, especialmente en la zona adyacente a la bifurcación de las arterias afectadas. Las secciones histológicas se caracterizan por la presencia de edema, daño neuronal e infiltrado de macrófagos y neutrófilos en las zonas perihematoma, como se detallará más adelante. La hemorragia se extiende a través de la sustancia blanca disecando los haces de fibras, aunque ocasionando mínima destrucción, dejando zonas de tejido neuronal intacto dentro del hematoma y en la zona perihematoma. Este patrón de propagación de la HIC indica la existencia de tejido viable y rescatable en la proximidad del hematoma, el cual se resuelve gradualmente en varias semanas dejando una cavidad en la zona donde se produjo.

### **1.6.2. Progresión del hematoma**

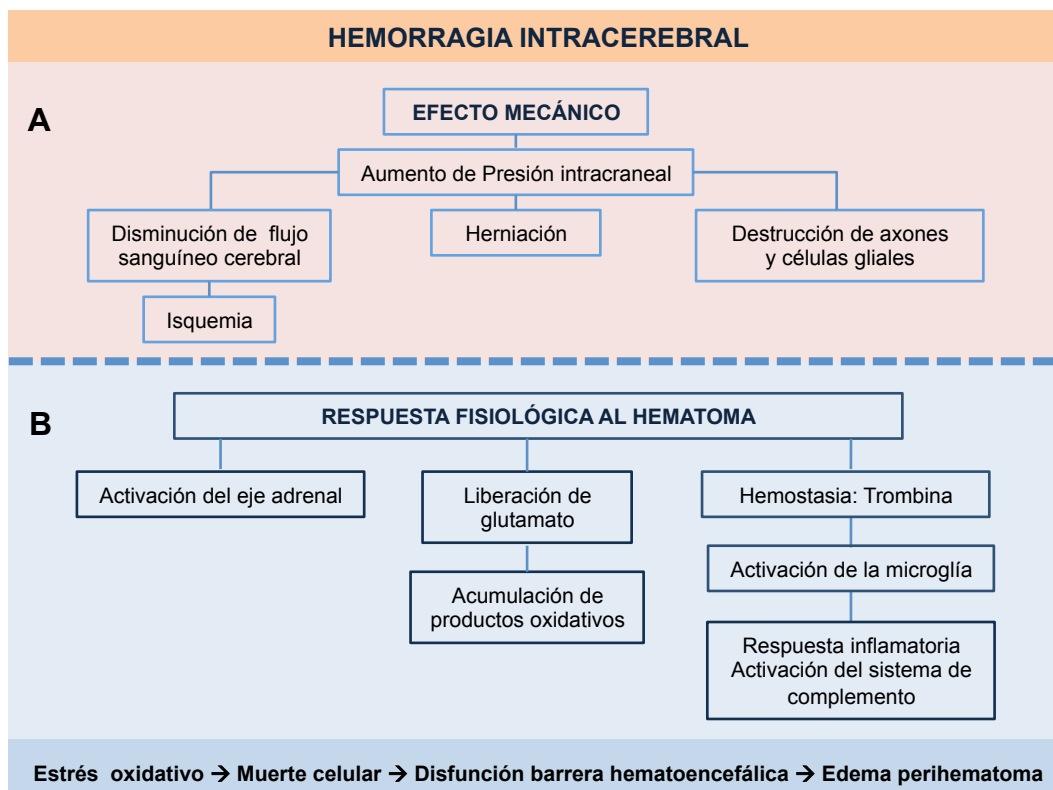
Inicialmente la HIC se consideró como un proceso monofásico que se detenía rápidamente por activación del sistema de coagulación y el taponamiento de las zonas adyacentes. Sin embargo, mediante TC se demostró que la HIC es un proceso evolutivo y que la tendencia del hematoma es a expandirse en las primeras horas tras el sangrado, probablemente debido al sangrado continuo de la fuente primaria y/o a la ruptura mecánica de los vasos circundantes, además de picos agudos de hipertensión arterial o alteraciones de la coagulación (Qureshi *et al.*, 2001).

### **1.6.3. Mecanismos moleculares del daño cerebral**

El análisis de la cascada de daño cerebral tras una HIC es crucial para la identificación de aquellos factores implicados en la patogénesis, constituyendo una

fuente de potenciales dianas terapéuticas y biomarcadores. En este sentido, el empleo de modelos animales y los avances en neuroimagen han implementado el conocimiento de la fisiopatología de la HIC desde el punto de vista molecular (Senn *et al.*, 2014), derivando, además, en un gran número de ensayos clínicos (Keep *et al.*, 2012).

Las teorías actuales sugieren que la lesión neuronal en la HIC se establece en dos fases: primero se produce un efecto mecánico precoz y, posteriormente, una fase subaguda de inflamación, estrés oxidativo y formación de edema, entre otros, en respuesta a la extravasación de sangre, así como la activación simultánea del eje de estrés neuroendocrino (Mracsko and Veltkamp 2014; Senn *et al.*, 2014) (Figura 3).



**Figura 3. Mecanismos moleculares de daño cerebral** Primera fase o efecto mecánico (A) y segunda fase o respuesta fisiológica al hematoma (B).

### **- Primera fase: efecto mecánico**

Durante los primeros 60 minutos después de la lesión, la sangre liberada en el parénquima cerebral produce la compresión anatómica de estructuras cerebrales, aumentando la presión por efecto masa. En los casos de gran volumen extravasado, esto podría incrementar tanto la presión intracraneal que determine fenómenos de herniación cerebral, disminución del flujo sanguíneo y destrucción mecánica directa de los axones y células gliales. Además, en esta primera fase se produce la liberación de componentes del coágulo, como hemoglobina y hierro (Figura. 3A).

### **- Segunda fase: respuesta fisiológica al hematoma**

Durante la hemorragia aguda, rápidamente se produce una respuesta sistémica tras la activación del eje adrenal hipotálamo-hipófisis y del sistema nervioso simpático; además se activan distintos mecanismos locales que pueden agravar la lesión. Así, en la zona del sangrado, se produce liberación de glutamato debido a la ruptura vascular y la necrosis de las neuronas perihematoma, lo cual tiene como efecto la acumulación de subproductos oxidativos, la muerte celular de células vecinas y la formación de edema citotóxico temprano (Senn *et al.*, 2014).

En los primeros dos días tras el sangrado, se activan los mecanismos hemostáticos para limitar la hemorragia. La trombina liberada tiene un papel fundamental en la hemostasia y también ejerce su efecto en la zona de penumbra, creando condiciones neurotóxicas inflamatorias. La trombina, produce la activación de la microglía, liberación de mediadores inflamatorios y fomenta la proliferación de células mesenquimales, así como la formación de tejido cicatrizal. Además, causa disfunción endotelial, aumentando la permeabilidad y provocando la rotura de la barrera hematoencefálica, lo cual puede contribuir a la formación de edema vasogénico tras la HIC (Xi *et al.*, 2003).

La respuesta inflamatoria es de gran relevancia en el daño y la recuperación cerebral tras una HIC. No sólo se activa la microglía, sino que neutrófilos, monocitos, mastocitos y linfocitos migran al cerebro para ejercer su función

proinflamatoria (Mracsko & Veltkamp, 2014). Así, la HIC se ha asociado con el aumento de varios mediadores inflamatorios en el cerebro incluyendo citoquinas como el factor de necrosis tumoral TNF- $\alpha$  e interleucina (IL) 1 $\beta$ , quimiocinas, moléculas de adhesión y metaloproteinasas de la matriz, como la MMP3 y la MMP9. Después de varios días, tras la lisis de los eritrocitos y los componentes del coágulo como parte de respuesta a la trombina, en la zona hemorrágica se liberan hierro, hemoglobina y radicales libres provocando aún más inflamación y la formación de edema tardío (Xi *et al.*, 2006). El último mecanismo que resulta de la inflamación intracerebral y edema tardío es la activación del sistema de complemento, que producirá un daño adicional en las neuronas, glía y vasos sanguíneos de la zona perihematoma y, por tanto, más lisis celular e inflamación (Figura 3B).

Cada vez son más las evidencias que confirman el papel de la apoptosis en la fisiopatología de la HIC. Mediante técnicas inmunohistoquímicas de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyUridine triphosphate-biotin Nick End-Labeling*) y detección de caspasa-3 activa se ha comprobado la existencia de un gran número de células con marcaje y morfología típicamente apoptóticos en modelos experimentales de HIC. De hecho, 24 horas después de inducir el daño, ya se observa un incremento en células TUNEL+, mayoritariamente neuronas, en la zona perihematoma (Matsushita *et al.*, 2000); (Gong *et al.*, 2001). En pacientes con HIC sometidos a cirugía también se ha visto una proporción importante de células apoptóticas TUNEL+ en la región perihematoma (Qureshi *et al.*, 2003). La tinción con TUNEL detecta extremos 3'-OH de DNA resultantes de su fragmentación. Esto podría incluir, a priori, células necróticas, mitóticas o dañadas durante el procesamiento del tejido. Sin embargo, la reducción en el número de células TUNEL+ tras el tratamiento con zVADfmk, un inhibidor de caspasas, indica la participación activa de estas proteasas en la muerte neuronal tras una HIC (Matsushita *et al.*, 2000). Este hecho, junto con los hallazgos morfológicos pone de manifiesto la relevancia de la apoptosis tras un ictus hemorrágico. En teoría, sería una muerte celular más retardada, prominente en la zona perihematoma, donde el efecto mecánico es menos intenso y donde no

se produce la total privación energética, condiciones que encajarían bien con las requeridas por los procesos de muerte celular programada.

## **2. FENÓMENOS DE REPARACIÓN CEREBRAL**

Inmediatamente después de un ictus se activan mecanismos de reparación que median la resolución del edema o la inflamación. Asimismo, se desencadena una respuesta regenerativa que incluye, entre otros, la proliferación de células progenitoras neurales endógenas, un aumento en la neurogénesis y un incremento de la neovascularización. Parece que angiogénesis y oligodendrogénesis también participan en la recuperación de la función neuronal a largo plazo (Ma *et al.*, 2015). Todo ello estaría mostrando plasticidad cerebral, en contraposición con las teorías más clásicas que negaban la capacidad regenerativa del cerebro. La activación de procesos de remodelado y plasticidad neurovascular endógena tras un ictus plantean su posible participación en la recuperación funcional de los pacientes.

En las últimas décadas se ha demostrado la capacidad que tienen determinadas células progenitoras derivadas de la médula ósea para movilizarse a la sangre periférica y migrar a un área cerebral lesionada para promover su reparación (Borlongan, 2011). Este hecho, que será discutido en profundidad más adelante, ofrece un nuevo enfoque en la terapia regenerativa.

### **2.1. Evidencias de neovascularización en el cerebro adulto**

Aunque el sistema vascular del cerebro adulto es extremadamente estable en condiciones normales, se activa en respuesta a situaciones de daño, tales como el daño isquémico (Beck & Plate, 2009). La neovascularización tras un ictus es una respuesta compensatoria esencial que media la reparación cerebral al estimular el flujo sanguíneo y el metabolismo en la zona dañada (Quaegebeur *et al.*, 2011). La generación de nuevos vasos sanguíneos estimula otros procesos de remodelación cerebral como la neurogénesis, la sinaptogénesis y la plasticidad sináptica (Ergul

*et al.*, 2012). Estos procesos están involucrados en la neuroreparación a largo plazo tras un evento isquémico.

El restablecimiento de la circulación cerebral tras un evento cerebrovascular implica entre otros procesos la formación de nuevos vasos sanguíneos (Krupinski, 1994; Hayashi *et al.*, 2003). La correlación entre vascularización y buen pronóstico funcional tras un evento cerebrovascular isquémico o hemorrágico se ha observado tanto en modelos experimentales como en pacientes (Ergul *et al.*, 2012). Tras un ictus, los pacientes con mayor densidad de vasos sanguíneos tienen mejor pronóstico funcional y mayor supervivencia (Arenillas *et al.*, 2007; Navarro-Sobrino *et al.*, 2011).

Es probable que el "estado proangiogénico," inducido en respuesta a un evento isquémico, tenga múltiples efectos desde las primeras horas hasta semanas después de la lesión (Ergul *et al.*, 2012). En primer lugar, la expresión de factores de crecimiento puede promover la supervivencia de células endoteliales, gliales y algunos tipos neuronales en el área de penumbra. En segundo lugar, la neovascularización puede participar en la eliminación del tejido dañado, actuando como un mecanismo de "limpieza" (Manoonkitiwongsa *et al.*, 2001). Finalmente, puede crear un "nicho neurovascular" en el cual se generen progenitores neurales y a través del cual puedan migrar hacia zonas peri-lesión donde se diferencian a neuronas o células de la glía (Ohab & Carmichael, 2008). Esto promueve el acoplamiento entre angiogénesis y neurogénesis con el establecimiento de neuroblastos en la periferia del infarto y la colocalización con pequeños vasos sanguíneos en áreas con remodelación vascular activa (Ohab *et al.*, 2006).

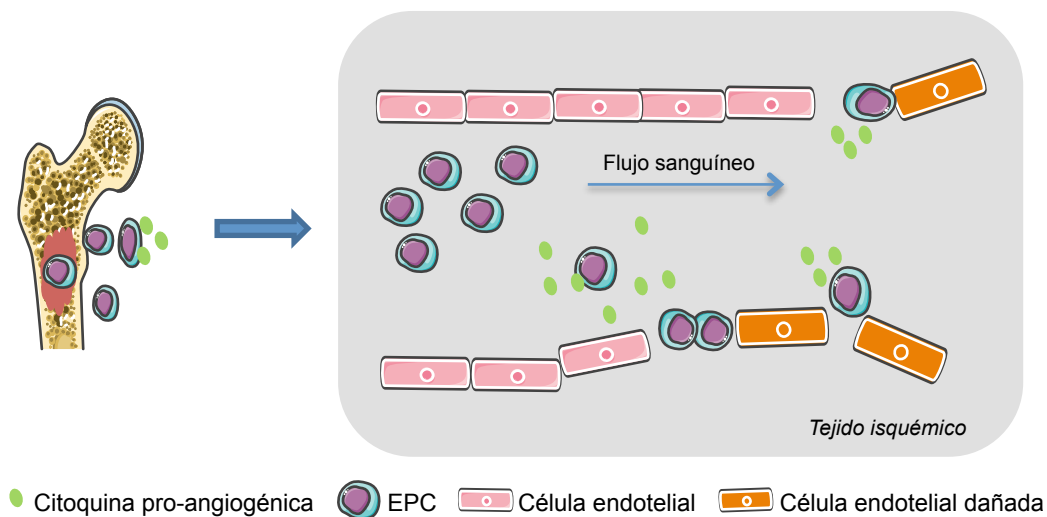
Clásicamente se pensaba que la formación de nuevos vasos sanguíneos estaba mediada exclusivamente por la formación de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes (Beck & Plate, 2009). Sin embargo, este dogma fue cuestionado por el descubrimiento de células progenitoras derivadas de médula ósea circulantes en sangre de adulto, que presentaban características endoteliales y se vio podían contribuir a los mecanismos de homeostasis y reparación vascular (Asahara, 1997).



### 3. CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES E ICTUS

Las células progenitoras endoteliales (en adelante EPCs, *Endothelial Progenitor Cells*) son células endoteliales inmaduras, que pueden encontrarse circulantes en sangre periférica y contribuyen a la reparación vascular tras un evento isquémico (Asahara *et al.*, 1997; Asahara & Kawamoto, 2004). Las EPCs pueden diferenciarse a células endoteliales y ser incorporadas en sitios de neovascularización para la reparación postnatal del sistema vascular. Este hecho avala el papel actual de las EPCs como un modelo para la regeneración endotelial y reparación de vasos sanguíneos tras enfermedades cerebrovasculares (Borlongan, 2011).

Se ha demostrado que las EPCs se movilizan desde la médula ósea después de una lesión vascular y migran al sitio de neovascularización. Allí contribuyen a la regeneración vascular y, por tanto, a la recuperación cerebral (i) mediante su incorporación directa en las estructuras que se están formando o (ii) indirectamente mediante un efecto paracrino secretando factores de crecimiento y citoquinas proangiogénicas (Asahara *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2002; Taguchi *et al.*, 2004) (Figura 4).



**Figura 4. Reparación del endotelio vascular mediada por EPCs tras una isquemia.** Después de una lesión vascular las células progenitoras endoteliales migran desde la médula ósea al tejido isquémico, donde participan en fenómenos de reparación mediante incorporación directa al sitio de neovascularización o liberando sustancias proangiogénicas.

Las EPCs se aislaron por primera vez de la fracción mononuclear de sangre periférica (Asahara *et al.*, 1997). El cultivo celular y la citometría de flujo son los métodos más empleados para aislar y determinar las EPCs (Fadini *et al.*, 2012). No existe un marcador único bien definido y específico para estas células, sino que se definen en función de marcadores “stem” y endoteliales. Una definición actual y ampliamente aceptada es que estas células co-expresan marcadores de superficie celular CD34<sup>+</sup>, CD133 y el receptor de VEGF-2 (VEGFR-2), también llamado KDR (*Kinase insert Domain Receptor*) (Liman & Endres, 2012), aunque aún existe controversia en este sentido (Ma *et al.*, 2015).

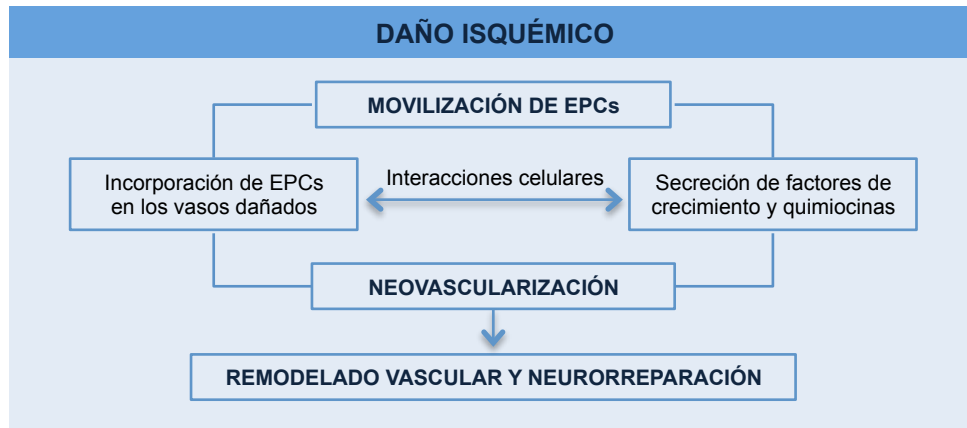
El primer estudio de movilización de EPCs en respuesta a un daño cerebral de tipo isquémico data de 1999 (Takahashi *et al.*, 1999). Desde entonces, cada vez son más las evidencias que apoyan el papel de las EPCs tras un ictus: manteniendo la integridad endotelial al ser incorporadas en los vasos en formación (Carmeliet, 2003) e incluso mejorando la función cerebrovascular (Taguchi *et al.*, 2004). Tras una lesión, el tejido dañado induce la movilización de las EPCs desde la médula ósea y produce una variedad de citoquinas que las dirigen a la zona del daño para la revascularización y la reparación tisular (Reinisch *et al.*, 2009) (Navarro-Sobrino *et al.*, 2010). Diversos estudios han demostrado el papel de los receptores de quimiocinas C-X-C, en concreto el eje CXCR4/SDF-1, en la neovascularización mediada por EPCs (Mao *et al.*, 2014), así como el potencial terapéutico de las EPCs en el tratamiento de enfermedades isquémicas en modelos experimentales (Ma *et al.*, 2015).

En isquemia cerebral, Ohta y colaboradores (Ohta *et al.*, 2006) demostraron por primera vez que el trasplante autólogo intra-arterial de EPCs derivadas de médula ósea después de 90 minutos de isquemia reduce el volumen de infarto y mejora la función motora. Posteriormente, en un modelo de oclusión transitoria de la arteria cerebral media en ratón, se demostró una vez más que la administración intravenosa aguda de EPCs humanas se asocia con la reducción en el volumen del infarto y en la atrofia cerebral, la reducción a largo plazo de déficits neurológicos, y el aumento en la densidad de vasos sanguíneos cerebrales (Fan

*et al.*, 2010). Más recientemente, se vio que la administración de EPCs humanas también mejora la función neurológica en un modelo de isquemia-reperfusión en rata. En este caso, observaron una recuperación ligada a un aumento en la angiogénesis, disminución de la apoptosis en áreas periinfarto y aumento de la neurogénesis en la zona subventricular (Moubarik *et al.*, 2011).

La movilización de EPCs podría representar una potente estrategia terapéutica en pacientes con enfermedades vasculares isquémicas (Takahashi *et al.*, 1999; Boy *et al.*, 2011). De hecho, existen evidencias que confieren a las EPCs circulantes un valor pronóstico en la predicción del estado funcional de pacientes tras un ictus isquémico (Sobrino *et al.*, 2007; Yip *et al.*, 2008; Bogoslovsky *et al.*, 2010) y una HIC (Sobrino *et al.*, 2011). Mediante un estudio prospectivo, incluyendo una cohorte de 32 pacientes con HIC, se demostró que los niveles de células progenitoras CD34<sup>+</sup> determinados mediante citometría de flujo al día 7 tras la HIC se asocian de forma independiente con buen pronóstico funcional a los 3 meses. Además, este efecto se acompañaba de un menor volumen de lesión residual también a los 3 meses. Por lo tanto se podría considerar la mediación de las EPCs en procesos de neuroreparación crónica y se confirma la asociación de un incremento de EPCs al séptimo día tras una HIC con un mejor pronóstico funcional de los pacientes (Sobrino *et al.*, 2011). Por el contrario, niveles reducidos de EPCs circulantes se han asociado con varios factores de riesgo cardiovascular como diabetes, hipercolesterolemia, hipertensión arterial, hábito tabáquico, enfermedad coronaria (Borlongan, 2011) y con factores pronósticos tras un ictus como la edad, enfermedades cardíacas, severidad del ictus, hipertensión arterial, glucemia (Sobrino *et al.*, 2007).

En resumen, las EPCs contribuyen a la neuroreparación tras un ictus participando activamente en el remodelado vascular o bien a través de un efecto paracrino, secretando factores de crecimiento y otras citoquinas (Figura 5). Sin embargo, queda por determinar su papel como herramienta capaz de promover la neuroreparación crónica tras una HIC.



**Figura 5. Resumen de las principales funciones de las EPCs tras un daño isquémico.** La movilización de EPCs tras el daño isquémico participa en la neovascularización y de esta forma contribuye al remodelado vascular y neurorreparación.

#### **4. MOVILIZACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES MEDIADA POR FACTORES PROANGIOGÉNICOS**

En el adulto la mayoría de EPCs residen en la médula ósea. Sin embargo, existe una gran variedad de factores de crecimiento, enzimas y receptores de membrana implicados en diversas vías de señalización (Greenberg & Jin, 2005) que participan en la movilización de EPCs a la circulación periférica, su reclutamiento e incorporación a las áreas de neovascularización (Asahara *et al.*, 1999; Hattori *et al.*, 2001; Sobrino *et al.*, 2009).

La capacidad de estos compuestos de inducir la movilización de EPCs y promover la neovascularización se ha demostrado en varios modelos experimentales de isquemia (Yamaguchi *et al.*, 2003). Se ha visto una asociación entre los niveles de factores de crecimiento y EPCs, así como una relación entre los niveles de EPCs circulantes y la gravedad del ictus (Bogoslovsky *et al.*, 2010), confiriendo a estas medidas un valor pronóstico en la recuperación tras el daño.

Entre las moléculas que median el proceso de movilización se incluyen, el SDF-1 $\alpha$  (*Stromal-derived factor*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), G-CSF (*Granulocyte-Colony-Stimulating Factor*), SCF (*Stem Cell Factor*), interleuquinas IL-6 y IL10, o la óxido nítrico sintasa endothelial (eNOS) (Bogoslovsky *et al.*, 2011).

Por su relevancia en el presente trabajo, los dos primeros serán descritos más detalladamente en el siguiente apartado.

#### **4.1. Factor derivado de estroma-1 $\alpha$ (SDF-1 $\alpha$ )**

Los procesos de movilización y migración de EPCs están influenciados por varias vías de transducción de señales. Uno de ellos requiere de la unión del ligando SDF-1 $\alpha$  (también conocido como CXCL12) a su receptor CXCR4 (C-X-C *Chemokine Receptor type 4*) (Yamaguchi *et al.*, 2003). La mayoría de EPCs expresan dicho receptor, aunque tras un ictus isquémico la expresión de CXCR4 aumenta en respuesta a la sobreproducción de SDF-1 en el cerebro dañado. Se sabe que SDF-1 $\alpha$  responde a condiciones de hipoxia y, de hecho, su síntesis está regulada por HIF-1 o factor inducible por hipoxia (Dar *et al.*, 2005), lo que demuestra su participación en respuesta a un ictus. De hecho, esta quimiocina es esencial para la movilización y reclutamiento de EPCs desde la médula ósea a los tejidos isquémicos, como se ha demostrado en estudios experimentales (Yamaguchi *et al.*, 2003) y clínicos (Paczkowska *et al.*, 2009).

Además de ser uno de los reguladores clave del tráfico de EPCs desde la médula ósea a la circulación, SDF-1 $\alpha$  juega un papel importante en la reparación cerebral a través de la activación de su receptor CXCR4 en otras células del sistema nervioso central (neuronas, microglía, endotelio, y astrocitos), predominantemente en epéndimo, corteza, hipocampo y cerebelo (Bogoslovsky *et al.*, 2011). SDF-1 $\alpha$  también parece ejercer un efecto directo en la neovascularización, como se vio en un modelo experimental de isquemia de extremidad posterior (Yamaguchi *et al.*, 2003). En este caso, la administración local de SDF-1 $\alpha$  incrementó la eficacia del trasplante de EPCs, ya que se producía una mayor acumulación de progenitores en la zona dañada, y mejoraba la revascularización del tejido isquémico.

Niveles elevados de SDF-1 $\alpha$  en la fase aguda del ictus también se asocian con un menor volumen de lesión y mejor pronóstico funcional. Por el contrario, niveles

más bajos se relacionan con necrosis neuronal, muerte de astrocitos y disfunción del endotelio vascular (Bogoslovsky *et al.*, 2011).

En el cerebro, el eje SDF-1 $\alpha$ /CXCR4 coopera con otros factores de crecimiento, como es el VEGF/VEGFR, para aumentar el reclutamiento de EPCs en regiones isquémicas y mejorar la neovascularización en la fase subaguda del ictus (Bogoslovsky *et al.*, 2011).

#### **4.2. Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)**

El VEGF es el principal mediador de la angiogénesis cerebral (Kanzler *et al.*, 2013). Además, posee efectos neurotróficos y neuroprotectores, ya que inhibe la apoptosis y disminuye el estrés oxidativo (Greenberg & Jin, 2013). Por su relación con el aprendizaje y la plasticidad sináptica, la administración de VEGF se ha considerado una potencial estrategia terapéutica en ictus (Dzietko *et al.*, 2013). En modelos experimentales de isquemia cerebral se ha demostrado que la administración exógena tardía de VEGF mejora la recuperación funcional (Rosell *et al.*, 2013). Adicionalmente el VEGF participa en la movilización de las EPCs al sitio de neovascularización a través de un efecto quimiotáctico, aumenta la permeabilidad vascular y modula la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio (Asahara *et al.*, 1999).

La unión de VEGF a sus receptores en la superficie de las células endoteliales activa los dominios tirosina quinasa intracelulares que desencadenan múltiples señales para promover la angiogénesis (Beck & Plate, 2009). Aunque existen múltiples variantes de VEGF y su receptor, los efectos angiogénicos están mediados principalmente a través de la interacción de VEGF-A (la variante más común, denominada también VEGF) con su receptor VEGFR-2 (receptor 2 de VEGF también conocido como Flk-1 o KDR). VEGF se induce por hipoxia a través del factor de transcripción HIF-1 (Greenberg & Jin, 2005). El receptor VEGFR2 también estaría involucrado en fenómenos de proliferación endotelial y se ha visto que su expresión aumenta tras un proceso isquémico. De hecho, se ha descrito su inducción en células de la glia y células endoteliales de un modelo de rata

(Lenmyr F et al, 1998), así como en neuronas y endotelio de ratón tras una isquemia experimental (Beck & Plate, 2009).

Por tanto, la isquemia también estimula la expresión de VEGF y sus receptores en la zona de penumbra isquémica. Y este incremento de los niveles de VEGF/VEGFR durante las primeras 24 horas tras un ictus se relaciona con buen pronóstico funcional y menor volumen de lesión en caso de HIC (Sobrinho *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010).

### **4.3. Angiopoyetina 1 (Ang-1)**

La angiopoyetina 1 pertenece a una familia de factores de crecimiento endotelial, funciona como ligando para el receptor tirosina kinasa, Tie-2, específico de endotelio. El sistema Ang-1/Tie-2 juega un papel crucial en la interacción recíproca entre el endotelio y la matriz extracelular (Suri *et al.*, 1996) y promueve la maduración y estabilización de los vasos sanguíneos (Zhou *et al.*, 2008). Se ha visto que en el sistema nervioso central el sistema Ang-1/Tie-2 están involucrados en varios trastornos, desde malformaciones vasculares y tumores cerebrales hasta isquemia cerebral (Zhang *et al.*, 2002; Harrigan, 2003). En modelos animales se ha descrito que la expresión de Ang-1/Tie-2 aumenta tras una HIC (Zhou *et al.*, 2008), y parece que el receptor Tie-2 es necesario para la estabilización y maduración de vasos recién formados tras la HIC.

Mediante experimentos *in vitro* se ha demostrado que Ang-1 tiene efectos específicos en las células endoteliales, induciendo respuesta quimiotáctica (Witzenbichler *et al.*, 1998), controlando la angiogénesis (Koblizek *et al.*, 1998), formación de capilares y supervivencia frente apoptosis (Kwak *et al.*, 1999). También se ha descrito que participa en el reclutamiento de células mesenquimales peri-endoteliales a los vasos sanguíneos (Suri *et al.*, 1996).

## **5. VARIABILIDAD GENÉTICA Y RECUPERACIÓN FUNCIONAL TRAS LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL. PAPEL PRONÓSTICO DEL POLIMORFISMO Arg72Pro DE Tp53**

El análisis de los mecanismos de muerte neuronal y reparación cerebral tras una HIC resulta interesante desde la perspectiva genética. La variación genética interindividual puede influir en la vulnerabilidad de un paciente al daño y explicar por qué pacientes con HIC de similar tamaño y localización tienen diferente pronóstico funcional (Xi *et al.*, 2006). Se han descrito polimorfismos de un único nucleótido (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*) en el DNA cromosómico que median los procesos de muerte y supervivencia neuronal, afectan la respuesta a diferentes terapias y, por tanto, estarían implicados en la recuperación de los pacientes. Aunque faltan estudios sobre las posibles consecuencias de esta variabilidad genética en el pronóstico funcional tras una HIC (Lindgren, 2014), sí se conoce que uno de los mecanismos implicados en la muerte neuronal tras un ictus es la apoptosis. Se ha descrito que la presencia de neuronas apoptóticas en el área perihematoma puede explicar el deterioro clínico de los pacientes tras una HIC. Por lo tanto, la predicción del pronóstico funcional tras un ictus puede estar relacionada con la susceptibilidad genética a la apoptosis (Almeida, 2013).

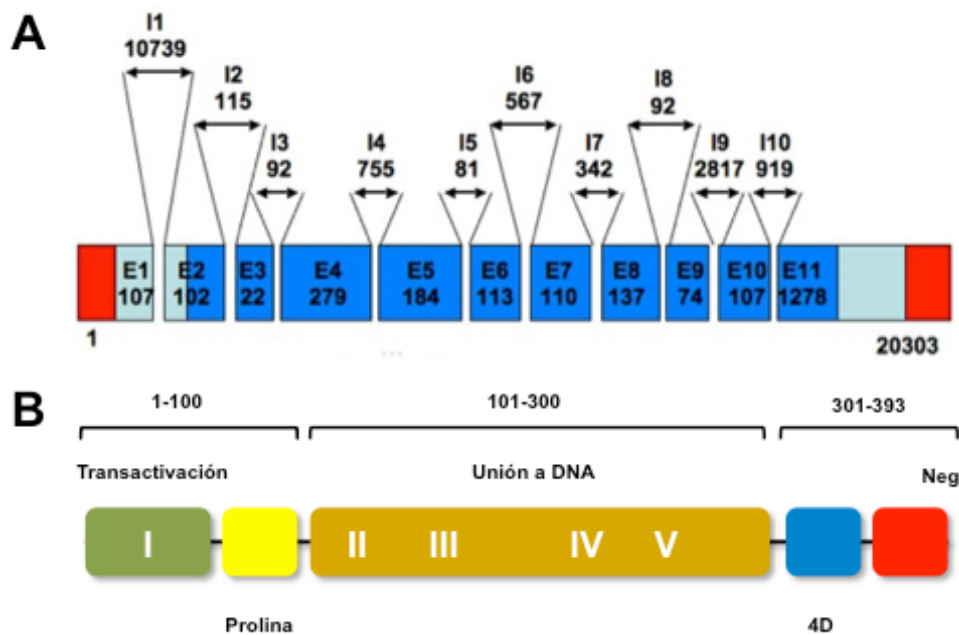
En este contexto, se ha descrito que la proteína p53 media la apoptosis neuronal inducida por daño en el DNA, hipoxia, falta de nutrientes, hipoglucemia o estrés oxidativo. Así, p53 estaría implicada en la muerte neuronal que ocurre en la enfermedad de Alzheimer, Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica traumatismo cerebral, y también tras un ictus (Culmsee & Mattson, 2005).

Bajo condiciones de estrés, p53 se estabiliza y se activa. Este hecho desencadena la apoptosis mediante activación transcripcional de genes pro-apoptóticos o por mecanismos independientes de esta vía. Por un lado, p53 puede mediar la apoptosis induciendo la expresión de Bax y otras proteínas pro-apoptóticas que actúan en la mitocondria (Toshiyuki & Reed, 1995). Pero también puede actuar a través de un mecanismo no transcripcional mediante su traslocación a la mitocondria e interacción directa con otras proteínas, como puede ser Bcl-2 o Bcl-



xL, que finalmente causan liberación de citocromo c y muerte celular (Sax *et al.*, 2002).

Se han descrito polimorfismos en el gen *Tp53*, la mayoría en regiones no codificantes. Pero hasta ahora, el polimorfismo del codón 72 en el exón 4 (*Arg72Pro*, rs1042522) es el único que se ha asociado con apoptosis. Este polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53*, que es específico de humanos, se localiza en una región que codifica para un dominio rico en prolina en la proteína p53, que es importante precisamente por su papel en apoptosis (Sakamuro *et al.*, 1997). En esa posición el gen contiene bien CCC, que codifica un residuo de prolina y da lugar a la variante “Pro”, o bien CGC, que codifica una arginina, sintetizándose la variante “Arg” de p53 (Pietsch *et al.*, 2006). (Figura 6)



**Figura 6. Organización del gen *Tp53* (A) y dominios de la proteína (B).** La longitud de los exones (E) e intrones (I) se expresa en pares de bases. La transcripción comienza en el exón 2. En amarillo se identifica el dominio rico en prolina de p53, donde se produce el cambio *Pro>Arg* motivado por el polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53*.

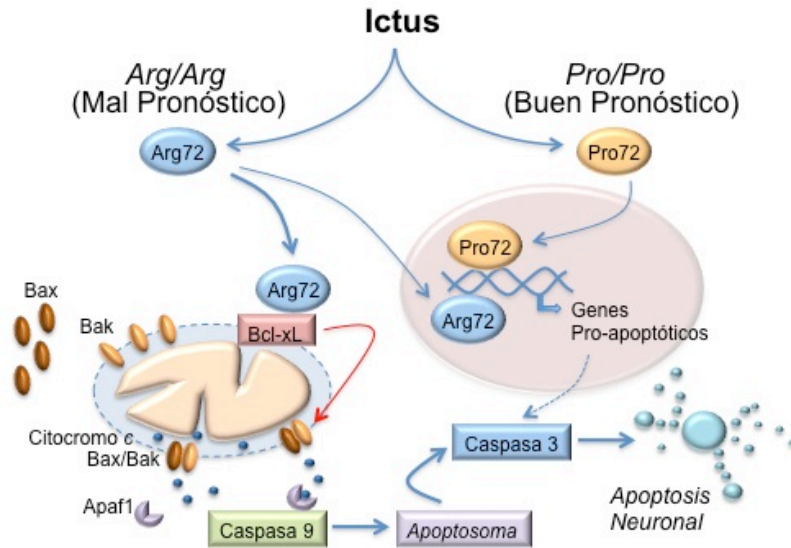
Se ha demostrado que existen diferencias funcionales en la proteína que son dependientes de esa variación génica. De hecho, la variante Arg de p53 es más eficiente a la hora de inducir apoptosis que la variante Pro. Esta mayor actividad

apoptótica se basa en su capacidad para ser transportada a la mitocondria e inducir apoptosis con la activación de caspasas, independientemente de sus efectos transcripcionales (Almeida, 2013; Gómez-Sánchez *et al.*, 2011).

Recientemente, se demostró que el polimorfismo *Tp53 Arg72Pro* modula el pronóstico funcional de pacientes con ictus isquémico y hemorrágico (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011). El ser portador del genotipo *Arg/Arg* se asoció con mal pronóstico funcional a los 3 meses. Además, el genotipo *Arg/Arg* se asoció con deterioro neurológico precoz en pacientes con ictus isquémico y con mayor volumen residual de la lesión en pacientes con HIC (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011).

En este mismo estudio se demostró también en cultivo primario de neuronas sometido a un protocolo de isquemia experimental, que la variante *Arg*, pero no *Pro*, se trasloca a la mitocondria donde interactúa directamente con Bcl-xL y activa la vía intrínseca de apoptosis. Es decir, se produce una liberación de citocromo c que promueve la activación de la caspasa 9, formación de apoptosoma y apoptosis neuronal (Figura 7), lo que fomenta la vulnerabilidad a la muerte celular por apoptosis inducida por isquemia.

Estos resultados demuestran que el genotipo *Arg/Arg* del gen *Tp53* estaría modulando la vulnerabilidad neuronal a la apoptosis, por lo que puede considerarse un marcador genético para predecir mal pronóstico funcional tras un ictus (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011).



**Figura 7. El polimorfismo Arg72Pro de Tp53 modula la susceptibilidad neuronal a la apoptosis inducida por isquemia.** El genotipo Arg/Arg se asocia con mal pronóstico después de un ictus isquémico o hemorrágico. Ambas variantes polimórficas de p53 presentan idéntica actividad transcripcional para activar genes proapoptóticos dependientes de p53. Sin embargo, sólo la variante Arg se trasloca a la mitocondria, donde se une a Bcl-xL y lo inactiva, induciendo la permeabilización de la membrana mitocondrial externa. Esto produce la salida de citocromo c de la mitocondria al citosol promoviendo la activación de las caspasas 9 y 3, lo que conlleva a la apoptosis neuronal (Modificado de Almeida, 2013).



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## HIPÓTESIS

La neovascularización en el tejido dañado representa un importante mecanismo compensatorio de reparación cerebral tras la hemorragia intracerebral. Durante la fase aguda del ictus, se liberan factores de crecimiento y citoquinas que promueven la movilización de las células precursoras endoteliales desde la médula ósea y su migración al tejido vascular dañado, en el que contribuyen a la neovascularización y, por tanto, a la reparación cerebral. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que el polimorfismo *Arg72Pro* del gen humano *Tp53* regula la susceptibilidad de las neuronas a la apoptosis causada por la isquemia y condiciona el pronóstico funcional de pacientes de ictus. Por ello, pensamos que este polimorfismo también podría regular la supervivencia de las células endoteliales del cerebro y, con ello, la capacidad de reparación del tejido vascular dañado. De este modo el polimorfismo *Arg72Pro de Tp53* condicionaría no solo el daño cerebral, sino también la capacidad de reparación del tejido dañado, ambos procesos esenciales para la recuperación funcional de los pacientes de ictus hemorrágico





## OBJETIVOS

A la vista de los antecedentes descritos en el apartado de introducción y la hipótesis, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. *Corroborar la función del polimorfismo Arg72Pro de p53 en el pronóstico funcional de pacientes de ictus hemorrágico.*
2. *Estudiar el efecto del polimorfismo Arg72Pro de p53 sobre los niveles circulantes de las células precursoras endoteliales y su impacto en el pronóstico funcional de pacientes de ictus hemorrágico.*
3. *Investigar los mecanismos moleculares que median la función del polimorfismo Arg72Pro de p53 en la reparación cerebral tras la isquemia en ratones knock-in de las variantes polimórficas humanas de p53.*



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **1. ESTUDIO CLÍNICO**

Se ha realizado un estudio prospectivo observacional en pacientes con hemorragia intracerebral (HIC) ingresados en el Hospital Universitario de Santiago de Compostela entre marzo de 2011 y febrero de 2013. Dicho estudio se enmarca en el contexto de colaboración propiciado por la Red de Investigación Cooperativa Neurovascular (INVICTUS), integrada por 22 grupos de diferentes comunidades del Estado y financiada por el Instituto de Salud Carlos III.

### **1.1. Población de pacientes**

Se reclutó una cohorte hospitalaria de pacientes ingresados por HIC en el Hospital Universitario de Santiago de Compostela

Los datos correspondientes a los pacientes se recogieron de forma prospectiva y se incluyeron 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. Se recogió información sobre 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 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.

Se excluyeron 4 pacientes con incapacidad funcional previa (Rankin modificado, Rankin-m > 2), 3 con enfermedades inflamatorias crónicas, 5 pacientes con enfermedad sistémica grave (hepática y renal), 2 con cáncer y uno con enfermedad infecciosa los 15 días previos a la inclusión. Tres pacientes rehusaron participar. Al final, se incluyeron en la cohorte un total de 78 pacientes.

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca 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, 2011).

Los grupos etiológicos para las HIC fueron: Hipertensivas, por Angiopatía Amiloide, por Anticoagulación e Indeterminada. En cuanto a los grupos topográficos se clasificaron en: Profundas, Lobulares, Cerebelosas, del Tronco Encéfalo y Primariamente intraventriculares.

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

El volumen la hemorragia cerebral se determinó mediante estudios 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. El TC se practicó al ingreso, entre las 48 y 72 horas del mismo y un tercer estudio a los 6 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 2) (Wolfe *et al.*,1991). Se categorizó considerando mal pronóstico aquellos con puntuaciones  $> 2$  (buen pronóstico si la puntuación fue de 2 o inferior).

---

**Tabla 2. Escala de Rankin modificada (Rankin-m).**

---

<b>Puntuación</b>	<b>Grado de discapacidad</b>	<b>Características</b>
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	

---

Modificado de Banks & Marotta, 2007.

Para los análisis secundarios se valoraron, además de la variable principal, la situación funcional a los 12 meses, el volumen del edema perihematoma y el volumen de la lesión residual final en el 3er TC.

### **1.3. Genotipado del polimorfismo Arg72Pro de *Tp53***

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 Arg72Pro del gen *Tp53* se realizó mediante amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de un fragmento de 291 pares de bases del exón 4 (Lazar *et al.*, 1993). Para ello se utilizaron los siguientes oligonucleótidos cebadores:

Oligonucleótido sentido: 5'-TCTACAGTCCCCCTTGCCGT-3'

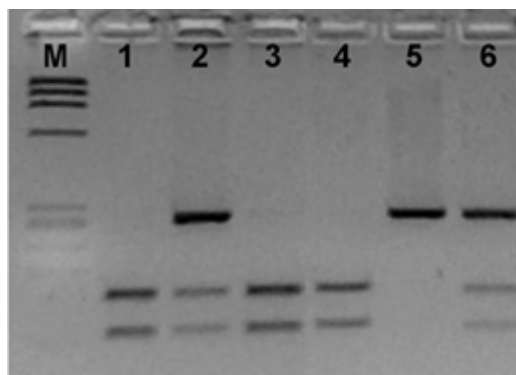
Oligonucleótido anti-sentido: 5'-CTGACCGTGCAAGTCACAGA-3'

Las muestras de DNA procedente de la sangre de los pacientes se amplificaron en un termociclador automático (Mastercycler Pro, Eppendorf Ibérica). Las PCRs se realizaron en un volumen final de 12  $\mu$ L que contenían 150 ng de DNA genómico, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 200  $\mu$ M, 10 pmol de cada oligonucleótido cebador (sentido y anti-sentido) y 0,3 U de la Taq polymerase (Promega®, Promega Biotech Ibérica). Las condiciones experimentales de las PCRs fueron 1 x (95°C, 5 min), 35 x (95°C, 30 seg; 62°C 30 seg; 72°C, 30 seg), 1 x (72°C, 10 min).

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. El producto de la PCR fue digerido con la enzima de restricción BstUI (Bsh1236I, Fermentas Life Sciences) que reconoce el sitio de corte generado en la secuencia por el cambio de **C**itosina a **G**uanina. Los fragmentos generados tras la digestión a 37°C se separaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 3% (Gibco BRL Life Technologies), para identificar tres genotipos (Figura 8). La electroforesis se llevó a cabo en tampón TAE 1X (TrisAcetate 0.04 M, EDTA 1,0 mM, pH 8,3) a 120 voltios, durante 30 minutos. Como marcador del peso molecular se utilizó DNA del fago  $\Phi$ X-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 de DNA amplificados se visualizaron en el gel de agarosa utilizando Midori Green Advance (5  $\mu$ g/ml) (Nippon Genetics Europe GmbH), que emite fluorescencia al ser expuesto a la luz UV (254 nm). Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un sistema de fotografía digital (Gel Imager system, Bio-Rad) acoplado a un programa informático de tratamiento de imagen.

El genotipado fue realizado por personas que no conocían la situación clínica de los pacientes.





**Figura 8. Genotipado de muestras humanas.** Electroforesis en gel de agarosa al 3% de los fragmentos amplificados por PCR del codón 72 de *Tp53* y digeridos con *Bst*UI. Las calles 1, 3 y 4 corresponden a pacientes homocigotos Arg/Arg (fragmentos de 165 y 126 pares de bases, pb); la calle 5 a un paciente homocigoto Pro/Pro (291 pb); y las calles 2 y 6 a pacientes heterocigotos Arg/Pro (291, 165 y 126 pb). M: marcador de peso molecular.

## 2. ESTUDIO EXPERIMENTAL

### 2.1. Modelo experimental de hemorragia intracerebral

Para llevar a cabo el estudio comparativo entre las variantes polimórficas de p53 (Arg y Pro), se utilizó un modelo de ratón humanizado *knock-in* para el polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* (KI p53) que fue donado amablemente por el profesor D.G. Johnson (Universidad de Texas MD Anderson Cancer Center, Smithville, Texas, USA) (Zhu *et al.*, 2010). Los animales se alimentaron en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la Universidad de Salamanca, de acuerdo con la legislación Española (RD 53/2013). Los protocolos fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca.

La HIC experimental se realizó en ratones de 12 semanas mediante la inyección de colagenasa bacteriana VII de *Clostridium histolyticum* (Sigma) en los ganglios basales (Clark *et al.*, 1998). Los animales se anestesiaron con sevofluorano (al 4% para inducción y al 3% para mantenimiento) evaporado en una mezcla de oxígeno-aire (30 al 70%) y posteriormente se colocaron en un marco estereotáxico (modelo nº 1900, Kopf®) para posicionar al animal utilizando un sistema digital de lectura

de coordenadas (Wizard 550 Readouts, Anilam). Una vez desinfectada el área quirúrgica, se practicó una incisión de 1 cm en el cuero cabelludo (línea media). Se perforó el cráneo con un trépano (modelo n°. 1911, Kopf®) y una broca de 0,75 mm, en las coordenadas: 0,9 mm anterior y +2,0 mm lateral al bregma. Posteriormente se colocó en una bomba de inyección una jeringa Hamilton (Hamilton, 5 µL) con colagenasa tipo VII de *Clostridium histolyticum* (purificada mediante cromatografía, Sigma) disuelta en solución salina (0,2 U/µL). Una vez fijada la posición de origen (con ejes X, Y y Z en 0.0) sobre *bregma*, la aguja se recolocó en las coordenadas de entrada (+0.9, +2.0), insertando la misma lentamente en el estriado a una profundidad de 3,5 mm bajo la superficie del cráneo, para inyectar un volumen de 0,5 µL de colagenasa a razón de 0.1 µL/min durante 5 minutos. Se dejó la aguja en la misma posición durante 10 minutos adicionales y luego se sacó lentamente a razón de 1 mm/min para prevenir el reflujo de colagenasa y sangre. El agujero fue sellado con cera de hueso (Ethicon) y la incisión fue suturada. Durante el procedimiento, se monitorizó la temperatura rectal (BAT-12 thermometer, Physitemp) y se mantuvo en  $37 \pm 0.5$  °C. Después de la cirugía, los animales se ubicaron en un ambiente cálido para su recuperación. El volumen de la lesión se calculó a partir de secciones de los cerebros de los ratones, mediante la técnica de tinción de Nissl a las 6 horas, 1, 7 y 14 días después de la inyección de colagenasa.

## **2.2. Análisis de los niveles de células endoteliales progenitoras circulantes y apoptosis celular mediante citometría de flujo**

Las muestras de sangre venosa periférica (7 mL) de pacientes con HIC se extrajeron al momento del ingreso y al día  $7 \pm 1$  en tubos con EDTA. En el plazo de 1 hora tras la recogida fueron procesadas por un investigador ciego a los datos clínicos y radiológicos de los pacientes. Las células mononucleadas se aislaron de la muestra de sangre periférica mediante centrifugación por densidad en gradiente de Ficoll (Sobrino *et al.*, 2011). Para el análisis mediante citometría se suspendieron las células mononucleares en 100 ml de PBS y se realizó una tinción por triplicado con un anticuerpo conjugado a un fluorocromo CD34-

Isotiocianato de fluoresceína (FITC; Becton Dickinson). El anticuerpo IgG1-FITC (Becton Dickinson) se utilizó como isotipo para control negativo. Tras la tinción durante 30 minutos con los anticuerpos conjugados, la fluorescencia de las células se midió inmediatamente por citometría de flujo (BD FACSAria Ilu Becton Dickinson). El número de células progenitoras humanas CD34<sup>+</sup> se expresó como el recuento absoluto de células obtenidas después de medir  $2,5 \times 10^5$  eventos en el *gate* de linfocitos (FACS Diva software; BD Biosciences) (Sobrino *et al.*, 2011).

Las muestras de sangre de los ratones KI Arg72Pro p53, se recogieron en tubos microtainer recubiertos con EDTA (Becton Dickinson) 24 horas antes de la cirugía (basal) y 1,3, 7 y 14 días después de la HIC experimental. Las células rojas se lisaron 2 veces en FACS Lysing solution (Becton Dickinson) antes del protocolo de tinción. La tinción de las células por inmunofluorescencia se realizó por triplicado utilizando anticuerpos fluorescentes conjugados CD34-FITC, VEGFR2-APC (eBioscience), y CD45-Ficoeritrina (PE; Immunostep). La fluorescencia de las células se midió inmediatamente tras la tinción mediante citometría de flujo (Asahara *et al.*, 1999). El porcentaje de células CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/VEGFR2<sup>+</sup> se calculó utilizando el software CellQuest (BD Biosciences).

En algunos experimentos, tras la tinción con CD34-FITC, las células se tiñeron con anexina V-alofocianina (APC) y 7-amino-actinomicinaD (7-AAD) en solución reguladora (*binding buffer*: HEPES 100 mM, NaCl 140 mM, y CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM) para determinar cuantitativamente el porcentaje de células apoptóticas CD34<sup>+</sup> por citometría de flujo. Las células se tiñeron de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y se analizaron  $3 \times 10^5$  células en 4 replicados por condición, en un citómetro FACScalibur (FACSDiva software). Este método se basa en la detección de la fosfatidilserina expuesta en la membrana plasmática de células apoptóticas. La anexina V es una glicoproteína dependiente de calcio con una potente capacidad anticoagulante *in vitro*, que presenta gran afinidad por los fosfolípidos de membrana como la fosfatidilserina. Pero la anexina-V no sólo se une a fosfatidilserina de la superficie de células apoptóticas, sino que también se une a la que se encuentra en el interior de células necróticas o en estado de muerte

avanzada que tienen alterada su membrana plasmática. Por ello, también incluimos la tinción con 7-AAD, que se une específicamente al DNA de las células necróticas, para poder considerar como células apoptóticas aquellos progenitores CD34<sup>+</sup> (identificados por fluorescencia con FITC) teñidos con anexina V-APC que son negativas para 7-AAD (Almeida *et al.*, 2005; Gómez-Sánchez *et al.*, 2011).

### **2.3. Medida de los niveles séricos de VEGF, Ang-1 y SDF-1 $\alpha$**

Se obtuvieron muestras de suero de pacientes con HIC a las 72  $\pm$  24 h tras la HIC, y de los ratones KI p53 a diferentes tiempos tras la inyección de colagenasa. Las muestras recogidas en tubos con anticoagulante se centrifugaron a 3000 x g durante diez minutos e inmediatamente se congelaron a -80°C. Los niveles plasmáticos de VEGF, Ang-1 y SDF-1 $\alpha$  se midieron utilizando kits comerciales de ensayos por inmunoadsorción ligados a enzimas (ELISA), (VEGF, Ang-1: R&D Systems, Inc.; SDF-1 $\alpha$ : RayBiotech, Inc. and Abcam) (Sobrino *et al.*, 2011). Las determinaciones se realizaron en un laboratorio independiente en el cual no se conocían los resultados experimentales. Los coeficientes intra- e inter-ensayo fueron < 8% para todos los marcadores.

### **2.4. Cultivos celulares y tratamientos**

#### **2.4.1. Cultivo primario de células endoteliales de cerebro**

Los cultivos de células endoteliales de capilares de cerebro se prepararon a partir de cortezas cerebrales de ratones KI p53 de 3 semanas de edad (Andjelkovic *et al.*, 2003). Para ello se aisló la corteza y se removieron otros vasos sanguíneos y meninges utilizando un hisopo de algodón. La corteza se cortó y se homogeneizó suavemente en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) con una pipeta serológica. Se eliminó la mielina de los homogenados utilizando una solución de BSA al 20% (p/v) en DMEM y se separaron los eritrocitos mediante dos centrifugaciones a 1.000  $\times$  g, durante 15 minutos. A continuación se digirió la suspensión resultante que contenía los componentes vasculares en 0.02 mg/ml de colagenasa/disypasa (Roche) en DMEM suplementado con 0.04 mg/mL de DNasa I

(Roche), durante 1 hora a 37°C, en baño de agitación. Las células se sembraron en placas de plástico cubiertas con colágeno I (BD Biosciences) y se incubaron en medio de crecimiento de células endoteliales MV2 (listo para usar; Promocell) suplementado con L-glutamina (Lonza) y 3 µg/mL de puromicina (Sigma). Las células endoteliales cerebrales expuestas a privación de oxígeno y glucosa (OGD) (Almeida *et al.*, 2002) se tiñeron con anexina V-APC y 7-AAD para determinar cuantitativamente el porcentaje de células apoptóticas (V-APC<sup>+</sup>/7-AAD<sup>-</sup>) mediante citometría de flujo (Almeida *et al.*, 2005; Gomez-Sanchez *et al.*, 2011).

## **2.5. Inmunohistoquímica**

### **2.5.1. Obtención de muestras**

Los ratones KI p53 fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de una mezcla (1:4) de clorhidrato de xilacina (Rompun; Bayer) y ketamina (Imalgene; Merial), usando 1 ml de la mezcla por kg de peso. Luego se perfundieron vía aorta con una solución de NaCl al 0.9%, seguido de 5 ml por gramo de peso del fijador Somogyi (4% p/v paraformaldehído, 0.2% p/v ácido pícrico en buffer fosfato 0,1 M, pH 7.4). Una vez perfundidos, los cerebros se extraen cuidadosamente para obtener tres secciones coronales que se fijan en la solución de Somogyi durante toda la noche a 4 °C. Los bloques de cerebro se lavaron sucesivamente durante 10 min, 30 min y 2 horas con una solución de buffer fosfato (PB 0.1M, pH 7.4), y se sumergieron secuencialmente en una solución de sacarosa en PBS al 10%, 20% y 30% (p/v). Tras la crioprotección del tejido se obtuvieron secciones coronales de 20 µm de espesor mediante un criostato (Leica CM 1950 AgProtect, Leica).

### **2.5.2. Inmunofluorescencia**

Las secciones coronales se lavaron tres veces en PB 0.1 M, durante 10 minutos cada vez, y posteriormente se incubaron en (i) anti-mouse CD31 1:250 (550274, BD Pharmingen), anti-Iba1 1:200 (019-19741, Wako), anti-NeuN 1:1000 (MAB377, Millipore), o anti-IB4 1:50 (L2140, Sigma) en Triton X-100 al 0.2% (Sigma) y suero

de cabra al 5% (Jackson Immoresearch) durante 72 h a 4 °C en PB 0.1 M; (ii) anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforo (Jackson Immunoresearch Laboratories) en Triton X-100 al 0.05% y suero de cabra al 2% en 0.1 M PBS, durante 2 h a temperatura ambiente; (iii) los núcleos se tiñeron con 4,6-diamino-2-fenilindol 0.5 µg/mL (DAPI, Sigma D9542) o TO-PRO®-3 durante 10 minutos a temperatura ambiente (Quintana-Cabrera *et al.*, 2012). Después de lavar con PBS, las secciones se montaron con el medio acuoso Fluoromount™ (Sigma).

Las preparaciones se examinaron mediante microscopía de epifluorescencia empleando conjuntos de filtros apropiados de un microscopio (Nikon Inverted microscope Eclipse Ti-E, Japan) equipado con un iluminador de fibra precentrado (Nikon Intensilight C-HGFI) y una cámara digital B/N CCD (Hamamatsu, ORCAER), o mediante un microscopio confocal espectral (Leica TSC-SL, Leica Microsystems) con tres láseres: multiline Argon (488 nm), Helium-Neon (543 nm) y Helium-Neon (633 nm); y equipado con objetivos 40X y 63X (1.4) HCX PL Apo en aceite de inmersión para imágenes de alta resolución. Las cuantificaciones se realizaron por triplicado, en tres regiones corticales perihematoma de tres secciones consecutivas, con cada animal Pro y Arg en un microscopio de epifluorescencia. Se contó el número de células totales y neuronas de cada región utilizando tinción de DAPI y NeuN, respectivamente. El área ocupada por vasos CD31 positivos se estimó utilizando el programa de procesamiento de imágenes ImageJ (ImageJ 1.48v; Java 1.6.0\_65 [64-bit]).

## **2.6. Estudio de apoptosis mediante la técnica de TUNEL**

La técnica TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end-labelling*) se realizó en secciones cerebrales siguiendo el protocolo del fabricante (Roche Diagnostics). Las secciones de cerebros fijadas, se preincubaron en buffer de TUNEL que contiene CoCl<sub>2</sub> 1 mM, cacodilato de sodio 140 mM y 0.3 % de triton X-100 en Tris buffer 30 mM, pH 7.2, durante 30 minutos. Después de la incubación a 37°C con la mezcla de reacción TUNEL que contiene el enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (800 U/ml) y la mezcla de nucleótidos (dUTPs 1 mM) durante

90 minutos, se lavaron los cortes de cerebro con PBS y se realizó una tinción con estreptavidina unida al fluoróforo Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories) (Quintana -Cabrera *et al.*, 2012).

### **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; Bonafé *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*, que denominamos Arg.

Para estudiar la relación entre el polimorfismo *Arg72Pro* 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 buen o mal 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 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® Statistics 22.0 para Macintosh (SPSS Ibérica, IBM Company).



## **RESULTADOS**



## **1. IMPACTO DEL POLIMORFISMO DE *Tp53* EN LOS NIVELES DE CÉLULAS CD34<sup>+</sup> CIRCULANTES Y SU VALOR PRONÓSTICO EN LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL**

Para estudiar la asociación entre el polimorfismo en el exón 4, codón 72 (*Arg72Pro*) de *Tp53* con los niveles de células CD34<sup>+</sup> circulantes y el pronóstico funcional de los pacientes tras una HIC, se utilizó una cohorte hospitalaria de 78 pacientes con HIC.

### **1.1. Análisis descriptivo general de la cohorte de pacientes con hemorragia intracerebral**

La edad de los pacientes de la cohorte estudiada fue  $70,4 \pm 11,1$  años, expresada como media  $\pm$  SD. La distribución por sexos fue de 54 varones (69,2%) y 24 mujeres (30,8%).

En cuanto a los factores de riesgo, expuestos en la tabla 3, el 53,8% de los pacientes presentaba antecedentes de HTA, 20,5% padecían diabetes, el 12,82% tenía hábito tabáquico, un 21,7% tenía antecedentes de alcoholismo y un 14,1% fibrilación auricular.

Factor de riesgo	N (78)	%
Hipertensión	42	53,8
Diabetes	16	20,5
Tabaquismo	10	12,82
Abuso de alcohol	17	21,7
Fibrilación auricular	11	14,1

En 48 de los pacientes (61,5%), la localización de la HIC fue hemisférica profunda y en 30 (38,5%) lobular. En la tabla 4 se especifica la distribución de la HIC según la etiología. Así, en 36 pacientes (46,1%) la causa de la HIC fue hipertensiva, seguida de las atribuidas a anticoagulantes en 26 pacientes (33,3%), en 13

(16,6%) el origen fue indeterminado y en 3 pacientes (3,8%) la causa se atribuyó a AAC.

**Tabla 4. Distribución de la HIC según la etiología**

Etiología	N (78)	%
Hipertensiva	36	46,1
Anticoagulantes	26	33,3
Indeterminada	13	16,6
Amiloidea	3	3,8

El grado de afectación neurológica al ingreso, expresado como la mediana de la puntuación de la escala NIHSS, fue 10 con un rango [2,16]. En los datos de neuroimagen se observó que el volumen basal del hematoma en TC (medido como se indica en la Figura 2: *Volumen del hematoma = 0,5 x A x B x C*) (Broderick *et al.*, 1993), fue de  $28,8 \pm 27,9$  ml. En 23 de los pacientes de la cohorte, lo que representa un 29,5%, la HIC se extendió a los ventrículos cerebrales. El volumen residual de la HIC a los 3 meses fue de  $11,7 \pm 17,7$  ml.

La tabla 5 muestra la distribución de las distintas variables polimórficas de *Arg72Pro Tp53*. Se ha descrito que el alelo *Pro* ejerce un efecto dominante sobre el alelo *Arg* (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011). Por ello, se han agrupado los genotipos *Arg/Pro* y *Pro/Pro* en un único grupo, que se denominó “Prolina (Pro)”. Un segundo grupo “Arginina (Arg)” incluye aquellos individuos homocigotos *Arg/Arg*. La distribución de frecuencias génicas se ajusta al equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,1$ ).

**Tabla 5. Distribución del polimorfismo Arg72Pro de Tp53**

Arg72ProTp53	N	%
Arg (Arg/Arg)	47	60,2
Pro (Arg/Pro+ Pro/Pro)	31	39,8

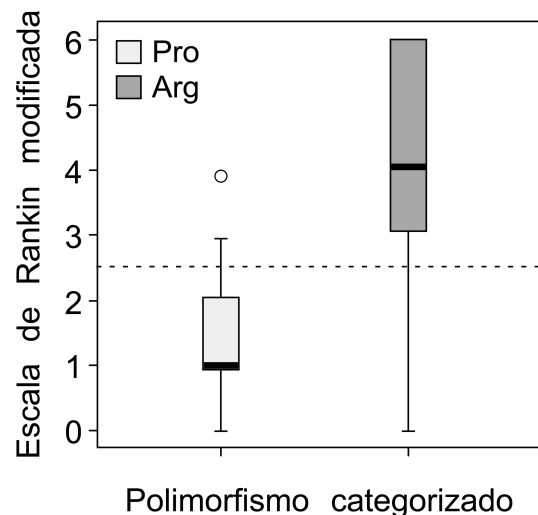
La cuantificación del estado funcional a los 3 y 12 meses tras la HIC, se realizó mediante la escala de Rankin modificada (Rankin-m, ver Tabla 2) (Banks & Marotta, 2007). En la cohorte, 42 pacientes (53,8%) presentaban mal pronóstico funcional (Rankin-m>2) a los 3 meses de sufrir la HIC, mientras que 36 pacientes (46,2%) se encontraban en la situación definida como buen pronóstico funcional (Rankin-m≤2). La distribución de los distintos estados funcionales de los pacientes con HIC se resume en la Tabla 6.

**Tabla 6. Distribución de los distintos estados funcionales en la cohorte de pacientes con hemorragia intracerebral**

Rankin-m	N	%
0	10	12,8
1	17	21,8
2	9	11,5
3	12	15,9
4	9	11,5
5	3	3,8
6	18	23,1

## 1.2. El polimorfismo Arg72Pro de Tp53 condiciona el pronóstico funcional de los pacientes con hemorragia intracerebral

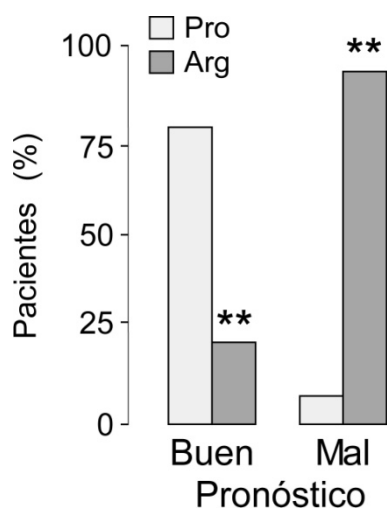
Estudios previos en nuestro grupo de investigación han demostrado que la variante Arg se correlaciona con un peor pronóstico funcional en una cohorte de pacientes con ictus (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011). Como se muestra en la Figura 9, el estado funcional de los pacientes a los 3 meses tras la HIC también se correlaciona con el genotipo Arg72Pro de Tp53 en la cohorte de estudio. Los pacientes del grupo Pro (Pro/Pro y Pro/Arg) mostraron un mejor pronóstico funcional respecto a los pacientes Arg (Arg/Arg). Así, la mediana de los valores en la escala de Rankin-m en los pacientes Pro fue de 1 [1,2], mientras que en los pacientes homocigotos para el alelo Arg fue de 4 [3,6], (Mann-Whitney-Wilcoxon test;  $p < 0,0001$ ).



**Figura 9. Asociación entre el polimorfismo Arg72Pro de Tp53 y el estado funcional a los 3 meses tras la HIC.** El estado funcional de los pacientes tras la HIC se cuantificó mediante la escala de Rankin modificada. Los pacientes fueron agrupados según su genotipo en Arg (Arg/Arg) o Pro (Pro/Arg y Pro/Pro). Los portadores del alelo Pro presentan mejor situación funcional a los 3 meses tras la HIC que los que portan el alelo Arg en homocigosis. Los valores se expresan como mediana [rango intercuartílico].

Cuando se compara la distribución de las variantes alélicas y el buen o mal pronóstico funcional a los 3 meses tras la HIC, se observa que 28 de los 31

pacientes del grupo Pro, que representa un 90,4%, tenían una situación funcional de Rankin-m $\leq$ 2 asociado a buen pronóstico. Este resultado contrasta con lo observado en el grupo de pacientes Arg, ya que 39 pacientes (92%) se encontraban en una situación de Rankin-m $>$ 2 o mal pronóstico funcional. Sin embargo, este fenómeno sólo se observó en 3 pacientes (9,6%) del grupo Prolina (Figura 10). Estos resultados corroboran que el polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* es un potente biomarcador de pronóstico funcional en pacientes con hemorragia intracerebral, como habíamos descrito anteriormente (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011).

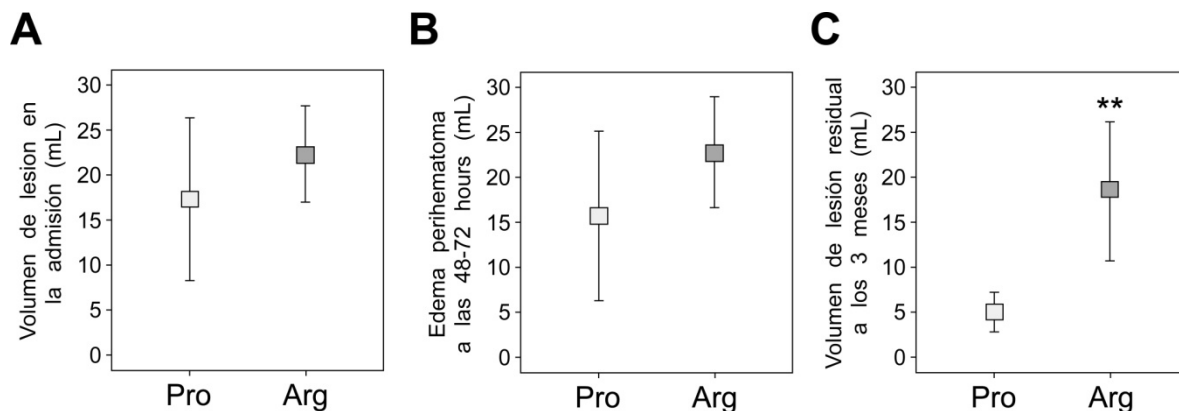


**Figura 10. Distribución del polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* según el pronóstico funcional a los 3 meses tras la HIC.** El porcentaje de pacientes con buen pronóstico funcional (Rankin-m $\leq$ 2) es mayor en el grupo de pacientes con el alelo Pro que en los pacientes que portan el alelo Arg en homocigosis. Los valores se expresan como porcentaje (%). \*\* $p < 0,0001$  respecto a los pacientes Pro.

### **1.2.1. El polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* condiciona el volumen de lesión, volumen residual y volumen del edema perihematoma**

Una de las variables secundarias estudiadas en la cohorte de pacientes fue el volumen de la lesión, tanto inicial como residual a los 3 meses de la HIC. Además, se determinó el volumen de edema perihematoma en la TC de control realizada entre las 48-72 horas tras la HIC. Al ingreso no se encontraron diferencias significativas en el volumen de la lesión en función del genotipo *Arg72Pro* de *Tp53* tal como se observa en la (Figura 11A). Tampoco se encontró una asociación significativa entre la media del volumen de edema a las 48-72 horas de la HIC con el polimorfismo (15  $\pm$  10 y 25  $\pm$  5 en Pro y Arg, respectivamente) (Figura 11B). Sin

embargo, a los 3 meses tras la HIC la media del volumen de infarto fue significativamente diferente entre los pacientes según el genotipo. Aquellos pacientes con genotipo *Arg/Arg* tenían una media de volumen residual 4 veces superior frente a los pacientes portadores del alelo *Pro* (Figura 11C). Estos datos confirman de nuevo la asociación de la variante polimórfica *Pro* con un mejor pronóstico funcional de los pacientes con HIC, validando el polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* como un predictor genético de pronóstico en ictus (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011).



**Figura 11. Asociación entre el polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53*, el volumen de la lesión al ingreso, el volumen de edema perihematoma y el volumen residual a los 3 meses.** La media de (A) volumen de lesión al ingreso y (B) volumen de edema no fueron diferentes en función del polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53*. (C) El volumen de lesión residual resultó ser mayor en el grupo de pacientes *Arg* (*Arg/Arg*) que en los pacientes que portan el alelo *Pro*. Los valores se expresan como medias  $\pm$  SD. **\*\* $p < 0,0001$**  respecto a los pacientes *Pro*.

Para observar los factores que influyen en el pronóstico funcional de los pacientes con HIC, se realizó un análisis univariante de las variables segregadas según buen (Rankin- $m \leq 2$ ) o mal pronóstico (Rankin- $m > 2$ ), como se ha descrito previamente (Tabla 7). Los valores se expresan como medias  $\pm$  SD o porcentajes, excepto el valor de la escala NIHSS que se expresa como mediana [rango intercuartílico].



**Tabla 7. Análisis univariante según el pronóstico funcional de los pacientes tras la HIC**

	Buen pronóstico N = 36	Mal pronóstico N = 42	p
Edad, años	67.0 ± 11.4	72.7 ± 10.0	0.017
Hombres, %	69.4	69.0	0.583
Antecedente hipertensión arterial, %	69.4	40.5	0.013
Antecedente diabetes, %	27.8	14.3	0.168
Antecedente tabaco, %	13.9	11.9	0.528
Antecedente alcohol, %	27.8	16.7	0.279
Antecedente fibrilación auricular, %	11.1	16.7	0.356
TAS mm Hg	163.7 ± 29.4	164.7 ± 30.1	0.877
TAD mm Hg	87.6 ± 20.5	87.6 ± 16.7	0.988
Glucemia basal, mg/dL	129.3 ± 34.1	134.3 ± 33.9	0.147
Leucocitos basales, x 10 <sup>3</sup> /mL	9.0 ± 1.8	9.1 ± 3.3	0.364
Plaquetas basales, x 10 <sup>3</sup> /mL	237.2 ± 57.0	232.7 ± 56.6	0.849
NIHSS basal	5 [2, 10]	14 [9, 16]	<0.0001
Volumen hematoma basal, mL	13.6 ± 11.2	41.9 ± 31.3	<0.0001
Crecimiento del volumen en la 1ª semana, mL	21.7 ± 37.2	36.4 ± 32.9	0.069
Volumen edema 48-72 h, mL	35.3 ± 14.2	42.0 ± 30.0	0.069
Localización de la hemorragia, %			0.564
Lobular	38.9	38.1	
Profunda	61.1	61.9	
Extensión ventricular, %	5.6	50.0	<0.0001
Diagnóstico, %			0.142
Hipertensiva	58.3	35.7	
Amiloidea	5.6	2.4	
Anticoagulantes	22.2	42.9	
Indeterminada	13.9	19.0	
CD34 <sup>+</sup> al ingreso, células/250000 eventos	222.9 ± 102.9	202.0 ± 75.3	0.333
CD34 <sup>+</sup> al 7º día, células/250000 eventos	457.6 ± 97.4	255.9 ± 87.6	<0.0001
Incremento de CD34 <sup>+</sup> en la 1ª semana, %	139.9 ± 90.3	34.5 ± 43.5	<0.0001
Polimorfismo <i>Tp53</i> , %			<0.0001
Arg ( <i>Arg/Arg</i> )	19.4	90.5	
Pro ( <i>Pro/Pro</i> y <i>Pro/Arg</i> )	80.6	9.5	

Los valores son datos clínicos y de neuroimagen de los pacientes al momento del ingreso. Se expresan como medias (±SD), medianas (cuartiles) o porcentajes %. TAS, tensión arterial sistólica; TAD, tensión arterial diastólica; HIC, hemorragia intracerebral; NIHSS, *National Institute of Health Stroke Scale*.

Las variables evaluadas fueron: edad, sexo, antecedentes (de hipertensión arterial, diabetes, tabaquismo, enolismo, fibrilación auricular), situación neurológica al ingreso, parámetros de laboratorio, tensión arterial al ingreso, variables de neuroimagen (volumen basal del hematoma, edema perihematoma, localización de la hemorragia, extensión ventricular), clasificación etiológica de la HIC y variables relacionadas con las EPCs (número al ingreso y al día 7 tras la HIC, así como el incremento en la primera semana). Además, se incluyó en este análisis el polimorfismo *Arg72Pro de Tp53* categorizado (Arg y Pro).

El análisis univariado reveló que, de todas las variables estudiadas, aquellas que se relacionan con mal pronóstico funcional a los 3 meses son: la edad ( $p=0,017$ ), el antecedente de hipertensión arterial ( $p=0,013$ ), la NIHSS ( $p<0,0001$ ), el volumen del hematoma al ingreso ( $p<0,0001$ ) y la extensión ventricular ( $p<0,0001$ ). Como se observa en la Tabla 7, el genotipo *Arg/Arg de Tp53* se asoció con mal pronóstico funcional con una asociación estadística altamente significativa ( $p<0,0001$ ), corroborando su función como biomarcador de mal pronóstico de ictus hemorrágico (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011).

En relación al recuento de células progenitoras, no se observaron diferencias en el número de células  $CD34^+$ , que incluye la población de EPCs (Liman & Endres, 2012), entre los pacientes con buen y mal pronóstico al momento del ingreso ( $p=0,013$ ). Sin embargo, los niveles de células  $CD34^+$  al 7º día tras la HIC fueron significativamente superiores ( $p<0,0001$ ) en aquellos pacientes con buen pronóstico funcional. De la misma manera, el grupo de pacientes con buen pronóstico funcional presentó un incremento en los niveles de EPCs en la primera semana de evolución ( $p<0,0001$ ). Estos resultados corroboran las evidencias que confieren a las EPCs circulantes un valor pronóstico en la predicción del estado funcional de pacientes tras una HIC (Sobrino *et al.*, 2011).

### **1.2.2. Análisis multivariante principal: El polimorfismo Arg72Pro de Tp53 se asocia al pronóstico funcional a los 3 meses**

El análisis multivariado reveló que los resultados de este trabajo confirman que el genotipo Arg/Arg de Tp53 es un predictor independiente de mal pronóstico funcional tras ajustarlo por edad, hipertensión arterial, volumen del hematoma, extensión ventricular y puntuación en la escala NIHSS al momento del ingreso. Como se observa en la Tabla 8, los resultados apoyan la hipótesis de que el recuento de células CD34<sup>+</sup> es una variable subsidiaria del polimorfismo Arg72Pro de Tp53.

**Tabla 8. Análisis de regresión logística de variables independientes asociadas con mal pronóstico funcional a los 3 meses tras la HIC.**

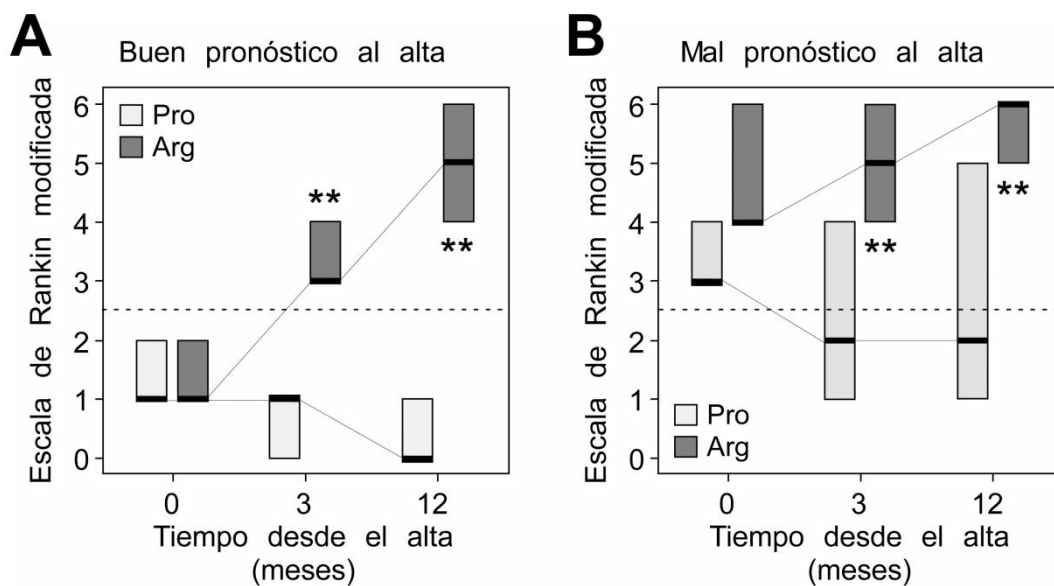
	OD	IC 95%	p
Edad	1.18	0,35-2,01	0.128
Antecedente de HTA	2.20	0,37-536,61	0.309
NIHSS basal	1.83	1,17 – 3,22	0.009
Volumen HIC basal	2.33	0.97 – 1.26	0.082
Contaminación ventricular	21.08	2.52 – 1052.03	0.007
Incremento de CD34 <sup>+</sup> 1ª semana	0.88		0.0065
Genotipo Arg/Arg de Tp53	118.15	10.46 – 1809.55	<0.0001

Se calculó la OR y el IC de 95% para demostrar la asociación independiente entre el mal pronóstico funcional y el genotipo Arg/Arg. NIHSS, *National Institute of Health Stroke Scale*.

### **1.2.3. El polimorfismo Arg72Pro de Tp53 condiciona la recuperación funcional a largo plazo de los pacientes tras la hemorragia intracerebral**

Una vez confirmada la función del polimorfismo Arg72Pro de Tp53 con el estado funcional de pacientes a los 3 meses de la HIC, decidimos estudiar su posible efecto sobre el pronóstico de los pacientes a largo plazo, es decir, a los 12 meses de la HIC (Figura 12). Así, cuando se comparó el estado funcional a los 3 y 12 meses tras la HIC, mediante la escala Rankin-m, con el estado funcional al alta hospitalaria en ambos grupos de individuos (Arg y Pro), se observó que aquellos

pacientes portadores del genotipo *Arg/Arg* que presentaban buen pronóstico al alta (Rankin-m $\leq$ 2) habían empeorado su situación funcional a los 3 meses y sufrían un empeoramiento aún mayor a los 12 meses. Por el contrario, los pacientes del grupo Pro mantenían un pronóstico favorable aún a los 12 meses tras la HIC (Figura 12A). Además, confirmamos el efecto positivo que ejerce el alelo *Pro* en el pronóstico a largo plazo en aquellos pacientes con Rankin-m $>$ 2 al alta (Figura 12B). Mientras que los pacientes *Arg/Arg* sufrían un aumento progresivo de la discapacidad, se observó una recuperación funcional, asociada a una mejoría en la puntuación en la escala de Rankin-m, de los pacientes Pro con mal pronóstico tras la HIC.



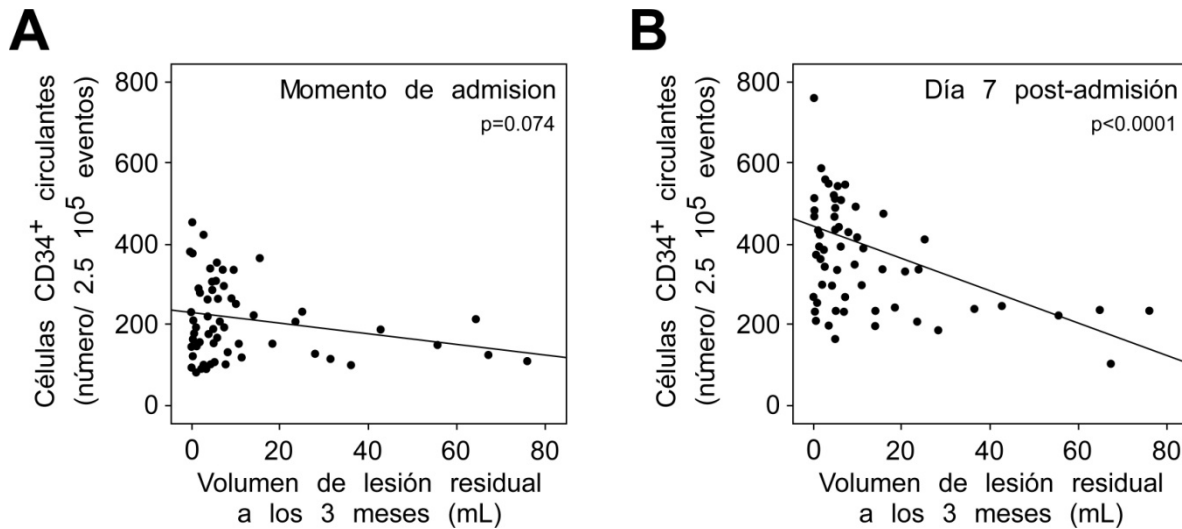
**Figura 12. Asociación entre el polimorfismo Arg72Pro de Tp53 y el pronóstico funcional mediante la escala de Rankin a los 3 y 12 meses tras la HIC según el estado funcional al alta hospitalaria.** Los pacientes fueron agrupados según el pronóstico funcional a los 3 y 12 meses tras la HIC en buen pronóstico (A, Rankin-m $\leq$ 2) y mal pronóstico (B, Rankin-m $>$ 2) en función del polimorfismo Arg72Pro de Tp53. Los diagramas de caja muestran los valores medios (líneas horizontales dentro de la caja) y cuartiles (límites del cuadro). \*\*p < 0,0001 respecto a los pacientes Pro.

A pesar de las diferencias existentes entre ambos genotipos en lo que respecta a vulnerabilidad neuronal tras la isquemia (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011), lo que determinaría el peor pronóstico tras la HIC en pacientes *Arg/Arg*, dichas

diferencias en la recuperación funcional a largo plazo de los individuos Pro podría sugerir la participación de otros mecanismos de reparación alternativos. Teniendo presentes los antecedentes descritos sobre EPCs e ictus (Sobrino *et al.*, 2011) y habiendo observado una relación entre buen pronóstico y el incremento en los niveles de células CD34<sup>+</sup> a los 7 días después de la HIC, decidimos estudiar el posible efecto del polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* sobre los niveles de células CD34<sup>+</sup> circulantes a los 7 días tras la HIC y su impacto en el pronóstico funcional los pacientes con HIC.

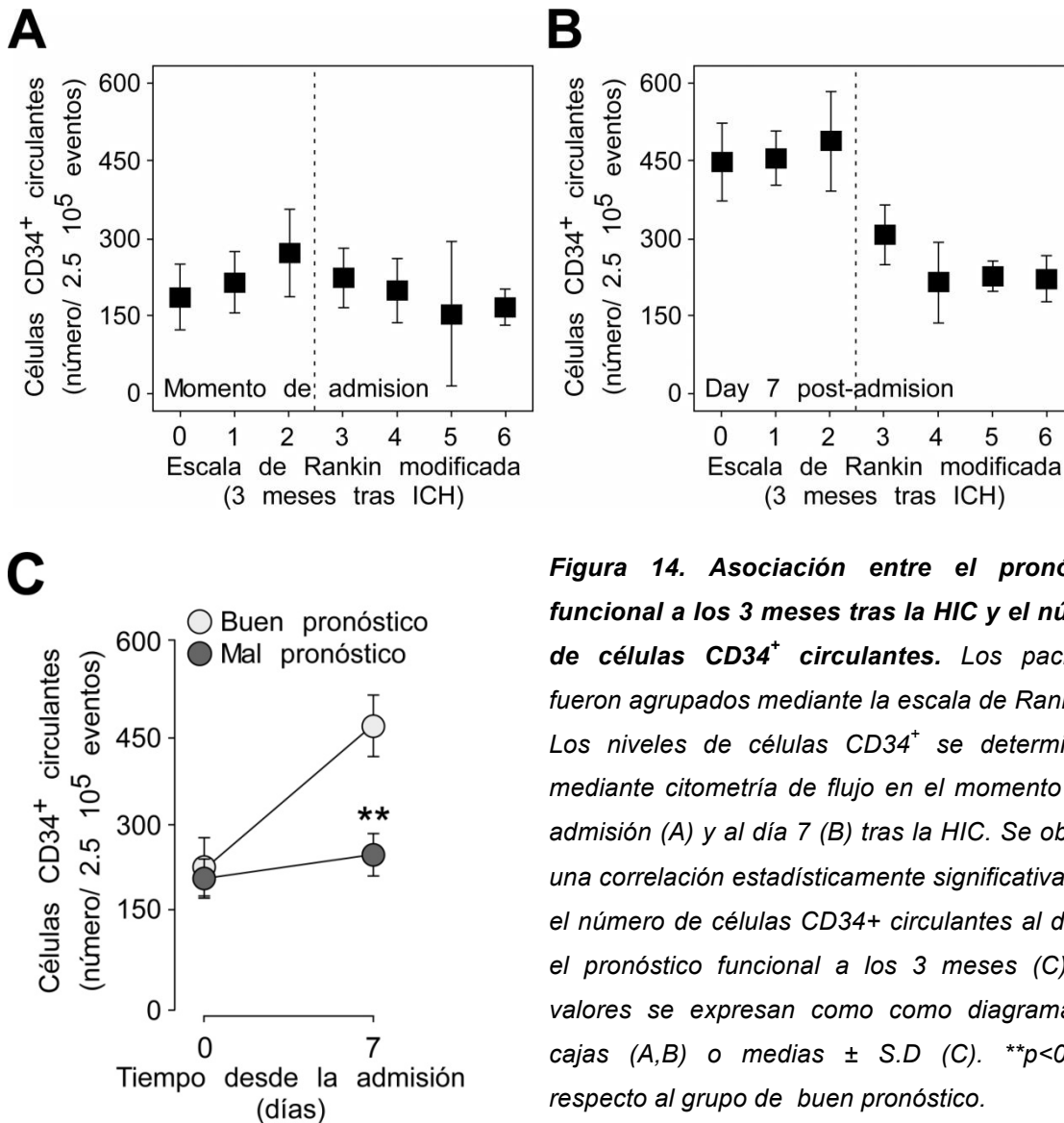
### ***1.3. El polimorfismo Arg72Pro de Tp53 regula los niveles circulantes de células progenitoras endoteliales y el pronóstico funcional de los pacientes con hemorragia intracerebral***

Los niveles de progenitores endoteliales CD34<sup>+</sup> circulantes están ligados al pronóstico funcional tras un ictus (Asahara *et al.* 1997; Sobrino *et al.*, 2007; Yip *et al.*, 2008; Sobrino *et al.*, 2011). Como se ha mencionado en la introducción, se sabe que el número de células progenitoras CD34<sup>+</sup> determinados al día 7 tras la HIC se asocia de forma independiente con buen pronóstico funcional y esto se acompaña de un menor volumen de lesión residual a los 3 meses. Esta premisa fue confirmada en la cohorte de pacientes de HIC (Figura 13). Verificamos que, efectivamente, existe una correlación negativa entre las células progenitoras CD34<sup>+</sup> a los 7 días de la HIC y el volumen residual a los tres meses (Figura 13B); efecto que no se detecta al ingreso (Figura 13A).



**Figura 13. Correlación entre volumen de lesión residual a los 3 meses y niveles de progenitores CD34<sup>+</sup> circulantes en el momento de la admisión (A) y al día 7 (B) después de la HIC. Se observa una correlación positiva a la semana de la admisión  $p<0,0001$ .**

Además, analizamos la relación entre los niveles de células CD34<sup>+</sup> circulantes y el pronóstico funcional a los 3 meses en la cohorte de pacientes con HIC. Para ello, se agrupó a los pacientes mediante la escala de Rankin-m y se determinaron los niveles de EPCs (CD34<sup>+</sup>) circulantes en el momento de la admisión (Figura 14A) y a los 7 días tras la HIC (Figura 14B). Mientras que en el momento de la admisión los niveles de EPCs resultaron ser los mismos en todos los grupos (Figura 14A), a los 7 días de la HIC observamos que los pacientes con valores de la escala de Rankin-m $\leq$ 2 (buen pronóstico funcional) presentaban niveles más altos de EPCs que los pacientes con Rankin-m $>$ 2 (mal pronóstico funcional) (Figura 14B). Es más, en la Figura 14C se muestra que en los pacientes con buen pronóstico se produjo un incremento en el porcentaje de EPCs circulantes durante la primera semana tras la HIC, que no se observó en los pacientes con mal pronóstico. Estos resultados confirman que los niveles circulantes de EPCs (CD34<sup>+</sup>) a los 7 días tras la HIC condicionan el pronóstico funcional de los pacientes de ictus hemorrágico (Sobrino *et al.*, 2011).

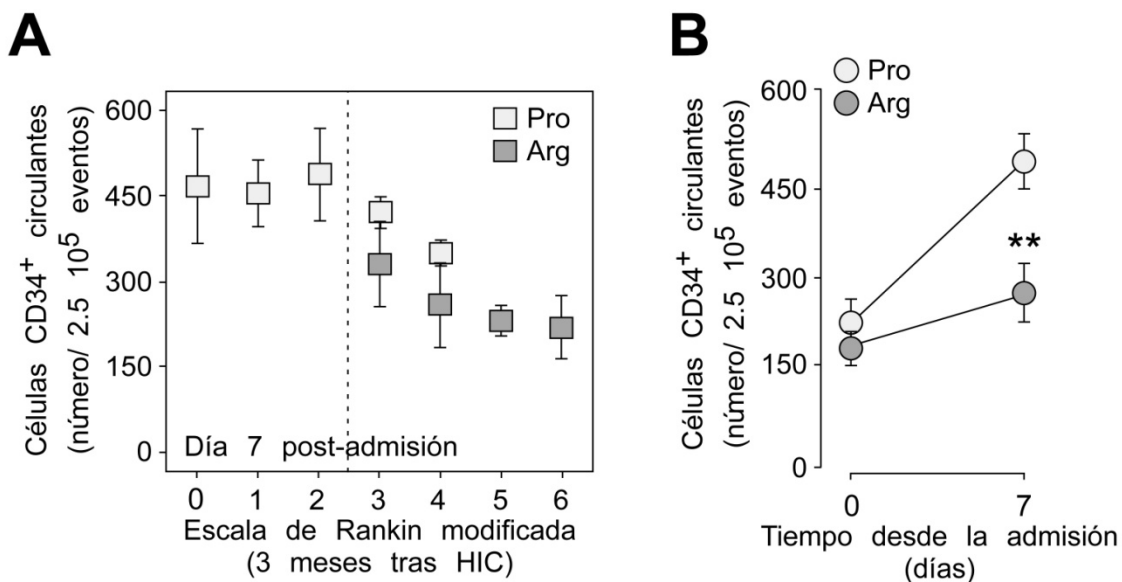


**Figura 14. Asociación entre el pronóstico funcional a los 3 meses tras la HIC y el número de células CD34<sup>+</sup> circulantes.** Los pacientes fueron agrupados mediante la escala de Rankin-m. Los niveles de células CD34<sup>+</sup> se determinaron mediante citometría de flujo en el momento de la admisión (A) y al día 7 (B) tras la HIC. Se observa una correlación estadísticamente significativa entre el número de células CD34<sup>+</sup> circulantes al día 7 y el pronóstico funcional a los 3 meses (C). Los valores se expresan como como diagramas de cajas (A,B) o medias  $\pm$  S.D (C). \*\* $p < 0,0001$  respecto al grupo de buen pronóstico.

Dada la relación entre los niveles circulantes de EPCs y el pronóstico funcional de los pacientes de HIC, decidimos estudiar la influencia del polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* sobre dicha asociación.

Para ello, se agrupó a los pacientes mediante la escala de Rankin-m y se determinó el polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* y los niveles circulantes de EPCs (CD34<sup>+</sup>). Como se muestra en la Figura 15, en los pacientes con buen pronóstico funcional (Rankin-m  $\leq 2$ ) a los 3 meses de la HIC, que corresponden con pacientes Pro, presentaron niveles elevados de células CD34<sup>+</sup> a los 7 días de la HIC. Por el

contario, los pacientes con valores de Rankin-m>2 (mal pronóstico funcional) fueron, en su mayoría, del grupo Arg y presentaban niveles más bajos de células progenitoras CD34<sup>+</sup> (Figura 15A). Al agrupar a los pacientes según el polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* se observó un incremento en los niveles circulantes de células CD34<sup>+</sup> en la población de pacientes Pro a los 7 días del ingreso. Sin embargo, dicho efecto no se observó en los paciente Arg (Figura 15B). De hecho, los pacientes que portan el alelo *Pro* presentan niveles superiores de EPCs (CD34<sup>+</sup>) que los pacientes Arg (Figura 15B). Teniendo en cuenta la asociación descrita entre el pronóstico funcional de los pacientes de ictus hemorrágico y los niveles circulantes de EPCs (Sobrino *et al.*, 2011), el buen pronóstico de los pacientes Pro puede estar relacionado con una mayor movilización de las EPCs en estos pacientes.

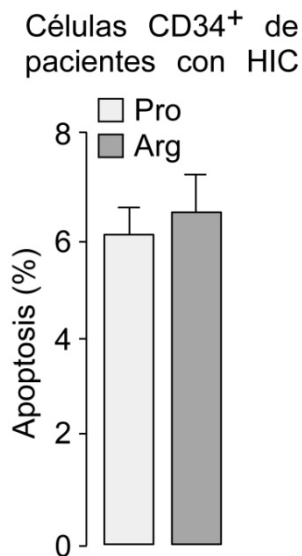


**Figura 15. Influencia del polimorfismo Arg72Pro de Tp53 en el pronóstico funcional a los 3 meses tras la HIC y el número de células CD34<sup>+</sup> circulantes.** Los pacientes fueron agrupados según su genotipo, en Arg o Pro, y pronóstico, mediante la escala de Rankin-m (A). Los niveles más elevados de células CD34<sup>+</sup> en el grupo Pro, determinados mediante citometría de flujo al día 7 tras la HIC, correspondieron con pacientes con valores mas bajos de la escala de Rankin-m (buen pronóstico). (B) Los niveles de células CD34<sup>+</sup> circulantes aumentaron a los 7 días del ingreso en los pacientes Pro, pero no en los pacientes Arg que presentan valores inferiores. Los resultados se expresan como diagramas de cajas (A) o medias  $\pm$  S.D (B). \*\* $p < 0,0001$  respecto al grupo de pacientes Pro.



### 1.3.1. El polimorfismo Arg72Pro de Tp53 no condiciona la viabilidad de las células progenitoras (CD34<sup>+</sup>) circulantes

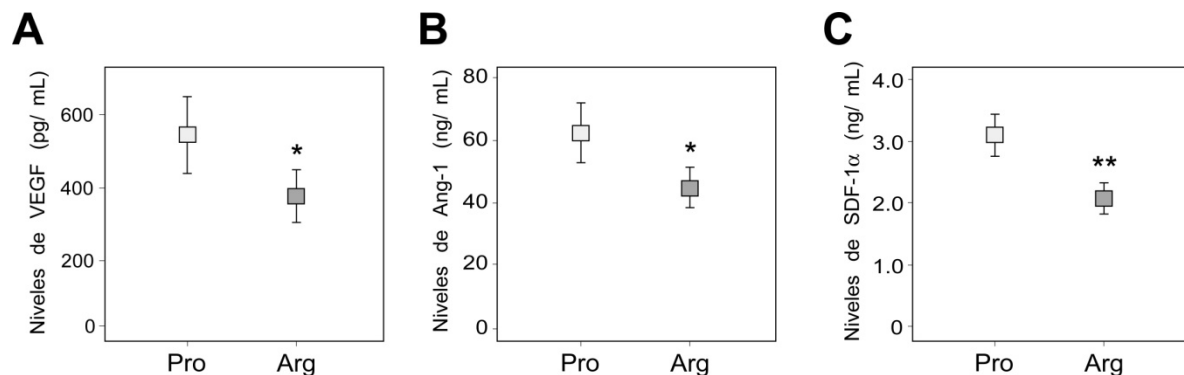
Como ya hemos indicado, el polimorfismo Arg72Pro de Tp53 condiciona la actividad apoptótica de la proteína p53, de manera que la variante polimórfica Arg posee una actividad apoptótica mayor que la variante Pro (Almeida, 2013; Gómez-Sánchez *et al.*, 2011). Dado que los pacientes Pro presentaron niveles superiores de células CD34<sup>+</sup> que los Arg, en primer lugar decidimos estudiar el posible efecto del polimorfismo sobre la supervivencia de estas células en sangre de pacientes con HIC. Como se muestra en la Figura 16, el porcentaje de células apoptóticas en la población de células CD34<sup>+</sup> resultó ser el mismo en los pacientes Pro y Arg, por lo que descartamos un posible efecto del polimorfismo Arg72Pro de Tp53 sobre supervivencia de las células CD34<sup>+</sup>.



**Figura 16. Determinación de la apoptosis de progenitores CD34<sup>+</sup> en función de su genotipo.** El porcentaje de células CD34<sup>+</sup> apoptóticas (anexina-V<sup>+</sup>, 7AAD<sup>-</sup>) se determinó mediante citometría de flujo al día 7 tras la HIC. Se representan los datos  $\pm$  SEM de 10 muestras diferentes obtenidas de pacientes de cada genotipo.

### 1.3.2. El polimorfismo Arg72Pro de Tp53 determina la activación y movilización de células progenitoras endoteliales de la médula ósea

Los niveles plasmáticos de los factores de crecimiento, VEGF y Ang-1, y la quimiocina SDF1- $\alpha$ , entre otros, determinan la movilización de las EPCs desde la médula ósea y, por tanto, los niveles de estos precursores en la circulación periférica. Por ello, nuestro siguiente objetivo fue investigar si las diferencias observadas en los niveles de células CD34<sup>+</sup> circulantes en los pacientes según el polimorfismo Arg72Pro de Tp53 podría estar motivada por diferencias en los niveles de VEGF, Ang-1, y SDF1- $\alpha$ . Como se observa en la Figura 17, los niveles plasmáticos de VEGF (Figura 17A), Ang-1 (Figura 17B) y SDF-1 $\alpha$  (Figura 17C) fueron significativamente superiores en los pacientes Pro que en los pacientes Arg, a las 72 horas tras la HIC.



**Figura 17. Efecto del polimorfismo Arg72Pro de Tp53 sobre los niveles de VEGF, Ang-1 y SDF-1 $\alpha$  en suero de pacientes a las 72 horas tras la HIC.** Los niveles de (A) VEGF (pg/ml), (B) Ang-1 (ng/ml) y (C) SDF-1 $\alpha$  (ng/ml) fueron significativamente superiores en los pacientes Pro que en los pacientes Arg, a las 72 horas tras la HIC. Los valores se expresan como media  $\pm$  S.D. \* $p < 0,001$ , \*\*  $p < 0,0001$  respecto al grupo de pacientes Pro.

Estos resultados demuestran que el polimorfismo Arg72Pro de Tp53 determina los niveles de factores de crecimiento y citoquinas y, con ello, la movilización de EPCs desde la médula ósea a la sangre periférica, lo que contribuiría a una reparación más eficiente del daño y, por consiguiente, repercutiría en el pronóstico funcional de los pacientes tras una HIC.

## **2. INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO Arg72Pro DE Tp53 EN LA SUPERVIVENCIA ENDOTELIAL Y LA NEOVASCULARIZACIÓN TRAS LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL**

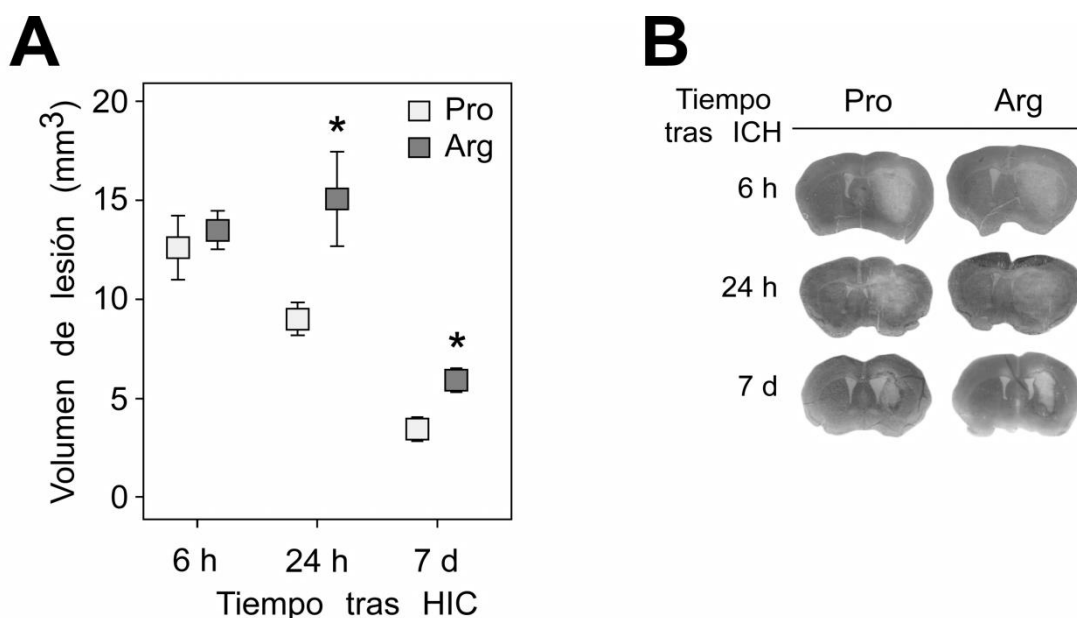
### **2.1. Modelo experimental de hemorragia intracerebral en ratones knock-in Arg72Pro de Tp53 (Klp53)**

Los modelos animales han permitido mejorar la comprensión de los procesos fisiopatológicos implicados en la HIC (Senn *et al.*, 2014). En el presente trabajo, hemos utilizado ratones *knock-in* (KI) de p53 “humanizados” que portan las variantes polimórficas humanas de p53, Pro y Arg, para investigar los mecanismos que median el efecto del polimorfismo sobre la movilización de EPCs y el pronóstico funcional observado en pacientes de ictus hemorrágico.

En primer lugar, y para demostrar que el modelo murino elegido era apropiado para el estudio, verificamos que se reproducía el mismo fenotipo observado en pacientes de HIC. Para ello, ratones *knock-in Arg72Pro de Tp53* (Klp53), denominados como Arg y Pro, se sometieron a un modelo experimental de HIC. Puesto que tamaño y localización de la lesión son factores críticos que determinan el pronóstico, tanto en humanos (Broderick *et al.*, 1993) como en roedores (MacLellan *et al.*, 2008), se utilizó el modelo de inyección de colagenasa descrito inicialmente por Clark y colaboradores (Clark *et al.*, 1998). De este modo, se rompe la lámina basal de los vasos sanguíneos en una localización concreta, logrando un sangrado continuo y la expansión gradual del hematoma con un perfil similar al observado en el humano (MacLellan *et al.*, 2008).

Como muestra la Figura 18, el volumen de lesión a las de 6 horas de la HIC experimental fue similar en ambos grupos de animales, Arg y Pro. Sin embargo, en los ratones que expresan la variante Pro se observó una recuperación más rápida que en los Arg, en los que el volumen de hematoma fue significativamente mayor, tanto a las 24 horas como a los 7 días tras la HIC. Estos resultados indican que los ratones Klp53 utilizados en el presente trabajo reproducen el fenotipo

observado en pacientes de HIC (Figura 11), de manera que la variante Pro está asociada a menor volumen de lesión tras la HIC.

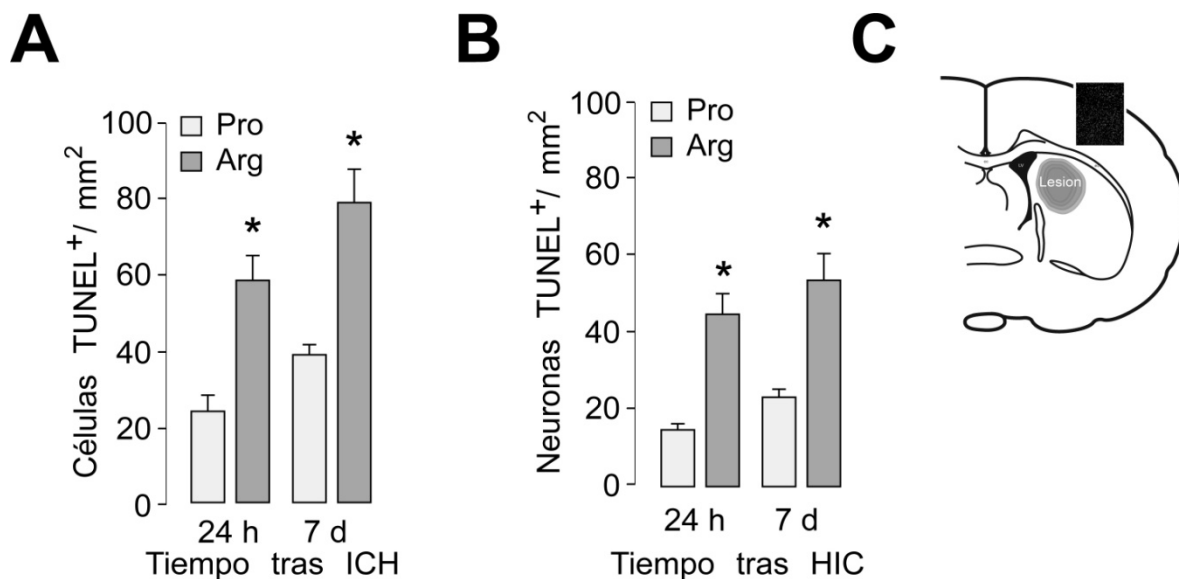


**Figura 18. Efecto del polimorfismo Arg72Pro de Tp53 sobre el volumen de lesión en ratones Klp53 sometidos a HIC experimental.** Ratones Klp53 que expresan las variantes humanas Arg y Pro de p53 se sometieron a HIC experimental. (A) El volumen de lesión ( $\text{mm}^3$ ) se determinó en secciones histológicas mediante la técnica de Nissl, a distintos tiempos tras la HIC experimental. (B) Se muestran imágenes representativas de secciones de cerebros de ratones Klp53 Pro y Arg a diferentes tiempos tras la HIC experimental. Los valores se expresan como media  $\pm$  S.E.M. ( $n=4$  ratones por grupo). \* $p<0,05$  respecto a ratones Klp53 Pro.

## 2.2. Efecto del polimorfismo Arg72Pro de Tp53 sobre la apoptosis celular *in vivo*

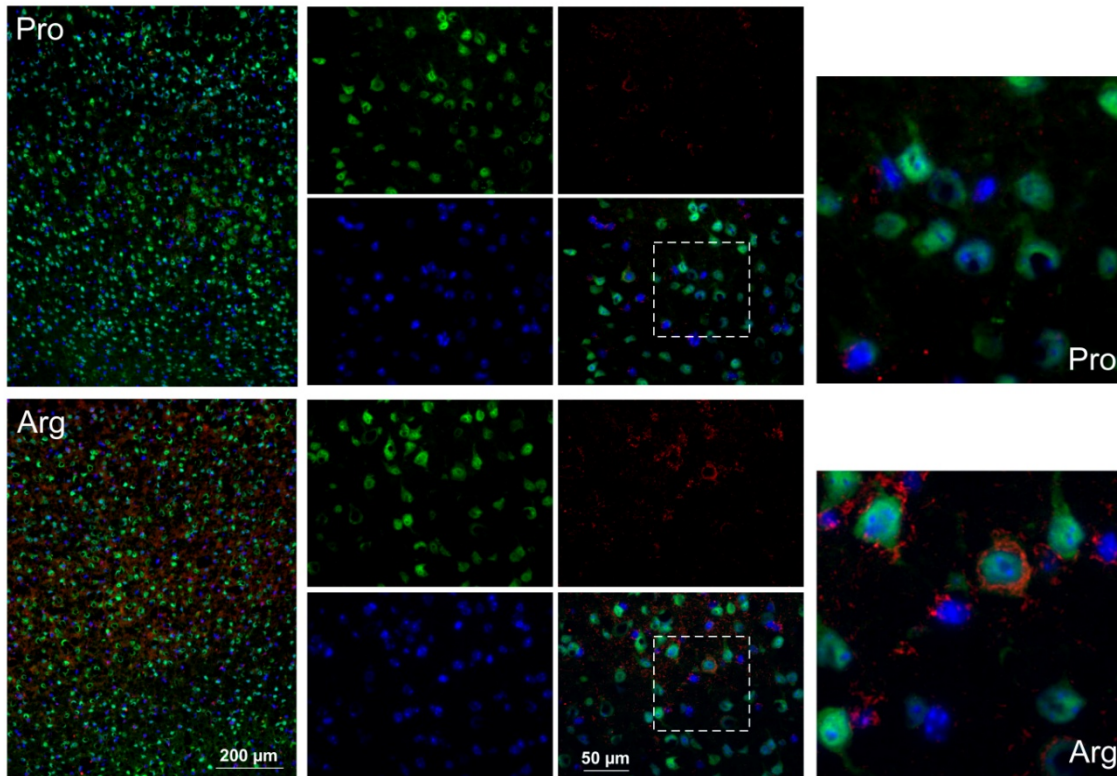
Ante situaciones de estrés celular se produce la estabilización de p53 y, como consecuencia, la parada de ciclo celular, senescencia y/o apoptosis, dependiendo del contexto celular (Jin & Levine, 2001; Culmsee & Mattson, 2005). En el caso concreto de la isquemia cerebral, p53 se acumula y activa rápidamente, lo que supone el inicio de la apoptosis celular, especialmente en neuronas (Crumrine *et al.*, 1994; Saito *et al.*, 2005). Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que el polimorfismo Arg72Pro de Tp53 las neuronas presentan diferente susceptibilidad a la apoptosis causada por la isquemia *in vitro* (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011). Por

ello, nuestro siguiente objetivo fue estudiar el efecto del polimorfismo sobre la apoptosis celular tras la HIC *in vivo*. Para ello, ratones K1p53 Arg y Pro se sometieron a la HIC experimental y se determinó la apoptosis celular en secciones cerebrales mediante la técnica de TUNEL. Como se muestra en la Figura 19A, el número de células apoptóticas (TUNEL<sup>+</sup>) resultó ser menor en los ratones Pro que en los ratones Arg, tanto a las 24 horas como a los 7 días de la HIC. Es más, mediante tinción conjunta con el marcador neuronal NeuN y TUNEL pudimos demostrar que el número de neuronas apoptóticas (células NeuN<sup>+</sup>, TUNEL<sup>+</sup> cuantificadas en la zona mostrada en la Figura 19C) en los ratones Pro fue significativamente menor que en los ratones Arg (Figura 19B, 20). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en cultivos de neuronas *in vitro* (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011), y demuestran que las neuronas que expresan la variante polimórfica Pro son más resistentes a la apoptosis causada por la HIC, que las neuronas que expresan la variante Arg.



**Figura 19. Efecto del polimorfismo Arg72Pro de Tp53 sobre la apoptosis neuronal en ratones K1p53 sometidos a HIC experimental.** Ratones K1p53 que expresan las variantes humanas Arg y Pro de p53 se sometieron a HIC experimental. (A) La apoptosis celular se determinó en secciones cerebrales mediante la técnica de TUNEL. (B) La apoptosis neuronal se determinó mediante la tinción conjunta con el marcador neuronal NeuN y la técnica de TUNEL. (C) Imagen que muestra la región perihematoma seleccionada para la cuantificación de la apoptosis celular. Los valores se expresan como media  $\pm$  S.E.M. (n=4-5 ratones por grupo) \* $p < 0,05$  respecto a ratones K1p53 Pro.

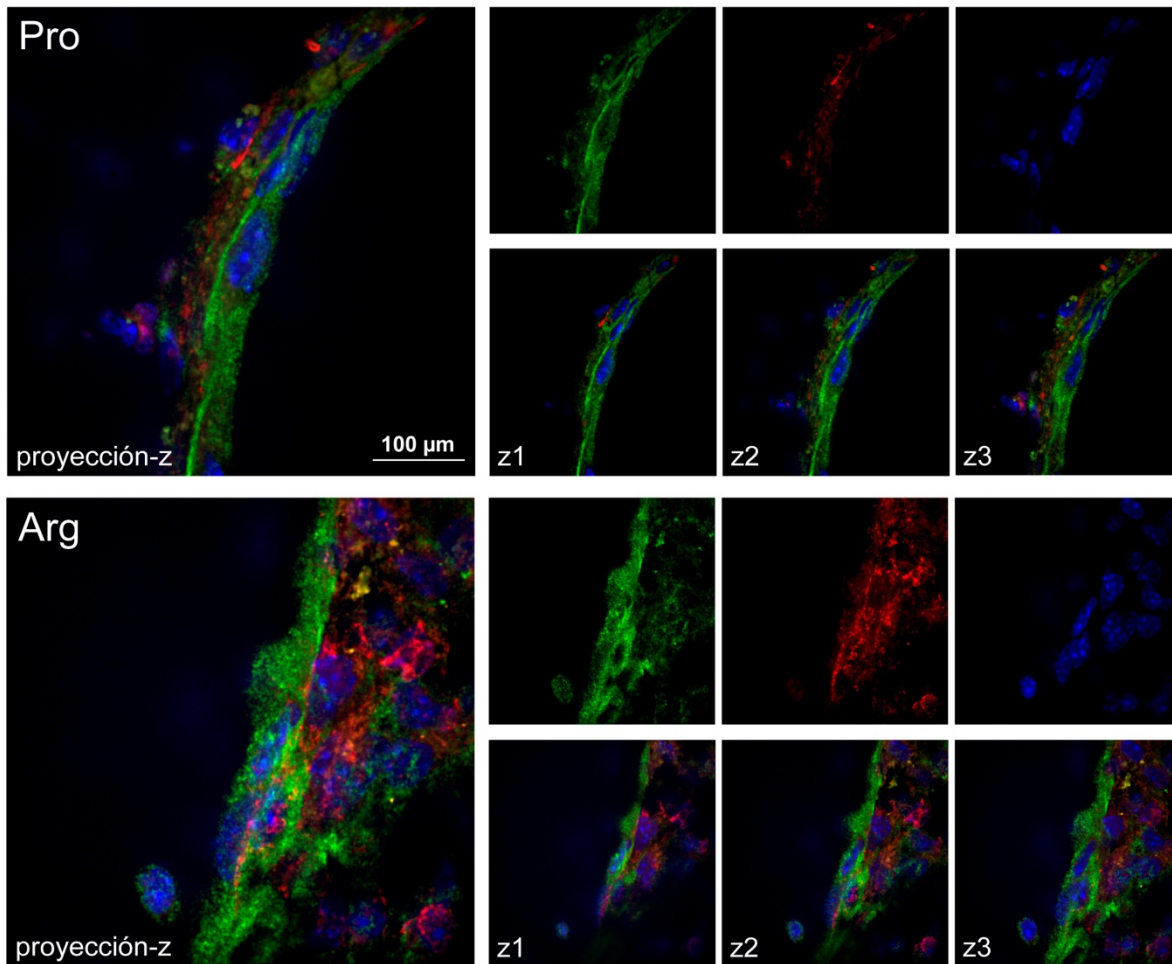
### NeuN/TUNEL/DAPI



**Figura 20. Imagen representativa de tinción de TUNEL en secciones de cerebro de animales Klp53.** Se muestra imagen de secciones de cerebro tras la tinción conjunta con el marcador neuronal NeuN (verde), el marcador nuclear DAPI (azul) y la técnica de TUNEL (rojo), procedentes de ratones Klp53 a las 24 horas tras la HIC experimental.

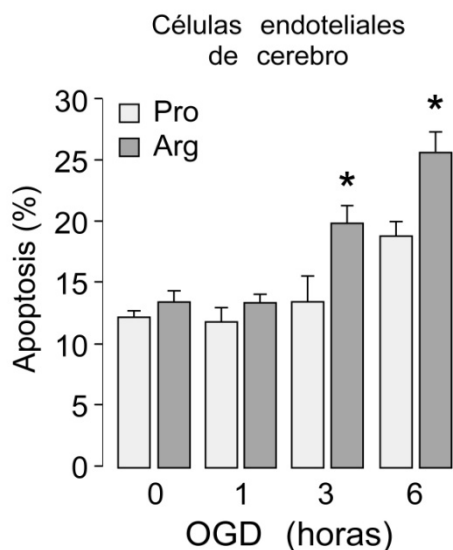
Aunque las neuronas son las células más vulnerables a la apoptosis causada por la isquemia cerebral (Broughton *et al.*, 2009), otras células presentes en el cerebro, especialmente las células endoteliales, son también vulnerables al proceso isquémico. Por ello, determinamos la apoptosis de las células endoteliales mediante la doble tinción con el marcador endotelial CD31 (verde) y el TUNEL (rojo). Como se observa en la Figura 21, el número de células endoteliales apoptóticas (doble tinción CD31<sup>+</sup> y TUNEL<sup>+</sup>) resultó ser menor en ratones que expresan la variante Pro que en los que expresan la variante Arg.

## CD31/TUNEL/DAPI



**Figura 21. Imagen representativa de tinción TUNEL en secciones de cerebro de animales Klp53.** Se muestra imagen de secciones de cerebro tras la tinción conjunta con el marcador endotelial CD31 (verde), el marcador nuclear DAPI (azul) y la técnica de TUNEL (rojo), procedentes de ratones Klp53 a las 24 horas tras la HIC experimental.

Para corroborar el efecto del polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* sobre la susceptibilidad de las células endoteliales a la HIC experimental, se realizaron cultivos primarios de células endoteliales de cerebro de ratones Klp53. Las células se sometieron a isquemia experimental *in vitro* (incubación en ausencia de glucosa y oxígeno) durante diferentes tiempos y se determinó la apoptosis celular mediante citometría de flujo. En la Figura 22 se muestra que las células endoteliales que expresan la variante Arg fueron más susceptibles a la isquemia experimental que las procedentes de ratones Pro.



**Figura 22. Efecto del polimorfismo Arg72Pro de Tp53 sobre la apoptosis de células endoteliales de cerebros Klp53.** Células endoteliales de cerebro en cultivo primario se incubaron en ausencia de glucosa y oxígeno (OGD, isquemia experimental). El porcentaje de células apoptóticas (anexinaV<sup>+</sup>, 7AAD<sup>-</sup>) se determinó mediante citometría de flujo a los tiempos de OGD indicados. Los valores se expresan como media  $\pm$  S.E.M. de 3 cultivos diferentes. \* $p < 0,05$  respecto a ratones Klp53 Pro.

Por lo tanto, nuestros resultados confirman que la variante polimórfica Pro de 53 incrementa la supervivencia de las neuronas y demuestra, por primera vez, que dicho efecto se produce también en células endoteliales del cerebro. Por tanto, el polimorfismo Arg72Pro de Tp53 condiciona la susceptibilidad de las células endoteliales a la isquemia y, en consecuencia, el daño vascular producido por la HIC.

### **2.3. Efecto del polimorfismo Arg72Pro de Tp53 sobre la movilización de células endoteliales progenitoras en los ratones Klp53 tras la hemorragia intracerebral**

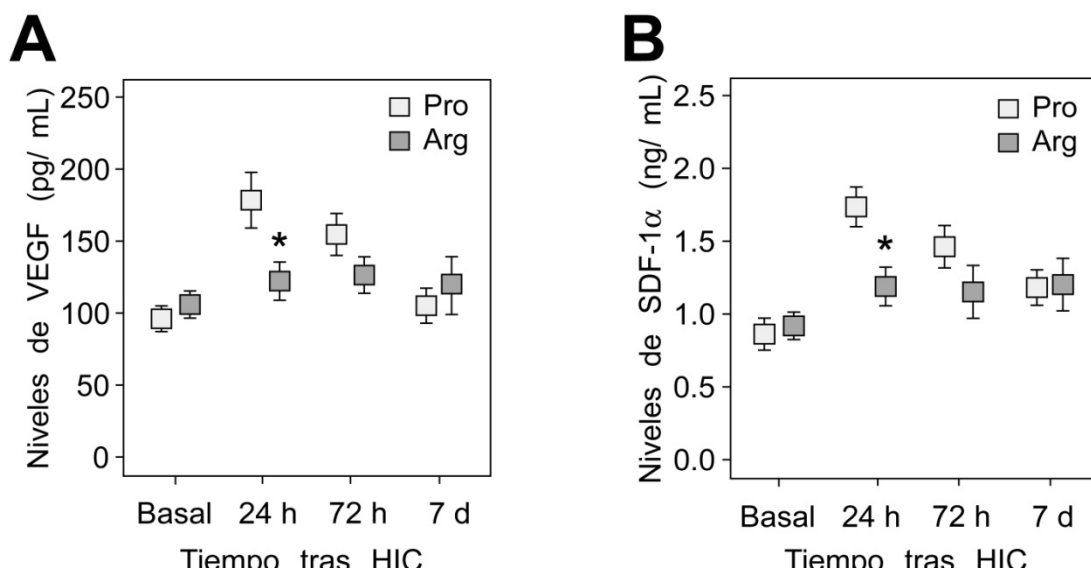
Como ya hemos indicado, las EPCs circulantes derivadas de médula ósea juegan un importante papel en los procesos de reparación tras un ictus (Borlongan, 2011). Para dicha movilización es necesario establecer un gradiente de factores de crecimiento y citoquinas, de manera que a mayor gradiente, mayor movilización de EPCs a sangre periférica. Considerando la capacidad de neuronas y astrocitos de producir VEGF tras una isquemia (Zhang et al, 2000), así como la que tienen las células endoteliales de liberar distintas sustancias proangiogénicas, como VEGF y



Ang-1, o quimiocinas como SDF-1 $\alpha$ , es concebible una relación inversa entre la muerte celular y la producción de dichos factores. Por tanto, nos planteamos como hipótesis que una mayor producción de factores proangiogénicos provocaría una mayor movilización de EPCs, lo que estaría ligado a procesos de reparación cerebrovascular y un mejor pronóstico funcional observado en pacientes que portan el alelo Pro.

### 2.3.1. Efecto del polimorfismo Arg72Pro de Tp53 sobre la liberación de factores pro-angiogénicos en ratones Klp53

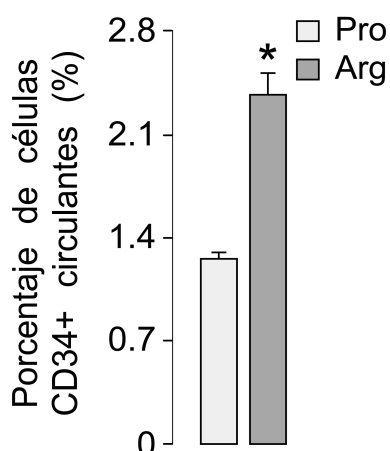
Para probar nuestra hipótesis, determinamos los niveles plasmáticos de VEGF y SDF-1 $\alpha$  en ratones Klp53 a diferentes tiempos tras la HIC experimental. Como se observa en la Figura 26, observamos un aumento pronunciado de VEGF (Figura 26A) y SDF-1 $\alpha$  (Figura 26B) en suero de animales que expresan la variante Pro tras la HIC. Sin embargo, este efecto fue significativamente menor en ratones Klp53 con la variante Arg. Estos resultados concuerdan con los observados en pacientes de ictus hemorrágico (Figura 17) y demuestran que el polimorfismo Arg72Pro de Tp53 regula la apoptosis de células endoteliales de cerebro y la liberación de citoquinas que promueven la movilización de EPCs desde la médula ósea, como VEGF y SDF-1 $\alpha$ , tras la HIC.



**Figura 26. Efecto del polimorfismo Arg72Pro de Tp53 sobre la liberación de citoquinas proangiogénicas en ratones Klp53 sometidos a HIC experimental.** Ratones Klp53 que expresan las variantes humanas Arg y Pro de p53 se sometieron a HIC experimental. Los niveles plasmáticos de (A) VEGF (pg/ml) y (B) SDF-1 $\alpha$  (ng/ml) se determinaron en diferentes tiempos tras la HIC. (Basal: 24 horas antes de la HIC). Los valores se expresan como media  $\pm$  SEM (n=4-5 ratones por grupo) \*p<0,05 respecto a ratones Klp53 Pro.

### 2.3.2. Recuento de células endoteliales progenitoras circulantes

Dada la alta capacidad del endotelio cerebral sano para producir VEGF y SDF-1 $\alpha$  incluso varias semanas tras el daño isquémico (Quaegebeur *et al.*, 2011), proponemos que la alta capacidad de supervivencia de las células endoteliales que expresan la variante polimórfica Pro es un factor clave que determina la producción a largo plazo de los factores de crecimiento y, por tanto, la movilización de EPCs tras la HIC. Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue determinar los niveles de EPCs circulantes en los ratones Klp53 a diferentes tiempos tras la HIC. Tal cómo se observó en los pacientes (Figura 15), los niveles de células progenitoras CD34<sup>+</sup> a las 24 horas tras la HIC fueron significativamente mayores en los ratones con la variante polimórfica Pro que en los que expresaban la variante Arg (Figura 23).

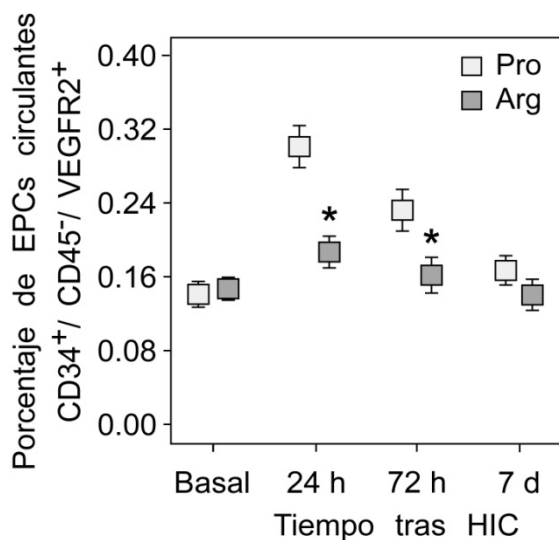


**Figura 23. Efecto del polimorfismo Arg72Pro de Tp53 sobre los niveles de células CD34<sup>+</sup> circulantes en ratones Klp53 tras la HIC.** Ratones Klp53 que expresan las variantes humanas Arg y Pro de p53 se sometieron a HIC experimental. Los niveles de células CD34<sup>+</sup> circulantes se determinaron a las 24 horas tras la HIC, mediante citometría de flujo. Los valores se expresan como media  $\pm$  S.E.M. (n=4 ratones por grupo) \*p<0,05 respecto a ratones Klp53 Pro.

Debido a que la tinción con CD34 no es un marcaje exclusivo de EPCs, realizamos una determinación más específica de EPCs circulantes mediante

tinciones con CD34, junto con el marcador endotelial VEGFR2 y el antígeno de leucocitos CD45. Así, las EPCs se identificaron como CD34<sup>+</sup>, VEGFR2<sup>+</sup> y CD45<sup>-</sup> (Asahara *et al.*, 1999; Rafii y Lyden, 2003; Case *et al.*, 2007; Yip *et al.*, 2008). En la Figura 24 verificamos que los niveles de EPCs (CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/VEGFR2<sup>+</sup>) circulantes aumentaron rápidamente en los ratones que expresan la variante Pro, pero no en los ratones Arg. Es más, los niveles de EPCs fueron superiores en los ratones Pro a las 24 y 72 horas tras la HIC, respecto a los ratones Arg. Este efecto es similar al observado en humanos (Figura 15).

Todos estos resultados demuestran que la variante polimórfica Pro confiere resistencia a las células endoteliales frente la apoptosis causada por la HIC. Ello provoca un incremento en la producción de factores proangiogénicos lo que se traduce en una mayor liberación de EPCs y, por tanto, una neovascularización más eficaz tras la HIC.

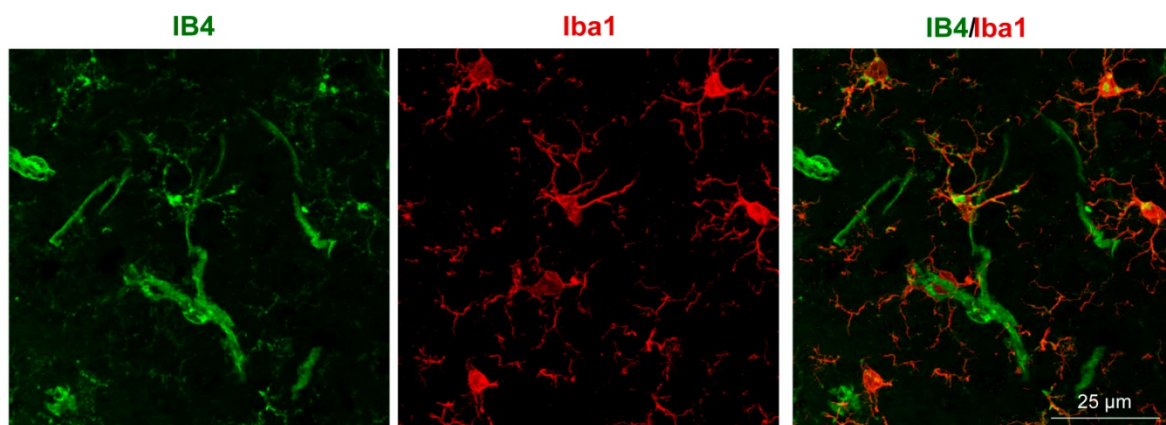


**Figura 24. Efecto del polimorfismo Arg72Pro de Tp53 sobre la movilización de EPCs en ratones KI p53 tras la HIC.** Ratones KI p53 que expresan las variantes humanas Arg y Pro de p53 se sometieron a HIC experimental. Los niveles de células EPCs circulantes (CD34<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>/VEGFR2<sup>+</sup>), expresados en %, se determinaron por citometría de flujo a distintos tiempos tras la HIC. (Basal: 24 horas antes de la HIC). Los valores se expresan como media ± S.E.M. (n=3-4 ratones por grupo) \*p<0,05 respecto a ratones KI p53 Pro.

#### 2.4. Diferencias en neovascularización dependientes del genotipo Arg72Pro

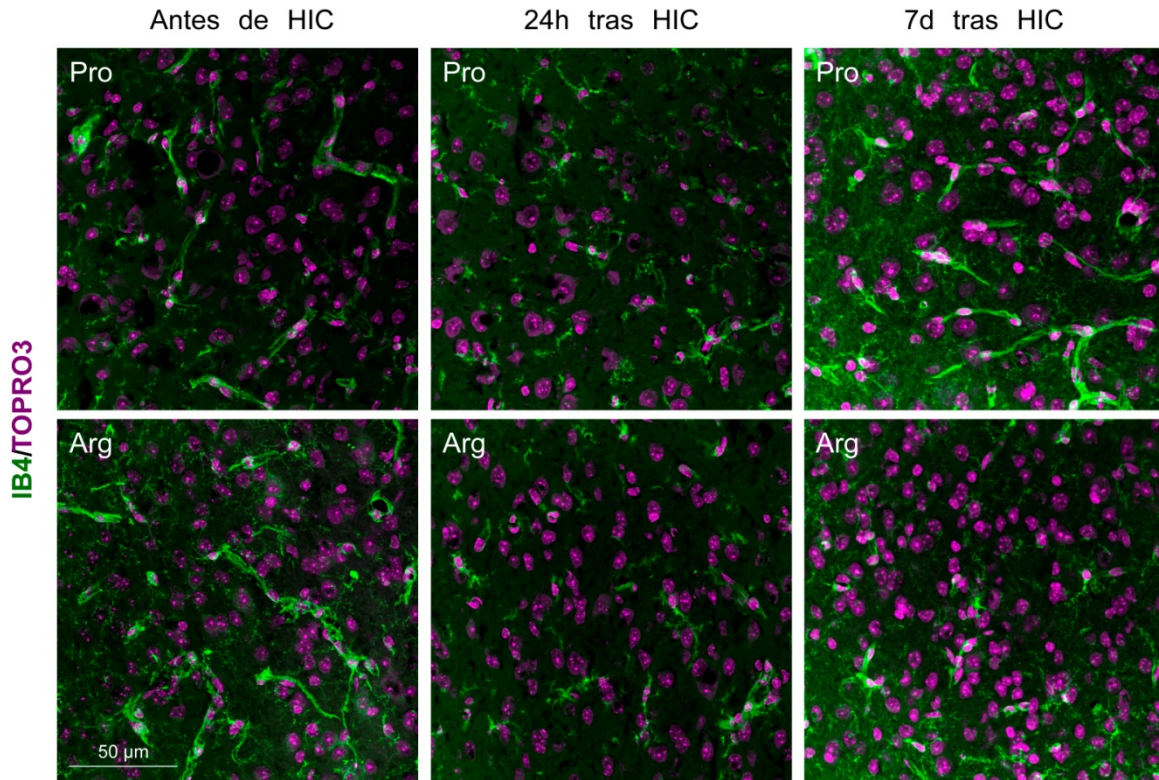
Para determinar si el polimorfismo Arg72Pro de Tp53 afecta a la neovascularización cerebral tras una HIC, se realizaron estudios de inmunohistoquímica utilizando marcadores específicos del endotelio. Tras la HIC

experimental, secciones de cerebros de ratones Klp53 se tiñeron con el marcador de células endoteliales vasculares isolectina-B4 (IB4), un conocido indicador de vascularización (Wälchli *et al.*, 2015). Dado que IB4 también se une a células microgliales se utilizó una combinación de IB4 con el marcador específico de microglia, Iba1. Como se muestra en la Figura 27, las células endoteliales (IB4<sup>+</sup>/Iba1<sup>-</sup>) forman estructuras tubulares, mientras que las células de la microglia (IB4<sup>+</sup>/Iba1<sup>+</sup>) presentan morfología dendrítica, lo que nos permite distinguir perfectamente ambos tipos de células (Figura 27). De modo que el marcaje IB4 representa una buena forma de identificar células endoteliales (Wälchli *et al.*, 2015) y, por tanto, determinar la neovascularización tras la HIC.



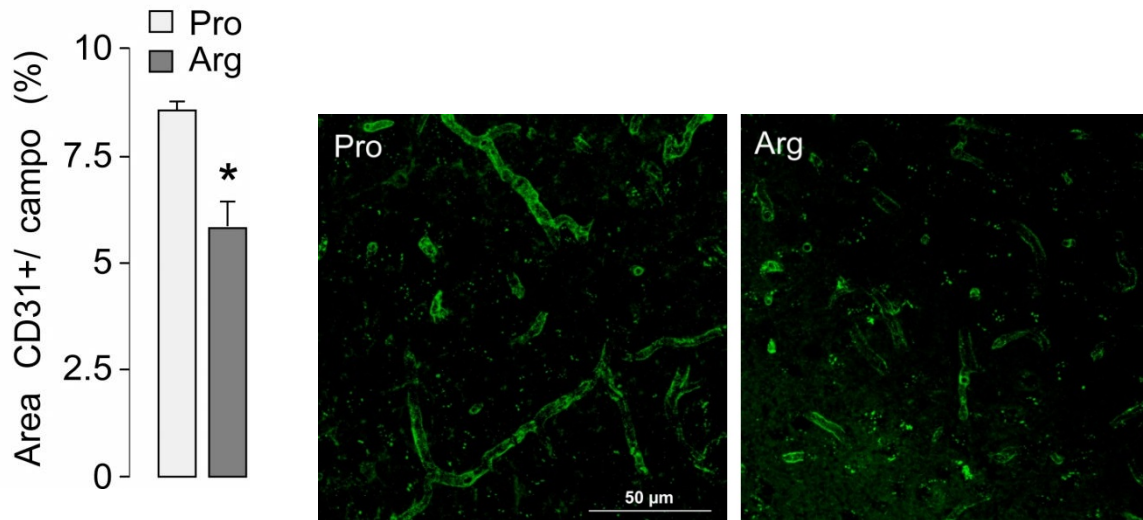
**Figura 27. Imágenes representativa que muestran células endoteliales y microglía.** Secciones cerebrales de ratón se tiñeron con el marcador vascular de las células endoteliales isolectina-B4, IB4 (verde) y el marcador específico de microglia Iba1 (rojo).

Como se observa en la Figura 28, la HIC experimental indujo la disminución en el número de células endoteliales en la zona perihematoma, a juzgar por la menor tinción IB4, a las 24 horas de la HIC, respecto a la situación de antes del daño hemorrágico. Cabe resaltar que el daño vascular resultó ser mayor en los ratones Arg que en los Pro, a las 24 horas tras la HIC, lo que concuerda con los resultados obtenidos en los cultivos primarios de células endoteliales de cerebro (Figura 22).



**Figura 28.** Impacto del polimorfismo Arg72Pro de Tp53 sobre la vascularización en la zona perihematoma en ratones Klp53 sometidos a HIC. Ratones Klp53 que expresan las variantes humanas Arg y Pro de p53 se sometieron a HIC experimental. Secciones cerebrales se tiñeron con el marcador endotelial isolectina-B4, IB4 (verde), y el marcador nuclear TO-PRO®-3 (morado).

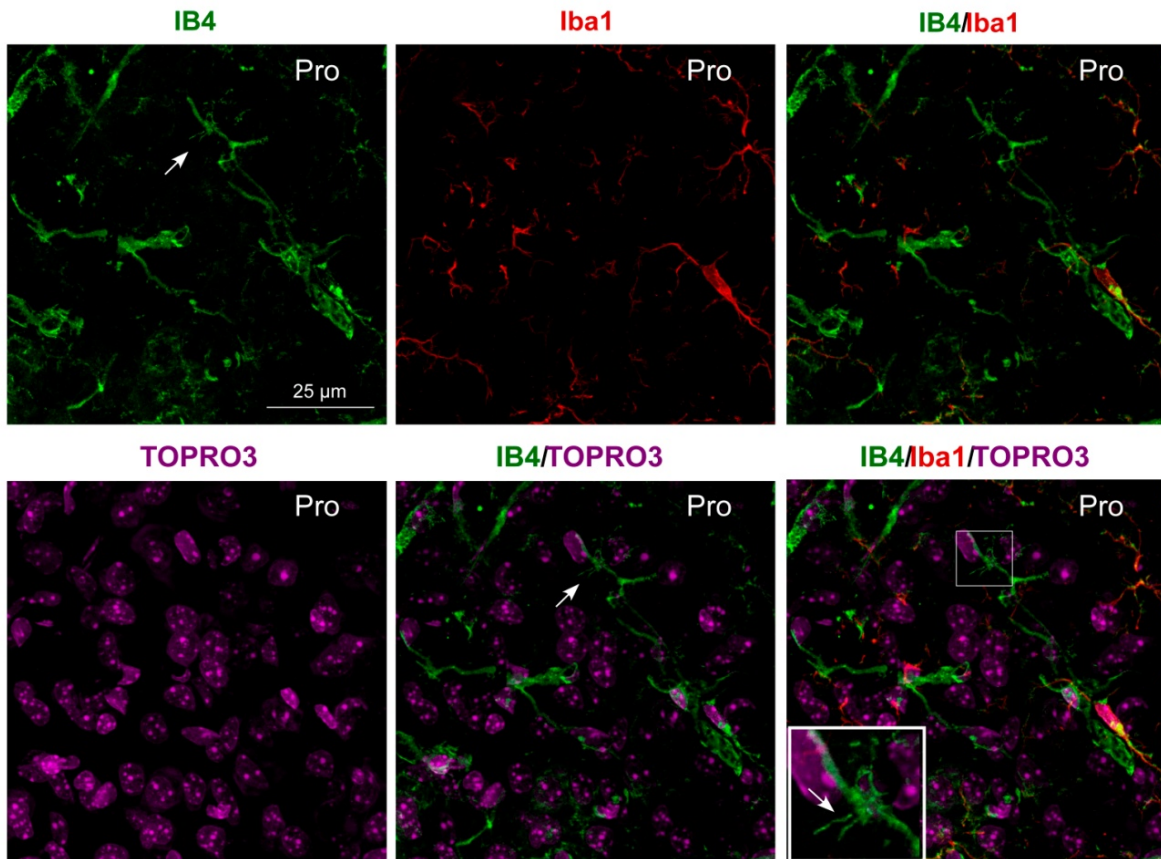
Es interesante resaltar que la densidad vascular aumenta significativamente en los animales Pro durante la primera semana tras la HIC, como refleja la tinción con IB4, lo que indica neovascularización. Por el contrario, este efecto no se aprecia en los ratones Arg (Figura 28). Para confirmar este hallazgo, se realizó una tinción con el marcador específico de células endoteliales CD31 (Figura 29). La cuantificación del área ocupada por vasos sanguíneos, expresada como porcentaje de señal CD31<sup>+</sup>, en el hemisferio dañado a los 7 días tras la HIC mostró diferencias significativas entre ambos genotipos. Por tanto, nuestros resultados demuestran que la variante Pro está asociada a una mayor capacidad de neovascularización que la variante Arg tras la HIC.



**Figura 29. Impacto del polimorfismo Arg72Pro de Tp53 sobre la vascularización (CD31) en la zona perihematoma en ratones Klp53 sometidos a HIC.** Ratones Klp53 que expresan las variantes humanas Arg y Pro de p53 se sometieron a HIC experimental. Secciones cerebrales se tiñeron con el marcador endotelial CD31 (verde), se tomaron microfotografías y se cuantificó la fluorescencia. Los valores se expresan como media  $\pm$  S.E.M. (n=3-4 ratones por grupo) \*p<0,05 respecto a ratones Klp53 Pro.

Finalmente, confirmamos la neovascularización mediante la identificación de la formación de nuevos vasos (neovascularización) con el marcaje IB4<sup>+</sup>/Iba1<sup>-</sup> (Wälchli *et al.*, 2015) en la zona peri-hematoma de ratones Klp53 que expresan la variante Pro, a los 7 días tras la HIC experimental (Figura 30).

Por tanto, la variante polimórfica Pro promueve la vascularización tras la HIC lo que, a su vez, favorece la reparación cerebral y, en consecuencia, el pronóstico funcional de pacientes de ictus hemorrágico.



**Figura 30. Neovascularización en animales *Klp53* que portan la variante *Pro* sometidos a HIC.** Ratones *Klp53* que expresan la variante humana *Pro* de *p53* se sometieron a HIC experimental. Secciones cerebrales se tiñeron con el marcador endotelial isolectina-B4, IB4 (verde), y el marcador nuclear TO-PRO®-3 (morado) a los 7 días tras la HIC. Las flechas blancas indican la formación de nuevos vasos.





## **DISCUSIÓN**



Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que el polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* regula el pronóstico funcional de pacientes de HIC (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011). En el presente trabajo de tesis doctoral hemos corroborado dicho efecto y hemos desenmascarado el mecanismo implicado. Así, el polimorfismo regula la movilización de EPCs desde la médula ósea y, en consecuencia, la neovascularización del cerebro dañado, lo que condiciona la reparación cerebral y el pronóstico funcional de pacientes de ictus hemorrágico. Por tanto, describimos que el polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* representa un importante biomarcador genético de daño cerebral y pronóstico en la HIC.

Hasta el momento, los modelos pronósticos en la HIC se basan fundamentalmente en factores clínicos y de neuroimagen (Wilson *et al.*, 2014; Van Beijnum *et al.*, 2009; Al-Shahi & Labovitz D, 2009; Leira *et al.*, 2004). Sin embargo, se han realizado numerosos trabajos para establecer biomarcadores genéticos en pronóstico de ictus. En los últimos años, se han caracterizado varios biomarcadores, en su mayoría en sangre periférica, asociados al diagnóstico, estratificación de riesgo y pronóstico funcional en pacientes de HIC, si bien la mayoría de los estudios están orientados a la función de los genes como factores de riesgo (Carpenter *et al.*, 2015). En relación al pronóstico, se ha demostrado la asociación entre la proteína C reactiva (PCR) o el conteo total de leucocitos, y el riesgo de muerte o discapacidad tras una HIC (Kumar *et al.*, 2015). De la misma manera, los cambios en el recuento de leucocitos a las 72 horas de la HIC se han descrito como un marcador pronóstico a los 3 meses (Agnihotri *et al.*, 2011). Un estudio posterior demostró que niveles elevados de neutrófilos en la fase aguda de la HIC se relacionan con un menor riesgo de expansión del hematoma. Contrariamente, el recuento de monocitos (Adeoye *et al.*, 2014) se ha relacionado también con mal pronóstico funcional en modelos animales y humanos de HIC (Morotti *et al.*, 2016). Por tanto, existe una gran controversia. Además, estos hallazgos aún no se han validado, ni se utilizan actualmente en la práctica clínica. Podemos concluir que aún quedan por conocer muchos de los mecanismos que determinan las variaciones funcionales en los pacientes tras la HIC.

La HIC es una enfermedad compleja y multifactorial en la cual las variaciones genéticas pueden influir tanto en la presentación como en la evolución de la misma (Carpenter *et al.*, 2015), lo que justifica la dificultad en la identificación de biomarcadores genéticos de pronóstico de HIC. Existen distintos tipos de estudios para evaluar las causas genéticas del ictus, hasta ahora el abordaje más extendido ha sido el de estudio de gen candidato mediante el cual se seleccionan los genes que podrían asociarse a una enfermedad, basándose principalmente en la fisiopatología y las vías celulares implicadas en la misma (Giralt-Steinhauer *et al.*, 2015). Uno de los problemas de esta técnica de asociación genética es que la hipótesis se genera antes de iniciar el estudio, lo que puede orientar los resultados a ideas preconcebidas del investigador. Este tipo de problema se puede subsanar con distintas herramientas, una de ellas es evitar los sesgos (de selección y de otro tipo), replicar los resultados en otras poblaciones o agrupar distintos resultados y una fundamental es la comprobación de esa asociación con estudios experimentales. En este trabajo se ha realizado el estudio clínico con su correlato experimental, lo cual aporta evidencia del mecanismo implicado en esta asociación. Todo ello hace que el polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* sea un importante marcador genético a tener en cuenta en el pronóstico funcional de pacientes de ictus hemorrágico.

***El alelo Pro de Tp53 se asocia con niveles elevados de EPCs y buen pronóstico funcional tras la hemorragia intracerebral***

La recuperación funcional tras un ictus depende del balance entre el daño cerebral, que incluye apoptosis neuronal entre otros mecanismos (Almeida, 2013), y la activación de la respuesta compensatoria para reparar el daño (Tovar *et al.*, 2016). La neovascularización juega un papel fundamental en los procesos de reparación cerebral, ya que estimula el flujo sanguíneo y el aporte de nutrientes de la zona dañada (Potente *et al.*, 2011; Quaegebeur *et al.*, 2011) induciendo así el remodelado cerebral y mejorando el pronóstico funcional (Krupinski *et al.*, 1994; Ergul *et al.*, 2012), aunque este proceso se inicia de manera retardada para interactuar con la cascada de muerte celular isquémica. La formación de nuevos

vasos desempeña un papel determinante en la recuperación funcional a largo plazo, ya que estimula mecanismos de regeneración endógena como neurogénesis, sinaptogénesis y plasticidad sináptica, todos ellos involucrados en la recuperación cerebral tardía tras una isquemia cerebral. La correlación entre angiogénesis y buen pronóstico funcional tras un ictus se ha observado en estudios clínicos y con modelos animales (Ergul *et al.*, 2012).

Las células precursoras endoteliales CD34<sup>+</sup> se han relacionado con la reparación del endotelio y la neovascularización tras la isquemia cerebral (Asahara, 1997; Griese *et al.*, 2003; Taguchi *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2002). Los resultados de este trabajo confirman que niveles elevados de células endoteliales circulantes CD34<sup>+</sup> (EPCs) a los 7 días del ingreso se asocian con un menor volumen de lesión residual a los 3 meses tras una HIC, lo cual es compatible con una eficiente reparación cerebral (Potente *et al.*, 2011; Quaegebeur *et al.*, 2011) y con un mejor pronóstico funcional (Sobrino *et al.*, 2011). Además, confirmamos que el genotipo *Arg/Arg* es un marcador independiente de mal pronóstico funcional tras una HIC después de ajustar por variables como la edad, tensión arterial, temperatura, volumen del hematoma, extensión ventricular y NIHSS al ingreso, hallazgos concordantes con los descritos previamente en otra cohorte de pacientes de ictus hemorrágico (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011). Es más, la variante polimórfica *Arg* incrementa la susceptibilidad de las neuronas a la apoptosis causada por la HIC *in vivo*, como ya describimos *in vitro* (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011), lo que podría explicar el mal pronóstico funcional de los pacientes a los 3 meses tras la HIC. Por otro lado, en la cohorte de pacientes estudiada, la recuperación funcional a los 3 (corto plazo) y 12 (largo plazo) meses de la HIC sólo se produjo en los pacientes portadores del alelo *Pro*, pero no en los portadores del alelo *Arg* en homocigosis (*Arg/Arg*), lo que sugiere la participación de otros mecanismos, además del daño cerebral, como son procesos de reparación cerebral.

Un retraso en la revascularización del tejido cerebral tras una isquemia representa el principal obstáculo para preservar la función cerebral después de un ictus. Este fenómeno también se ha descrito en retinopatías isquémicas (Moskowitz *et al.*,

2010; Xing *et al.*, 2012). En el presente trabajo demostramos que los pacientes homocigotos *Arg/Arg* presentan una menor capacidad de neovascularización, así como un peor pronóstico funcional tras la HIC, frente a los portadores del alelo *Pro*. La neovascularización no sólo aumenta el flujo cerebral (Potente *et al.*, 2011; Quaegebeur *et al.*, 2011), sino también promueve la migración de macrófagos al área isquémica con la finalidad de eliminar rápidamente los restos necróticos (Krupinski *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 2007). En consecuencia, la formación de vasos sanguíneos está relacionada con la supervivencia a la largo plazo de los pacientes tras un accidente cerebrovascular (Krupinski *et al.*, 1994). Los datos presentados en este trabajo demuestran que las diferencias en los niveles circulantes de EPCs en ambos genotipos pueden ser responsables de los diferentes patrones de recuperación tras la HIC y del pronóstico funcional, de manera que el alelo *Pro* se asocia con mayores niveles de EPCs, menor volumen de la lesión y mejor pronóstico funcional a los 3 meses de la HIC.

***Los pacientes que portan el alelo Pro presentan una mayor movilización de progenitores endoteliales tras la hemorragia intracerebral***

La activación y movilización de células progenitoras desde la médula ósea se induce a través de la producción y liberación de factores angiogénicos, entre los que se encuentran VEGF y Ang-1, en respuesta a la hipoxia tras un accidente cerebrovascular (Asahara *et al.*, 1999; Hattori *et al.*, 2001). Por otra parte, el VEGF y la quimiocina SDF-1 $\alpha$  promueven la migración e incorporación de las EPCs a los tejidos lesionados, favoreciendo su diferenciación y activando las células endoteliales maduras (Bogoslovsky *et al.*, 2011; Potente *et al.*, 2011), contribuyendo todo ello a la neovascularización. Los niveles elevados de los factores de crecimiento VEGF y SDF-1 $\alpha$ , que se encuentran tras una HIC en los pacientes portadores del alelo *Pro*, reflejan una eficiente movilización y reclutamiento de las células progenitoras CD34<sup>+</sup>, incluyendo la población de EPCs, desde la médula ósea a los sitios de lesión vascular. Además de su contribución directa a la formación de nuevos vasos, las EPCs reclutadas al tejido cerebral isquémico también pueden permanecer en el espacio intersticial donde,

mediante la secreción de estas citoquinas y factores de crecimiento, indirectamente promueven la reparación vascular a través de mecanismos paracrinos (Asahara *et al.*, 1999; Hattori *et al.*, 2001). Se ha descrito también que la liberación de SDF-1 $\alpha$  por el tejido cerebral infartado, junto con las EPCs, funciona como un sistema de retroalimentación positiva, ejerciendo un papel quimiotáctico para el reclutamiento de nuevas EPCs (Urbich *et al.*, 2005; Quaegebeur *et al.*, 2011). Todos estos datos indican que esta vía se encuentra activa en los pacientes portadores del alelo *Pro*, lo cual permite una eficiente reparación vascular y cerebral condicionando el buen pronóstico funcional tras una HIC.

Estos resultados demuestran que el polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* modula la activación de factores que activan la liberación de EPCs y la movilización de estas desde la médula ósea, desempeñando, por consiguiente, un papel mediador en la reparación cerebral y recuperación funcional tras la HIC.

### ***La variante polimórfica Pro de Tp53 promueve la neovascularización tras la hemorragia intracerebral***

Para dilucidar el mecanismo responsable de las diferencias en el proceso de neovascularización tras una isquemia cerebral en los individuos *Arg* y *Pro*, nos hemos centrado en resultados anteriores del grupo que muestran que el polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* modula la supervivencia neuronal tras la isquemia *in vitro* (Gómez-Sánchez *et al.*, 2011), hecho que confirmamos en un modelo *in vivo* en este trabajo. La reducción de la vulnerabilidad a la apoptosis tras la HIC observada en las neuronas, se observa también en las células endoteliales de los pacientes portadores del alelo *Pro*. En consecuencia, las células endoteliales sanas, de la misma forma que las de los pacientes *Pro*, producirán más VEGF y SDF-1 $\alpha$  por períodos de tiempo más largos tras la lesión isquémica, tal como se muestra en los datos presentados anteriormente (Quaegebeur *et al.*, 2011), por lo tanto, mejorando la neovascularización. Teniendo en consideración la dificultad para realizar una predicción certera de la evolución de los pacientes (Senn *et al.*, 2014), los resultados aquí reflejados arrojan luz sobre los determinantes que

condicionan la supervivencia y el pronóstico funcional a largo plazo de los pacientes tras una HIC.

En conclusión, este estudio es el primero en demostrar que el alelo *Pro de Tp53* está vinculado a la angiogénesis y a la capacidad de recuperación funcional tras un accidente cerebrovascular. Por tanto, proponemos que el polimorfismo *Arg72Pro de Tp53* puede ser utilizado para la estratificación de pacientes en ensayos clínicos con el fin de predecir el pronóstico funcional tras una HIC. Por otra parte, el mecanismo descrito en el presente trabajo podría estar implicado en el pronóstico de otros procesos patológicos, tales como cáncer enfermedades inflamatorias crónicas incluyendo retinopatías, por lo que es un campo de estudio que merece mayor investigación. Las terapias dirigidas a mejorar la movilización de las EPCs mediada por citoquinas para fomentar la neovascularización podrían ser consideradas como una estrategia para mejorar el pronóstico funcional de los pacientes con genotipo *Arg/Arg* tras la HIC.



## **CONCLUSIONES**



A la vista de los resultados descritos en el presente trabajo de Tesis Doctoral, podemos concluir:

1. El polimorfismo en el exón 4, codón 72 del gen *Tp53* condiciona el pronóstico funcional de pacientes de HIC, lo que le convierte en un factor responsable, al menos en parte, de la variabilidad interindividual asociada a dicha patología.
2. Los pacientes que portan el alelo *Pro* presentan menor volumen residual y daño cerebral tras la HIC que los pacientes con el genotipo *Arg/Arg*, lo que se asocia, a su vez, con un mejor pronóstico funcional de los pacientes que han sufrido una HIC.
3. La variante polimórfica *Pro* de *Tp53* promueve la supervivencia de las células endoteliales en cerebro y, con ello, la liberación de citoquinas, como VEGF y SDF-1 $\alpha$ , lo que provoca el incremento en la movilización de células precursoras endoteliales desde la médula ósea y, en consecuencia, una mejor capacidad de reparación cerebral de los pacientes tras la HIC.
4. La variante *Pro* promueve la neovascularización tras el daño hemorrágico, lo que contribuye a la reparación cerebral y, por tanto, a la recuperación funcional de los pacientes de HIC.

## **CONCLUSIÓN FINAL**

Los resultados del presente trabajo demuestran que el pronóstico funcional de los pacientes que han sufrido una HIC está condicionado por el polimorfismo *Arg72Pro* de *Tp53* a través de un mecanismo que implica diferencias en la susceptibilidad de las células endoteliales al proceso hemorrágico y, en consecuencia, en la liberación de citoquinas que regulan la movilización de EPCs desde la médula ósea, lo que se traduce en la modulación de los niveles de EPCs circulantes. Dicho mecanismo está encaminado a promover la neovascularización y reparación cerebral, mejorando de este modo el pronóstico funcional de los pacientes tras la HIC.



## **BIBLIOGRAFÍA**



Adeoye O., Walsh K., Woo J., Haverbusch M., Moomaw, C., Broderick, J., Kissela B., Kleindorfer D., Flaherty M. & Woo, D. (2014). Peripheral monocyte count is associated with case fatality after intracerebral hemorrhage. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 23, e107–e111.

Agnihotri S., Czap A., Staff I., Fortunato G., & McCullough, L. (2011). Peripheral leukocyte counts and outcomes after intracerebral hemorrhage. *Journal of Neuroinflammation* 8:160.

Almeida A. (2013). Genetic determinants of neuronal vulnerability to apoptosis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, 71–88.

Almeida A., Bolaños J. & Moreno S. (2005). Cdh1/Hct1-APC Is Essential for the Survival of Postmitotic Neurons. *Journal of Neuroscience* 25, 8115–8121.

Al-Shahi Salman R., Moultrie F., Josephson C., Sellar J., Warlow C., Murray G., *et al.* (2012). Untreated clinical course of cerebral cavernous malformations: a prospective, population-based cohort study. *Lancet Neurol* 11, 217–24.

Al-Shahi Salman, R., Labovitz D. & Stapf C. (2009). Spontaneous intracerebral haemorrhage. *BMJ* 339: b2586.

Andersen K., Olsen T., Dehlendorff C., & Kammergaard L. (2009). Hemorrhagic and ischemic strokes compared: Stroke severity, mortality, and risk factors. *Stroke* 40, 2068–2072.

Andjelkovic A., Stamatovic S., & Keep R. (2003). The protective effects of preconditioning on cerebral endothelial cells in vitro. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 23, 1348–1355.

Arenillas J., Sobrino T., Castillo J. & Dávalos A. (2007). The role of angiogenesis in damage and recovery from ischemic stroke. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine* 9, 205–212.

Ariesen M., Claus S., Rinkel G., & Algra A. (2003). Risk factors for intracerebral hemorrhage in the general population: A systematic review. *Stroke* 34, 2060–2065.

Asahara y Kawamoto. (2004). Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 287, C572–C579.

Asahara T. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964–966.

Asahara T., Takahashi T., Masuda H., Kalka C., Chen D., Iwaguro H., *et al.* (1999). VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO Journal* 18, 3964–3972.

Banks J., & Marotta C. (2007). Outcomes validity and reliability of the modified rankin scale: Implications for stroke clinical trials - A literature review and synthesis. *Stroke* 38, 1091–1096.

Beck H. & Plate, K. (2009). Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathologica*, 117, 481–496.

Biffi A., Cortellini L., Nearnberg C., Ayres A., Schwab K., Gilson A., *et al.* (2011). Body mass index and etiology of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 42, 2526–2530.

Biros E., Kohút A., Biros I., Kalina I., Bogyiová E. & Stubna J. (2002). A link between the p53 germ line polymorphisms and white blood cells apoptosis in lung cancer patients. *Lung Cancer* 35, 231–5.

Bogoslovsky T., Chaudhry A., Latour L., Maric D., Luby M., Spatz M., *et al.* (2010). Endothelial progenitor cells correlate with lesion volume and growth in acute stroke. *Neurology* 75, 2059–2062.

Bogoslovsky T., Spatz M., Chaudhry A., Maric D., Luby M., Frank J., & Warach S. (2011). Stromal-Derived Factor-1 $\alpha$  Correlates With Circulating Endothelial Progenitor Cells and With Acute Lesion Volume. *Stroke* 42, 618–625.

Bonafé M., Salvioli S., Barbi C., Trapassi C., Tocco F., Storci G., *et al.* (2004). The different apoptotic potential of the p53 codon 72 alleles increases with age and modulates in vivo ischaemia-induced cell death. *Cell Death and Differentiation* 11, 962–73.

Borlongan C. (2011). Bone marrow stem cell mobilization in stroke: a “bonehead” may be good after all! *Leukemia* 25, 1674–1686.

Boy S., Sauerbruch S., Kraemer M., Schormann T., Schlachetzki F., Schuierer G., Luerding R., Hennemann B., Orso E., Dabringaus A., Winkler J., Bogdahn U., for the RAIS (Regeneration in Acute Ischemic Stroke) Study Group. (2011). Mobilisation of hematopoietic CD34 + precursor cells in patients with acute stroke is safe - results of an open-labeled non randomized phase I/II trial. *PLoS ONE* 6, 4–13.

Broderick J., Brott T., Duldner J., Tomsick T., & Huster G. (1993). Volume of Intracerebral Hemorrhage A Powerful and Easy-to-Use Predictor of 30-Day Mortality. *Stroke* 24, 987–93.

Brott T., Thalinger K., & Hertzberg V. (1986). Hypertension as a risk factor for spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 17, 1078–83.

Broughton B., Reutens D., & Sobey C. (2009). Apoptotic mechanism after cerebral ischemia. *Stroke* 40, e331-e339.

Butcher K., Christensen S., Parsons M., De Silva, D., Ebinger M., Levi C., *et al.* (2010). Postthrombolysis blood pressure elevation is associated with hemorrhagic transformation. *Stroke* 41, 72–77.



- Carmeliet P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine* 9, 653–660.
- Carpenter A., Singh I., Gandhi C., & Prestigiacomo C. (2015). Genetic risk factors for spontaneous intracerebral haemorrhage. *Nature Reviews. Neurology* 12, 40–49.
- Charidimou A., Shakeshaft C., & Werring D. J. (2012). Cerebral microbleeds on magnetic resonance imaging and anticoagulant-associated intracerebral hemorrhage risk. *Frontiers in Neurology* 3, 1–13.
- Clark W., Gunion-Rinker L., Lessov N., & Hazel K. (1998). Citicoline treatment for experimental intracerebral hemorrhage in mice. *Stroke* 2136–2140.
- Crumrine, R., Thomas A., & Morgan, P. (1994). Attenuation of p53 expression protects against focal ischemic damage in transgenic mice. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 14, 887–891.
- Culmsee C., & Mattson, M P. (2005). P53 in Neuronal Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331, 761–777.
- Dar A., Goichberg P., Shinder V., Kalinkovich A., Kollet O., Netzer N., *et al.* (2005). Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nature Immunology* 6, 1038–1046.
- Demchuk A., Dowlatshahi D., Rodriguez-Luna D., Molina C., Blas Y., Dzialowski I., *et al.* (2012). Prediction of haematoma growth and outcome in patients with intracerebral haemorrhage using the CT-angiography spot sign (PREDICT): A prospective observational study. *The Lancet Neurology* 11, 307–314.
- Devan W., Falcone, G., Anderson, C., Jagiella J., Schmidt H., Hansen, B., *et al.* (2013). Heritability estimates identify a substantial genetic contribution to risk and outcome of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 44, 1578–1583.
- Domingues R., Rossi C., & Cordonnier C. (2014). Classification of Intracerebral Haemorrhages. *European Neurological Review* 9, 129–135.
- Dzietko M., Derugin N., Wendland M., Vexler Z., & Ferriero D. (2013). Delayed VEGF Treatment Enhances Angiogenesis and Recovery After Neonatal Focal Rodent Stroke. *Translational Stroke Research* 4, 189–200.
- Ergul A., Alhusban A., & Fagan, S. (2012). Angiogenesis: A harmonized target for recovery after stroke. *Stroke* 43, 2270–2274.
- Fadini G., Losordo D., & Dimmeler S. (2012). Critical reevaluation of endothelial progenitor cell phenotypes for therapeutic and diagnostic use. *Circulation Research* 110, 624–637.

Falcone G., Biffi A., Devan W., Brouwers H., Anderson C., Valant V., *et al.* (2013). Burden of blood pressure-related alleles is associated with larger hematoma volume and worse outcome in intracerebral hemorrhage. *Stroke* 44, 321–326.

Falcone G., Radmanesh F., Brouwers H., Battey T., Devan W., Valant V., *et al.* (2014). APOE epsilon variants increase risk of warfarin-related intracerebral hemorrhage. *Neurology* 83, 1139–1146.

Fan Y., Shen F., Frenzel T., Zhu W., Ye J., Liu J., *et al.* Y. (2010). Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice. *Annals of Neurology* 67, 488–497.

Feldmann E., Broderick J., Kernan W., Viscoli C., Brass L., Brott T., *et al.* (2005). Major Risk Factors for Intracerebral Hemorrhage in the Young Are Modifiable. *Stroke* 36, 1881–1885.

Fernández-Solà, J. (2005). Consumo de alcohol y riesgo cardiovascular. *Hipertensión y Riesgo Vascular* 22, 117–132.

Flaherty M., Kissela B., Woo D., Kleindorfer D., Alwell K., Sekar P., Moomaw C., Haverbusch, Broderick, J. (2007). The increasing incidence of anticoagulant-associated intracerebral hemorrhage. *Neurology* 68, 116–121.

Giralt-Steinhauer E, Jiménez-Conde J, Soriano C, Mola M, Rodríguez-Campello A, Cuadrado-Godia E, *et al.* (2015). Aproximación al conocimiento de las bases genéticas del ictus. Consorcio español de genética del ictus. *Neurología* 29, 560–566.

Gómez-Sánchez, J.C., Delgado-Esteban M., Rodriguez-Hernandez I., Sobrino T., Pérez de la Ossa N., Reverte S., *et al.* (2011). The human Tp53 Arg72Pro polymorphism explains different functional prognosis in stroke. *The Journal of Experimental Medicine* 208, 429–37.

Gong C., Boulis N., Qian J., Turner D., Hoff J., & Keep R. (2001). Intracerebral hemorrhage-induced neuronal death. *Neurosurgery* 48, 875–883.

Greenberg D., & Jin K. (2005). From angiogenesis to neuropathology. *Nature* 438, 954–959.

Greenberg, D., & Jin K. (2013). Vascular endothelial growth factors (VEGFs) and stroke. *Cellular and Molecular Life Sciences* 70, 1753–1761.

Griese D., Ehsan A., Melo L., Kong D., Zhang L., Mann M., *et al.* (2003). Isolation and Transplantation of Autologous Circulating Endothelial Cells into Denuded Vessels and Prosthetic Grafts: Implications for Cell-Based Vascular Therapy. *Circulation* 108, 2710–2715.

Hackam D., Woodward M., Newby L., Bhatt D., Shao M., Smith E., et al (2011). Statins and intracerebral hemorrhage: Collaborative systematic review and meta-analysis. *Circulation* 124, 2233–2242.

Hagii J., Tomita H., Metoki N., Saito S., Shioto H., Hitomi H., et al. (2014). Characteristics of Intracerebral Hemorrhage During Rivaroxaban Treatment: Comparison With Those During Warfarin. *Stroke* 45, 2805–2807.

Hankey G. (2014). Intracranial Hemorrhage and Novel Anticoagulants for Atrial Fibrillation: What Have We Learned? *Current Cardiology Reports* 16, 480.

Harrigan M. (2003). Angiogenic factors in the central nervous system. *Neurosurgery* 53, 639–661.

Hattori K., Dias S., Heissig B., Hackett N., Lyden D., Tateno M., et al. (2001). Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *The Journal of Experimental Medicine* 193, 1005–1014.

Hayashi T., Noshita N., Sugawara T., & Chan P. (2003). Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *Journal Cerebral Blood Flow Metabolism* 2, 166–180.

Hemphill J., Greenberg, S., Anderson, C., Becker K., Bendok B., Cushman M., et al. (2015). Guidelines for the Management of Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* 46, 2032-2060.

Horne M., Flemming K. D., Su, I., Stapf C., Jeon J., Li D., et al. (2016). Clinical course of untreated cerebral cavernous malformations: a meta-analysis of individual patient data. *The Lancet Neurology* 15, 166–173.

Ikram M., Wieberdink R., & Koudstaal P. (2012). International epidemiology of intracerebral hemorrhage. *Current Atherosclerosis Reports* 14, 300–306.

Jin S. & Levine A. (2001). The p53 functional circuit. *Journal of Cell Science* 114, 4139–4140.

Kanzler I., Tuchscheerer N., Steffens G., Simsekylmaz S., Konschalla S., Kroh A., et al. (2013). Differential roles of angiogenic chemokines in endothelial progenitor cell-induced angiogenesis. *Basic Research in Cardiology* 108, 310.

Kase C., Furlan A J., Wechsler L., Higashida R., Rowley H., Hart, R., et al. (2001). Cerebral hemorrhage after intra-arterial thrombolysis for ischemic stroke: the PROACT II trial. *Neurology* 57, 1603–1610.

Katz J., & Segal, A. (2005). Incidence and etiology of cerebrovascular disease in patients with malignancy. *Current Atherosclerosis Reports* 7, 280–288.

Keep R., Hua Y., & Xi G. (2012). Intracerebral haemorrhage: Mechanisms of injury and therapeutic targets. *The Lancet Neurology* 11, 720–731.

Kim H., Al-Shahi Salman R., McCulloch C., Stapf C., & Young, W. (2014). Untreated brain arteriovenous malformation: Patient-level meta-analysis of hemorrhage predictors. *Neurology* 83, 590–597.

Koblizek T., Weiss C., Yancopoulos G., Deutsch U. & Risau W. (1998). Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Current Biology* 8, 529–32.

Kothari R., Brott T., Broderick J., Barsan W., Sauerbeck, L., Zuccarello M., & Khoury J. (1996). The ABCs of measuring intracerebral hemorrhage volumes. *Stroke* 27, 1304–1305.

Krupinski J., Kaluza J., Kumar P., Kumar S., Wang J. (1994). Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* 25, 1794–1798.

Kumar A., Kumar P., Misra S., Sagar R., Kathuria P., Vibha D., *et al.* (2015). Biomarkers to enhance accuracy and precision of prediction of short-term and long-term outcome after spontaneous intracerebral haemorrhage: a study protocol for a prospective cohort study. *BMC Neurology* 15, 136.

Kwak H., So J., Lee S., Kim I., & Koh, G. (1999). Angiopoietin-1 is an apoptosis survival factor for endothelial cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 448, 249–253.

Lazar V., Hazard F., Bertin F., Janin N., Bellet D., & Bressac B. (1993). Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene. *Oncogene* 8, 1703–5.

Lee M., Saver J., Chang K., Liao H., Chang S., & Ovbiagele B. (2010). Impact of microalbuminuria on incident stroke: A meta-analysis. *Stroke* 41, 2625–2631.

Lee S., Lee K., Kim, Y., Kim S., Koh S., & Lee, Y. (2010). Serum VEGF levels in acute ischaemic strokes are correlated with long-term prognosis. *European Journal of Neurology* 17, 45–51.

Leira R., Dávalos A, Silva Y., Gil-Peralta A, Tejada J., Garcia M. & Castillo J. (2004). Early neurologic deterioration in intracerebral hemorrhage: predictors and associated factors. *Neurology* 63, 461–467.

Liman T.G., Endres M. (2012). New Vessels after stroke: postischemic neovascularization and regeneration. *Cerebrovascular Diseases* 33, 492-499.

Lin C., Loh J., Kwan A., & Howng, S. (1999). Spontaneous intracerebral hemorrhage in children. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences* 15, 146–151.

Lovelock C., Cordonnier C., Naka H., Al-Shahi Salman R., Sudlow, C., Sorimachi T., *et al.* (2010). Antithrombotic drug use, cerebral microbleeds, and intracerebral hemorrhage: A systematic review of published and unpublished studies. *Stroke* 41, 1222–1228.

Ma F., Morancho A., Montaner J., & Rosell A. (2015). Endothelial progenitor cells and revascularization following stroke. *Brain Research* 2015.

Manoonkitiwongsa P., Jackson-Friedman C., McMillan P., Schultz R., & Lyden P. (2001). Angiogenesis after stroke is correlated with increased numbers of macrophages: the clean-up hypothesis. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 21, 1223–1231.

Matlashewski G., Lamb P., Pim D., Peacock J., Crawford L., & Benchimol, S. (1984). Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene. *The EMBO Journal* 3, 3257–3262.

Matsushita K., Meng W., Wang X., Asahi M., Asahi K., Moskowitz M., & Lo E. (2000). Evidence for apoptosis after intercerebral hemorrhage in rat striatum. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 20, 396–404.

Memet B., Rudinskaya A., Krebs T., & Oelberg D. (2005). Wegener Granulomatosis With Massive Intracerebral Hemorrhage. *Journal of Clinical Rheumatology* 11, 314–318.

Mohr, J., Parides, S., Stapf C., Moquete E., Moy C., Overbey J., *et al.* (2014). Medical management with or without interventional therapy for unruptured brain arteriovenous malformations (ARUBA): A multicentre, non-blinded, randomised trial. *The Lancet* 383, 614–621.

Morotti A., Phuah C., Anderson C., Jessel M., Schwab K., Ayres A. M., *et al.* (2016). Leukocyte Count and Intracerebral Hemorrhage Expansion. *Stroke* 47, 1473–1478.

Moskowitz M., Lo E., & Ladecola C. (2010). The science of stroke: Mechanisms in search of treatments. *Neuron* 67, 181–198.

Moskowitz S., Calabrese L., & Weil R. (2007). Benign angiopathy of the central nervous system presenting with intracerebral hemorrhage. *Surgical Neurology* 67, 522–527.

Moubarik C., Guillet B., Youssef B., Codaccioni J., Piercecchi M., Sabatier F., *et al.* (2011). Transplanted Late Outgrowth Endothelial Progenitor Cells as Cell Therapy Product for Stroke. *Stem Cell Reviews and Reports* 7, 208–220.

Mracsko E., & Veltkamp R. (2014). Neuroinflammation after intracerebral hemorrhage. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8, 388.

Navarro-Sobrino M., Rosell A., Hernandez-Guillamon M., Peñalba A., Ribó M., Álvarez-Sabín J., & Montaner J. (2010). Mobilization, endothelial differentiation and functional capacity of endothelial progenitor cells after ischemic stroke. *Microvascular Research* 80, 317–323.

O'Donnell M., Denis X., Liu L., Zhang H., Chin S., *et al.* (2010). Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): A case-control study. *The Lancet* 376, 112–123.

Ohab J. & Carmichael S. (2008). Poststroke Neurogenesis: Emerging Principles of Migration and Localization of Immature Neurons. *The Neuroscientist* 14, 369–380.

Ohab J., Fleming S., Blesch A. & Carmichael, S. (2006). A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *Journal of Neuroscience* 26, 13007–13016.

Ohta T., Kikuta K. I., Imamura H., Takagi Y., Nishimura M., Arakawa Y., *et al.* (2006). Administration of ex vivo-expanded bone marrow-derived endothelial progenitor cells attenuates focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Neurosurgery* 59, 679–685.

Paczkowska E., Kucia M., Koziarska D., Halasa M., Safranow K., Masiuk M., *et al.* (2009). Clinical evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood in patients after stroke. *Stroke* 40, 1237–1244.

Pezzini A., Grassi M., Paciaroni M., Zini A., Silvestrelli G., Zotto E, *et al.* (2014). Antithrombotic medications and the etiology of intracerebral hemorrhage MUCH-Italy. *Neurology* 82, 529–535.

Pietsch E., Humbey O. & Murphy M. (2006). Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene* 25(11), 1602–1611.

Poon M., Bell S. & Al-Shahi Salman R. (2015). Epidemiology of Intracerebral Haemorrhage. *Frontiers of Neurology and Neuroscience* 37, 1–12.

Poon M., Fonville A., & Al-Shahi Salman R. (2014). Long-term prognosis after intracerebral haemorrhage: systematic review and meta-analysis. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 85, 660–7.

Poppe A., Majumdar S., Jeerakathil T., Ghali W., Buchan A., & Hill M. (2009). Admission Hyperglycemia Predicts a Worse Outcome in Stroke Patients Treated With Intravenous Thrombolysis. *Diabetes Care* 32, 617–622.

Potente M., Gerhardt H., & Carmeliet P. (2011). Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell* 146, 873–887.

Quaegebeur A., Lange C. & Carmeliet P. (2011). The neurovascular link in health and disease: Molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron* 71, 406–424.

Quintana-Cabrera R., Fernández-Fernández S., Bobo-Jimenez V., Escobar J., Sastre J., Almeida A. & Bolaños J. (2012).  $\gamma$ -Glutamylcysteine detoxifies reactive oxygen species by acting as glutathione peroxidase-1 cofactor. *Nature Communications* 3, 718.

Qureshi A, Mendelow A & Hanley D. (2009). Intracerebral haemorrhage. *Lancet* 373, 1632–1644.

Qureshi A, Stanley T, Broderick J, Batjer H, Hondo H. & Hanley D. (2001). Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. *New England Journal of Medicine* 344, 1450–1460.

Qureshi A., Suri M., Ostrow P., Kim S., Ali Z., Shatla A., *et al.* (2003). Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage. *Neurosurgery* 52, 1041–1048.

Rodríguez-Yáñez M., Castellanos M., Freijó M., López Fernández J., Martí-Fábregas J., Nombela F., *et al.* (2013). Guías de actuación clínica en la hemorragia intracerebral. *Neurología* 28, 236–249.

Rogers L. (2003). Cerebrovascular complications in cancer patients. *Neurologic Clinics*, 21, 167–192.

Rønning P., Sorteberg W., Nakstad P., Russell D., & Helseth E. (2008). Aspects of intracerebral hematomas - An update. *Acta Neurologica Scandinavica* 118, 347–361.

Rose D., Guerrero W., Mokin M., Gooch, C., Bozeman A., Pearson, J. & Burgin, W. (2015). Hemorrhagic stroke following use of the synthetic marijuana “spice”. *Neurology* 85, 1177–1179.

Rosell A., Morancho A., Navarro-Sobrino M., Martínez-Saez E., Hernández-Guillamon M., Lope-Piedrafita S., *et al.* (2013). Factors Secreted by Endothelial Progenitor Cells Enhance Neurorepair Responses after Cerebral Ischemia in Mice. *PLoS ONE* 8, 1–10.

Ruff C., Giugliano R., Braunwald E., Hoffman E., Deenadayalu N., Ezekowitz M. *et al.* (2014). Comparison of the efficacy and safety of new oral anticoagulants with warfarin in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomised trials. *The Lancet* 383, 955–962.

Saito A., Hayashi T., Okuno S., Nishi T. & Chan P. (2005). Modulation of p53 degradation via MDM2-mediated ubiquitylation and the ubiquitin-proteasome system during reperfusion after stroke: role of oxidative stress. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 25, 267–280.

Sakamuro D., Sabbatini P., White E. & Prendergast G. (1997). The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. *Oncogene* 15, 887–898.

Senn R., Elkind M., Montaner J., Christ-Crain M. & Katan M. (2014). Potential role of blood biomarkers in the management of nontraumatic intracerebral hemorrhage. *Cerebrovascular Diseases* 38, 395–409.

Shoamanesh A., Kwok C. & Benavente O. (2011). Cerebral microbleeds: Histopathological correlation of neuroimaging. *Cerebrovascular Diseases* 32, 528–534.

Sobrino T., & Arias S., Pérez-Mato M., Agulla J., Brea D., Rodríguez-Yañez M. & Castillo J. (2011). Cd34 +progenitor cells likely are involved in the good functional recovery after intracerebral hemorrhage in humans. *Journal of Neuroscience Research* 89, 979–985.

Sobrinho T., Arias S., Rodríguez-González R., Brea D., Silva Y., de la Ossa N., *et al.* (2009). High serum levels of growth factors are associated with good outcome in intracerebral hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 29, 1968–1974.

Sobrinho T., Hurtado O., Moro M., Rodríguez-Yañez M., Castellanos M., Brea D., *et al.* (2007). The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke* 38(10), 2759–2764.

Steiner T, Al-Shahi Salman R, Beer R, Christensen H, Cordonnier C, Csiba L., *et al.* (2014). European Stroke Organisation (ESO) guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage. *International Journal of Stroke* 9, 840–855.

Suri C., Jones P., Patan S., Bartunkova S., Maisonpierre P., Davis S., *et al.* (1996). Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell* 87, 1171–1180.

Taguchi A., Matsuyama T., Moriwaki H., Hayashi T., Hayashida K., Nagatsuka K., *et al.* (2004). Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* 109, 2972–2975.

Takahashi T., Kalka C., Masuda H., Chen D., Silver M., Kearney M., *et al.* (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature Medicine* 5, 434–438.

Takebayashi S. (1985). Ultrastructural morphometry of hypertensive medial damage in lenticulostriate and other arteries. *Stroke* 16, 449–53.

Takebayashi S., & Kaneko M. (1983). Electron-Microscopic Studies of Ruptured Arteries in Hypertensive Intracerebral Hemorrhage. *Stroke* 14, 28–36.

Thanvi B., Sprigg S., Munshi S. (2012). Advances in spontaneous intracerebral haemorrhage. *International Journal of Clinical Practice* 66, 556–564.

The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (NINDS). (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *New England Journal of Medicine* 333, 1581–1587.

Thompson A., Kosior, J., Gladstone, D., Hopyan, J., Symons, S., Romero, F., *et al.* (2009). Defining the CT Angiography “Spot Sign” in Primary Intracerebral Hemorrhage. *Canadian Journal Neurological Science* 36, 456-61.

Tovar-Y-Romo L., Penagos-Puig A. & Ramírez-Jarquín J. (2016). Endogenous recovery after brain damage: Molecular mechanisms that balance neuronal life/death fate. *Journal of Neurochemistry* 136, 13–27.

van Asch C., Luitse M., Rinkel G., van der Tweel I., Algra A. & Klijn, C. (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. *The Lancet Neurology* 9, 167–176.

Van Beijnum, J., Lovelock, C. E., Cordonnier, C., Rothwell, P. M., Klijn, C. J. M., Al-Shahi Salman, R., *et al.* (2009). Outcome after spontaneous and arteriovenous malformation-related intracerebral haemorrhage: Population-based studies. *Brain* 132, 537–543.

Wada R., Aviv, R., Fox A., Sahlas D., Gladstone D., Tomlinson G., & Symons S. (2007). CT angiography “spot sign” predicts hematoma expansion in acute intracerebral hemorrhage. *Stroke* 38, 1257–1262.

Wang Q. & Tuhim S. (2012). Etiologies of Intracerebral Hematomas. *Current Atherosclerosis Reports* 14, 314–321.

Wang X., Dong Y., Qi X., Huang C. & Hou L. (2013). Cholesterol Levels and Risk of Hemorrhagic Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Stroke* 44, 1833.

Wilson D., Charidimou A., Shakeshaft C., Ambler G., White M., Cohen H., *et al.* (2016). Volume and functional outcome of intracerebral hemorrhage according to oral anticoagulant type. *Neurology* 86, 360–366.

Wilson D., Charidimou A. & Werring D. J. (2014). Advances in understanding spontaneous intracerebral hemorrhage: insights from neuroimaging. *Expert Review of Neurotherapeutics* 14, 661–78.

Wityk R., Pessin, M., Kaplan, R., & Caplan, L. (1994). Serial assessment of acute stroke using the NIH Stroke Scale. *Stroke* 25, 362–365.

Witzenbichler B., Maisonpierre P., Jones P., Yancopoulos G., & Isner, J. (1998). Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. *Journal of Biological Chemistry* 273, 18514–18521.

Wolfe C., Taub N., Woodrow E. & Burney P. (1991). Assessment of scales of disability and handicap for stroke patients. *Stroke* 22, 1242–4.

Xi G., Keep R., Hoff J. (2006). Mechanisms of brain injury after intracerebral haemorrhage. *Lancet Neurology* 5, 53–63.

Xi G., Reiser G. & Keep R. (2003). The role of thrombin and thrombin receptors in ischemic, hemorrhagic and traumatic brain injury: Deleterious or protective? *Journal of Neurochemistry* 84, 3–9.

Xing C., Hayakawa K., Lok J., Arai K. & Lo E. (2012). Injury and repair in the neurovascular unit. *Neurological Research* 34, 325–30.

Yamaguchi J., Kusano K., Masuo O., Kawamoto A., Silver M., Murasawa S., *et al.* (2003). Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 107, 1322–1328.

Yip H., Chang L., Chang W., Lu C., Liou C., Lan M., *et al.* (2008). Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke. *Stroke* 39, 69–74.

Yu S., Friedman B., Cheng Q. & Lyden P. (2007). Stroke-evoked angiogenesis results in a transient population of microvessels. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 27, 755–763.

Zhang Y., Tuomilehto J., Jousilahti P., Wang Y., Antikainen R. & Hu G. (2011). Lifestyle Factors on the Risks of Ischemic and Hemorrhagic Stroke. *Archives of Internal Medicine* 171, 1811–1818.

Zhang Z., Zhang L., Jiang Q. & Chopp M. (2002). Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circulation Research* 90, 284–288.

Zhang Z., Zhang L., Tsang W., Soltanian-Zadeh H., Morris D., Zhang R., *et al.* (2002). Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22, 379–392.

Zhou H., Tang T., Guo C., Zhang H., Zhong J., Zheng J., *et al.* (2008). Expression of Angiopoietin-1 and the receptor Tie-2 mRNA in rat brains following intracerebral hemorrhage. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 68, 147–154.

Zhu F., Dollé M., Berton, T., Kuiper, R., Capps C., Espejo A., *et al.* (2010). Mouse models for the p53 R72P polymorphism mimic human phenotypes. *Cancer Research* 70, 5851–5859.

Zubkov A., Mandrekar J., Claassen D., Manno E., Wijidicks E., Rabinstein A., *et al.* (2008). Predictors of Outcome in Warfarin-Related Intracerebral Hemorrhage. *Archives of Neurology* 65, 82–92.