



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

LONGITUD DEL TELÓMERO,

POLIMORFISMOS DE LA TELOMERASA

Y AUTOFAGIA EN EL PRONÓSTICO

FUNCIONAL DE PACIENTES CON ICTUS

TESIS DOCTORAL

Luis López Mesonero 2018

DIRECTORES:

Prof. Dr. ROGELIO GONZÁLEZ SARMIENTO. Catedrático del Departamento de Medicina de la Universidad de Salamanca. Jefe de la Unidad de Medicina Molecular de la Universidad de Salamanca.

Dr. JOSÉ CARLOS GÓMEZ SANCHEZ. Doctor en Medicina. Profesor asociado de Neurología. Universidad de Salamanca.

CERTIFICAN:

Que el trabajo realizado bajo nuestra dirección por D. Luis López Mesonero titulado “LONGITUD DEL TELÓMERO, POLIMORFISMOS DE LA TELOMERASA Y AUTOFAGIA EN EL PRONÓSTICO FUNCIONAL DE PACIENTES CON ICTUS” reúne las condiciones de originalidad requeridas para la obtención del título del grado de Doctor en Medicina.

Y para que así conste a todos los efectos oportunos, firmamos la siguiente certificación en Salamanca a 19 de Julio de 2018.

Fdo: Dr. D. Rogelio González Sarmiento Fdo: Dr. D. José Carlos Gómez Sánchez

AGRADECIMIENTOS

A los directores de este trabajo:

Al Dr. Rogelio González Sarmiento, por la confianza depositada en la realización de este trabajo, por hacerme ver que la investigación es una parte fundamental de un clínico, y por su motivación para que viese posible la compatibilidad entre la clínica y la investigación básica.

Al Dr. José Carlos Gómez Sánchez, porque desde el primer momento me transmitió la ilusión por la neurología, por el trato exquisito a los pacientes, por hacerme ver que cada paciente es importante, y que la investigación traslacional puede ser una realidad en la actividad clínica asistencial.

A Javier Fernández Mateos, por su inestimable ayuda en el laboratorio, siendo al principio un absoluto desconocedor me guió a poder tener autonomía para realizar este trabajo, estando siempre presente en las numerosas e infinitas dudas que se me plantearon.

Al Dr. Julio Pascual, por su sencillez en el trato, por su disponibilidad y cercanía, con el di mis primeros pasos como neurólogo siendo estudiante de medicina, y me hizo ver que la neurología era apasionante y que podía ser mi especialidad.

Al Dr. Juan Francisco Arenillas y Ángel Luis Guerrero, por su trato exquisito, por hacerme sentir parte de su servicio, ejemplos para mí en la superación y en la búsqueda de la perfección desde el trabajo.

Al servicio de Neurología de Salamanca, crecí como persona y como neurólogo durante 4 años haciendo la residencia y en esta segunda etapa cada día aprendo con la ayuda de mis compañeros a seguir creciendo y disfrutar cada día de la neurología.

A las enfermeras de la quinta planta derecha, parte fundamental en este trabajo, por su disponibilidad incuestionable, y por hacer que el trabajo durante mi residencia fuera mucho más fácil.

A mis amigos, los “pitis”, es difícil imaginar unos amigos mejores, por suerte no me hace falta porque sé que son inigualables, a pesar de la distancia están a mi lado como desde el primer día.

A mis padres y a mi hermana por su apoyo diario en todo. Por su preocupación constante en todas las cosas que hago. A mis padres por enseñarme que la manera de conseguir lo que me proponga es desde el trabajo diario, y por su paciencia e infinitos consejos. Gracias por tanto.

A Sara, cualquier palabra se queda corta para lo que es para mí. Mi mejor amiga, mi mejor compañera de piso, mi mujer, ha hecho que pueda estar escribiendo estas frases, con su paciencia, y entendiendo lo importante que era para mí este trabajo. Con nuestros dos tesoros, Lucía y Pablo, hace que disfrutemos de lo mejor que tengo, una familia insuperable.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	8-42.
1.1. El ictus. Generalidades.....	8-10.
1.2. Envejecimiento celular.....	10-12.
1.3. Ictus y factores pronósticos.....	13-19.
1.4. Papel de los telómeros y de la telomerasa.....	19-33.
a) Regulación de la longitud telomérica.....	20-23.
b) Telómeros, telomerasa y enfermedades humanas.....	24-27.
c) Telómero, aterosclerosis y patología cardiovascular..	28-33.
1.5. Autofagia.	
a) Regulación de la autofagia.....	34-37.
b) Autofagia y enfermedades humanas.....	37-40.
c) Autofagia y patología cerebrovascular.....	41-42.
2. HIPÓTESIS.....	43.
3. OBJETIVOS.....	44.
3.1. Principal.	
3.2. Secundarios.	
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	45-58.
4.1. Diseño y población de estudio.....	45-46.
4.2. Definición de ictus.....	46.
4.3. Variables analizadas.....	46-49.
4.4. Extracción del DNA.....	49-50.

4.5. Medición de la longitud telomérica.....	50-54.
4.6. Análisis de los polimorfismos de la telomerasa TERC-63G>A (rs2293607) / TERT-1327C>T (rs2735940) y de autofagia ATG5/ATG16 (rs2241880).....	54-57.
4.7. Análisis estadístico.....	58.
5. RESULTADOS.....	59-80.
5.1. Descripción de la muestra.	
5.1.1. Características basales de la población.....	59-65.
5.2. Longitud telomérica y pronóstico funcional en pacientes con ictus.....	66.
5.3. Longitud telomérica en el momento del ictus y al año.....	67.
5.4. Relación entre los polimorfismos de la telomerasa y el pronóstico funcional.....	68.
5.5. Relación entre los polimorfismos de autofagia y pronóstico funcional.....	69.
5.6. Características epidemiológicas de los diferentes grupos de estudio.....	70-74.
5.7. Longitud telomérica en los diferentes grupos de estudio.....	75-77.
5.8. Longitud telomérica y factores de riesgo vascular.....	78-79.
5.9. Polimorfismos de telomerasa y autofagia y factores de riesgo vascular.....	80.

6. DISCUSIÓN	81-99.
6.1. Introducción.....	81.
6.2. Análisis de la población estudiada.....	81-82.
6.3. Otras variables del estudio.....	82-86.
6.4. Estudio de la longitud telomérica.....	86-95.
6.4.1. Tamaño del telómero en los diferentes grupos.....	86-89.
6.4.2. Longitud telomérica y pronóstico funcional en los ictus..	90-91.
6.4.3. Longitud telomérica al año.....	91-94.
6.4.4. Longitud telomérica y factores de riesgo.....	94-95.
6.5. Análisis de los polimorfismos de la telomerasa.....	96-98.
6.6. Análisis de los polimorfismos de autofagia.....	98-99.
7. CONCLUSIONES	100-101.
8. BIBLIOGRAFÍA	102-133.

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. El ictus. Generalidades.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el envejecimiento es el conjunto de modificaciones morfológicas y fisiológicas que aparecen como consecuencia de la acción del tiempo sobre los seres vivos, que suponen una disminución de la capacidad de adaptación en cada uno de los órganos, aparatos y sistemas, así como de la capacidad de respuesta a los agentes lesivos que inciden en el individuo (1).

La esperanza de vida del ser humano ha aumentado significativamente en las últimas décadas, un logro en parte atribuible al avance en las políticas de salud pública y del estado de bienestar. De hecho, la esperanza de vida es uno de los indicadores principales que reflejan las políticas sanitarias, sociales y económicas de un país (2) (figura 1.1).

Pero el aumento en la esperanza de vida es también un reto para una sociedad que debe adaptarse a esta nueva realidad. Con el envejecimiento comienzan una serie de procesos de deterioro paulatino de órganos y sus funciones asociadas. Muchas enfermedades se asocian al proceso de envejecimiento: ciertos tipos de demencia, enfermedades articulares, cardíacas, algunos tipos de cáncer, etc, con los consiguientes problemas humanos y gastos socio-sanitarios que esto conlleva. Todo ello ha suscitado un creciente interés de la investigación médica en los mecanismos implicados en el proceso al que llamamos “envejecer”.

En el mundo occidental, la principal causa de mortalidad son enfermedades relacionadas con el aparato cardiocirculatorio, entre las que incluimos los ictus y la cardiopatía isquémica. (figura 1.2) El ictus es una enfermedad edad-dependiente.

Aunque en los últimos años se estaba produciendo una disminución en la incidencia y mortalidad de esta enfermedad, recientemente parece haberse producido una inversión de esa tendencia, en posible relación con el envejecimiento de la población, junto con un mayor conocimiento de los síntomas y mejoría en las herramientas diagnósticas. A pesar del descenso de las tasas globales de muerte por ictus, este trastorno sigue siendo una de las principales causas de muerte y discapacidad (3,4)

Es bien conocido que la incidencia del ictus aumenta con la edad, siendo esta el factor de riesgo más importante; sin embargo, no se conocen con precisión los mecanismos implicados en dicha relación y si los mecanismos del envejecimiento celular intervienen tanto en la incidencia como en el pronóstico de estos trastornos.

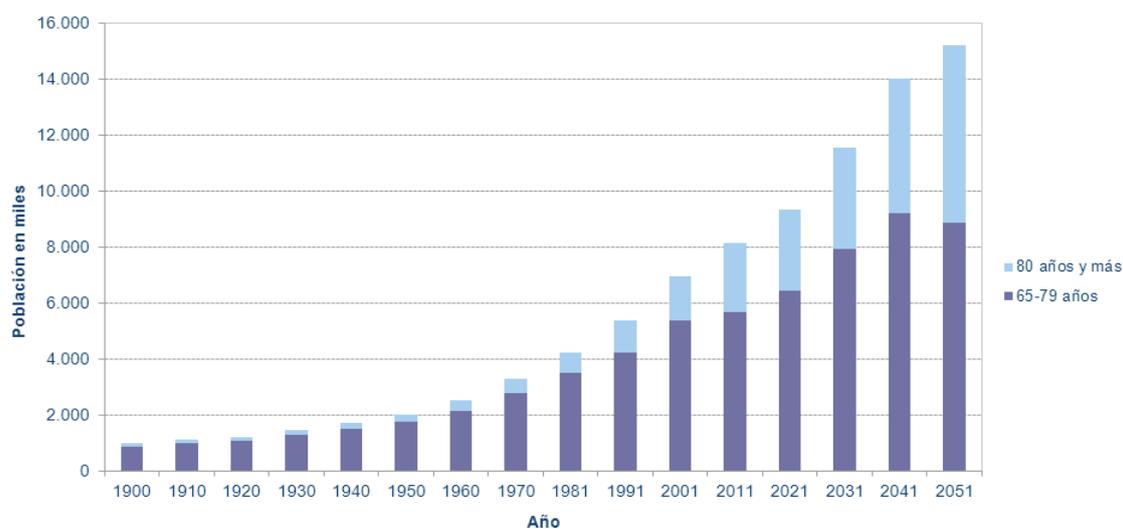


Figura 1.1.- Evolución de la población mayor, 1900-2051

De 1900 a 2011 los datos son reales; de 2021 a 2051 se trata de proyecciones

Fuente: INE: INEBASE:

1900-2001: Cifras de población.

2011: Cifras de población. Resultados nacionales, Censos de Población y Viviendas 2011

2021-2051: Proyecciones de la población a largo plazo. Consulta en enero 2014

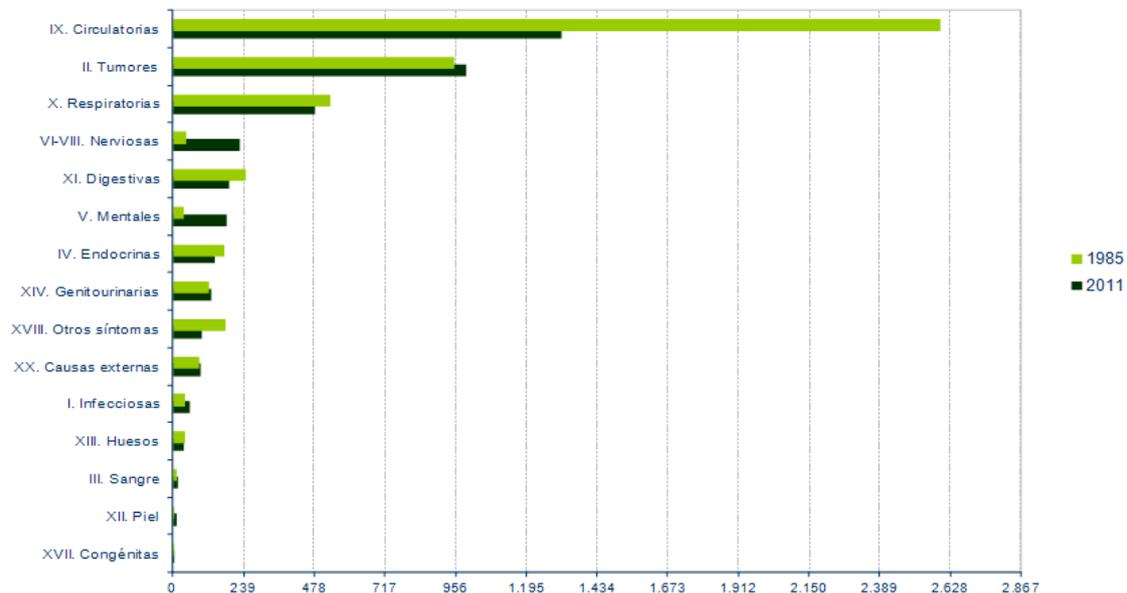


Figura 1.2.- Tasas de defunciones de población de 65 y más años según la causa, 1985 y 2011

Fuente: 2011: INE. INEBASE: Defunciones según la Causa de Muerte. Año 2011

2012: Población total de España obtenida de la Revisión del Padrón municipal de 2012
 1985: INE. INEBASE: Defunciones según causa de muerte 1985. Resultados Nacionales

1.2. Envejecimiento celular:

El envejecimiento puede ser descrito como una pérdida gradual de control en las funciones fisiológicas con el tiempo.

El estudio de aspectos epidemiológicos y biológicos ha generado diferentes teorías acerca de la naturaleza del proceso de envejecimiento general, en el que la teoría del envejecimiento celular ha ganado mayor número de adeptos. Las macromoléculas que conforman nuestro organismo van sufriendo daños que tienden a provocar un deterioro de su función; pero la célula tiene mecanismos de reparación de esas moléculas, de forma que la célula está en constante equilibrio entre la degradación y la reparación. Cuando este equilibrio se hace inestable y el daño es mayor que los procesos de reparación, la capacidad de control de las funciones celulares se deteriora.

En este equilibrio es fundamental el estrés oxidativo que ocurre cuando hay un aumento en la producción de radicales libres y/o una disminución de antioxidantes. El proceso normal de producción de energía en nuestras células, esencial para mantener las funciones vitales, tiene lugar en el interior de las mitocondrias. Sin embargo, de forma colateral, durante este proceso se generan especies reactivas del oxígeno que son compuestos moleculares inestables, extremadamente reactivos que pueden alterar todos los componentes celulares (ácidos nucleicos, proteínas y lípidos) (5)

El DNA contenido en el interior de las mitocondrias está mucho más expuesto al daño oxidativo que el DNA del núcleo, ya que está más próximo a la fuente de los radicales libres de oxígeno (RLO) y está menos protegido, al carecer de histonas (6). Puesto que el DNA mitocondrial codifica sobre todo componentes de la maquinaria de producción de energía, estos componentes acumulan alteraciones que contribuyen a reducir su funcionalidad, lo que produce una disminución de la producción de energía detectable a partir de los 50 años (7). Cuando la producción de energía disminuye por debajo de un umbral, la célula se hace incompetente, desencadenándose el proceso de muerte celular por apoptosis. La pérdida de celularidad contribuye al proceso de envejecimiento general del organismo; de hecho, estudios en animales corroboran una relación entre el nivel de estrés oxidativo y la longevidad. (8)

Durante el envejecimiento los radicales libres de oxígeno inducen errores casuales y acumulativos en macromoléculas provocando disfunción celular y, eventualmente, muerte celular. La mitocondria está implicada en este proceso de envejecimiento ya que está considerada como la principal fuente intracelular de anión superóxido, así como la principal diana de ataque de los radicales de oxígeno. Los RLOs producidos por errores en la cadena respiratoria mitocondrial conducen a errores en el DNA mitocondrial (9,10)

Desde el punto de vista molecular, los radicales libres actúan como potentes agentes oxidantes y son causa de envejecimiento al combinarse con moléculas como el DNA y proteínas, a las cuales desactivan. Los aldehídos, también un producto oxidativo, producen anclajes en el colágeno y otras macromoléculas, y determinan una pérdida de la flexibilidad de los tejidos. Otra consecuencia de la oxidación es la impregnación de órganos vitales por pigmentos del citoplasma celular. Estos pigmentos lipídicos (lipofucsina) aumentan con la edad e interfieren en las funciones celulares (11,12).

De forma paralela se piensa que los RLO están involucrados en procesos patológicos como la aterosclerosis a través de la oxidación de lipoproteínas y que muchos factores de riesgo como la hipertensión arterial y la hipercolesterolemia pueden desencadenar un desequilibrio entre prooxidación y antioxidación, con lo que también cooperarían en las enfermedades asociadas al envejecimiento (13-15).

Numerosos genes vinculados a longevidad y senescencia tienen también impacto en la función vascular, sugiriendo nexos entre el envejecimiento celular, el envejecimiento vascular, el envejecimiento del organismo y la aparición de enfermedades cardiovasculares asociadas con la edad (16).

Se podría considerar la patogenia de las enfermedades edad-dependientes como resultado de múltiples mecanismos interrelacionados; algunos ya conocidos como son el estrés oxidativo o la excitotoxicidad, pero también otros aún desconocidos, entre los que podrían figurar también los mecanismos involucrados en el envejecimiento celular (17-20)

1.3. Ictus y factores pronósticos.

El ictus es una entidad clínica, que se caracteriza por la brusca pérdida de funciones cerebrales focales, resultado de un daño vascular que afecta a un territorio particular. Dicho territorio puede sufrir una brusca interrupción de su perfusión por una oclusión arterial (ictus isquémico) o bien se puede dañar por una extravasación de sangre (ictus hemorrágico).

En el ictus, habitualmente se habla de buen o mal pronóstico en función de la escala de Rankin modificada. Esta escala nos permite utilizar un lenguaje universal y es utilizada como medida clínica y como medida final en ensayos clínicos. Se considera que puntuaciones entre 0-2 suponen un buen pronóstico, pues representan como peor situación una ligera discapacidad con conservación de la independencia. Si se obtiene una puntuación entre 3-6 hablamos de mal pronóstico (figura.1.3) (21-24)

ESCALA MODIFICADA DE RANKIN

Grado	Descripción
0	Sin síntomas
1	No hay discapacidad significativa pese a los síntomas (es capaz de llevar a cabo las actividades que realizaba anteriormente)
2	Ligera discapacidad (incapaz de llevar a cabo todas las tareas que realizaba previamente, pero puede llevar sus asuntos sin asistencia)
3	Discapacidad moderada (requiere alguna ayuda, pero puede caminar sin asistencia)
4	Discapacidad moderadamente severa (incapaz de andar sin asistencia e incapaz de atender sus necesidades corporales sin ayuda)
5	Discapacidad severa (incapaz de levantarse de la cama, incontinente y requiriendo constante atención y asistencia sanitaria)
6	Muerte

Figura 1.3. Escala modificada de Rankin.

A pesar de que en las últimas décadas las tasas de mortalidad por enfermedades cerebrovasculares han descendido notablemente, su carga global sigue siendo muy importante (representa la primera causa de mortalidad en las mujeres, la segunda causa de mortalidad en varones y la tercera de discapacidad), llegando a presentar un mal pronóstico en un 40% de los pacientes (25). La OMS prevé un incremento del 27% en la incidencia de ictus entre los años 2000 y 2025, en relación con el envejecimiento de la población; este dato, junto a la disminución observada en la mortalidad por ictus, plantea un importante problema socioeconómico, al aumentar la prevalencia de la discapacidad asociada al ictus (Figura 1.4) (26)

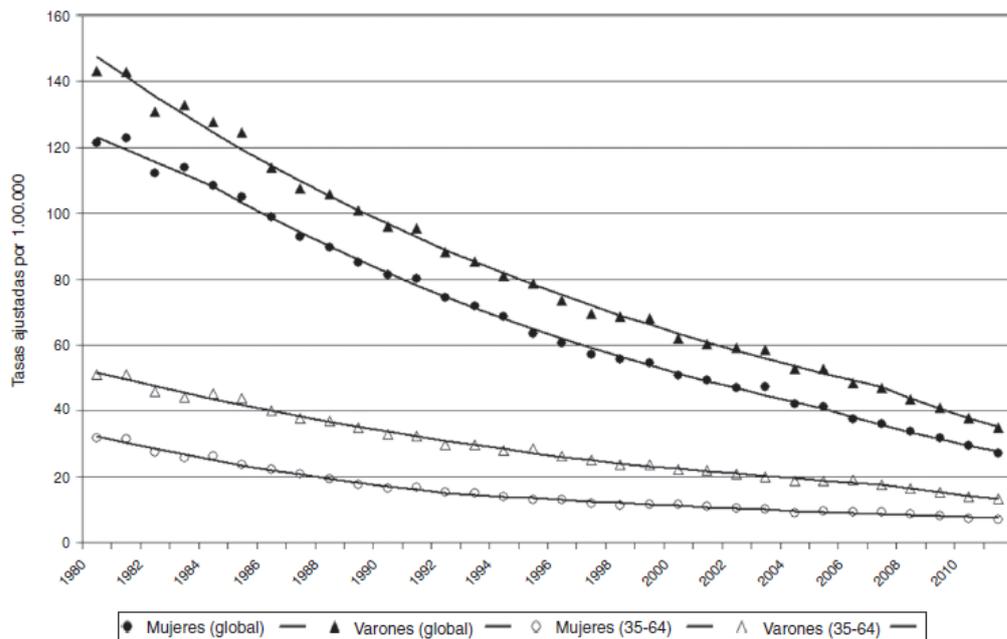


Figura 1.4. Tasas específicas de mortalidad por enfermedades cerebrovasculares según grupos de edad y sexo. España 1980-2011.

El descenso en la mortalidad en los pacientes con enfermedades cardiovasculares puede hacernos pensar que las medidas de prevención primaria y secundaria, junto al tratamiento, sean los responsables de esta mejoría. La implantación del Plan de Atención Sanitaria al Ictus (2007) o la Estrategia Nacional del Ictus (2009) podrían estar contribuyendo a mantener el marcado descenso de la mortalidad observado en el periodo 2005-2011(27).

La hemorragia intracerebral representa únicamente el 10-15% del total de los ictus, pero su mayor mortalidad y discapacidad implica una gran relevancia (28). Su mortalidad es alta: alrededor del 34% en la primera semana, del 50% el primer mes, y del 59% al año (29,30) Los factores clínicos que, de forma más consistente, se han encontrado como predictores de mayor mortalidad son la edad y la magnitud del daño neurológico (estimado por la afectación de la conciencia). Los factores radiológicos como el volumen, la presencia de sangre intraventricular, la localización infratentorial y en ganglios basales se asocian con un peor pronóstico (31,32) .Únicamente el 20% de los pacientes con hemorragia cerebral a los 6 meses son funcionalmente independientes (33).

En los ictus isquémicos hay que hacer algún matiz en cuanto al pronóstico funcional en función de los subtipos etiológicos. Generalmente puede ser producido por tres mecanismos fisiopatológicos diferentes: aterosclerosis, cardioembolismo y enfermedad de pequeño vaso (infartos lacunares). Los pacientes con infartos lacunares tienden a tener un pronóstico más favorable comparando con otros subtipos, sin prácticamente mortalidad intrahospitalaria, con buena recuperación en general y bajo riesgo de recurrencia; aunque en estudios realizados a largo plazo la proporción de pacientes con infarto lacunar que son dependientes a los 3 años es alta (42%) (34).

En los infartos lacunares los factores asociados a un peor pronóstico son la edad, la diabetes y la presentación clínica (35,36). En dos estudios se ha objetivado que la presencia de infartos subcorticales asintomáticos y leucoaraiosis conlleva un peor pronóstico funcional de forma independiente, sugiriendo que la enfermedad de pequeño vaso avanzada puede limitar la posibilidad de recuperación funcional (37,38).

Entre las variables que podemos considerar con capacidad predictiva se encuentran la edad, la magnitud de la afectación neurológica en función de la puntuación de la escala NIHSS (figura 1.5) en el momento del ingreso, la localización, el volumen del infarto (39-41).

La aparición de herramientas terapéuticas específicas, eficaces en el infarto agudo, ha hecho que adquieran también relevancia pronóstica factores como el tratamiento y el tiempo transcurrido hasta la valoración por el neurólogo en el caso de pacientes que sean candidatos a terapias de reperfusión. Se han caracterizado variables predictoras de resistencia a la recanalización que, en general, atañen al potencial fibrinolítico intrínseco del individuo, como el tamaño, la localización y composición del trombo, los factores hemodinámicos como la presión de perfusión del rtPA, y factores radiológicos como la circulación colateral que modifican el pronóstico funcional (42-47)

Category	Score/Description	Date/Time	Date/Time	Date/Time	Date/Time	Date/Time
		Initials	Initials	Initials	Initials	Initials
1a. Level of Consciousness (Alert, drowsy, etc.)	0 = Alert 1 = Drowsy 2 = Stuporous 3 = Coma					
1b. LOC Questions (Month, age)	0 = Answers both correctly 1 = Answers one correctly 2 = Incorrect					
1c. LOC Commands (Open/close eyes, make fist/let go)	0 = Obeys both correctly 1 = Obeys one correctly 2 = Incorrect					
2. Best Gaze (Eyes open - patient follows examiner's finger or face)	0 = Normal 1 = Partial gaze palsy 2 = Forced deviation					
3. Visual Fields (Introduce visual stimulus/threat to pt's visual field quadrants)	0 = No visual loss 1 = Partial Hemianopia 2 = Complete Hemianopia 3 = Bilateral Hemianopia (Blind)					
4. Facial Paresis (Show teeth, raise eyebrows and squeeze eyes shut)	0 = Normal 1 = Minor 2 = Partial 3 = Complete					
5a. Motor Arm - Left 5b. Motor Arm - Right (Elevate arm to 90° if patient is sitting, 45° if supine)	0 = No drift 1 = Drift 2 = Can't resist gravity 3 = No effort against gravity 4 = No movement X = Untestable (Joint fusion or limb amp)	Left				
		Right				
6a. Motor Leg - Left 6b. Motor Leg - Right (Elevate leg 30° with patient supine)	0 = No drift 1 = Drift 2 = Can't resist gravity 3 = No effort against gravity 4 = No movement X = Untestable (Joint fusion or limb amp)	Left				
		Right				
7. Limb Ataxia (Finger-nose, heel down shin)	0 = No ataxia 1 = Present in one limb 2 = Present in two limbs					
8. Sensory (Pin prick to face, arm, trunk, and leg - compare side to side)	0 = Normal 1 = Partial loss 2 = Severe loss					
9. Best Language (Name item, describe a picture and read sentences)	0 = No aphasia 1 = Mild to moderate aphasia 2 = Severe aphasia 3 = Mute					
10. Dysarthria (Evaluate speech clarity by patient repeating listed words)	0 = Normal articulation 1 = Mild to moderate slurring of words 2 = Near to unintelligible or worse X = Intubated or other physical barrier					
11. Extinction and Inattention (Use information from prior testing to identify neglect or double simultaneous stimuli testing)	0 = No neglect 1 = Partial neglect 2 = Complete neglect					
TOTAL SCORE						

Figura 1.5. Escala NIHSS.

Hay que destacar que se han hecho estudios usando TC y RM cerebral buscando correlación entre la localización del infarto y el pronóstico. La escala ASPECTS (The Alberta Stroke Program Early CT Score) es un sistema estandarizado para la interpretación de la TAC en los ictus isquémicos, que divide la circulación anterior en 10 regiones (Figura 1.6). La hipodensidad o falta de diferenciación entre sustancia blanca y sustancia gris se puntúa como 0, mientras que la preservación del parénquima se puntúa como 1.

Un ASPECTS ≥ 7 sugiere un mejor pronóstico con tratamiento trombolítico y terapia de reperfusión endovascular (OR: 82 [95% CI 23-290], $p < 0,001$) (48-51).

Se considera que no todas las regiones valoradas en la escala ASPECTS tienen la misma relevancia como marcador pronóstico ya que que las regiones M4 izquierda (frontal superior, OR, 5.46; 95% CI, 1.47–20.34; $P=0.012$) y M6 derecha (parietal superior, OR, 7.47; 95% CI, 2.07–27.02; $P=0.002$) están relacionadas con peor pronóstico funcional. Hay que considerar las limitaciones que tiene esta escala como predictor del pronóstico, que va a depender en gran medida de que se consiga una temprana recanalización del vaso ocluido con las terapias de reperfusión (52,53).

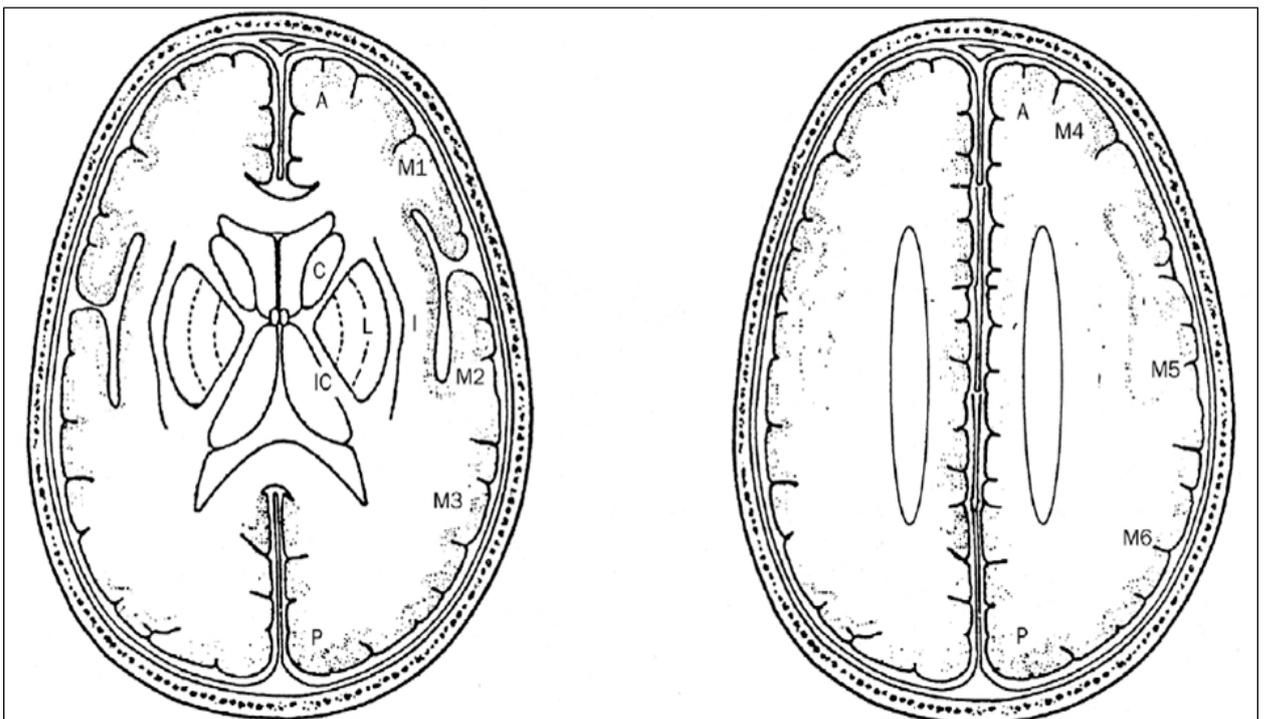


Figura 1.6. Escala ASPECTS. **A:** Circulación anterior; **P:** Circulación posterior; **C:** Caudado; **L:** Lenticular ; **IC:** Cápsula interna; **I:** Insula; **M1:**corteza anterior arteria cerebral media; **M2:** Corteza lateral al ribete insular ; **M3:** corteza posterior arteria cerebral media; M4,M5 y M6 son los territorios anterior, lateral y posterior, inmediatamente superiores a M1, M2 y M3.

A pesar de los datos que disponemos, ante un paciente que acaba de tener un ictus sigue siendo difícil determinar su pronóstico funcional individual a priori, ya que los modelos más amplios, incluyendo todas las variables anteriormente mencionadas con valor pronóstico, sólo explican alrededor del 50% de las variaciones que se dan en la situación funcional (54-57).

1.4. Papel de los telómeros y de la telomerasa:

Los telómeros son estructuras celulares compuestas por repeticiones en tándem de una secuencia de doble cadena de DNA enriquecida en guanina (TTAGGG) localizadas en los extremos de los cromosomas de las células eucariotas. Su función es esencialmente protectora de las agresiones naturales que sufren las moléculas de DNA tras completarse cada ciclo de replicación (58). Regulan la expresión génica, participan en la replicación completa de los cromosomas y los protegen de la degradación por las nucleasas (59).

Los telómeros desempeñan un papel muy importante en el mantenimiento de la estabilidad genómica y su funcionamiento anómalo tiene un enorme impacto en procesos como el envejecimiento o el cáncer. Su función protectora ya fue descrita en 1939 por Bárbara McClintock y Hermann Müller quienes observaron que los extremos de los cromosomas son cruciales para la transmisión de la información genética a las células hijas durante el proceso de división celular (60,61). Posteriormente, Hayflick y Harley demostraron que durante la división celular los telómeros se acortan en ausencia de actividad de telomerasa hasta una longitud crítica corta que provoca parada del ciclo celular y senescencia, seguido de apoptosis y muerte celular y, consecuentemente, la degeneración tisular relacionada con el envejecimiento (62,63).

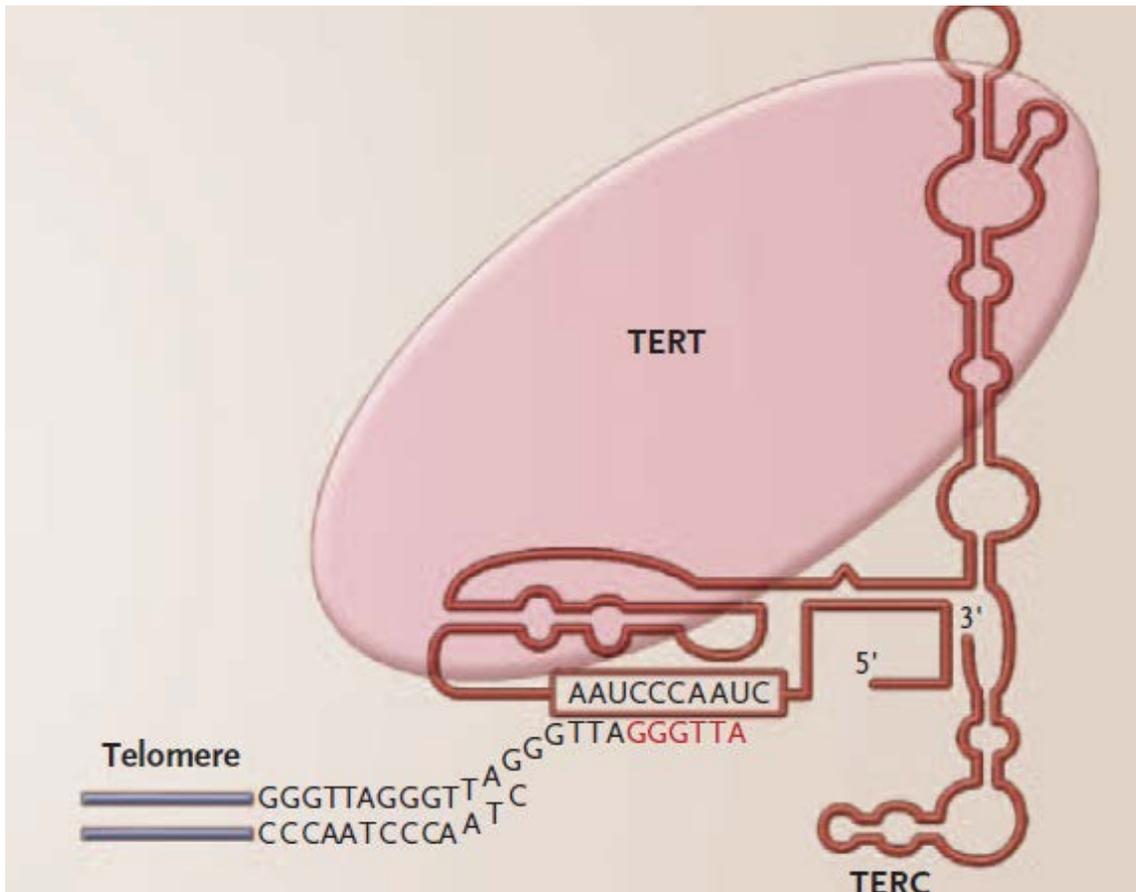


Figura 1.7: Estructura y función de la telomerasa.

Está formada por dos subunidades: una con actividad catalítica de polimerasa reversa, Telomeric End Reverse Transcriptase (TERT) y un fragmento de RNA complementario a las repeticiones teloméricas, Telomerase RNA Component (TERC).

a) **Regulación de la longitud telomérica:**

En 1970 se estableció el concepto de reloj biológico, que plantea que el envejecimiento es un mecanismo programado, de tal manera que las células tendrían un tiempo máximo de supervivencia codificado en el DNA, así como un número de mitosis predeterminadas dependiendo de la estirpe celular a la que pertenezcan (64). Las únicas células que no tendrían esta característica serían las células cancerosas y germinales.

En las células germinales y tejidos con altas tasas de renovación, la telomerasa está activada, asegurando la transmisión de la longitud total del cromosoma en cada división celular (65). En el resto de las células, la longitud de los telómeros es muy variable y en cada ciclo replicativo los telómeros se acortan. Las evidencias acumuladas en los últimos años han llevado a considerar que la longitud de los telómeros está relacionada con la edad de los órganos y de los tejidos.

La telomerasa es una ribonucleoproteína cuya función es la de añadir fragmentos de DNA con la secuencia repetitiva TTAGGG en los extremos de los telómeros para mantener una longitud telomérica estable (66,67). Está formada por una estructura proteica, compuesta por la subunidad catalítica hTERT, un fragmento de RNA complementario a las repeticiones teloméricas, Telomerase RNA Component (TERC) (figura 1.7) y proteínas accesorias específicas.

La transcriptasa inversa (TERT) usa el componente de RNA (TERC) como molde para sintetizar múltiples copias de las secuencias de DNA telomérico y así evitar el acortamiento cromosómico que presenta la actividad catalítica de polimerasa en reverso de DNA (el componente TERT, Telomeric End Reverse Transcriptase) (68,69).

De esta forma, lo que hace es compensar el acortamiento de los telómeros por transcripción inversa usando un RNA intrínseco como molde. Aunque existen mecanismos alternativos, la actividad telomerasa constituye el principal mecanismo regulador de la longitud telomérica (figura 1.8) (70-75).

La longitud del telómero va a depender fundamentalmente de dos factores: la erosión que sufre en cada ciclo celular, que provoca su acortamiento y con ello la relación con procesos de envejecimiento (figura 1.9) y los procesos de mantenimiento estructural a través de la actividad de la telomerasa.

La caracterización de los telómeros como uno de los principales determinantes del envejecimiento, se estableció tras la generación de un ratón con delección genética en homocigosis del componente RNA de la telomerasa (TERC). Presentaban dichos ratones numerosos síntomas de envejecimiento prematuro, lo cual sugería que la actividad telomerasa era uno de los principales determinantes del envejecimiento (76,77).

Por otra parte la generación del ratón K5-TERT, en el que se sobreexpresa en el epitelio estratificado el componente catalítico de la telomerasa mostró que estos ratones mantenían la capacidad homeostática durante más tiempo, las enfermedades asociadas al envejecimiento aparecían más tarde que los ratones control, y presentaban una mayor susceptibilidad a tumores (78,79).

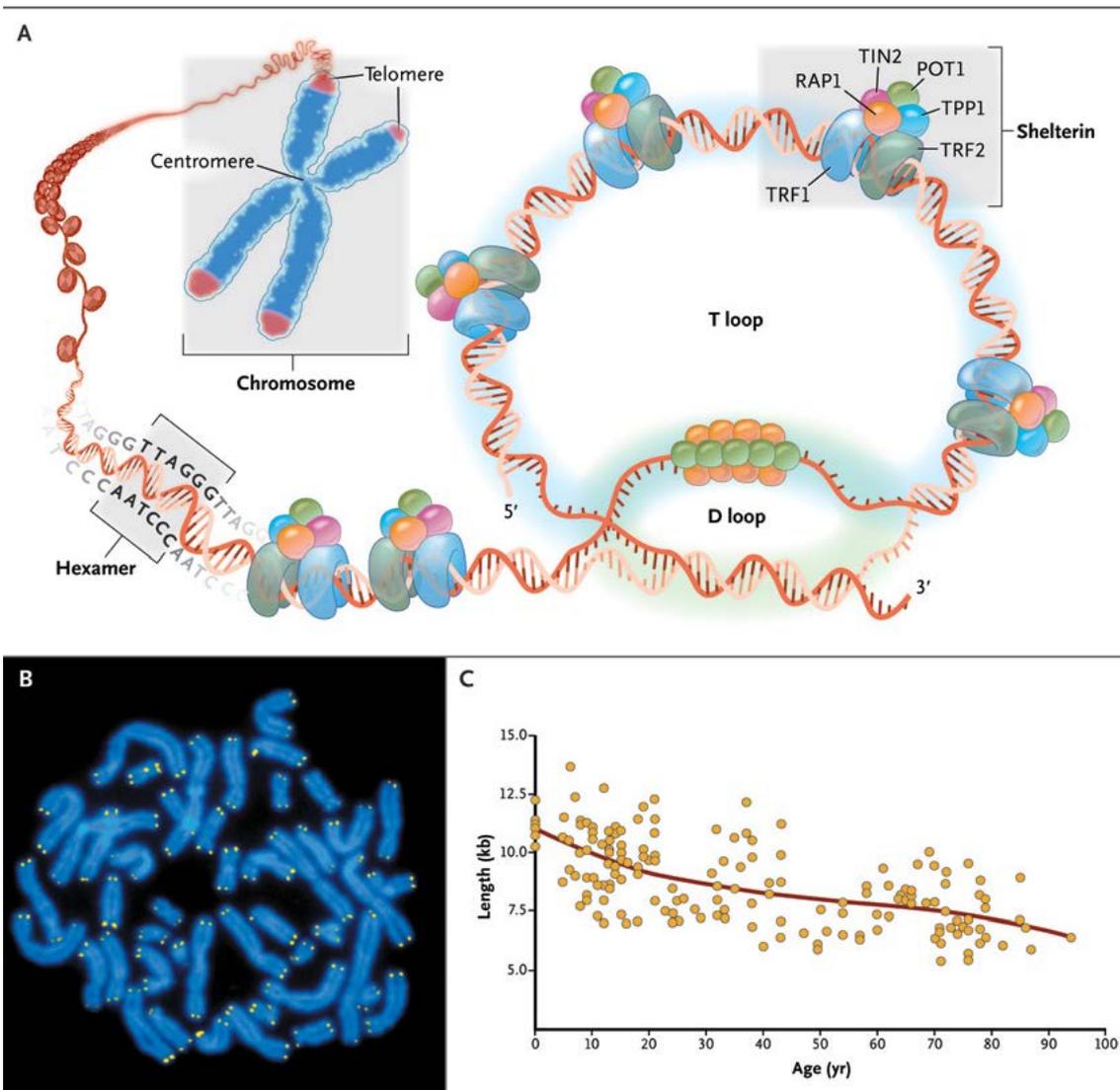


Figura 1.8. A. Telómeros están localizados al final de los cromosomas formados por miles de repeticiones de TTAGGG. Están recubiertos por unas proteínas llamadas shelterinas que se encargan de evitar degradación y favorecer estabilidad.

B. Telómeros en los extremos de los cromosomas visualizados con FISH (*fluorescence hybridization in situ*). Se identifican 4 señales por telómero y es una de las 3 técnicas de visualización. También está el southern-Blott y la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, con la ventaja ésta última de necesitar pequeñas cantidades de DNA.

C. Se identifica que a lo largo de la vida la media del tamaño del telómero va disminuyendo progresivamente.

Tomado de: Calado RT, Young NS. Telomere diseases. N Engl J Med 2009 10;361(24):2353-65.

b) Telómeros, telomerasa y enfermedades humanas:

La implicación de los telómeros en diferentes procesos de envejecimiento celular está fuera de toda duda. El descenso de la longitud telomérica a lo largo de los años también lo está, pero no las diferencias acorde al sexo y a la influencia en diferentes enfermedades (80)

Inicialmente, el complejo telómeros-telomerasa fue relacionado con las enfermedades humanas cuando se detectaron mutaciones en el gen DKC1, que codifica una proteína del complejo de la telomerasa llamada disquerina, en la disqueratosis congénita, una forma rara de aplasia medular (81,82). Entre sus características clínicas se encuentran la leucoplasia oral, la hiperpigmentación cutánea y la atrofia lingual, que suelen aparecer en la primera infancia. Esta enfermedad presenta un aumento de la susceptibilidad a padecer tumores en diferentes localizaciones y su pronóstico viene determinado por la aparición de anemia aplásica en la primera o segunda década de la vida (83).

Tras el descubrimiento de mutaciones en el gen DKC1, presente en el cromosoma X, se descubrieron mutaciones en TERC y TERT, en otras proteínas del complejo telomerasa, y en las shelterinas, todas ellas con implicación en el acortamiento del tamaño telomérico (84,85). Se ha objetivado una relación entre el acortamiento telomérico y el pronóstico funcional de estos pacientes, ya que se ha identificado el tamaño corto del telómero con formas más agresivas de la enfermedad, e incluso formas de presentación más manifiesta en las familias por acortamiento progresivo generación tras generación en las células germinales (86).

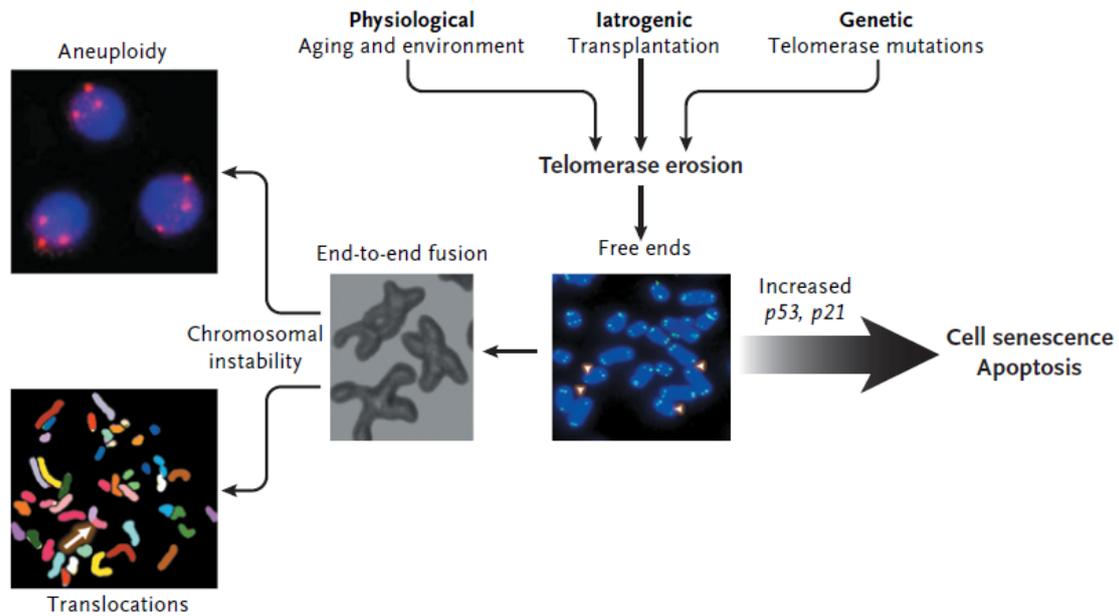


Figura 1.9. Los telómeros se acortan en cada ciclo celular y su erosión es una consecuencia inevitable del envejecimiento fisiológico, de factores iatrogénicos y alteraciones genéticas predisponentes. Si se produce un acortamiento crítico y la célula continua proliferando (ej. Una p53 inactiva) puede producirse inestabilidad cromosómica, translocaciones y aneuploidía.

Tomado de: Calado RT, Young NS. Telomere diseases. N Engl J Med 2009 10;361(24):2353-65

En las enfermedades hematológicas, se identificaron mutaciones en TERT en pacientes con anemia aplásica, objetivándose que un 10% de los pacientes con formas adquiridas de anemia aplásica presentan mutaciones en genes teloméricos (87). Estas mutaciones se asocian con una longitud telomérica menor, especialmente en los leucocitos, así como con una disminución en la actividad de la telomerasa. Los pacientes que presentan telómeros más cortos tienen una médula ósea más hipocelular y en ocasiones se han asociado con fallo del injerto (66).

Hay que hacer especial mención a la fibrosis pulmonar, llegándose a detectar hasta en un 15% en pacientes con fibrosis pulmonar idiopática familiar mutaciones en los genes teloméricos. En formas esporádicas de la enfermedad también se han descrito mutaciones en la telomerasa (88).

Hay que recalcar que en pacientes con fibrosis pulmonar no idiopática no se han detectado mutaciones, aunque si se asocia con acortamiento en el tamaño de los telómeros, lo que hace pensar que existen alteraciones genéticas aún no identificadas (89,90)

También se ha relacionado el acortamiento telomérico con manifestaciones clínicas hepáticas, identificándose mutaciones en TERC y TERT en pacientes con fibrosis, inflamación e hiperplasia nodular regenerativa que conduce a hipertensión portal no cirrótica (91,92).

Hay que destacar que en la disqueratosis congénita se detectan complicaciones pulmonares, como la fibrosis pulmonar, y hepáticas en el curso de la enfermedad, incluso tras el trasplante de médula ósea (93,94). Hay autores que consideran que las enfermedades relacionadas con los telómeros forman parte de un mismo patrón clínico, con genes que determinan el espectro clínico de la disqueratosis congénita y en otros casos actuando sobre órganos diana de forma específica, como en el pulmón (fibrosis pulmonar) o en el hígado.

En cuanto a la relación entre la longitud telomérica y cáncer, en los estudios iniciales no había acuerdo en cuanto a la relación entre la longitud telomérica y cáncer. En los primeros estudios realizados en cáncer colorrectal y neuroblastoma se relacionó su aparición con el acortamiento de los telómeros; sin embargo, en un estudio realizado en diferentes tumores, se objetivó que en hasta un 60% de los tumores no sólo no aparecía un descenso del tamaño telomérico, sino que incluso un aumento (95,96). Con los años han aumentado las evidencias en cuanto a la relación existente entre acortamiento de los telómeros y cáncer, fundamentalmente en cáncer de vejiga, esófago, estómago y renales (97,98). También existen estudios que relacionan la aparición de tumores con mayor longitud telomérica (99-100). Todo ello sugiere que es necesario continuar la investigación en esta línea para sacar conclusiones al respecto (101).

Lo que sí que reflejaban los estudios era que el acortamiento de los telómeros llegaba a un punto crítico que producía inestabilidad cromosómica y ahí es donde puede aparecer la carcinogénesis (102,103).

Con el tiempo, la hipótesis de la pérdida de longitud de los telómeros y el envejecimiento por una parte y la importancia de la activación de la telomerasa en mantener la estabilidad telomérica pero también su relación con el crecimiento tumoral, ha adquirido peso (104,105).

La actividad de la telomerasa generalmente está ausente en cultivos celulares y en tejidos normales. Muchos estudios demuestran actividad de la telomerasa en diferentes cánceres lo que sugería un papel en la transformación tumoral, estudiándose también en lesiones precancerosas (106-110). Otros estudios abogan por un papel de los telómeros para el diagnóstico y como marcador pronóstico (111-114). El mantenimiento del tamaño del telómero se ha visto como un mecanismo para evitar el envejecimiento de las células tumorales y, en la mayoría de los casos, es consecuencia de una reactivación de la actividad telomerasa. No obstante, en ocasiones, se ha observado un acortamiento de los telómeros a pesar de la actividad de la telomerasa (115,116). Incluso en diferentes tipos de sarcoma, se han reportado mecanismos diferentes para mantener el tamaño de los telómeros sin actividad de la telomerasa (117,118).

Se ha seguido analizando tanto el tamaño de los telómeros como la actividad de la telomerasa en los últimos años, dando un paso más mediante el estudio de polimorfismos en genes que codifican proteínas asociadas a los telómeros (119) con resultados dispares, identificándose una relación tanto con el acortamiento telomérico (120), con el aumento del tamaño del telómero (121) e incluso sin encontrarse relación alguna con la longitud telomérica (122).

c) Telómero, aterosclerosis y patología cardiovascular:

Las implicaciones del tamaño de los telómeros también han sido relacionadas con aterosclerosis y patología cardiovascular. La aterosclerosis es un proceso fisiopatológico implicado en la patogenia de las enfermedades cardiovasculares. El término aterosclerosis proviene de dos palabras griegas, athéro (pasta) y sklerós (duro), fue utilizado por primera vez por el médico francés Lobstein en 1833, que en su libro "Traité d'anatomie pathologique" la definió como " el endurecimiento y la pérdida de elasticidad de las arterias " (123).

No fue hasta 1904 cuando el médico alemán Marchand recomendó utilizar el término aterosclerosis que, según la Real Academia Española se define como "endurecimiento de los vasos sanguíneos, en especial de ciertas arterias, por la formación de ateromas" (124,125).

El fenómeno de la aterosclerosis afecta a todo el árbol circulatorio, especialmente a las arterias de mediano y gran calibre. Estas arterias tienen una capa interna, llamada íntima, que juega un papel crucial en el desarrollo de la aterosclerosis y está formada por células endoteliales que tienen capacidad antitrombótica, una membrana basal rica en colágeno y células musculares lisas (figura 1.10) (126). Las células endoteliales son esenciales para la génesis vascular durante el desarrollo embrionario y para la angiogénesis en el adulto (127,128).

Las células endoteliales regulan la célula muscular lisa produciendo sustancias vasoactivas como el óxido nítrico (vasodilatador) y la angiotensina II (vasoconstrictor); bajo esa membrana basal se encuentra la capa media, formada por células musculares lisas, fundamental en las grandes arterias porque soporta toda la energía de la sístole ventricular.

Separada de la capa media mediante la lámina elástica externa, se encuentra la capa más externa o adventicia que contiene colágeno, pequeños vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas fundamentales para mantener la dinámica vascular (129).

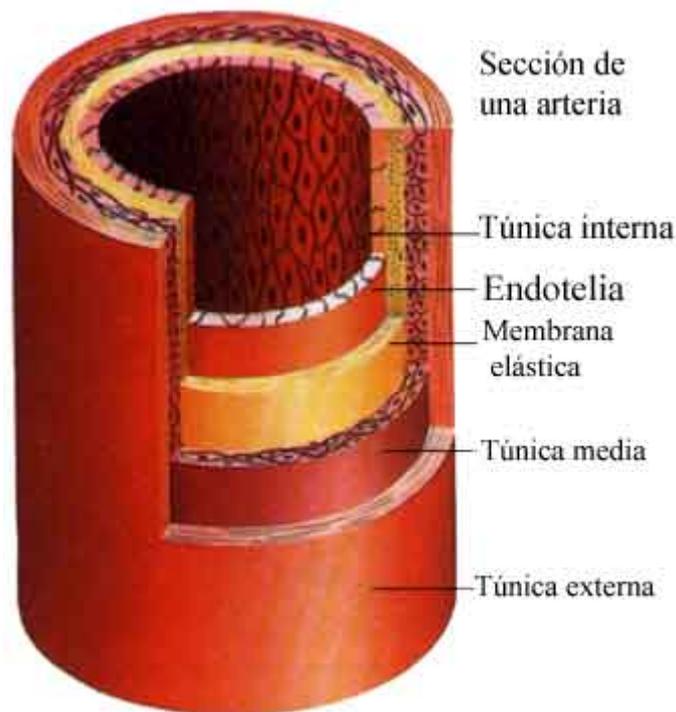


Figura 1.10. Esquema de capas de la pared arterial.

En la aterosclerosis se ha evidenciado una longitud telomérica acortada tanto en las células musculares como en las endoteliales de la placa aterosclerótica y, de igual manera, en leucocitos de sangre periférica en pacientes con aterosclerosis respecto a controles sanos, existiendo una relación inversa entre el tamaño del telómero con el riesgo de presentar manifestaciones cardiovasculares (130-132).

Una de las arterias donde más se ha estudiado el tamaño de los telómeros es en la arteria carótida interna. En pacientes con aterosclerosis carotídea se ha objetivado un menor tamaño de los telómeros, medido a través de leucocitos circulantes, en comparación con sujetos sanos. También se ha relacionado la longitud telomérica de las células endoteliales obtenidas de la placa aterosclerótica con la posible reestenosis tras endarterectomía (133).

Una de las formas de manifestación de la aterosclerosis es la cardiopatía isquémica. En pacientes con enfermedad coronaria, la longitud telomérica es más corta que en sujetos sanos (134), y los telómeros de células endoteliales son más cortos en los que presentan placas de aterosclerosis que en aquellos que no lo hacen (135)

De igual manera, existen estudios que relacionan el menor tamaño del telómero con el riesgo de presentar cardiopatía isquémica en pacientes jóvenes, y en otros estudios se determina que el tamaño de los telómeros puede ser un biomarcador del riesgo eventual de muerte en pacientes con cardiopatía isquémica estable (136).

Existen estudios que relacionan algunos polimorfismos del gen TERT como el 1327C>T (rs2735940) con la presencia de enfermedad coronaria, mientras que trabajos posteriores no han encontrado esta asociación (137,138).

Al igual que se han realizado estudios para medir la implicación de los telómeros en patogenia de la enfermedad coronaria, también se han realizado para analizar el efecto de medidas con impacto terapéutico en la arteriosclerosis coronaria, considerando que el tratamiento con estatinas puede atenuar el acortamiento telomérico, a través de efectos pleiotrópicos y antiinflamatorios que evitan el daño telomérico secundario al estrés oxidativo (139,140).

Además de las relaciones directas entre enfermedad cardiovascular y telómeros, éstos se han involucrado también a través de un efecto indirecto con diversos factores de riesgo cardiovascular. Por ejemplo, uno de los factores de riesgo clásicos, el sexo masculino: diversos trabajos han encontrado que las mujeres tienen los telómeros de mayor longitud que los hombres en la edad adulta (141,142).

La explicación a las diferencias encontradas respecto a la longitud de los telómeros entre sexos parece estar mediadas por factores hormonales. Hay evidencias de que los estrógenos pueden reducir el estrés oxidativo, que se ha relacionado con el acortamiento telomérico, y que los estrógenos estimulan la producción de telomerasa, que protege el tamaño del telómero (143,144). Por otra parte, la testosterona parece tener escasas propiedades antioxidantes y puede asociarse con un aumento del estrés oxidativo, lo cual podría contribuir al menor tamaño de los telómeros en los varones (145).

Además de los factores biológicos que explican las diferencias en el tamaño de los telómeros entre varones y mujeres, también están los factores de riesgo cardiovascular. Esto se debe a que existe una tendencia clásica a que los varones tengan peores condiciones de salud, por una mayor tendencia al tabaquismo, altos niveles de sobrepeso y obesidad, y menor actividad física (146-149). Todas estas condiciones están relacionadas de igual manera con el menor tamaño de los telómeros y podrían justificar las diferencias entre sexos.

También podrían influir en el tamaño de los telómeros la HTA, la resistencia a la insulina y una cantidad menor de HDL (150-152). Otras variables bioquímicas que podrían jugar un papel son niveles elevados de homocisteína (153), paciente con insuficiencia renal (154), y otros factores psicosociales como síntomas depresivos, estrés psicológico y el status social (155-157).

Además de los estudios que analizan la relación entre factores de riesgo y la longitud del telómero, también se ha identificado que el tamaño del telómero puede verse influenciado por específicos estilos de vida. Entre estos factores, están la dieta y el ejercicio físico (158,159)

La dieta mediterránea se ha relacionado con una longitud del telómero mayor, y otros dos estudios han encontrado un mayor tamaño de los telómeros en personas con hábitos de vida saludables, entre los que se incluyen no fumar, alta ingesta de frutas y verduras, ausencia de sobrepeso u obesidad y ejercicio físico (160,161). Todo esto apoya la teoría de que el estrés oxidativo está relacionado con la erosión del telómero, dado que la composición de éste y las regiones de DNA que lo conforman son sensibles al daño oxidativo.

En el caso del ictus, los factores de riesgo convencionales explican solo un 50-60% del riesgo de padecerlo (162,163), luego deben existir otros factores, ambientales y genéticos, aún no determinados.

Se han realizado estudios para ver la relación entre el ictus y el tamaño de los telómeros, con resultados dispares. Se ha asociado un menor tamaño de los telómeros con riesgo de ictus cardioembólico en pacientes con fibrilación auricular (164). Existen estudios que concluyen que una longitud menor del telómero podría estar asociado a un aumento del riesgo de incidencia, tanto de ictus isquémico como hemorrágico (165,166). Pero otros estudios no han identificado dicha asociación (167-169). Un estudio realizado en China encontró una asociación entre un menor tamaño telomérico y mayor riesgo de incidencia de ictus de etiología aterotrombótica, independientemente de otros factores de riesgo vasculares (165); sin embargo, no identificó dicha asociación con el ictus lacunar. En este estudio se encontraba que el menor tamaño de los telómeros podría ser también predictor independiente de un peor pronóstico de fallecimiento de los pacientes con ictus aterotrombótico.

Por todo ello, parece razonable concebir una relación entre los telómeros y el pronóstico de los ictus, tanto isquémico como hemorrágico. Sin embargo, la naturaleza, la fuerza de dicha asociación y las particularidades de la misma, son aún muy inciertos, precisando más estudios para caracterizarlos.

1.5. Autofagia.

La autofagia es un proceso que tiene lugar en todas las células eucariotas, encargado de la degradación y reciclaje de componentes celulares, actuando como una respuesta frente a condiciones de falta de nutrientes o cuando las células presentan organelas dañadas (170,171). A pesar de eso, un aumento de la autofagia puede facilitar la muerte celular.

La autofagia se considera un mecanismo de supervivencia celular, en el que si la célula no es capaz de contener marcadores adversos, puede continuar su acción hasta actuar como una muerte celular programada, distinguiéndose de otros como la apoptosis y la necrosis por sus diferencias morfológicas. Es conocido que debido al estrés oxidativo y otros mecanismos, se acumulan errores que conllevan una aceleración del envejecimiento celular (172). Estos errores se limitan por diferentes mecanismos, en los que la autofagia tiene un papel de relevancia.

La homeostasis celular requiere un equilibrio entre la síntesis (anabolismo) y la degradación (catabolismo) de macromoléculas (DNA, RNA, proteínas, organelas). Las células eucariotas tienen dos mecanismos fundamentales para la degradación de las proteínas: el proteosoma y los lisosomas. El proteosoma se encarga de degradar la mayoría de proteínas endógenas (vida media corta) y está relacionado con mecanismos de apoptosis y angiogénesis entre otros (173). Mientras tanto, los lisosomas degradan proteínas extracelulares (vida media larga) y componentes intracelulares (macromoléculas y organelas) resultado de la autofagia (174).

Existen tres tipos de autofagia: la mediada por chaperonas, la microautofagia y la macroautofagia (a la que nos referiremos como autofagia). La mediada por chaperonas no requiere la formación de vesículas intermedias, sino que las proteínas son directamente incorporadas a los lisosomas.

La diferencia entre la microautofagia y la macroautofagia, es que en la primera tiene lugar una exposición del contenido citoplasmático a la superficie del lisosoma por invaginación de la membrana limitante, es decir, el lisosoma engloba directamente las organelas a degradar. Mientras que en la macroautofagia el secuestro de componentes citoplasmáticos tiene lugar en una doble membrana denominada autofagosoma, también llamada vacuola de autofagia (170), que posteriormente se fusionan con los lisosomas formando el autofagolisosoma donde liberan los componentes citoplasmáticos para su degradación y reciclado (Figura 1.9).

La macroautofagia o autofagia se considera la principal vía de degradación de proteínas, organelas y material citoplasmático, permitiendo de esta manera el reciclaje intracelular (175). La autofagia es modulada por complejos mecanismos sensores y de traducción de señales. Algunos de los estímulos que pueden ser integrados dentro de su regulación son factores de crecimiento, el estado energético de la célula y situaciones de estrés celular, existiendo múltiples vías de señalización que controlan el proceso (176).

a) Regulación de la autofagia:

El proceso de la autofagia consiste en una serie de pasos secuenciales: 1) Secuestro. Una única membrana secuestra componentes citoplasmáticos, incluido organelas y forma un autofagosoma. 2) Transporte: el material secuestrado es transportado hacia el lisosoma. 3) Degradación. Los autofagosomas se fusionan con los lisosomas. Esas estructuras se denominan autolisosomas o autofagolisosomas.

La membrana y los materiales contenidos en el autofagosoma son degradados por las hidrolasas lisosomales. 4) Reutilización de los productos de degradación en el citoplasma (figura 1.11) (177).

Se considera que existen receptores de reconocimiento de organelas citoplasmáticas que permiten la incorporación de macromoléculas dentro del lisosoma, con diferentes nombres en función de la organela a degradar: mitocondria (mitofagia), lípidos (lipidofagia), patógenos (xenofagia), peroxisomas (peroxifagia) (178). De esta manera, existe un mecanismo de degradación específica, que actúa como control de calidad de la célula.

La autofagia realiza su función a través de la degradación de proteínas como fuente de energía y promoviendo la supervivencia celular durante situaciones de estrés regulando las organelas dañadas (179-181). Este proceso contribuye a la homeostasis celular y de los tejidos.

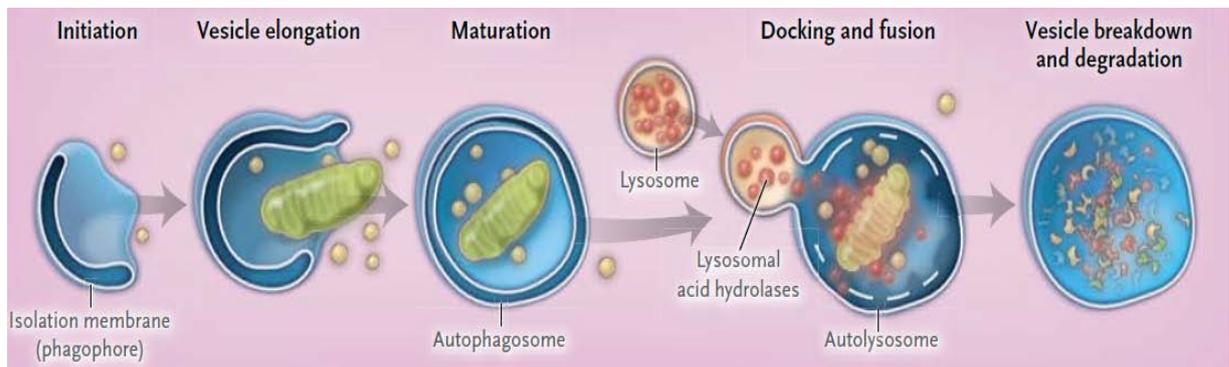


Figura 1.11. Fases de la autofagia. Se inicia con la formación de una membrana aislada, que conduce a la formación del autofagosoma y posterior fusión con el lisosoma. Los contenidos del autofagosoma son degradados por las hidrolasas del lisosoma, y se libera el material del autolisosoma para el reciclado metabólico.

La interacción entre elementos reguladores de la autofagia y de la apoptosis sugiere una relación entre los dos procesos y, aunque ni un exceso de autofagia ni un empeoramiento de su función se ha demostrado como una causa directa de muerte celular, ambos niveles de funcionalidad pueden estar asociados con apoptosis (182).

El proceso de autofagia es conocido desde hace 40 años, pero no es hasta los últimos 15 años cuando su conocimiento adquiere mayor amplitud. Estudios genéticos, principalmente en levaduras (*S.cerevisiae*) y hongos (*P.Pastoris* y *H.Polymorfa*) han aislado 34 componentes moleculares, los llamados genes ATG (“**AuTophagy** related genes”), cada uno de ellos con una función establecida y cuyos productos están involucrados en este proceso catabólico (183).

Para que se puedan formar los autofagosomas y su posterior fusión con los lisosomas, las proteínas ATG deben realizar su función específica. Estas proteínas se dividen en tres grupos fundamentales. Uno de ellos se cataloga como sistemas de conjugación por ubiquitina., formado por dos sistemas, ATG8/LC3 y ATG12.

El sistema de ATG 12 está formado por los genes ATG7 (184), que se transfiere posteriormente a ATG10 (185), para unirse a ATG5. La unión ATG12-ATG5 se asocia con ATG16L y forman un complejo proteico que es esencial en el proceso de autofagia y que, en su mayor parte, está difuso en el citoplasma y parte en membranas aisladas (186). Este complejo ATG12-ATG5-ATG16 se disocia tras formarse la vacuola autofágica. (187,188). ATG5 se considera imprescindible para la elongación de membranas aisladas, pero parece que no sólo regula la autofagia, sino que está implicado en regular la apoptosis. La proteólisis de ATG5 genera una proteína que se traslada del citosol a la mitocondria, donde tras asociarse con BCL-2 o BCL-XL, bloquea su función proapoptótica, siendo regulador de señalización entre apoptosis y autofagia (189).

Cada vez existe más información acerca de la relación entre la autofagia y muerte celular, así como la asociación entre autofagia y supervivencia. Su papel en la eliminación de organelas dañadas, a través del cual elimina patógenos y agregados proteicos, le otorga un mecanismo protector que podría hacer aumentar la supervivencia tanto en enfermedades infecciosas como en enfermedades degenerativas, protegiendo entre otros, a las neuronas del daño oxidativo, de la síntesis de proteínas defectuosas y de otros estímulos tóxicos.

Por otra parte, contrasta su papel como mecanismo de defensa con su relación con mecanismos de muerte celular programada. Diferentes estudios han determinado un tipo de muerte programada con proliferación de vacuolas autofágicas y desaparición de organelas (190).

Los errores de la autofagia o defectos en su función son una de las razones que justifica la acumulación de daño en el interior de la célula y que vincularía estos procesos con el envejecimiento celular. Por ello, los cambios en la autofagia se han relacionado con diferentes procesos fisiopatológicos tales como el cáncer, enfermedades degenerativas, metabólicas, cardiovasculares, pulmonares y como parte de una respuesta fisiológica al ejercicio y al envejecimiento (191). Al igual que ocurre con los telómeros donde ha sido objeto de más estudios es en el cáncer.

b) Autofagia y enfermedades humanas:

La autofagia puede ejercer una influencia multifactorial en el inicio y progresión del cáncer, así como en la efectividad de las diferentes terapias. Por una parte, se sugiere que la autofagia tiene una función antitumoral salvaguardando las células del estrés metabólico al mantener el recambio homeostático de la mitocondria y limpiando agregados proteicos (192-195) La delección de proteínas involucradas en autofagia causa disfunción mitocondrial, aumento del estrés oxidativo y la susceptibilidad a estímulos proinflamatorios, conduciendo todos ellos a daño del DNA y al incremento del riesgo de desarrollar tumores (196,197).

En cuanto a la respuesta al tratamiento en el cáncer, aunque se acepta un papel de la autofagia en la supervivencia del tumor durante la quimioterapia, hallazgos contradictorios sugieren que puede facilitar la citotoxicidad inducida por radioterapia o quimioterapia en células tumorales resistentes a la apoptosis (198-200).

Las enfermedades neurodegenerativas comparten en su mecanismo patogénico la disfunción mitocondrial y la acumulación de agregados proteicos (201,202). Diferentes estudios han demostrado que los autofagosomas se acumulan en el cerebro de pacientes con enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, encefalopatías espongiiformes, Parkinson o Huntington (203-208). Sin embargo, en modelos animales se ha postulado que su función es protectora contra la neurodegeneración y que la acumulación de autofagosomas representa la activación de autofagia como una respuesta fisiológica beneficiosa (209,210).

Se postula que la regulación de la autofagia se altera en enfermedades degenerativas (figura 1.12). Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer la acumulación de autofagosomas se acelera y el beta amiloide puede empeorar la función del lisosoma (211). Además, el autofagosoma contiene gamma-secretasa que participa en la formación de precursores de beta amiloide cuando se fusiona el autofagosoma con el lisosoma (212).

La participación de la disfunción mitocondrial en neurodegeneración se ejemplifica con el parkinson en modelos murinos, donde la disfunción mitocondrial en el autofagosoma es regulada por distintas proteínas (207,213). De esta manera, podemos considerar que la autofagia es una respuesta adaptativa en neurodegeneración, sujeta a una inhibición de su función por acumulación patogénica de sustratos, que puede suponer un fallo en mecanismos de reparación y una progresión de una determinada enfermedad (214). El proceso de envejecimiento es similar a la neurodegeneración en el sentido de que la acumulación de material no procesado se acelera, mientras que la función de mecanismos compensatorios, como la autofagia, disminuye (215,216).

La autofagia también participa durante la infección asistiendo durante la respuesta inmune degradando bacterias intracelulares y virus (217-219). De igual manera, contribuye suprimiendo la inflamación (220). En enfermedades infecciosas, la autofagia contribuye a la regulación de la respuesta innata y adaptativa (180, 215-222). Las proteínas de la autofagia han demostrado tener un papel protector contra diferentes patógenos. En cambio, diferentes alteraciones pueden aumentar el riesgo infeccioso, como la pérdida de ATG5, que en ratones aumenta la susceptibilidad a infección tuberculosa (223).

Existe relación entre los genes de autofagia y la susceptibilidad a enfermedad infecciosa o inflamatoria. Estudios de asociación genómica han revelado asociación entre polimorfismos en genes que regulan autofagia (ATG16L con la enfermedad de Crohn, y ATG5 con el lupus eritematoso sistémico) (180,224). Mientras que ATG16L, si se ha visto relación con mutaciones y enfermedad de Crohn, considerando que ATG16L puede tener un efecto protector en dicha enfermedad (225-227).

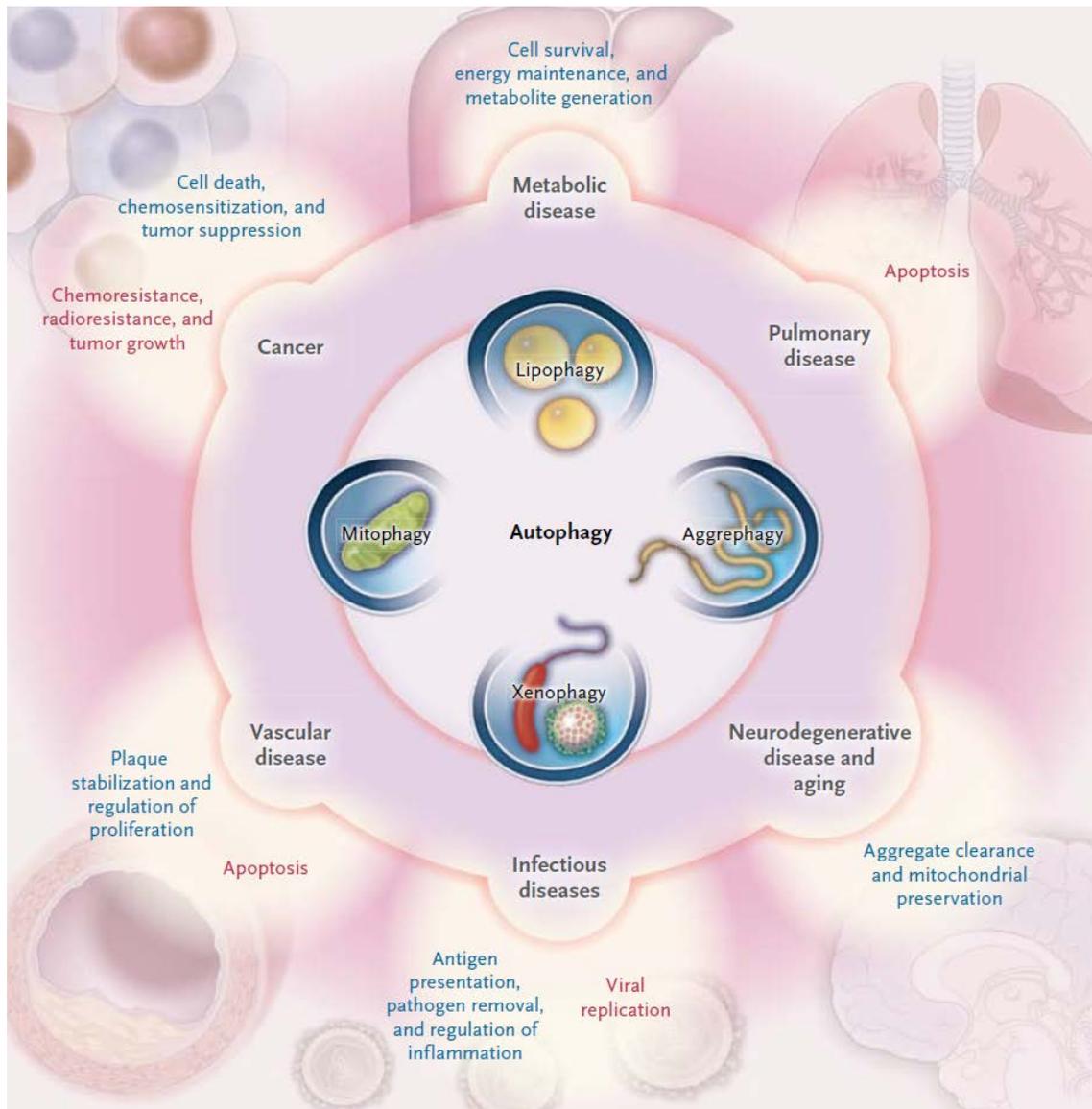


Figura 1.12. Efectos de autofagia en la progresión de enfermedad.

La autofagia influye de manera diferente en la progresión de enfermedades. Los efectos beneficiosos se observan en azul, y los perjudiciales en rojo.

Alteraciones en la autofagia se ha relacionado con cardiomiopatías, hipertrofia cardiaca, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardiaca y daño de repercusión isquémico (228). En éste último, se han identificado alteraciones morfológicas de autofagia que aumentan en respuesta a señales de estrés, incluyendo descenso de ATP, hipoxia y alteración del balance de calcio (229). La autofagia puede estabilizar las placas de aterosclerosis por medio de la prevención de la apoptosis de los macrófagos y la necrosis de la placa (230,231).

c) **Autofagia y patología cerebrovascular:**

Se han realizado diferentes estudios para ver la relación entre el ictus y la autofagia. En la hemorragia cerebral se han realizado modelos animales en ratas a las que administraban sangre autóloga haciendo dos grupos en función de la edad, y determinando dos biomarcadores, una proteína asociada al microtúbulo (LC3) que se considera un biomarcador del autofagosoma y que puede utilizarse para estimar la cantidad de autofagosomas antes de que sean degradados por enzimas lisosomales, y catepsina D, biomarcador lisosoma (232). Sus niveles eran mayores en ratas de mayor edad, por lo que consideraron como medidas indirectas de una autofagia de mayor expresión.

También se ha relacionado en la hemorragia cerebral la activación de la autofagia como respuesta a la trombina, que como parte de la cascada de la coagulación, se activa tras producirse una hemorragia cerebral para producir hemostasia (233).

El papel de la autofagia en la isquemia cerebral es, al igual que en la hemorragia, controvertido. Cuando el flujo de sangre se interrumpe en el cerebro, tienen lugar una serie de mecanismos moleculares que incluyen disfunción endotelial, excitotoxicidad, disfunción mitocondrial, alteración del balance iónico, estrés oxidativo e inflamación (234,235). Estos eventos moleculares pueden conducir a muerte celular y daño irreversible del tejido.

Clásicamente se han identificado dos tipos de muerte celular tras una isquemia cerebral, la apoptosis y la necrosis (236). Recientemente se ha identificado a la autofagia como un tercer mecanismo de muerte celular (237,238)

Ante la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas, se han realizado diferentes estudios ante una eventual influencia de la autofagia como tratamiento neuroprotector. Recientes estudios han demostrado que la autofagia se activa durante la isquemia e indica que la inducción de la autofagia podría servir como diana terapéutica (239,240);

aún así, la relación entre autofagia e isquemia no está clara, existiendo resultados contrapuestos, postulando que la activación de la autofagia protege a las neuronas, mientras otros indican que la autofagia tiene un papel más destructivo (241,242).

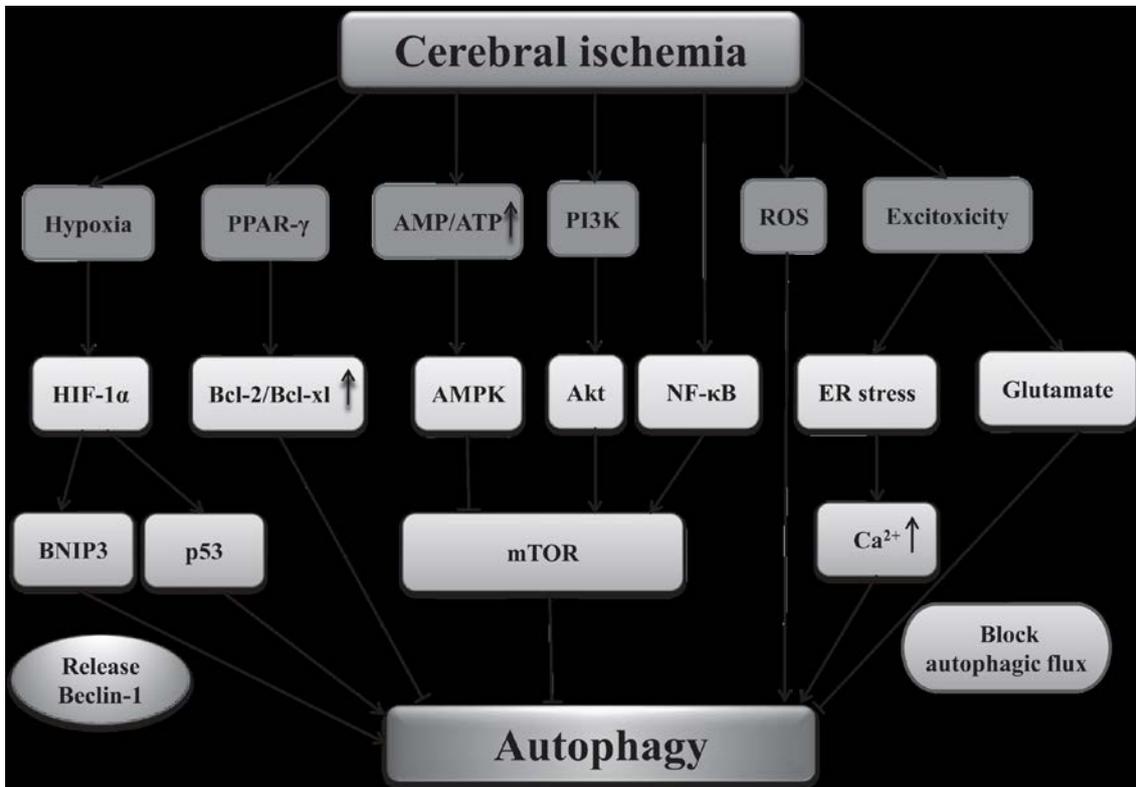


Figura 1.13. Posibles vías de señalización en isquemia y su relación con autofagia.

Lo que sí está más definido es que en la isquemia cerebral existen diferentes señales implicadas en la activación de la autofagia, se desconoce su fuerza de asociación, y por lo tanto cual es el papel exacto de la autofagia en la isquemia cerebral (243) (figura 1.13).

Por lo tanto, de la misma manera que con los telómeros, consideramos que la influencia de la autofagia en la isquemia y en la hemorragia cerebral está aún por definir, y por ello adquiere mayor relevancia su estudio.

2. HIPÓTESIS:

La telomerasa, como enzima que condiciona la longitud telomérica, es un marcador de envejecimiento celular. La autofagia es un proceso homeostático de degradación y reciclaje de componentes intracelulares, en el que el aumento de radicales libres puede condicionar daño tisular.

La eventual influencia que las variantes genéticas de estos mecanismos puedan tener en el pronóstico del ictus no ha sido estudiado hasta el momento.

El presente trabajo se sustenta sobre la hipótesis de que estos mecanismos desempeñan papeles en la susceptibilidad y pronóstico de los pacientes con ictus. Y en concreto:

- Que la longitud del telómero podría tener impacto en la capacidad de supervivencia celular en el tejido dañado en los pacientes con ictus.
- Que los polimorfismos de la telomerasa, al condicionar la longitud telomérica, afectan a dicha capacidad de supervivencia celular, hasta el punto de tener impacto en el pronóstico funcional de los mismos.
- Que los polimorfismos de los genes implicados en autofagia, por sus relaciones con los mecanismos de supervivencia celular, también podría tener importancia en la magnitud del daño y situación funcional tras el ictus.

3. OBJETIVOS:

3.1. Principal:

. Investigar el papel de la longitud telomérica en leucocitos de sangre periférica como eventual biomarcador en el pronóstico funcional de pacientes con ictus.

. Comparar la evolución del tamaño del telómero al diagnóstico del ictus y al año de presentar el evento vascular, analizando su posible influencia en el pronóstico.

. Investigar la influencia de los polimorfismos de la telomerasa (TERC-63G>A (rs2293607) y TERT-1327C>T (rs2735940)) y de la autofagia (ATG5((rs2245214) y ATG 16 (rs2241880)) en el pronóstico funcional de pacientes con ictus.

3.2. Secundarios:

. Comparar la longitud telomérica de pacientes con ictus, con otras enfermedades neurológicas como la enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular.

. Establecer la asociación entre la longitud telomérica y los factores de riesgo cardiovascular clásicos: HTA, DM, Dislipemia y tabaquismo.

. Analizar los polimorfismos de la telomerasa (TERC-63G>A (rs2293607) y TERT-1327C>T (rs2735940)) y de la autofagia (ATG5 (rs2245214) y ATG 16 (rs2241880)) en los cuatro grupos de estudio y su posible asociación con los factores de riesgo cardiovascular clásicos y el pronóstico de los pacientes.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1. Diseño y población de estudio:

Se ha estudiado una cohorte de pacientes con ictus reclutados de forma prospectiva entre los pacientes ingresados en el servicio de Neurología del Complejo Hospitalario Universitario de Salamanca durante el año 2012.

Se tomaron, además, muestras de pacientes con enfermedades neurológicas cuya mayor prevalencia está en segmentos de edad similares y han sido relacionadas con la longitud telomérica: pacientes con Demencia vascular y pacientes con Demencia tipo Alzheimer.

El diagnóstico de DV probable se realizó por un neurólogo atendiendo a los criterios DSM-IV y NINDS-AIREN tras la anamnesis, la exploración física, el estudio neuropsicológico –incluido el examen mini-mental (MMSE) – y los estudios de neuroimagen (TC y/o RM cerebral). Se aplicaron, además, los análisis recomendados por The Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology : hemograma, electrolitos (incluido calcio), uremia, glucemia, creatinina, pruebas de función hepática, T4 libre, TSH y vitamina B12.

El diagnóstico de EA probable se realizó por un neurólogo según los criterios del National Institute on Aging y la Alzheimer's Association 4 tras la anamnesis, la exploración física, el estudio neuropsicológico –incluido el examen mini-mental (MMSE) – y los estudios de neuroimagen (TC y/o RM cerebral). También se aplicaron los análisis recomendados por The Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology.

Los pacientes del grupo control preferentemente fueron sujetos vistos en Consultas de Valoración Preanestésica para cirugías oftalmológicas y traumatológicas, todos ellos originarios de la misma zona geográfica

Al grupo de pacientes con ictus, se les realizó seguimiento al año para valoración del estado funcional. En un subgrupo de los mismos (22 pacientes) al final del seguimiento se obtuvo (además de la valoración funcional) nueva muestra de sangre periférica para determinar la longitud telomérica y compararla con la basal al ingreso.

4.2. Definición de ictus:

En aquellos pacientes con ictus hemorrágico el diagnóstico se realizó al ingreso con el TC cerebral basal realizado en urgencias, mientras que el grupo con ictus isquémico fue reclutado a través de la presencia de una lesión establecida en el TC cerebral basal, o bien mediante la realización de TC o RM cerebral realizada durante su ingreso.

4.3. Variables analizadas:

4.3.1. Variables dependientes o variables respuesta:

- Pronóstico funcional medido por la escala modificada de Rankin (Figura 1.3). Se determinó mediante llamadas telefónicas y entrevista clínica en aquellos a los que se les realizó una nueva extracción de sangre periférica. A 29 de los pacientes, 23 del grupo de ictus isquémico y 6 con ictus hemorrágico no se les pudo realizar el seguimiento ya que fallecieron durante el ingreso hospitalario o bien en el seguimiento.

- Estudio de longitud telomérica al ingreso y al año.

4.3.2. Variables independientes o covariables:

- Clínicas:

- . Edad.
- . Sexo.
- . Factores de riesgo cardiovascular:
 - . Diagnóstico previo de Hipertensión arterial.
 - . Diagnóstico previo de Diabetes Mellitus.
 - . Diagnóstico previo de Dislipemia.
 - . Tabaquismo (fumador o ex-fumador)
 - . Alcoholismo.
- . Clasificación topográfica del ictus (Figura 4.1) (244).

- Radiológicas:

. Presencia de **infartos lacunares** en el TC basal o en la RM cerebral realizada durante el ingreso, definido como lesiones hiperintensas en secuencias potenciadas en T2, hipointensas en secuencias potenciadas en T1, con un tamaño entre 5 y 15 mm de diámetro.

. **Leucoaraiosis** según la clasificación de Fazekas. Es un término radiológico descrito por Hachinski en 1987 que lo utilizó para definir una alteración de la imagen en el TC y en la RM cerebral que consiste en zonas de hipodensidad e hiperintensidad respectivamente localizadas en la sustancia blanca de regiones periventriculares y subcorticales (245). La escala de Fazekas para determinar la magnitud de las lesiones de la sustancia blanca es la más utilizada, clasificando como grado 0 a la ausencia de lesión; grado 1 a la existencia de lesiones focales; grado 2 al comienzo de la confluencia de lesiones, y como grado 3 las lesiones difusas (246,247).

- . **Estudio neurosonológico:** mediante el doppler de troncos supraórticos se analizó durante el ingreso la presencia de placas de ateroma y si presentaban estenosis \geq del 50% que condicionaban repercusión hemodinámica (248).

- A.** Infarto total de la circulación anterior o TACI (*total anterior circulation infarction*). Cuando el déficit neurológico cumple los tres criterios siguientes:
1. Disfunción cerebral superior o cortical (afasia, discalculia o alteraciones visuales)
 2. Déficit motor y/o sensitivo en al menos dos de las tres áreas siguientes: cara, extremidades superiores e inferiores
 3. Hemianopsia homónima
- B.** Infarto parcial de la circulación anterior o PACI (*partial anterior circulation infarction*). Cuando se cumple alguno de los criterios siguientes:
1. Disfunción cerebral superior o cortical (afasia, discalculia o alteraciones visuales)
 2. Dos de los tres criterios de TACI
 3. Déficit motor y/o sensitivo más restringido que el clasificado como LACI (déficit limitado a una sola extremidad)
- C.** Infarto lacunar o LACI (*lacunar infarction*). Cuando no existe disfunción cerebral superior ni hemianopsia y se cumple uno de los siguientes criterios:
1. Síndrome motor puro que afecta al menos dos de las tres partes del cuerpo (cara, extremidades superiores e inferiores)
 2. Síndrome sensitivo puro que afecta a dos de las tres partes del cuerpo (cara, extremidades superiores e inferiores)
 3. Síndrome sensitivo motor puro que afecta al menos dos de las tres partes del cuerpo (cara, extremidades superiores e inferiores)
 4. Hemiparesia-ataxia ipsilateral
 5. Disartria-mano torpe
 6. Movimientos anormales focales y agudos
- D.** Infarto en la circulación posterior o POCI (*posterior circulation infarction*). Cuando se cumple alguno de los criterios siguientes:
1. Afectación ipsilateral de pares craneales con déficit motor y/o sensitivo contralateral
 2. Déficit motor y/o sensitivo bilateral
 3. Enfermedad oculomotora
 4. Disfunción cerebelosa sin déficit de vías largas ipsilaterales (hemiparesia-ataxia)
 5. Hemianopsia homónima aislada

Figura 4.1. Clasificación topográfica del parénquima cerebral según la clasificación de la Oxfordshire Community Stroke de 1991.

- **Genéticas:**

- . Polimorfismos de genes de autofagia: ATG5 (rs2245214) y ATG 16L1 (rs2241880).
- . Polimorfismos de genes de la telomerasa: TERC-63G>A (rs2293607) y TERT-1327C>T (rs2735940)

4.4. Extracción del DNA:

Las muestras de sangre periférica recogidas en las primeras 24 horas del ingreso hospitalario fueron obtenidas mediante venopunción y recogidas en tubos de 10 ml con anticoagulante (EDTA).

Se extrajo DNA de alto peso molecular a partir de leucocitos de sangre periférica. La forma más habitual en la mayoría de estudios para determinar la longitud del telómero es hacerlo en leucocitos en sangre periférica, por su facilidad de obtener y porque en un mismo individuo se equipara la longitud telomérica en leucocitos a la de células somáticas (249,250).

Inicialmente los tubos se centrifugaron dando lugar a la separación de la muestra obtenida en 3 fases: el plasma en la parte superior, las células nucleadas en la interfase y los eritrocitos en la inferior. Una vez seleccionada la interfase, se añadieron 50 ml de agua bidestilada para provocar la lisis osmótica de los eritrocitos. A continuación se lavaron las células mononucleadas en tampón Fornace (0.25 M Sacarosa; 50 mM Tris-HCl pH: 7.5; 25 mM KCl; 5 mM MgCl₂) con objetivo de proporcionar la osmolaridad necesaria para no romper los leucocitos.

A esta mezcla se le añadió EDTA 0.5M pH 8 (concentración final 10 mM) que actúa como quelante de iones divalentes posibilitando así la inactivación de las nucleasas, proteinasa K (Boehringer Mannheim, concentración final 50 µg/ml) para degradar las proteínas y SDS (dodecil sulfafo sódico, concentración final 1%) para romper las membranas celulares, incubándose la mezcla a 55 °C durante 8-16 h.

Tras la incubación, se procedió a la extracción y purificación del DNA tratándolo con una mezcla de fenol tamponado a pH 8 (para prevenir que el DNA fuera “atrapado” en la fase intermedia: entre la fase acuosa y la orgánica) y CIAA (cloroformo:alcohol isoamílico 24:1). Posteriormente se sometió a centrifugación. Con este proceso el DNA permaneció en la fase acuosa y se limpió de otros residuos al mezclarla con CIAA y centrifugar para separar de nuevo las dos fases, una en la que estaba contenido el DNA y otra que contenía los detritos celulares. . Una vez recuperada de nuevo la fase acuosa, el ADN de esta solución se precipitó mediante la adición de 2,5 ml de etanol al 100%, a -20°C, se lavó con etanol al 70% y finalmente se suspendió en ddH₂O estéril.

La concentración del DNA obtenido se calculó mediante espectrofotometría en el Nanodrop® ND 1000. Realizando diluciones estandarizadas con el objetivo final de obtener una concentración fija de 5 ng/μl (251).

4.5. Medición de la longitud telomérica.

Para realizar el estudio de medida de longitud telomérica, se utilizó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. La reacción en cadena de la polimerasa, cuyas iniciales en inglés son PCR (Polymerase Chain Reaction) es una técnica que fue desarrollada por Kary Mullis a mediados de los años 80. Con esta metodología se pueden generar en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de DNA específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de DNA. Se basa en la actividad de la enzima DNA polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de DNA complementaria a otra ya existente.

Sus únicos requerimientos son que existan nucleótidos - adenina, timina, citosina y guanina - en el medio y unos pequeños segmento de DNA - oligonucleótidos – de secuencia complementaria al DNA, que flanquean la región de DNA que queremos amplificar, para que sirvan como cebadores (el cebador, en inglés primer).

La sensibilidad de la técnica de PCR es muy alta si se optimiza la secuencia de los cebadores, así como la temperatura precisa para que estos se unan al DNA en la localización correcta.

Utilizamos PCR cuantitativa comparativa relativa que permite conocer la longitud telomérica en una determinada muestra de DNA mediante su comparación con un DNA de referencia, por lo que no se obtiene una medida absoluta de la longitud telomérica en kilobases (252,253)

Una vez que se elimina la contaminación proteica, es necesario utilizar una muestra de referencia de DNA con la que comparar todas las muestras que van a ser objeto de nuestro estudio. Para cada muestra de DNA, la PCR se repite tantas veces como sea necesario hasta obtener la misma cantidad de DNA probando que de DNA de referencia; así podemos calcular la cantidad de copias iniciales del fragmento de DNA que estamos estudiando a través del ciclo umbral (Ct).

El Ct es el número de ciclos de PCR necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal base y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas molde. La fluorescencia captada por el lector en las PCRs del gen 36b4 fue la misma para todas las muestras demostrando así que partimos de la misma cantidad de DNA en cada una de ellas (el mismo Ct). Sin embargo, la fluorescencia captada en las PCRs de los telómeros varió de unas muestras a otras dependiendo de la cantidad de copias teloméricas iniciales.

El equipo empleado para llevar a cabo la PCR a tiempo real fue StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), compuesto por un termociclador y varios canales de lectura de fluorescencia. Para el manejo de este equipo se usó el programa informático StepOne software 2.1 (Applied Biosystems).

Como agente fluoróforo se utilizó el SYBR Green incluido en la mezcla comercial SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). El SYBR Green es un agente intercalante que se une con gran afinidad al surco menor del DNA bicatenario, aumentando su fluorescencia unas 1000 veces.

Para detectar las secuencias de DNA se emplean sondas de oligonucleótidos marcadas con el fluoróforo específicas para el gen 36b4 y para las secuencias teloméricas (Figura 4.2)

Secuencias de oligonucleótidos	
Telómeros forward	5'-GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-3'
Telómeros reverse	5'-TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-3'
36b4 forward	5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'
36b4 reverse	5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'

Figura 4.2. Secuencias de los oligonucleótidos en dirección (5'-3') empleados en la reacción.

Las PCRs se realizaron en placas ópticas de 96 pocillos (MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode 0.1 mL, Applied Biosystems). En cada placa se llevaron a cabo, por cada muestra, dos reacciones diferentes en pocillos diferentes: una reacción de amplificación de telómeros de la muestra y una reacción de amplificación del gen 36b4. Se realizaron tres réplicas de cada amplificación para minimizar la variabilidad en la concentración de las muestras.

Las placas fueron cubiertas con láminas transparentes ópticas para permitir la lectura de la fluorescencia a través de ellas (MicroAmp® Optical Adhesive Film, Applied Biosystems).

Cada reacción constó de un volumen final de 20 µl y estuvo compuesta por los siguientes elementos (Figura 4.3)

Reactivos	Amplificación telomérica	Amplificación de 36b4
SYBR Green® Master Mix	10 µl	10 µl
Oligonucleótido <i>forward</i> (5 µM)	1 µl	0.4 µl
Oligonucleótido <i>reverse</i> (5 µM)	2.33 µl	0.4 µl
ddH ₂ O	4.67 µl	7.2 µl
DNA (5ng/µl)	2 µl (10 ng)	2 µl (10 ng)

Figura 4.3. Cantidades relativas de cada uno de los componentes de la reacción en función del fragmento de DNA a amplificar.

La eficiencia de PCR fue del 88,915% y el coeficiente de determinación de 0,976 en el caso de la amplificación del gen 36b4 y una eficiencia del 76,665% y coeficiente de determinación de 0,974 en el caso de los telómeros. Se realizaron controles negativos en los que se incluían todos los componentes de la reacción a excepción del DNA, asegurando así la ausencia de contaminación en las reacciones de amplificación.

El programa de amplificación utilizado fue el que se expone a continuación (Figura 4.4):

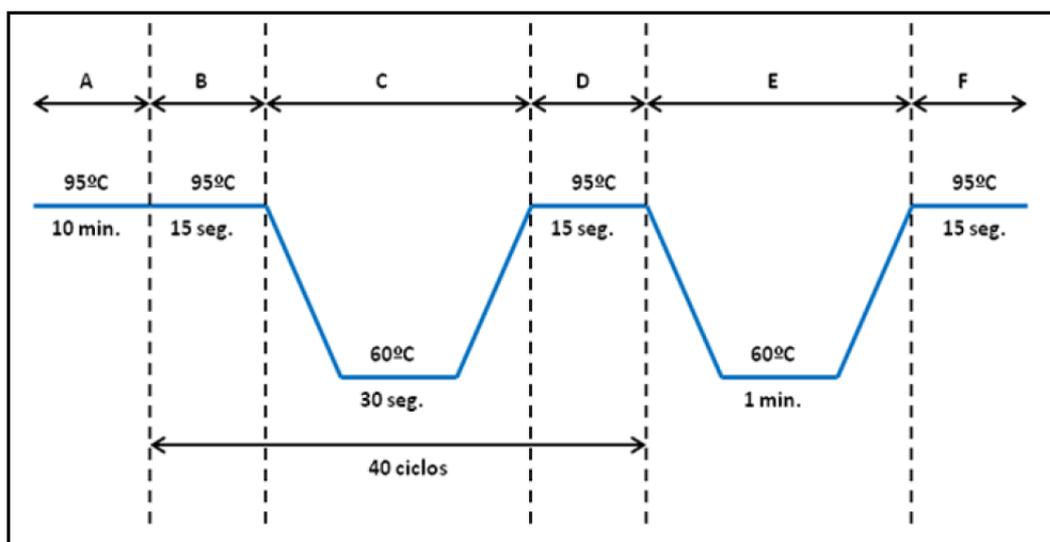


Figura 4.4. Esquema representativo del programa del termociclador para la cuantificación relativa de telómeros mediante PCR a tiempo real cuantitativa relativa. A: Tramo de desnaturalización previa; B: Tramo de desnaturalización; C: Tramo de anillamiento de los oligonucleótidos; D: Tramo de elongación; E y F: Tramos de obtención de las curvas de fusión de los fragmentos amplificados. En cada tramo se incluyen su duración y la temperatura que precisan.

El análisis de la medida de la longitud telomérica se realizó gracias a los programas informáticos StepOne software 2.1 (Applied Biosystems) y GenEx 5.2.1 Enterprise.

Los datos obtenidos de las todas las PCRs se exportaron a GenEx 5.2.1 desde StepOne software 2.1., permitiendo así una valoración conjunta. GenEx es un programa adecuado para el análisis de datos en este caso mediante la realización de una corrección de las frecuencias de amplificación del fragmento a estudiar y del gen reportero. Además, normaliza las distintas réplicas de una misma muestra entre ellas y respecto al DNA de referencia presente en cada placa.

Como resultado final, una vez realizadas las correcciones y normalizaciones referidas anteriormente, la longitud telomérica se expresa mediante el cociente T/S (relación entre el número de copias de la secuencia telomérica entre el número de copias del gen de copia única, 36b4 en nuestro caso).

4.6. Análisis de los polimorfismos de la telomerasa TERC-63G>A (rs2293607) / TERT-1327C>T (rs2735940) y de autofagia ATG5/ATG16 (rs2241880)

Para realizar la discriminación alélica de los polimorfismos de la telomerasa y de autofagia se realizó PCR a tiempo real, cuyo objetivo es detectar y cuantificar las secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante el uso de fluorescentes en la reacción (254).

Para llevar a cabo la discriminación alélica de los polimorfismos se emplearon sondas TaqMan MGB® (Applied Biosystems) (figura 4.5). Estas sondas son oligonucleótidos marcados que hibridan específicamente y constan de un donador (fluorocromo) en el extremo 5', que absorbe energía y pasa al estado excitado, de manera que, al volver al estado inicial, emite el exceso de energía en forma de fluorescencia. El otro componente es un aceptor o quencher en el extremo 3' que acepta la energía de la fluorescencia liberada por el donador y la disipa en forma de calor (255).

Mientras no haya unión de la sonda a su blanco, no habrá amplificación y tampoco señal de fluorescencia.

Reactivos	Cantidades
TaqMan® Universal PCR Master Mix No AmpErase® UNG	5 µl
Sonda+oligonucleótidos	0,25 µl
ddH ₂ O	4,25 ml
DNA	0,5 ml

Figura 4.5. Cantidades relativas de los reactivos usados en reacciones de PCR.

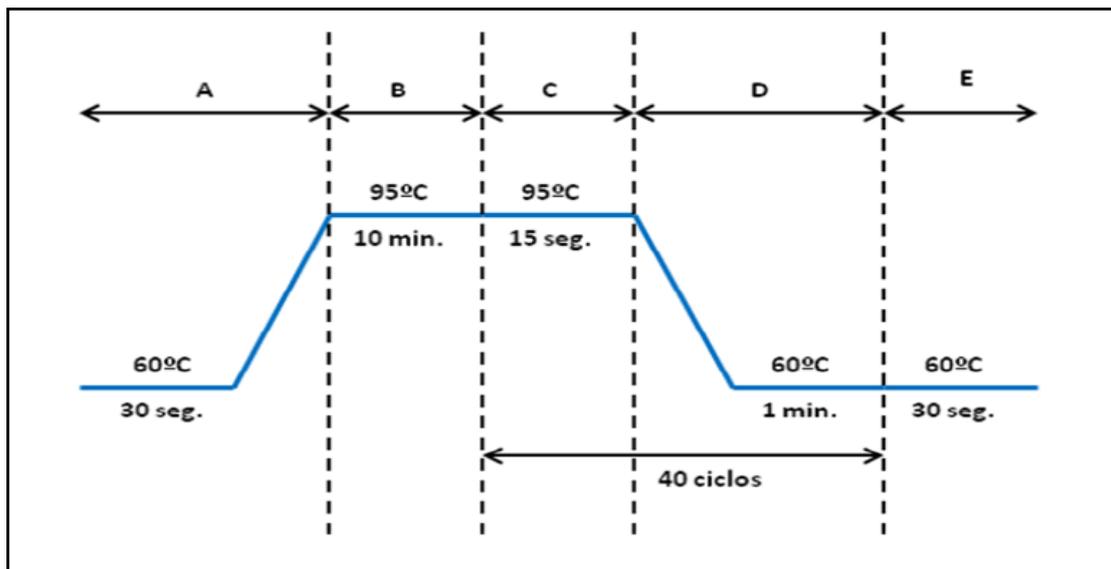


Figura 4.6. Esquema del termociclador utilizados para el genotipado de los polimorfismos. A: Tramo de pre-PCR; B: desnaturalización inicial; C: Desnaturalización; D: Anillamiento y elongación; E: elongación final.

Durante la PCR a tiempo real, mientras la sonda conserve su integridad, la fluorescencia emitida por el donador es absorbida por el aceptor debido a su proximidad. Sin embargo, durante la amplificación, la sonda hibrida con su cadena complementaria de DNA (figura 4.6).

La enzima DNA polimerasa tiene actividad 5' exonucleasa, por lo que, al desplazarse a lo largo de la cadena en su capacidad sintética, hidroliza el extremo libre 5' de la sonda. Debido a esto, se produce la liberación del fluorocromo donador que se encuentra en ese momento muy alejado espacialmente del aceptor. De esta forma, el lector es capaz de captar la fluorescencia emitida. Las gráficas de puntos resultantes permiten la discriminación alélica en cada uno de los pacientes para los polimorfismos que hemos estudiado (Figura 4.7).

Allelic Discrimination Plot

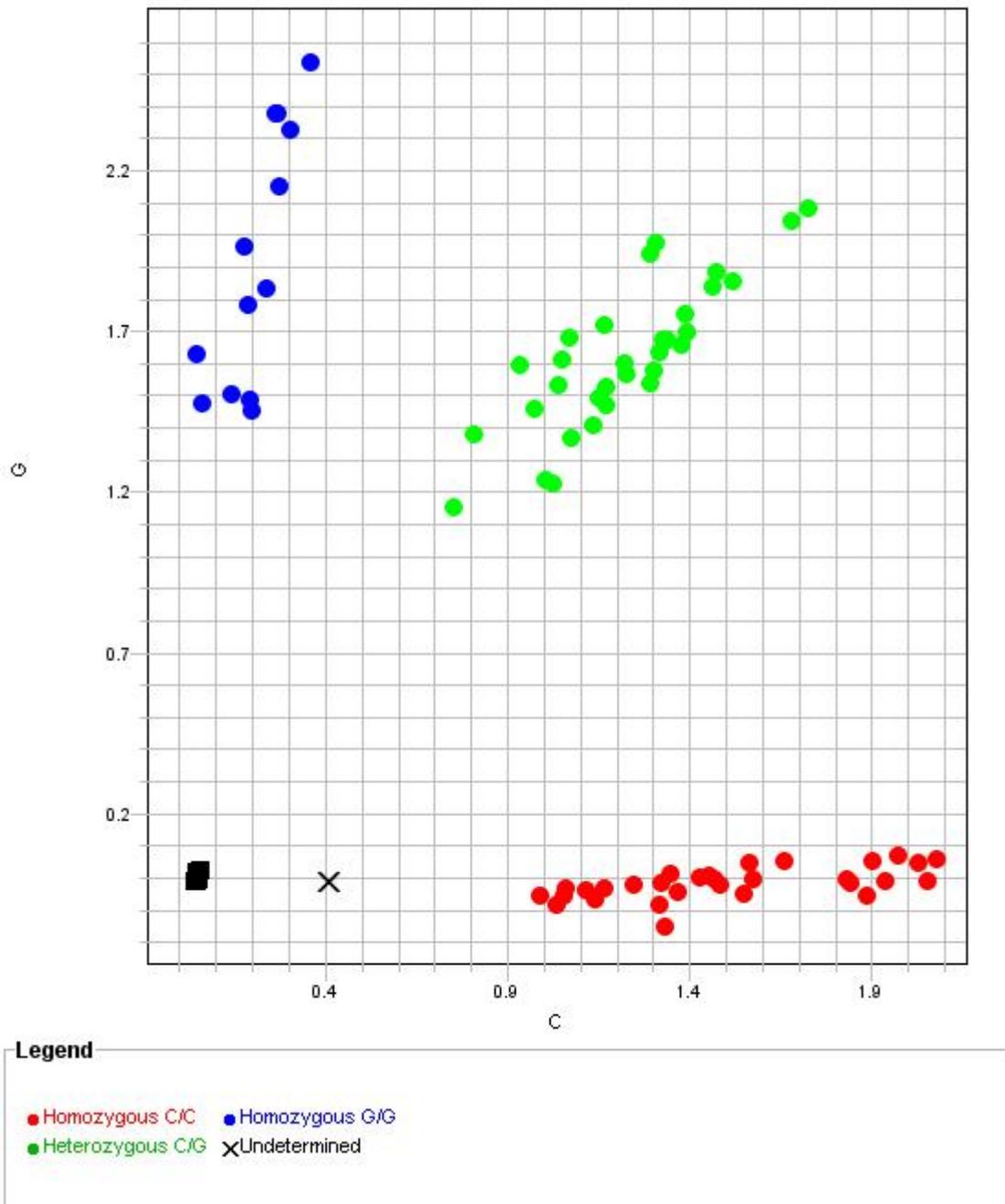


Figura 4.7. Representación del genotipado de ATG5, cada nube de puntos representa un genotipado, siendo homocigotos ambos extremos y heterocizogoto en el centro.

4.7. Análisis estadístico:

Para las variables clínicas se realizó primero un análisis descriptivo mediante porcentajes para las variables categóricas y descripción mediante medias (con desviación estándar) o medianas (y rango inter-cuartílico) para las cuantitativas (dependiendo de su distribución normal o no).

Para los objetivos que buscaban asociaciones con el pronóstico, se compararon las diferencias de las variables en función del pronóstico a los 3 meses utilizando la escala de Rankin modificada dicotomizada como variable de agrupación. Las proporciones se compararon usando test de Chi cuadrado y los test de Student o Mann-Whitney se usaron para comparar variables cuantitativas entre grupos. El coeficiente Pearson o el análisis de Spearman se usaron para las correlaciones bivariantes según la normalidad o no.

Por la importancia de asentar 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 Chi cuadrado, con las frecuencias alélicas esperadas por el principio de Hardy Weinberg.

Los análisis estadísticos se realizaron con los programas informáticos 21.0 para Windows (SPSS Ibérica, IBM Company).

Para los análisis de los polimorfismos se realizó una dicotomización para usar análisis con dos grado de libertad, asumiendo un modelo dominante en el que clasificamos a los pacientes en función de que posean o no el alelo que confiere el riesgo en cada uno de los polimorfismos: en el caso del polimorfismo TERC-63G>A (rs2293607) el alelo G y en el polimorfismo TERT-1327C>T (rs2735940) el alelo C. En los polimorfismos de autofagia, el alelo que se ha relacionado con un aumento del riesgo es el G en el polimorfismo de ATG5 (rs2245214) y el alelo C en polimorfismo ATG16 (rs2241880).

5. RESULTADOS

5.1. Descripción de la muestra:

5.1.1. Características basales de la población:

Hemos estudiado 582 pacientes, de los cuales 291 eran varones (50%) con una media de edad de $79,4 \pm 7,8$ (DE).

El total de la población estaba compuesto por 4 grupos:

- A. Una cohorte de 135 pacientes con ictus (105 isquémicos y 30 hemorrágicos)
- B. Una muestra de 150 pacientes con Demencia vascular.
- C. Una muestra de 147 pacientes con Enfermedad de Alzheimer.
- D. Una muestra de 150 pacientes como grupo control sin enfermedad.

A continuación se exponen las principales características epidemiológicas del grupo de ictus isquémicos y hemorrágicos.

Edad y sexo.

Tabla 5.1. Edad y sexo en ictus isquémicos e ictus hemorrágicos.

	EDAD	SEXO
ICTUS ISQUEMICO	76,8 +/- 8.3	32,3% Mujeres/ 67.3% Varones
ICTUS HEMORRAGICO	80,9 +/- 9.1	53,3% Mujeres/ 46.7% Varones

Factores de riesgo vascular.

Tabla 5.2. Factores de riesgo vascular en ictus isquémicos e ictus hemorrágicos.

	HTA	DM	DISLIPEMIA	TABACO	ALCOHOL
ISQUEMIA	78/105(74%)	30/105(29%)	48/105(46%)	30/105(28%)	12/105(11%)
HEMORRAGIA	25/30(83%)	10/30(33%)	9/30(30%)	7/30(23%)	6/30(20%)

Mortalidad.

Al igual que el pronóstico funcional fue una variable analizada al año del ingreso hospitalario. En los pacientes que presentaron un ictus hemorrágico seis fallecieron (20% del total), mientras que en el grupo de ictus isquémico fallecieron veintitres (21,9% del total).

El análisis de la mortalidad en el grupo de ictus isquémico en función de la localización territorial del ictus según la Oxfordshire Community Stroke, refleja que los pacientes que tuvieron un infarto total de la circulación anterior (TACI) presentaron mayor mortalidad (52,2% de los éxitos) en comparación con el resto de localizaciones (figura 5.1)

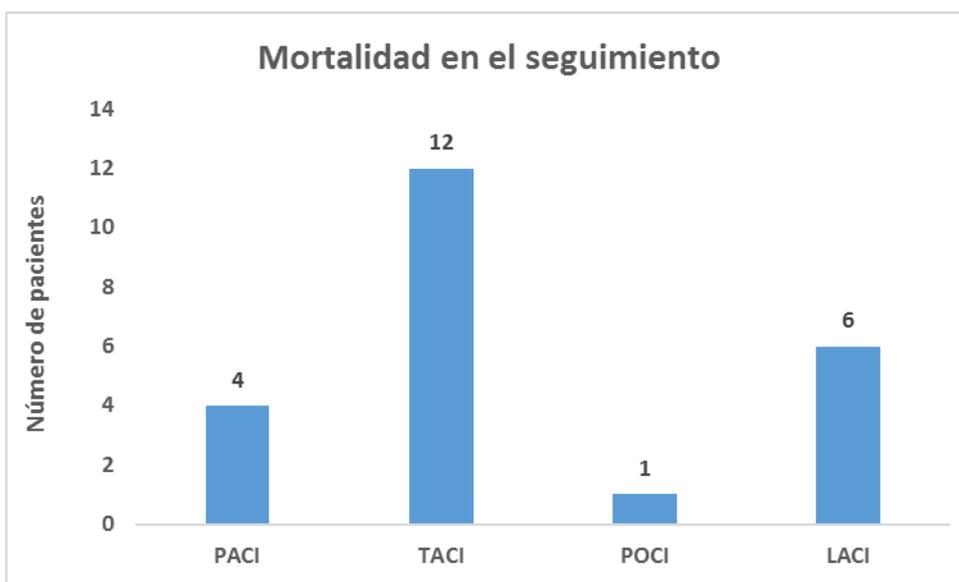


Figura 5.1. Mortalidad en el seguimiento al año en función de la localización del ictus.

Al clasificar la mortalidad en función de la longitud telomérica, determinando la longitud media en los pacientes fallecidos tanto en el grupo de ictus isquémico como en el de ictus hemorrágicos observamos que en el grupo de ictus isquémicos fue de 10.45 y en el de ictus hemorrágicos de 5.69 (figura 5.2).

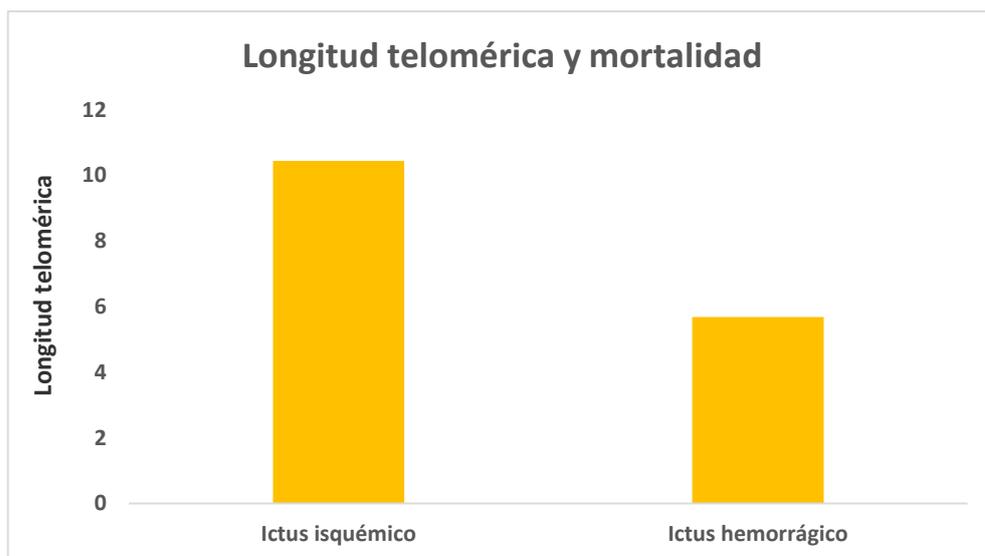


Figura 5.2. Longitud telomérica media en ictus isquémico y hemorrágico que fallecen.

Morbilidad

La morbilidad la analizamos determinando el pronóstico funcional de los pacientes, en función de la escala de Rankin modificada, que clasifica a los pacientes en buen y mal pronóstico funcional, considerando como buen pronóstico aquellos pacientes con un Rankin menor o igual a 2.

En el grupo de pacientes con ictus hemorrágico presentaban un buen pronóstico funcional un 36,7% y un mal pronóstico funcional en un 63,3%. Esta tendencia se invertía en el grupo de ictus isquémico, siendo mayor el número de pacientes con un buen pronóstico funcional (59%) (figura 5.3)

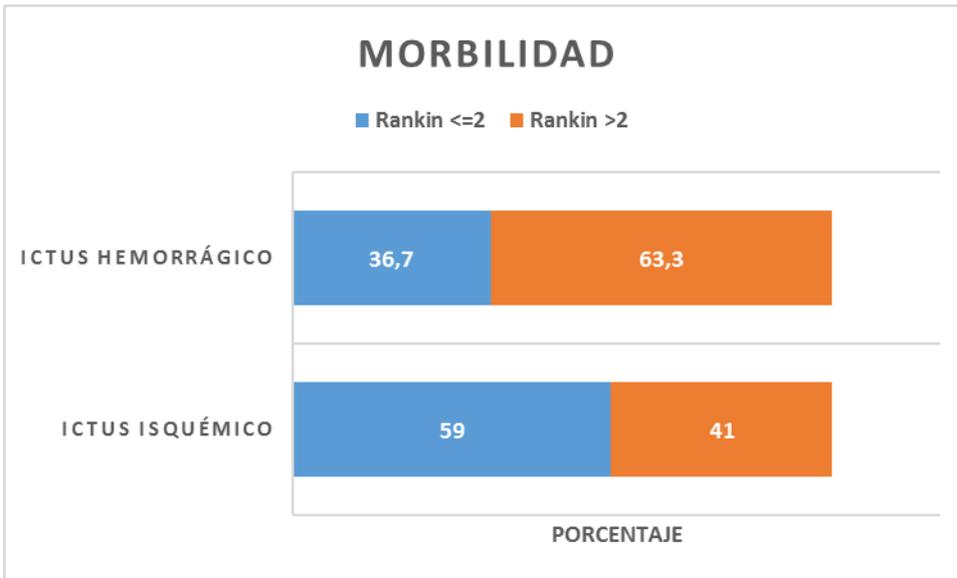


Figura 5.3. Pronóstico funcional según la escala de Rankin modificada.

Leucoaraiosis

La leucoaraiosis según la escala de Fazekas tuvo los siguientes resultados (figura 5.4).

- Ausencia de lesión (0): 63 pacientes.
- Existencia de lesiones focales (1): 48 pacientes.
- Confluencia de lesiones (2): 22 pacientes.
- Lesiones difusas (3): 2 pacientes.

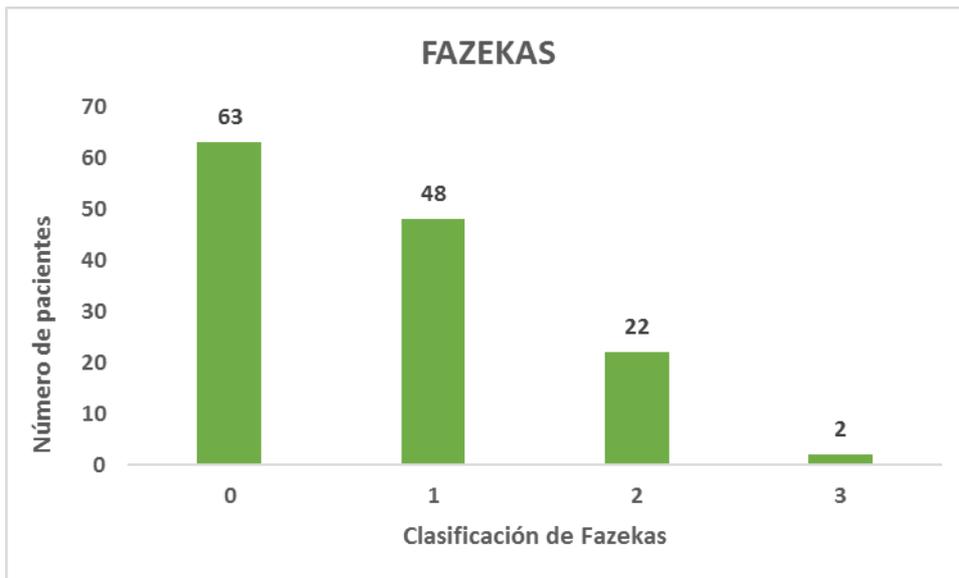


Figura 5.4. Resultados ictus en base a clasificación de Fazekas: 0: ausencia de lesión; 1: existencia de lesiones focales; 2: confluencia de lesiones; 3: lesiones difusas.

Localización

Respecto a la localización del territorio vascular afectado, los pacientes con ictus isquémico los clasificamos basándonos en la Oxfordshire Stroke Project Classification (OCSP) con los siguientes resultados (figura 5.5):

- Infarto lacunar (LACI): 38 pacientes (36,2%)
- Infarto parcial de la circulación anterior (PACI): 31 pacientes (29,5%).
- Infarto total de la circulación anterior (TACI): 25 pacientes (23,8%)
- Infarto de la circulación posterior (POCI): 9 pacientes (8,5%)
- Multiinfarto: 2 pacientes (1,9%)

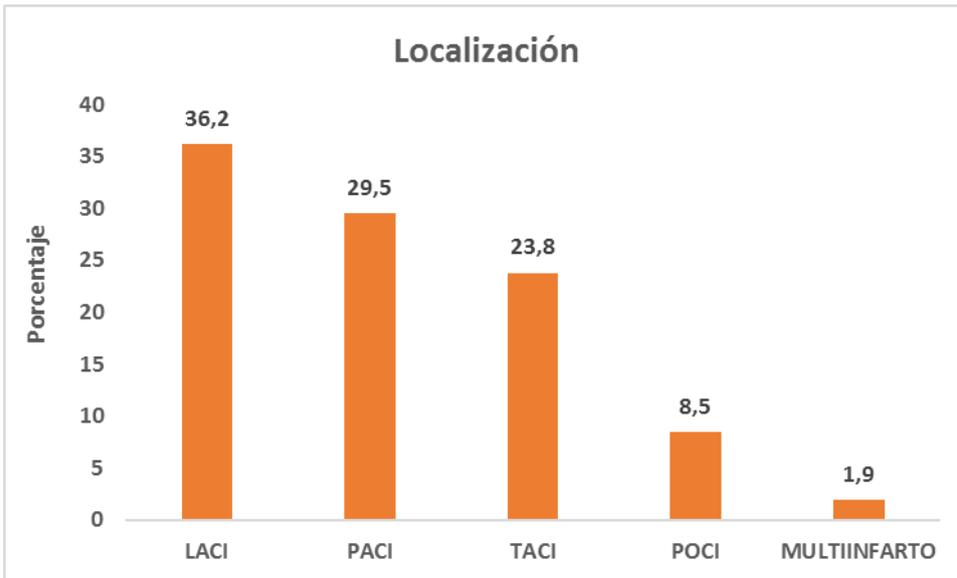


Figura 5.5. Localización ictus isquémico: PACI (Infarto Parcial de la Circulación Anterior); TACI (Infarto Total de la Circulación Anterior); LACI (Infarto Lacunar); POCI (Infarto de la Circulación Posterior).

Polimorfismos telomerasa en el subgrupo de ictus

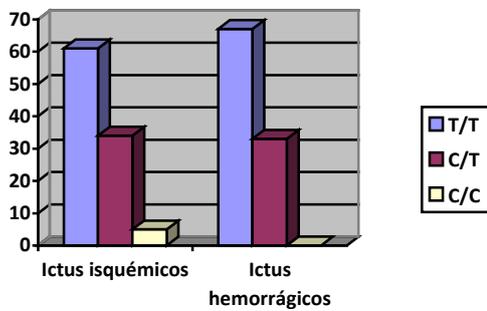


Figura 5.6. Distribución de genotipos de TERT-1327 C>T en ictus isquémicos y hemorrágicos.

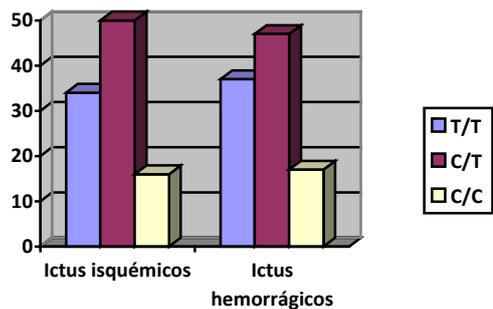


Figura 5.7. Distribución de genotipos de TERC-63 G>A en ictus isquémicos y hemorrágicos.

Polimorfismos autofagia en el subgrupo de ictus

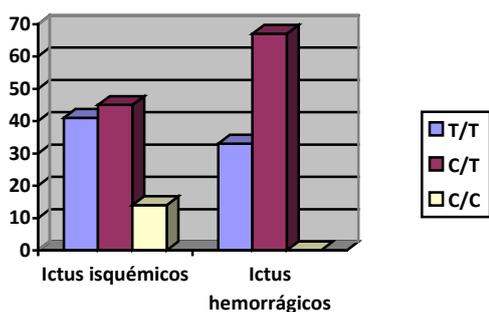


Figura 5.8. Distribución de genotipos de ATG5 en ictus isquémicos y hemorrágicos.

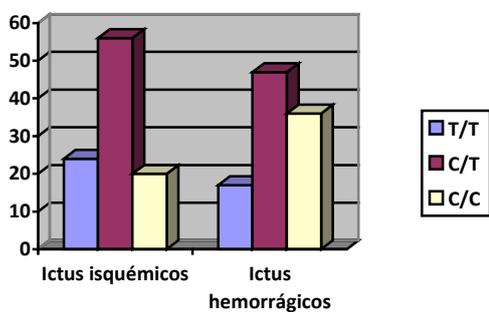


Figura 5.9. Distribución de genotipos de ATG 16L1 en ictus isquémicos y hemorrágicos.

Longitud telomérica y pronóstico funcional en pacientes con ictus (5.2.)

Se estudiaron las eventuales relaciones entre la longitud telomérica y el pronóstico funcional de los pacientes.

Tras analizar, por la prueba de Kolmogorov-Smirnov, que la longitud telomérica no tenía una distribución normal, dicotomizamos la longitud telomérica, mediante la mediana. Aquellos que tenían un valor menor a la mediana de su grupo formaron el grupo de “telómeros pequeños” y los que tenían un valor superior a su mediana, formaron el grupo de “telómeros grandes”.

No se encontraron diferencias significativas en las proporciones de telómeros grandes entre los pacientes con buen y mal pronóstico al año, definidos estos según la escala de Rankin.

Tabla 5.3. Pronóstico funcional en base a la longitud telomérica.

	Telómeros pequeños		Telómeros grandes		p
	Rankin ≤2	Rankin >2	Rankin ≤2	Rankin >2	
Isquemia	23 (24,4%)	14 (14,9%)	38 (40,4%)	19 (20,2%)	0,65
Hemorragia	6 (22,2%)	13 (48,4%)	4 (14,8%)	4 (14,8%)	0,36

Longitud telomérica en el momento del ictus y al año (5.3)

Dentro del grupo de pacientes con ictus isquémico y con buen pronóstico funcional, definido según la escala de Rankin, analizamos al año en 22 de esos pacientes, una segunda medida de la longitud telomérica para establecer si existían diferencias con el resultado basal. En la primera medida, en el estudio basal al ingreso del paciente, la media de la longitud telomérica fue de 10,27. Mientras al año, en esos 22 pacientes con buen pronóstico funcional fue de 14,07 (figura 5.10)

Las diferencias en la longitud telomérica fueron estadísticamente significativas, con una $p < 0,001$.

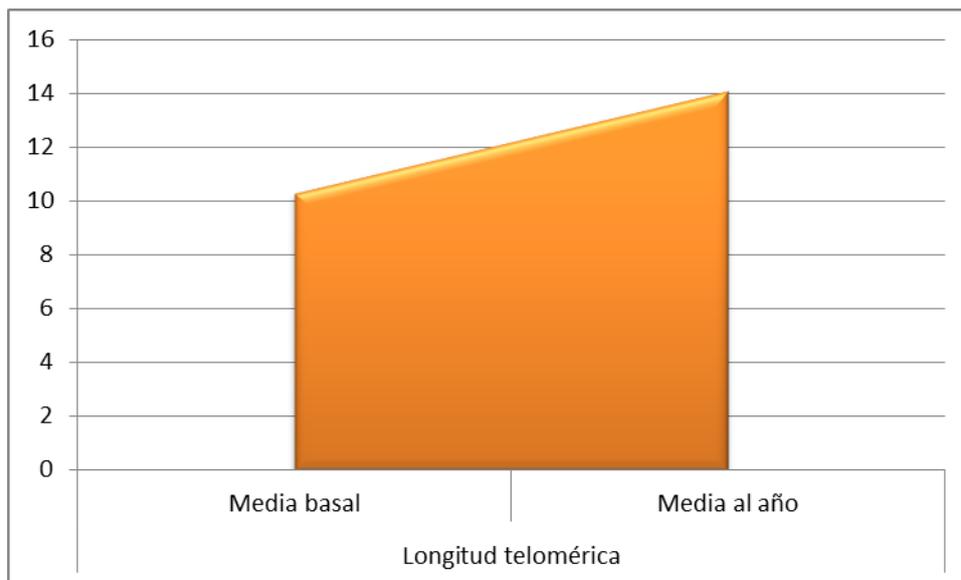


Figura 5.10. Longitud telomérica basal y al año.

Relación entre los polimorfismos de la telomerasa y el pronóstico funcional (5.4.)

Siguiendo un modelo dominante, se clasificó en dos grupos en función del alelo que esté en relación con disfunción de la telomerasa. En el caso de TERC-63G>A (rs2293607) la presencia del alelo G, y en el TERT-1327C>T (rs2735940) la presencia de C.

Tabla 5.4. TERT y pronóstico funcional.

	Buen pronóstico	Mal pronóstico	
CC y CT	63 (56,8%)	48 (43,2%)	NS
TT	10 (43,5%)	13 (56,5%)	NS
Total	73 (54,5%)	61 (45,5%)	

Entre el polimorfismo de la telomerasa TERT (rs2735940) y el pronóstico funcional de pacientes con ictus no hubo asociación estadísticamente significativa ($p=0,244$)

Tabla 5.5. TERC y pronóstico funcional.

	Buen pronóstico	Mal pronóstico	
GG y AG	69 (53,1%)	61 (46,9%)	
AA	4 (80%)	1 (20%)	NS
Total	73 (54,1%)	62 (45,9%)	NS

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismos de la telomerasa TERC (rs2293607) y el pronóstico funcional ($p=0,236$).

Objetivo principal 4: Relación entre los polimorfismos de autofagia y pronóstico funcional (5.5.)

Para analizar una posible asociación entre los diferentes polimorfismos se siguió también un modelo dominante, en el cual se clasificaba a cada alelo de los polimorfismos en dos grupos, en función de que posean el alelo que según los estudios se ha relacionado con una disfunción de la autofagia. Para el polimorfismo ATG5 (rs2245214) el alelo G, y en el caso de ATG16 el alelo C.

Tabla 5.6. ATG5 y pronóstico funcional.

	Buen pronóstico	Mal pronóstico	
GG y CG	41 (50%)	41 (50%)	NS
CC	32 (60,4%)	21 (39,6%)	NS
Total	73 (54,1%)	62 (45,9%)	

No se identificó relación estadísticamente significativo entre el polimorfismo de autofagia ATG 5 (rs2245214) y el pronóstico funcional ($p=0,237$). Ni tampoco entre el polimorfismo ATG 16 (rs2241880) y el pronóstico funcional ($p=0,469$).

Tabla 5.7. ATG16 y pronóstico funcional.

	Buen pronóstico	Mal pronóstico	
CC y CT	58 (55,8%)	46 (44,2%)	NS
TT	15 (48,4%)	16 (51,6%)	NS
Total	73	62	

RESULTADOS SECUNDARIOS

Características epidemiológicas de los diferentes grupos de estudio (5.6)

La edad de los pacientes con ictus isquémicos era menor, y el grupo de mayor edad eran los pacientes diagnosticados de Enfermedad de Alzheimer, con diferencias significativamente estadísticas ($p < 0,05$)

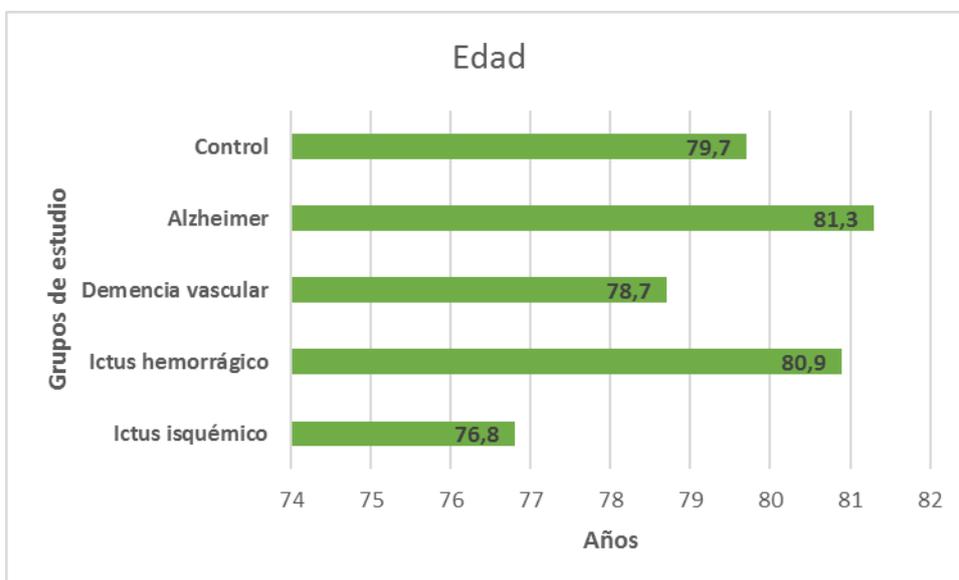


Figura 5.11. Edad en los diferentes grupos de estudio.

En la figura 5.12 se observa que la proporción de mujeres era significativamente menor en la cohorte de pacientes con ictus isquémico, siendo mayor en el grupo control ($p < 0,05$)

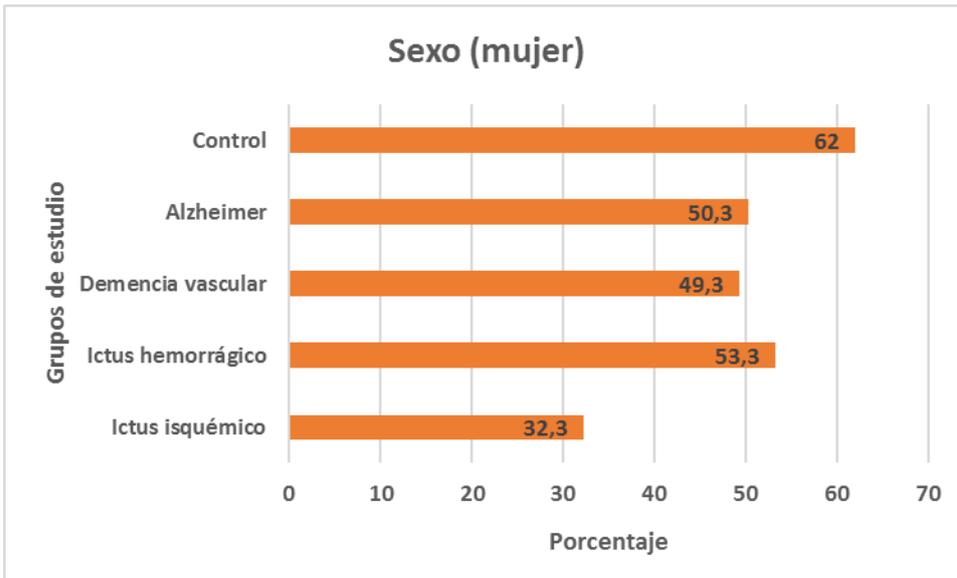


Figura 5.12. Porcentaje de mujeres en los diferentes grupos de estudio.

La distribución de factores de riesgo tampoco fue completamente homogénea:

- La proporción de hipertensos fue mayor en los pacientes con ictus hemorrágicos y en la demencia vascular y, en cambio, significativamente menor en los controles.
- Menor proporción de diabetes mellitus en el grupo control, siendo mayor en pacientes con demencia vascular.
- Dislipemia: mayor proporción en la demencia vascular, siendo menor en los ictus hemorrágicos.
- Tabaco: la proporción de fumadores fue mayor en la demencia vascular, y menor en el grupo control.
- Alcohol: el consumo enólico de riesgo fue menos frecuente en los controles y en grupo de enfermedad de Alzheimer.

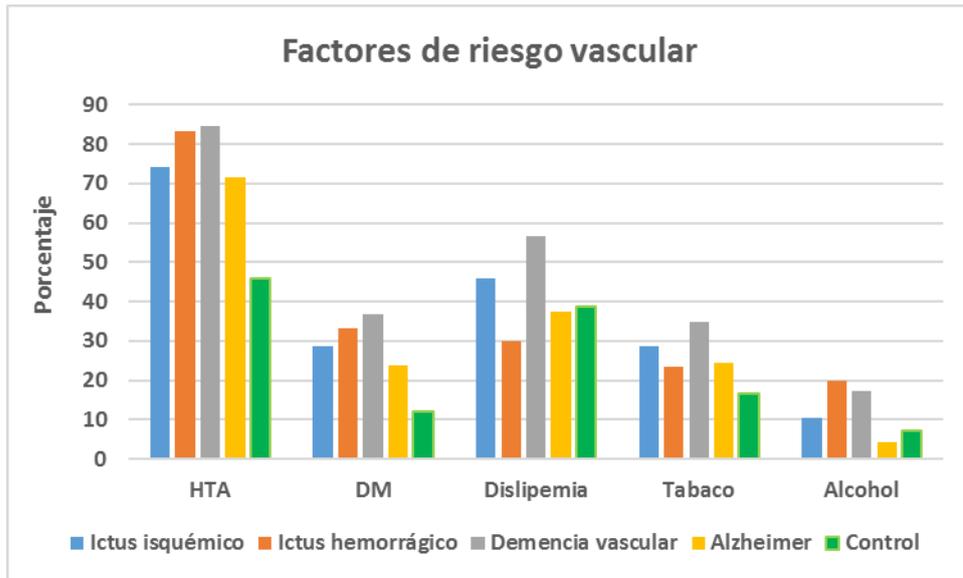


Figura 5.13. Factores de riesgo vascular en los grupos de estudio.

No se encontraron diferencias significativas en la distribución de los diferentes genotipos de los polimorfismos entre las diferentes muestras. Ni para los polimorfismos de la telomerasa ni para los de la autofagia.

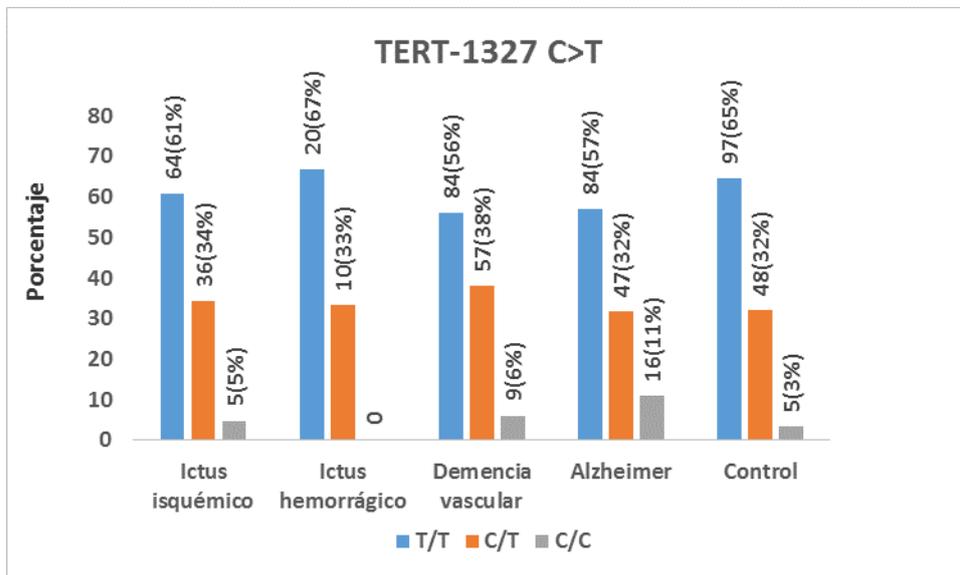


Figura 5.14. Distribución de genotipos de TERC-1327 C>T en cada grupo.

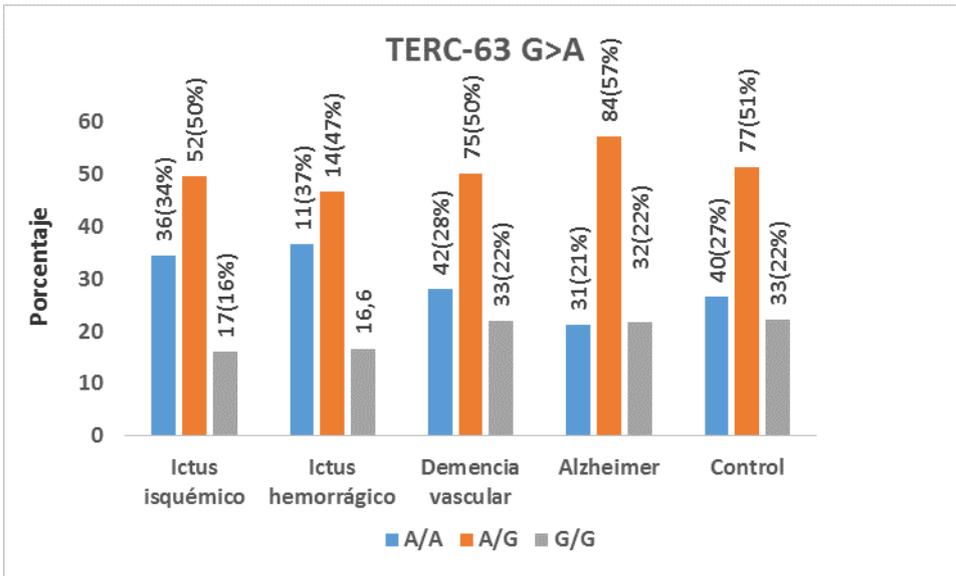


Figura 5.15. Distribución de genotipos de TERC-63 G>A en cada grupo.

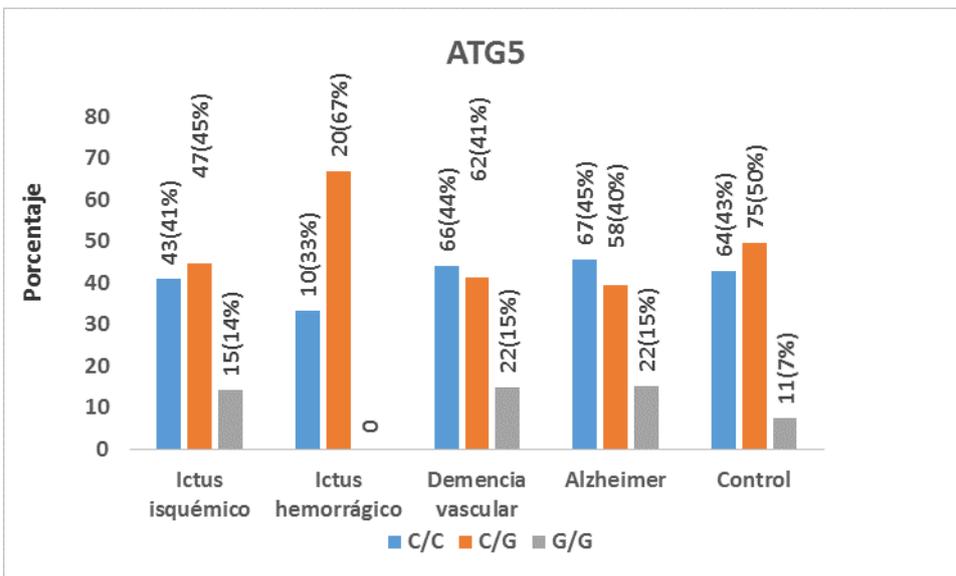


Figura 5.16. Distribución de genotipos de ATG 5 en cada grupo.

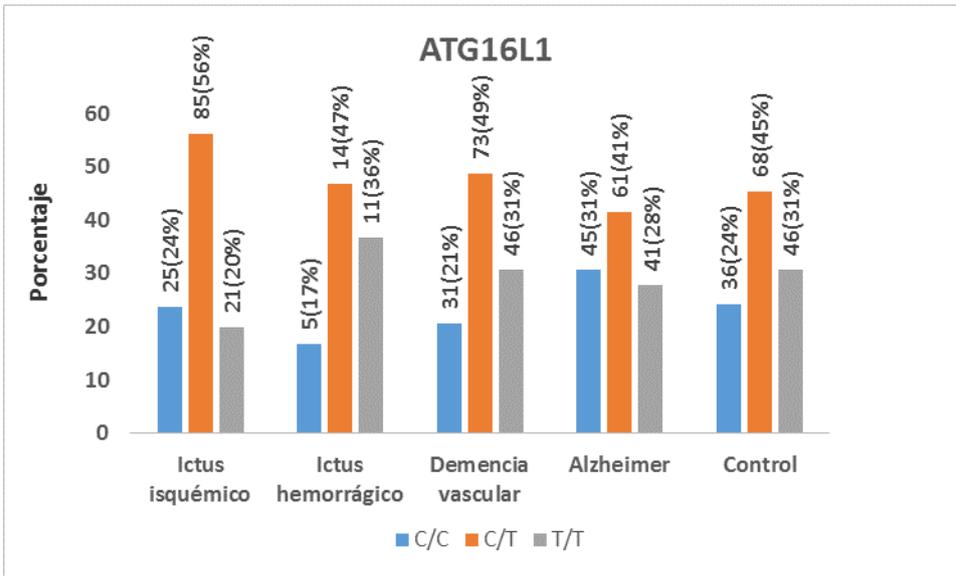


Figura 5.17. Distribución de genotipos de ATG16L1 en cada grupo.

Longitud telomérica en los diferentes grupos (5.7)

A continuación exponemos los valores medios de la longitud telomérica en los diferentes grupos de estudio (Tabla 5.8) y en la figura 5.18 su representación gráfica.

Tabla 5.8. Media de la longitud telomérica en los diferentes grupos de estudio.

	N	MEDIA	DESVIACIÓN TÍPICA
ISQUEMIA	94	10,279	4,547
HEMORRAGIA	27	7,163	2,833
DEMENCIA VASCULAR	28	7,199	1,811
ALZHEIMER	25	7,389	2,204
CONTROLES	28	11,002	2,684
TOTAL	202		

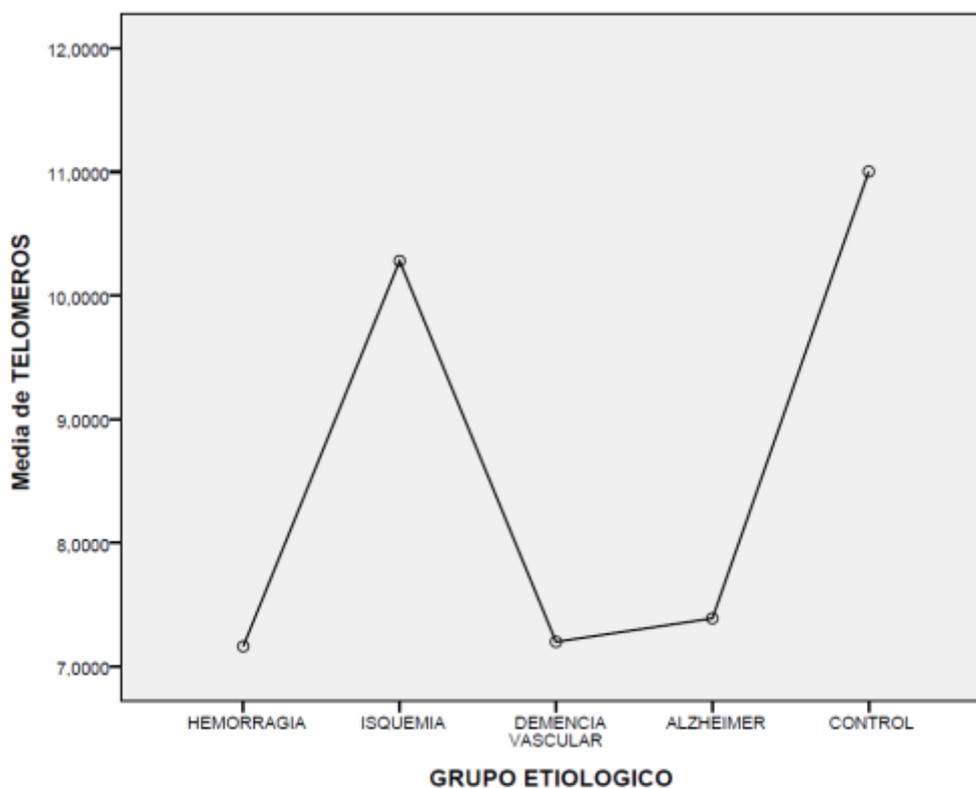


Figura 5.18. Media de longitud telomérica de los diferentes grupos de estudio.

Al no tener distribución normal se obtuvo la mediana y se clasificó a los pacientes en dos grupos: aquellos que tenían un valor menor a la mediana de su grupo formaron el grupo de “telómeros pequeños” y los que tenían un valor superior a su mediana, formaron el grupo de “telómeros grandes”.

En la figura 5.19 representamos la proporción en cada uno de los grupos

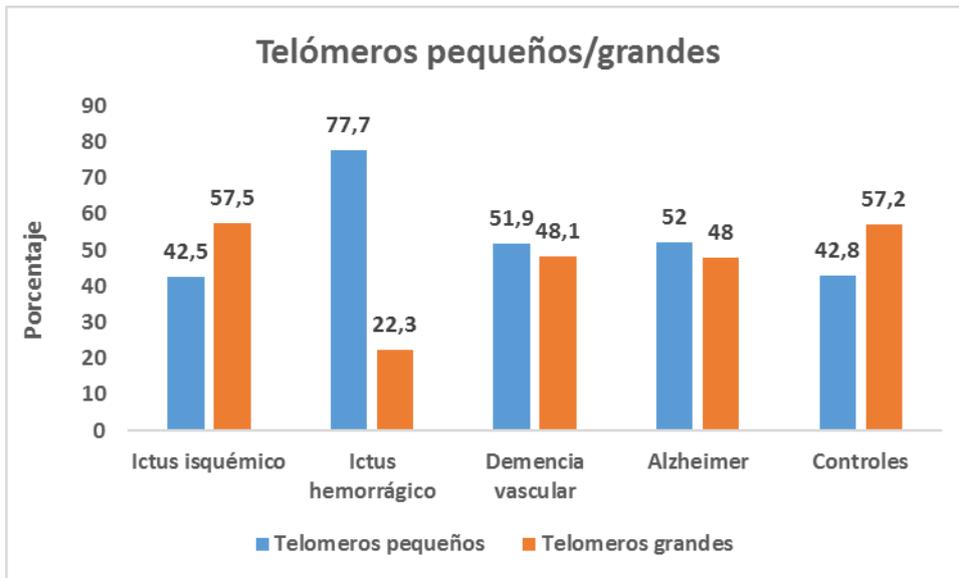


Figura 5.19. Proporción telómeros pequeños/grandes en los diferentes grupos.

En la figura 5.19 se observa que en el grupo de ictus isquémico y en los controles la proporción de telómeros de mayor tamaño es mayor que en los otros grupos, destacando el ictus hemorrágico, con una frecuencia mayor de telómeros de menor tamaño, existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,025$).

Las diferencias dadas en cada grupo de estudio en base a la longitud telomérica, podría estar influenciada por la edad de los pacientes, por lo que analizamos las diferencias existentes en base a la edad.

Se clasificó a los pacientes en tres grupos: adultos jóvenes (hasta 50 años), adultos (de los 50 a los 75 años) y mayores (mayores de 75 años). En este último es en el que se representa el mayor número de pacientes, y en el que se mantenían las diferencias objetivadas de forma global, siendo estadísticamente significativa la diferencia entre los ictus isquémicos y el grupo control respecto al resto de grupos ($p<0,001$).

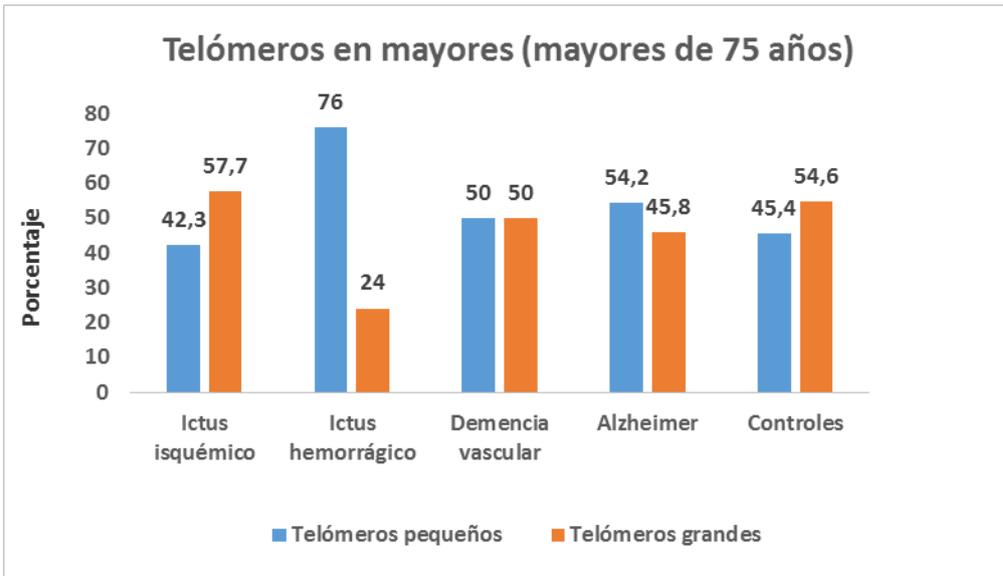


Figura 5.20. Proporción de telómeros en mayores.

Longitud telomérica y factores de riesgo vascular (5.8)

Se analizó en un primer momento una eventual relación entre los factores de riesgo y la longitud telomérica, siendo sus resultados detallados a continuación:

Tabla 5.9. Relación longitud telomérica con los factores de riesgo en ictus isquémicos.

Factores de riesgo	Telómeros pequeños		Telómeros grandes		p
	SI	NO	SI	NO	
HTA	27 %	10 %	40 %	17 %	0,77
DM	9 %	28 %	19 %	38 %	0,35
Dislipemia	18 %	19 %	23 %	34 %	0,42
Tabaco	8 %	29 %	18 %	39 %	0,29
Alcohol	1 %	36 %	9 %	48 %	0,04
Lacunar	19 %	18 %	31 %	26 %	0,77
Placas	17 %	20 %	34 %	23 %	0,19
Estenosis	9 %	28 %	16 %	41 %	0,68

Se observó una relación estadísticamente significativa entre la longitud telomérica y el consumo de alcohol en pacientes con ictus isquémicos, de manera que en aquellos que tienen telómeros de mayor tamaño existía mayor número de pacientes alcohólicos.

Se analizaron además de los factores de riesgo clásicos, otros datos como la presencia de infartos lacunares previos, placas de ateroma en el estudio doppler, estenosis carótidas y la localización.

Este último dato, en función de la Oxfordshire Stroke Project Classification (OCSF), que clasifica los ictus en base a su localización, sin existir diferencias en los resultados ($p=0,46$).

Se realizó un análisis similar en los ictus hemorrágicos para determinar si la presencia de factores de riesgo podrían influir en la longitud telomérica, con los siguientes resultados:

Tabla 5.10. Relación longitud telomérica con los factores de riesgo en ictus hemorrágico.

Factores de riesgo	Telómeros pequeños		Telómeros grandes		p
	SI	NO	SI	NO	
HTA	15 %	4 %	7 %	1 %	0,60
DM	8 %	11 %	2 %	6 %	0,40
Dislipemia	4 %	15 %	4 %	4 %	0,13
Tabaco	5 %	14 %	2 %	6 %	0,94
Alcohol	4 %	15 %	2 %	6 %	0,82

No se objetivó ninguna relación entre los factores de riesgo clásicos y la longitud telomérica en los pacientes con ictus hemorrágicos.

Polimorfismos de telomerasa y autofagia y factores de riesgo vascular (5.9)

Se analizó una posible relación entre los polimorfismos de telomerasa, TERT (rs2735940) y TERC (rs2293607), con los factores de riesgo vascular, sin objetivarse asociación estadísticamente significativa.

Tabla 5.11. Polimorfismos de telomerasa y factores de riesgo vascular.

Factores de riesgo	TERT		p	TERC		p
	CC y CT	TT		AG y GG	AA	
HTA	65(61,9%)	12(11,4%)	0,43	74(70,5%)	4(3,8%)	0,76
DM	22(20,9%)	7(6,6%)	0,25	29(27,6%)	1(0,9%)	0,66
Dislipemia	38(36,1%)	9(8,6%)	0,65	45(42,8%)	3(2,8%)	0,51
Tabaco	22(20,9%)	7(6,6%)	0,25	27(25,7%)	3(2,8%)	0,11
Alcohol	7(6,6%)	3(2,8%)	0,26	10(9,5%)	1(0,9%)	0,47

De igual manera, no se identificó relación estadísticamente significativa, entre los polimorfismos de autofagia ATG 5 (rs2245214) y ATG 16 (rs2241880) con los factores de riesgo vascular clásicos (Tabla 5.12).

Tabla 5.12. Polimorfismos de autofagia y factores de riesgo vascular.

Factores de riesgo	ATG5		p	ATG16		p
	CG y GG	CC		CC y CT	TT	
HTA	49(46,6%)	29(27,6%)	0,18	57(54,3%)	21(20%)	0,38
DM	19(18,1%)	11(10,4%)	0,57	24(22,8%)	6(5,7%)	0,47
Dislipemia	30(28,6%)	18(17,1%)	0,50	35(33,3%)	13(12,4%)	0,61
Tabaco	15(14,3%)	15(14,3%)	0,23	20(19,04%)	10(9,5%)	0,19
Alcohol	6(5,7%)	5(4,7%)	0,74	6(5,7%)	5(5,7%)	0,09

6. DISCUSIÓN:

6.1 Introducción:

En este trabajo hemos explorado el posible papel que dos grupos de mecanismos celulares relacionados con el envejecimiento celular (longitud de los telómeros y autofagia) podrían tener en la patogenia y, por tanto, en el pronóstico de varios procesos neurológicos, fundamentalmente en el ictus.

6.2 Análisis de la población estudiada.

Según los datos del estudio INTERSTROKE, que determinó los factores de riesgo tanto en ictus isquémicos y hemorrágicos en un total de 22 países diferentes, nuestros datos se extrapolan en gran manera a sus resultados (256).

Hay diferencias que es oportuno comentar, como la edad media, siendo de 66 años en los países desarrollados que participaron en el estudio (incluso menor en países en vías de desarrollo), mientras que en nuestra población la edad media del ictus isquémico es de 76 años y el ictus hemorrágico de 80 años. Esto puede deberse al envejecimiento de la población, con un aumento de la esperanza de vida que en los próximos años irá en aumento (figura 1.1.) en los países occidentales (2).

Las diferencias en la edad media, aún mayores respecto a países subdesarrollados o en vías de desarrollo, puede deberse a diferencias geográficas o a que enfermedades como la desnutrición o enfermedades infecciosas están viendo disminuida su prevalencia a favor de enfermedades crónicas como el ictus o el infarto de miocardio, lo que hace que la prevalencia del ictus en dichos países esté en aumento, a lo que se suma la carencia de estrategias de prevención (257,258).

En cuanto a los factores de riesgo, son equiparables los resultados tanto en ictus isquémicos como hemorrágicos, siendo similares la HTA, el tabaquismo y el hábito enólico, siendo la mayor diferencia en el grupo de hemorragias la presencia de pacientes diabéticos de un 33% frente al 10% del INTERSTROKE, probablemente debido a la importante diferencia de edad en nuestro grupo, siendo mayor la prevalencia de diabetes en nuestra población octogenaria.

6.3 Otras variables del estudio.

Si nos ceñimos a otras variables que hemos incluido, como es la localización, en nuestro estudio destaca la presencia de una alta frecuencia de TACI (total anterior circulation infart). Nos hemos basado para categorizar los diferentes subtipos de ictus en la OCSF (Oxfordshire Community Stroke Project) propuesta por Bamford et al en 1991, que incluye infartos lacunares (LACI), de circulación posterior (POCI), totales de circulación anterior (TACI) y parciales de circulación anterior (PACI) (259).

Si comparamos datos en función de OCSF con estudios poblacionales como el INTERSTROKE, los pacientes que se presentaron clínicamente como un TACI fue de un 23,8%, mientras que en el mencionado estudio fue de tan sólo un 7%. En cambio en una revisión sistemática basada en el pronóstico en base a la localización, de Paci et al (260), nuestros resultados son prácticamente similares.

Hay que destacar el hecho de que todos nuestros pacientes no se les realizó ninguna terapia de reperfusión, ya que la muestra sanguínea se extrajo en las primeras 24 horas del ingreso, cuando en nuestro centro hospitalario si se les realiza cualquier terapia de reperfusión ingresan en la Unidad de Cuidados Intensivos las primeras 24-48 horas.

Por lo tanto, es de esperar que nuestros resultados de pacientes con infartos totales de la circulación anterior fuese aún mayor del que hemos obtenido, ya que son los pacientes que mayor beneficio pueden obtener de tratamientos de fibrinólisis o endovasculares.

Este dato adquiere aún mayor importancia si, al igual que el estudio de Paci et al, comparamos datos de pronóstico funcional en base a la localización del ictus. Las tasas de mayor mortalidad fueron en aquellos pacientes con mayor extensión de la isquemia, como se puede esperar en un primer momento, siendo de un 52% en los TACI si tenemos en cuenta la mortalidad al año. Si lo comparamos con el total de TACI de nuestra serie (25 pacientes), casi el 50% de nuestra serie había fallecido al año.

Hay que hacer varios matices a esta afirmación: por una parte, es lógico pensar que los infartos más extensos estén en relación con peor pronóstico funcional, como nuestro estudio, ya que tanto el deterioro clínico precoz como el pronóstico final dependen de la severidad inicial del ictus (261-263). Lo que no es de esperar, o al menos si requiere de una reflexión, es que prácticamente el 50% de los pacientes con infarto total de la circulación anterior fallezcan al año. Como hemos comentado anteriormente, no hemos incluido pacientes fibrinolizados que en el periodo de tiempo en el que se realizó el estudio era el único tratamiento de reperfusión aprobado (264).

Aunque ahora mismo sólo sea una conjetura, un porcentaje de esos pacientes se beneficiarían en la actualidad del tratamiento endovascular, desde que en 2015 se ha aprobado como tratamiento de elección en estos pacientes (265-269).

Aún así, y dado que estamos analizando nuestra serie, la mortalidad de los TACI puede ser debida fundamentalmente a que al no realizarse ningún tratamiento de reperfusión es de esperar un peor pronóstico funcional, a lo que se suman las complicaciones debidas a la inmovilización y mayor riesgo de complicaciones como broncoaspiraciones.

Respecto al resto de localizaciones, los infartos lacunares ocupan el segundo lugar en mortalidad. Esto puede deberse, a la mayor heterogeneidad clínica con la que puede manifestarse (disartria-mano torpe, hemiparesia atáxica, síndrome motor puro, síndrome sensitivo puro, síndrome sensitivo-motor), y a que los infartos lacunares pueden presentar con mayor frecuencia un empeoramiento clínico tras el primer evento vascular. Aunque el mecanismo de un eventual empeoramiento no está establecido, si que se sugiere un mayor déficit en aquellos con síndrome motor puro, o que esté en relación con niveles altos de glucemia, al igual que la progresión de aterosclerosis de pequeño vaso (270-272).

En nuestra serie, los infartos parciales de la circulación anterior son los siguientes respecto a la mortalidad, coincidiendo con otras series, si bien estas se basaban en el pronóstico a corto plazo, no en el seguimiento al año como hemos realizado (259,273).

Si nos basamos en datos globales, llama la atención la alta tasa de mortalidad en nuestro estudio, siendo de un 20% en ictus hemorrágicos y un de 21,9% en ictus isquémicos. Si lo comparamos con el INTERSTROKE tan sólo fue de un 7%, si bien, hay que tener en cuenta, que la mayoría de los estudios en los que se realiza el seguimiento tras presentar un ictus se marca el pronóstico funcional a los 3 meses, y en nuestro caso lo hemos realizado al año, lo que también puede determinar esa alta tasa de mortalidad.

También hay que destacar el hecho de que los ictus isquémicos presenten mayor mortalidad. Esto puede ser debido a que a corto plazo tras un ictus, las hemorragias están relacionadas con mayores tasa de mortalidad independientemente de la edad, el sexo y los factores de riesgo vascular, si bien esa diferencia que inicialmente es 4 veces superior, tras los 3 meses del ictus se va recortando (274,275)

Esto afianza el hecho de que tras un año es de esperar que las tasas de mortalidad prácticamente sean semejantes, a pesar de que en nuestra serie los pacientes con hemorragias presenten factores que están implicados con un mayor riesgo y peor pronóstico como son la mayor ingesta de alcohol que en el grupo de ictus isquémicos (276).

Otro dato que puede explicar dichas tasas de mortalidad, es que la edad de nuestros pacientes es mayor que en otras series y de que no se les ha administrado ningún tratamiento de reperfusión.

En lo que respecta al pronóstico funcional, un 59% del grupo de ictus isquémico presentaban al año un buen pronóstico, definido por una puntuación menor o igual a 2 de la escala de Rankin, mientras que un 41% estaban incluidos en el grupo de mal pronóstico. Por otra parte, en los ictus hemorrágicos, un 36,7% tuvieron un buen pronóstico funcional, mientras que un 63,3% un mal pronóstico funcional.

Si nos basamos únicamente en esos datos, podemos concluir que se ciñen a lo que se espera de que el ictus hemorrágico tiene peor pronóstico funcional que el ictus isquémico, aunque dicha información puede tener sus matices.

Hay muchos estudios sobre el pronóstico funcional a corto plazo, y medirlo a los 3 meses de tener el evento vascular es lo habitual, ya que es la medida estandarizada que se utiliza en los ensayos clínicos (277-280). La recuperación tras un ictus es heterogénea, con muchos factores interrelacionados, pero lo que habitualmente observamos en la práctica clínica es una recuperación hasta alcanzar una meseta, aunque un empeoramiento en la discapacidad a más largo plazo es plausible.

Algunos estudios han medido el pronóstico funcional a largo plazo, y han concluido que a los 3 meses de tener un ictus, el pronóstico no es estable, y que 1 de cada 6 pacientes puede sufrir un deterioro entre los 3 y 12 meses en el seguimiento (281-284).

En un registro Sueco, la mortalidad a los 3 meses era de un 13,2% y al año de un 18%, cifras que se aproximan a las tasas de mortalidad de nuestro estudio de un 20%. Incluso sólo en los pacientes que eran dependientes el porcentaje variaba de un 16.2% a los 3 meses, hasta un 28,3% (285).

Probablemente el hecho de que no hemos tenido en cuenta quienes han padecido una recurrencia del ictus en el seguimiento pueda influir en los resultados ya que tras la recurrencia las tasas de mortalidad son mayores que tras un primer evento.

6.4. Estudio de la longitud telomérica.

6.4.1. Tamaño del telómero en los diferentes grupos de estudio.

Incluimos en el estudio otros grupos poblacionales de enfermedades a las que se las ha relacionado con el tamaño de los telómeros. Para ello, elegimos dos grupos de enfermedades neurológicas que se han relacionado con una menor longitud telomérica, fundamentalmente la enfermedad de Alzheimer que es la que más estudios acapara (286-290), y la demencia vascular (291). El acortamiento telomérico se ha relacionado con deterioro cognitivo, patología amiloidea y una hiperfosforilación de tau, jugando un papel patogénico fundamentalmente en la enfermedad de Alzheimer. El otro grupo que elegimos fue un grupo control, sano, sin patología neurológica, del mismo grupo de edad (292).

Para realizar las medidas oportunas hemos empleado PCR cuantitativa comparativa relativa (252,253), que tiene una gran correlación con la que hasta la fecha había sido la técnica de elección, que es la medida de los fragmentos de restricción, la cual ha quedado relegada como *gold standard* por ser un proceso lento, que precisa de grandes cantidades de DNA, y cuya medida puede estar afectada por la inclusión de secuencias subteloméricas (293).

Una forma alternativa es la hibridación in situ fluorescente (FISH) cuantitativa (Q-FISH), que utiliza una sonda marcada que se une al DNA, con el claro inconveniente de que precisa cromosomas en metafase, siendo limitado su utilización (294).

Ha surgido una nueva variante que es FISH de flujo (Flow-FISH) que aúna las características de la técnica FISH con las ventajas de la citometría de flujo, pudiendo diferenciar distintos tipos de células (295). Como desventaja necesita una gran calibración del sistema.

Otras técnicas son de gran aplicación para detectar los telómeros más cortos, denominada Universal STELA, pero que requiere de un proceso laborioso, y más largo de duración, lo que implica una desventaja a la hora de realizar estudios poblacionales (296).

Por todos estos motivos, se ha considerado la PCR cuantitativa comparativa relativa, como la de mayor aplicación para nuestro estudio poblacional, con las claras ventajas de que no precisa como en otros estudios cromosomas en división, que no se incluyen secuencias subteloméricas en la medida del tamaño del telómero, que nos permite adquirir resultados en un corto periodo de tiempo y que estos son altamente reproducibles.

Una vez realizadas las mediciones oportunas en cada grupo de estudio, observamos como había diferencias en la longitud telomérica entre los diferentes subgrupos poblacionales incluidos. Así el grupo control, sano, tenía mayor longitud telomérica, siendo algo menor con la media de los ictus isquémicos. Sin embargo, estos dos grupos, se diferenciaban en gran manera con la media de los otros 3 grupos, ictus hemorrágicos, demencia vascular y enfermedad de Alzheimer.

El acortamiento de los telómeros es un mecanismo que se ha demostrado en fibroblastos, células madre hematopoyéticas, leucocitos, queratinocitos, células epiteliales y células endoteliales (297-302). Este acortamiento se ha vinculado a una predisposición de padecer determinadas enfermedades como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas, y patología cardiovascular. Aunque hay estudios que determinan que en pacientes sanos con la edad se produce un acortamiento de los telómeros, en nuestro estudio este hecho no lo hemos visto reflejado (292).

Para analizar una eventual influencia de la edad en nuestros resultados respecto a la longitud telomérica, dividimos nuestros grupos poblacionales en función de la edad, manteniéndose la diferencia de que en el grupo control el tamaño del telómero era el mayor en todos los grupos de edad, lo que nos permite considerar que en sujetos sanos, sin enfermedades crónicas, y con la única presencia de factores de riesgo en un bajo porcentaje de ellos, el tamaño del telómero se mantiene estable.

Los pacientes con ictus isquémicos presentaban un tamaño de los telómeros menor que el grupo control, con la única diferencia de que en este grupo el porcentaje de todos los factores de riesgo vascular clásicos era mayor. Nuestra hipótesis es que la diferencia de tamaño de los telómeros entre ambos grupos puede ser a expensas de una significativa diferencia de factores de riesgo en el grupo de ictus isquémicos.

Hay estudios que reflejan una relación entre el acortamiento de los telómeros, y la presencia de HTA, diabetes mellitus, dislipemia y tabaquismo (303-308). Estos factores se sumarían al estrés oxidativo, a la inflamación y al aumento del turnover celular como los principales determinantes del acortamiento telomérico.

Si comparamos el grupo control y los ictus isquémicos, con los otros 3 subgrupos poblacionales las diferencias son significativas. Tanto en los ictus hemorrágicos, como en la demencia vascular y la enfermedad de Alzheimer de nuestra serie es francamente menor el tamaño de los telómeros.

Este hecho es conocido, en lo que consideramos como enfermedades degenerativas como se trata de la enfermedad de Alzheimer y la demencia vascular.

Como hemos comentado anteriormente la enfermedad de Alzheimer es la patología neurológica en la que más se ha vinculado el tamaño del telómero con la probabilidad de padecer dicha enfermedad. La hipótesis que más se vincula es la influencia del estrés oxidativo en su patogenia, el cual puede contribuir a la erosión del telómero y causar un acortamiento acelerado. Los estudios que se han realizado con grupos controles, van en contra de pensar que estos telómeros más cortos sean una simple aceleración del proceso de envejecimiento (287). Esta última afirmación la corroboramos con la diferencia existente en nuestro estudio (media de longitud telomérica en el grupo control de 11,002 y en el grupo de Alzheimer 7,38).

Respecto al ictus hemorrágico, la longitud media de los telómeros era similar a la demencia vascular y a la enfermedad de Alzheimer. Su diferencia marcada respecto al grupo control y al de ictus isquémicos, con los cuales compartía un perfil similar de factores de riesgo vascular clásicos y similares márgenes de edad, nos hace pensar que el menor tamaño de los telómeros pueda influir en la patogenia de la enfermedad.

La cuestión de si la pérdida del tamaño del telómero es un factor causal en la patogenia del ictus hemorrágico, o si tanto el menor tamaño telomérico como el ictus hemorrágico son causados por un mecanismo etiológico diferente requiere investigaciones añadidas, aunque existen datos de apoyo que nos hacen pensar que sean un factor añadido a los ya conocidos factores de riesgo dentro de la patogenia de la enfermedad (166,167).

6.4.2. Longitud telomérica y pronóstico funcional en los ictus.

Como objetivo fundamental, una vez establecido que el tamaño del telómero es diferente en los grupos poblacionales estudiados, buscamos identificar una eventual relación entre la longitud telomérica en los ictus isquémicos y hemorrágicos con el pronóstico funcional al año.

Para ello, analizamos el pronóstico de los 135 pacientes con ictus, su pronóstico basándonos en la escala de Rankin modificada. En nuestro estudio no encontramos relación entre la longitud y el pronóstico funcional. No existen datos en la literatura acerca de un posible papel del tamaño de los telómeros y su relación con el pronóstico funcional. Se ha descrito una menor longitud telomérica y el riesgo de padecer un ictus, bien sea isquémico o hemorrágico, pero no el papel que puede jugar en el pronóstico de nuestros pacientes.

No obstante, si que hemos encontrado diferencias en la longitud media de aquellos pacientes que fallecieron en ambos grupos, siendo esas diferencias aún mayores, si analizamos la longitud de todos los pacientes incluidos en los grupos de ictus isquémicos y hemorrágicos. En los pacientes con ictus isquémicos que fallecieron la longitud media fue 10,45, mientras que en los ictus hemorrágicos fue de 5,69.

Estos datos consideramos que son relevantes dada la alta mortalidad de nuestra serie en ambos grupos, de un 20%, por lo que en el caso del ictus hemorrágico podríamos sugerir que no sólo una longitud menor del telómero puede tener un papel en la patogenia de la enfermedad, sino que puede suponer un riesgo aumentado de mortalidad.

En otras patologías, como en el síndrome coronario agudo, también se ha establecido una relación entre una menor longitud telomérica y una mayor incidencia de muerte por cualquier causa, sin encontrar mayor incidencia de sucesos cardiovasculares adversos, incluidos accidentes cerebrovasculares (309).

Incluso en estudios en pacientes sanos se encontró una menor supervivencia en los que presentaban una menor longitud telomérica, fundamentalmente a expensas de mortalidad cardiovascular y enfermedades infecciosas (310).

Estos resultados, al igual, que la ausencia de relación con el pronóstico funcional en los ictus isquémicos, habría que refrendarlo en estudios posteriores, con un número mayor de pacientes.

6.4.3. Longitud telomérica al año.

Los telómeros son marcadores de estrés oxidativo, y de envejecimiento celular, en un marcado ambiente proinflamatorio. Todas estas características son las responsables del daño en el endotelio vascular, y que aúnen el proceso final causante del acortamiento del telómero. Por ese motivo, los telómeros se considera que disminuyen con la edad, y que están relacionados con la aparición de diferentes patologías.

Consideramos que resultaba de interés el comparar en una muestra de nuestra población, la longitud telomérica de forma basal, en el momento del ingreso, y una segunda medida al año. Se seleccionaron 22 pacientes, de ambos sexos, y todos ellos cumplían una serie de requisitos: habían sufrido un ictus isquémico, habían recibido rehabilitación, se les había realizado control exhaustivo de los factores de riesgo vascular, y presentaban un buen pronóstico funcional, definido por una puntuación menor o igual de 2 en la escala de Rankin.

En esos 22 pacientes, la media de la longitud telomérica fue de 10,27, mientras que al año el resultado fue de 14,07. El resultado es estadísticamente significativo con una $p < 0,001$. De esta manera demostramos una asociación estadísticamente significativa, a favor de que el tamaño del telómero medido al año en los mismos pacientes se había incrementado.

Dicho resultado es sorprendente si nos basamos en lo que podemos esperar de que los telómeros son marcadores de envejecimiento celular, y lo esperado tras un año, es que su tamaño se haya recortado. Cuando nos planteamos su medida, en un grupo con unas premisas seleccionadas, nuestro objetivo era demostrar una estabilidad del tamaño si se realizaba un control estricto de los factores de riesgo y los pacientes tenían un buen pronóstico funcional.

Hay datos en la literatura que apoyan la idea de que un adecuado control de factores de riesgo, el ejercicio físico y la dieta retrasan el acortamiento del telómero y consecuentemente el envejecimiento celular.

El control de los factores de riesgo vascular se ha relacionado con telómeros de mayor tamaño, a través de un aumento de la actividad de la telomerasa, siendo la fuerza de asociación mayor cuando se realiza de forma conjunta control de factores de riesgo y estilos de vida saludables, como en un estudio de cáncer de próstata en el que la abstención de tabaco, alta ingesta de frutas y verduras, reducir el índice de masa corporal y el aumento de ejercicio físico se relacionaba con longitud telomérica mayor (311). De igual manera, siguiendo las mismas premisas, se realizó un estudio exclusivamente en mujeres, determinado mayor longitud del telómero, en cada condición por separado, siendo la fuerza de asociación y el tamaño mayor al combinar todos los factores y estilos de vida (312).

Song et al demostraron que la duración del ejercicio se relacionaba inversamente con biomarcadores que dañan el DNA y los telómeros y con la expresión de p16, un biomarcador de envejecimiento celular (313). Werner et al, asociaron el ejercicio en ratones con elevada actividad de la telomerasa y supresión de proteínas apoptóticas, como p53 y p16 (314).

En humanos se ha comparado en leucocitos de atletas que tenían una elevada actividad de la telomerasa y reducido el acortamiento de los telómeros, en comparación con personas que no eran atletas (315). Por todas estas razones, el ejercicio parece estar asociado con una reducción del estrés oxidativo y un aumento de expresión de proteínas que estabilizan el telómero, y así reducir el envejecimiento celular.

Con la dieta existen resultados en la misma línea. En animales, reduciendo la ingesta de alimentos, se reduce la carga de oxidación y con ello se reduce el daño del DNA, manteniendo las células biológicamente jóvenes e incrementando la esperanza de vida hasta en un 66% (316). Los estilos de vida saludables con dieta rica en frutas y en verduras, combinado con el ejercicio, la disminución del índice de masa corporal y la abstención del hábito tabáquico está en relacionado con telómeros de mayor tamaño (310). También se ha relacionado un mayor tamaño con la toma de vitamina C y E (317).

El tamaño del telómero es un indicador del envejecimiento biológico, en el que influyen tres posibles mecanismos. Por una parte, el estrés oxidativo como hemos venido comentado con anterioridad. Un segundo mecanismo es la inflamación crónica que promueve el acortamiento del telómero, especialmente en leucocitos, posiblemente por un aumento del turnover celular (318). Y por último, un aumento de la resistencia a la insulina puede contribuir a la erosión del telómero (319).

Estos mecanismos probablemente expliquen el efecto protector en el tamaño del telómero, que tiene el control de los factores de riesgo, el ejercicio físico, y una dieta saludable. Así podríamos explicar los resultados que hemos obtenido en nuestro estudio, con la aportación que supone el realizar dos medidas del mismo paciente al año, demostrando que no sólo se estabiliza el tamaño del telómero en pacientes que se cumplen esas premisas, sino que incluso aumenta.

Los estudios que se han realizado con anterioridad se basan en una única medida de la longitud del telómero, por lo tanto consideramos que el realizar un seguimiento del tamaño del telómero nos puede ayudar a entender las implicaciones fisiopatológicas del telómero en la fisiopatología del ictus, con las modificaciones que puede suponer el control de los factores de riesgo y estilos de vida que realizamos como prevención secundaria en nuestros pacientes.

6.4.4. Longitud telomérica y factores de riesgo.

En nuestra muestra objetivamos una relación estadísticamente significativa entre la longitud telomérica y el consumo de alcohol en pacientes con ictus isquémicos, de manera que tenían los telómeros más largos aquellos que consumían alcohol. Todos los pacientes que eran consumidores de alcohol, fueron definidos como consumidores “moderados”, clasificando el consumo de alcohol entre aquellos que no consumían nada, moderados si ingerían menos de 3 unidades/diarias de alcohol, y un alto consumo si este era mayor. Los 10 pacientes del grupo de ictus isquémicos que aseguraron realizar una ingesta habitual, fueron definidos en base a ese criterio como “moderados consumidores”.

El consumo de alcohol tiene múltiples acepciones que lo relacionan como hábito saludable o como perjudicial para la salud en función de la cantidad ingerida. Por una parte el exceso se ha asociado a múltiples enfermedades, incluyendo el riesgo para muchos tipos de cáncer (320). Por otra parte, su consumo ligero o moderado, se considera que ejerce notables efectos beneficiosos, reduciendo el riesgo de enfermedades cardiovasculares, y ayudando a preservar el nivel cognitivo y el estado físico con la edad (321-324).

Muy pocos estudios han analizado la relación de la longitud telomérica y el consumo de alcohol. En un estudio de casos y controles comparando el consumo social y el abuso, este fue relacionado con menor tamaño del telómero, probablemente debido a la relación entre el exceso de consumo de alcohol y la carcinogénesis (325). Mientras que en otro, incluso se relaciona el acortamiento del telómero con un consumo moderado (326).

Aunque los mecanismos por los cuales el alcohol puede actuar en la actividad de la telomerasa no son conocidos, podemos especular que un consumo moderado, como el de nuestros pacientes con ictus isquémicos podría influir en mantener una mayor longitud telomérica, de la misma manera que ejerce efectos cardiosaludables, su consumo moderado podría resultar en un beneficio para frenar el envejecimiento celular. Con el tamaño muestral que tenemos de consumidores de alcohol (1 con telómeros pequeños y 9 con telómeros grandes) sería interesante aumentar el tamaño muestral e incluir consumidores de abuso en pacientes con ictus para objetivar que diferencias podemos encontrar, ya que hasta la fecha es el único estudio que relaciona el consumo de alcohol con la longitud telomérica.

No hemos encontrado relación entre otros factores de riesgo y la longitud telomérica ni en el grupo de ictus isquémico ni en el de ictus hemorrágico. Se han identificado en otros estudios relación entre el hábito tabáquico y el tener telómeros más cortos, basado en el estrés oxidativo al que se exponen los fumadores, y por la producción de citoquinas que determinan un ambiente proinflamatorio en el que se promueve el acortamiento del telómero (327,328). También se han encontrado relaciones entre la diabetes y una menor longitud del telómero, siendo más escasa la asociación con otros factores de riesgo (329).

6.5. Análisis de los polimorfismos de la telomerasa.

Para determinar los genotipos de los polimorfismos de la telomerasa estudiados utilizamos PCR a tiempo real, que es la que habitualmente se utiliza en los diferentes estudios. Existen otras técnicas como el southern blot o hibridación in situ con el inconveniente de que precisa de mayor tiempo y mayores cantidades de DNA, y los microarrays con la clara ventaja de poder obtener secuenciación genómica, pero a expensas de alto coste. Por estos motivos, la PCR es la que se utiliza en la mayoría de estudios en este campo, lo cual también supone la ventaja de poder comparar los resultados obtenidos con los de otros estudios.

Nuestros objetivos fueron dos: buscar una relación entre los polimorfismos con la presencia de factores de riesgo vascular, y por otra parte, y al igual que hicimos con el tamaño del telómero analizar una eventual relación con el pronóstico funcional.

Tanto con el polimorfismo TERT 1327C>T (rs2735940), como con el polimorfismo TERC-63G>A (rs2293607) no hemos encontrado una asociación estadísticamente significativa con los factores de riesgo, y en nuestra muestra tampoco hemos encontrado que dichos polimorfismos tengan un papel pronóstico.

El papel de la telomerasa y la presencia de factores de riesgo se han analizado con anterioridad, fundamentalmente su relación con la hipertensión arterial (HTA). Según Pérez-Rivera et al, existe una asociación entre la hipertensión arterial (HTA) y el polimorfismo TERT 1327C>T (rs2735940), de manera que los portadores del alelo C que se asocia a disfunción de la telomerasa presentan con mayor frecuencia HTA (330). En otro estudio se demostró que ratones deficitarios del componente de RNA de la telomerasa (TERC -/-) eran hipertensos con más frecuencia (331).

En el ictus, tanto isquémico como hemorrágico, parece evidente que existe un componente genético que influye en la aparición de los ictus, aunque aún está lejos de quedar establecido (332). Este componente, tampoco está definido si hablamos del pronóstico funcional de nuestros pacientes (333). Los modelos más amplios y validados aceptan que conocemos un 50% de los factores que están implicados en el pronóstico. Por este motivo, sugerimos que el papel de la genética pueda ser un factor relevante en el 50% del pronóstico que desconocemos (56).

El que no hayamos encontrado relación entre los polimorfismos estudiados y el pronóstico se puede deber a varios motivos. Cuando se hacen estudios de genes fundamentalmente son de dos tipos: estudios de gen candidato como el nuestro y los que analizan todo el genoma, conocidos como estudios de genotipado masivo o GWAS (Genome Wide Association studies).

Por una parte, cuando se buscan polimorfismos de genes candidatos en enfermedades multifactoriales como es el ictus, nos encontramos con que puede haber varios rasgos genéticos no definidos, ya que el ictus es una patología poligénica. Hay que entender que en las enfermedades multifactoriales la fuerza de un único factor suele ser ínfima, si no se tienen en cuenta el resto de factores, más si cabe cuando hablamos de genética.

Otro motivo indiscutible, es que el número de pacientes es pequeño, cuando el objetivo es determinar la influencia de un polimorfismo, que habitualmente requiere poblaciones de miles de pacientes. Este tamaño muestral como el de nuestro estudio, suelen conllevar escasa potencia estadística, que en ocasiones se resuelve con la realización de meta-análisis, aunque los resultados diferentes de cada población, incluso de etnias diferentes, hace que tengan menos relevancia dichos análisis conjuntos.

Si hablamos en concreto de los polimorfismos de la telomerasa, se han realizado diferentes estudios buscando una relación con la patología vascular cerebral, tras mostrar que el polimorfismo de TERT (rs2735940) y variantes cercanas a TERC estaban relacionadas con el tamaño del telómero, sugiriendo una participación de relevancia de genes asociados a telómeros en el mantenimiento de su biología (334). Se realizó el estudio ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) desarrollado en 15, 792 personas de entre 45 y 64 años, identificándose una asociación entre dos polimorfismos (rs2736122 y rs2853668) y la incidencia de enfermedad coronaria e ictus en afroamericanos (335). En un estudio realizado en 23294 mujeres caucásicas con polimorfismos en 11 genes candidatos, no se encontró relación con variaciones genéticas de TERC, aunque si con otros genes candidatos que fueron asociados con un aumento del riesgo de ictus isquémico (336).

Probablemente, replicando los resultados de diferentes polimorfismos de otros genes implicados en el mantenimiento del telómero pueda ayudar a determinar si las variantes genéticas asociadas con la homeostasis del telómero influyen en el riesgo de patología vascular cerebral.

6.6. Análisis de los polimorfismos de autofagia.

En el caso de la autofagia, analizamos dos polimorfismos: ATG5 (rs2245214) y ATG16L1 (rs2241880). De la misma manera, que con los polimorfismos de la telomerasa, determinamos una eventual relación con la presencia de factores de riesgo clásicos y un posible papel como marcador pronóstico.

Tanto con el polimorfismo ATG5 (rs2245214) como con el polimorfismo ATG16L1 (rs2241880) no hemos encontrado una relación estadísticamente significativa con la presencia de factores de riesgo, ni tampoco que estos polimorfismos tengan un papel con el pronóstico en nuestra serie.

El papel de la autofagia en la patogenia del ictus es controvertido. Es conocido su figura esencial en la fisiología de la célula, y como las alteraciones en el proceso de degradación y reciclaje de componentes celulares influye en la patogenia de de diferentes enfermedades, incluido la patología vascular cerebral (337). Alguna investigación indica que el ictus induce activación de la autofagia (338). Mientras diferentes estudios reportan que la autofagia causa disminución energética, fragmentación del DNA y daño severo de los componentes intracelulares (339-341), otros estudios le dan a la autofagia un papel protector frente al ictus isquémico (342-345)

Existen cada vez más datos que reflejan que la autofagia en el sistema nervioso central se puede activar por la isquemia, hipoxia, deprivación energética, estrés oxidativo y neurotoxinas (346-349), siendo su acción inicial aportar respuesta a la célula ante la falta de nutrientes, de ahí que se relacione con la isquemia, considerando que activa tras la falta de nutrientes secundaria a la isquemia (350-352).

Incluso se han determinado en un estudio biomarcadores de autofagia en líquido cefalorraquídeo y suero de pacientes con ictus isquémico, Beclin1 y LC3B, y correlacionándose con un buen pronóstico funcional (353).

Seleccionamos dos polimorfismos con un papel central en la fisiopatología de la autofagia, siendo ATG 5 y ATG16L1 destacados en la formación de la autofagosoma, y a los que se les ha relacionado con otras patologías como el lupus o la enfermedad de Crohn, pero en nuestro estudio no hemos encontrado relación en nuestro estudio ni con el ictus isquémico ni con el hemorrágico, ni en su relación con los factores de riesgo vascular ni con el pronóstico funcional.

7. CONCLUSIONES.

- La longitud telomérica en los pacientes con ictus isquémicos y en el grupo control es mayor que en los ictus hemorrágicos, en la demencia vascular y en la enfermedad de Alzheimer.
- En los pacientes con ictus isquémicos, la longitud telomérica se relaciona de forma significativa con el hábito enólico, de modo que los consumidores “moderados” se relacionan con una longitud del telómero mayor.
- No hemos demostrado asociación significativa entre la longitud telomérica y otros factores de riesgo cardiovascular.
- No hemos encontrado asociación significativa entre la longitud telomérica y el pronóstico funcional ni en ictus isquémico ni en ictus hemorrágico.
- En pacientes con buen pronóstico funcional basados en la escala de Rankin al año, la longitud del telómero aumenta de forma significativa, por lo que el control de factores de riesgo y hábitos de vida saludables como la dieta y el ejercicio físico, pueden frenar el envejecimiento celular, y con ello el acortamiento telomérico.
- No se ha objetivado asociación estadística entre los polimorfismos de la telomerasa TERT-1327C>T (rs2735940) y TERC-63G>A (rs2293607) y los factores de riesgo vascular clásicos ni con el pronóstico funcional en ictus isquémicos y en ictus hemorrágicos.

- No se ha objetivado asociación estadística entre los polimorfismos de autofagia ATG5 (rs2245214) y ATG16L1 (rs2241880), y los factores de riesgo vascular clásicos ni con el pronóstico funcional en pacientes con ictus isquémicos y hemorrágicos.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. 2013. (Accessed April, 1st, 2013, at www.who.int.)
2. Instituto Nacional de Estadística. 2013. (Accessed March, 30th, 2013, at www.ine.es.)
3. Feigin VL, Forouzanfar MH, Krishnamurthi R, Mensah GA, Connor M, et al. Global and regional burden of stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2010; 383:245-54.
4. Fuentes B, Tejedor ED. Stroke: The worldwide burden of stroke--a blurred photograph. *Nat Rev Neurol*. 2014; 10: 127-8.
5. Griending KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003; 108: 1912-6.
6. Madamanchi NR, Runge MS. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res*. 2007; 100: 460-73.
7. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF, Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* 1997; 337: 408-16.
8. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78: 547-81
9. Pak JW, Herbst A, Bua E, Gokey N, McKenzie D, Aiken JM. Mitochondrial DNA mutations as a fundamental mechanism in physiological declines associated with aging. *Aging Cell* 2003; 2:1-7.
10. Richter C. Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *Int. J. Biochem. Cell Biol*, 1995; 27: 647-653.
11. Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging Dis*. 2015; 6: 109-20.
12. González R. Rehabilitación médica de ancianos: fisiología del envejecimiento. Masson, 1995; 1-5.
13. Li H, Horke S, Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014; 237: 208-19.

14. Sinha N, Dabla PK. Oxidative Stress and Antioxidants in Hypertension-A Current Review. *Curr Hypertens Rev.* 2015; 11: 132-42.
15. Tangvarasittichai S. Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus. *World J Diabetes.* 2015; 6: 456-80.
16. Smith JG, Newton-Cheh C. Genome-wide association studies of late-onset cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2015; 83: 131-41.
17. Lucke-Wold BP, Logsdon AF, Turner RC, Rosen CL, Huber JD. Aging, the metabolic syndrome, and ischemic stroke: redefining the approach for studying the blood-brain barrier in a complex neurological disease. *Adv Pharmacol.* 2014; 71: 411-49.
18. Tian XL, Li Y. Endothelial cell senescence and age-related vascular diseases. *J Genet Genomics.* 2014 20; 41: 485-95.
19. Dailey T, Metcalf C, Mosley YI, Sullivan R, Shinozuka K, et al. An Update on Translating Stem Cell Therapy for Stroke from Bench to Bedside. *J Clin Med.* 2013; 2: 220-241.
20. Mattson MP. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2008; 1144: 97-112.
21. Sulter G, Steen C, De Keyser J. Use of the Barthel index and modified Rankin scale in acute stroke trials. *Stroke.* 1999; 30: 538-41.
22. Banks JL, Marotta CA. Outcomes validity and reliability of the modified Rankin scale: implications for stroke clinical trials: a literature review and synthesis. *Stroke.* 2007; 38: 1091-6.
23. Cheng B, Forkert ND, Zavaglia M, Hilgetag CC, Golsari A, et al. Influence of stroke infarct location on functional outcome measured by the modified Rankin scale. *Stroke.* 2014; 45: 1695-702.
24. Cheng B, Forkert ND, Zavaglia M, Hilgetag CC, Golsari A. Influence of stroke infarct location on functional outcome measured by the modified rankin scale. *Stroke.* 2014; 45: 1695-702.
25. Heuschmann PU, Wiedmann S, Wellwood I, Rudd A, Di Carlo A, et al. Three-month stroke outcome: the European Registers of Stroke (EROS) investigators. *Neurology.* 2011; 76: 159-65.

26. Cayuela A, Cayuela L, Escudero-Martínez I, Rodríguez-Domínguez S, González A, et al. Analysis of cerebrovascular mortality trends in Spain from 1980 to 2011. *Neurologia*. 2016; 31: 370-8.
27. Estrategia en Ictus del Sistema Nacional de Salud. Sanidad 2008. Ministerio de Sanidad y Consumo. [consultado 10 Dic2013]. Disponible en: http://www.semg.es/doc/documentos_SEMG/estrategias_ictus_SNS.pdf
28. Qureshi AI, Mendelow AD, Hanley DF. Intracerebral haemorrhage. *Lancet*. 2009; 373 : 1632-44.
29. Lovelock CE, Molyneux AJ, Rothwell PM. Change in incidence and aetiology of intracerebral haemorrhage in Oxfordshire, UK, between 1981 and 2006: a population-based study. *Lancet Neurol*. 2007; 6: 487-93.
30. Sacco S, Marini C, Toni D, Olivieri L, Carolei A. Incidence and 10-year survival of intracerebral hemorrhage in a population-based registry. *Stroke* 2009; 40: 394-9.
31. Poon MT, Fonville AF, Al-Shahi Salman R. Long-term prognosis after intracerebral haemorrhage: systematic review and meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2014 Jun; 85: 660-7.
32. Murthy SB, Moradiya Y, Dawson J, Lees KR, Hanley DF. Perihematomal Edema and Functional Outcomes in Intracerebral Hemorrhage: Influence of Hematoma Volume and Location. *Stroke* 2015; 46: 3088-92.
33. Sacco RL, Shi T, Zamanillo MC, Kargman DE. Predictors of mortality and recurrence after hospitalized cerebral infarction in an urban community: the Northern Manhattan Stroke Study. *Neurology*. 1994; 44: 626-34.
34. Norrving B. Long-term prognosis after lacunar infarction. *Lancet Neurol*. 2003 ;2: 238-45.
35. Huang YH, Xia ZX, Wei W, Gao GR, Gong JJ, et al. The impact of leucoaraiosis on neurological function recovery in elderly patients with acute cerebral infarction: Clinical study involving 279 Chinese patients. *J Int Med Res*. 2014; 42: 857-62.

36. Palacio S, McClure LA, Benavente OR, Bazan C , Pergola P, et al. Lacunar strokes in patients with diabetes mellitus: risk factors, infarct location, and prognosis: the secondary prevention of small subcortical strokes study. *Stroke*. 2014; 45: 2689-94.
37. De Jong G, Kessels F, Lodder J. Two types of lacunar infarcts. Further arguments from a study on prognosis. *Stroke* 2002; 33: 2072–76.
38. Samuelsson M, Söderfelt B, Olsson GB. Functional outcome in patients with lacunar infarction. *Stroke* 1996; 27: 842–46
39. Abdul-Rahim AH, Fulton RL, Sucharew H, Kleindorfer D, Khatri P, et al. National Institutes of Health Stroke Scale Item Profiles as Predictor of Patient Outcome: External Validation on Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study Data. *Stroke*. 2015; 46: 2779-85.
40. Wu O, Cloonan L, Mocking SJ, Bouts MJ, Copen WA, et al. Role of Acute Lesion Topography in Initial Ischemic Stroke Severity and Long-Term Functional Outcomes. *Stroke*. 2015; 46: 2438-44.
41. Fink JN, Selim MH, Kumar S, Silver B, Linfante I, et al. Is the association of National Institutes of Health Stroke Scale scores and acute magnetic resonance imaging stroke volume equal for patients with right- and left-hemisphere ischemic stroke? *Stroke*. 2002; 33: 954-8.
42. Ueda T, Sakaki S, Kumon Y, Ohta S. Multivariable analysis of predictive factors related to outcome at 6 months after intra-arterial thrombolysis for acute ischemic stroke. *Stroke*. 1999; 30: 2360-5.
43. Hankey GJ. Long-term outcome after ischaemic stroke/transient ischaemic attack. *Cerebrovasc Dis*. 2003 ;16 Suppl 1: 14-9.
44. Rusanen H, Saarinen JT, Sillanpää N. Collateral Circulation Predicts the Size of the Infarct Core and the Proportion of Salvageable Penumbra in Hyperacute Ischemic Stroke Patients Treated with Intravenous Thrombolysis. *Cerebrovasc Dis*. 2015 ;40: 182-190.

45. David S. Liebeskind, Reza Jahan, Raul G. Nogueira, Osama O. Zaidat, Jeffrey L. Saver. Impact of Collaterals on Successful Revascularization in Solitaire FR With the Intention for Thrombectomy. *Stroke*. 2014; 45: 2036–2040.
46. Berkhemer OA, Fransen PS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2015; 372: 11-20.
47. Saver JL, Goyal M, Bonafe A, Diener HC, Levy EI. Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N Engl J Med*. 2015; 372: 2285-95.
48. Alexander LD, Pettersen JA, Hopyan JJ, Sahlas DJ, Black SE. Long-term prediction of functional outcome after stroke using the Alberta Stroke Program Early Computed Tomography Score in the subacute stage. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2012; 21: 737-44.
49. Song D, Lee K, Kim EH, Kim YD, Kim J. Value of utilizing both ASPECTS and CT angiography collateral score for outcome prediction in acute ischemic stroke. *Int J Stroke*. 2015; 10: 1018-23.
50. Barber PA, Demchuk AM, Zhang J, Buchan AM. Validity and reliability of a quantitative computed tomography score in predicting outcome of hyperacute stroke before thrombolytic therapy. ASPECTS Study Group. *Alberta Stroke Programme Early CT Score*. *Lancet*. 2000 ; 355: 1670–1674.
51. Demchuk AM, Hill MD, Barber PA, Silver B, Patel SC, Levine SR; NINDS rtPA Stroke Study Group, NIH. Importance of early ischemic computed tomography changes using ASPECTS in NINDS rtPA Stroke Study. *Stroke*. 2005; 36: 2110–2115.
52. Rangaraju S, Streib C, Aghaebrahim A, Jadhav A, Frankel M, et al. Relationship Between Lesion Topology and Clinical Outcome in Anterior Circulation Large Vessel Occlusions. *Stroke*. 2015; 46: 1787-92
53. Phan TG, Demchuk A, Srikanth V, Silver B, Patel SC, et al. Proof of concept study: relating infarct location to stroke disability in the NINDS rt-PA trial. *Cerebrovasc Dis*. 2013;35: 560–565.

54. Castillo J. Deteriorating stroke: diagnostic criteria, predictors, mechanisms and treatment. *Cerebrovasc Dis.* 1999; 9 Suppl 3: 1-8.
55. Muir KW, Buchan A, von Kummer R, Rother J, Baron JC. Imaging of acute stroke. *Lancet Neurol.* 2006; 5: 755-68.
56. Weimar C, Ziegler A, König IR, Diener HC. Predicting functional outcome and survival after acute ischemic stroke. *J Neurol.* 2002; 249: 888-95.
57. Weimar C, König IR, Kraywinkel K, Ziegler A, Diener HC, et al. Age and National Institutes of Health Stroke Scale Score within 6 hours after onset are accurate predictors of outcome after cerebral ischemia: development and external validation of prognostic models. *Stroke.* 2004; 35: 158-62.
58. Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85: 6622-6.
59. Blackburn EH: Structure and function of telomeres. *Nature.* 1991; 350: 569-73.
60. Muller HJ: The remaking of chromosomes. *The Collecting Net* 1938; 13: 181-198.
61. McClintock B: The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 1941; 26: 234-282.
62. Hayflick L. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-36.
63. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458-60.
64. J Dunlap, J Loros y PJ DeCoirsey, *Chronobiology. Biological Timekeeping.* Nueva York:Sinauer,2004.
65. Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, et al. Telomere structure and telomerase in health and disease (review). *Int J Oncol.* 2012; 41: 1561-9.
66. Calado RT, Young NS. Telomere diseases. *N Engl J Med.* 2009; 361: 2353-65.
67. Artandi SE. Telomeres, telomerase, and human disease. *N Engl J Med.* 2006; 355: 1195-7.

68. Autexier C, Greider CW. Boundary elements of the Tetrahymena telomerase RNA template and alignment domains. *Genes Dev* 1995; 9: 2227-39.
69. Bhattacharyya A, Blackburn EH. Architecture of telomerase RNA. *EMBO J* 1994; 13: 5721-31.
70. Greider CW and Blackburn EH: Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 1985; 43: 405-413.
71. Wyatt HD, West SC, Beattie TL. InTERTpreting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38: 5609-22.
72. Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol* 2007; 3: 640-9.
73. Liu, L. et al. Telomere lengthening early in development. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 1436-1441.
74. Autexier, C. & Greider, C.W. Boundary elements of the Tetrahymena telomerase RNA template and alignment domains. *Genes Dev* 1995; 9: 2227-2239.
75. Autexier, C. & Greider, C.W. Functional reconstitution of wild-type and mutant Tetrahymena telomerase. *Genes Dev* 1994; 8: 563-575.
76. Bhattacharyya, A. & Blackburn, E.H. Architecture of telomerase RNA. *EMBO J* 1994; 13: 5721-5731.
77. Blasco, M.A. et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997; 91: 25-34.
78. Herrera, E., Samper, E. & Blasco, M.A. Telomere shortening in mTR^{-/-} embryos is associated with failure to close the neural tube. *EMBO J* 1999 ; 18: 1172-1181.
79. Armanios, M. et al. Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging. *Am J Hum Genet* 2009; 85: 823- 832.
80. Tomas-Loba, A. et al. Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancerresistant mice. *Cell* 2008; 135: 609-622.
81. Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, et al. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet* 1998; 19: 32-8.

82. Mitchell JR, Wood E, Collins K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 1999; 402: 551-5.
83. Dokal I. Dyskeratosis congenita in all its forms. *Br J Haematol* 2000; 110: 768-79.
84. Walne AJ, Vulliamy T, Marrone A, et al. Genetic heterogeneity in autosomal recessive dyskeratosis congenita with one subtype due to mutations in the telomerase-associated protein NOP10. *Hum Mol Genet* 2007; 16: 1619-29.
85. Savage SA, Giri N, Baerlocher GM, Orr N, Lansdorp PM, Alter BP. TIN2, a component of the shelterin telomere protection complex, is mutated in dyskeratosis congenita. *Am J Hum Genet* 2008; 82: 501-9.
86. Vulliamy T, Marrone A, Szydlo R, Walne A, Mason PJ, Dokal I. Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC. *Nat Genet* 2004; 36: 447-9.
87. Yamaguchi H, Baerlocher GM, Lansdorp PM, et al. Mutations of the human telomerase RNA gene (TERC) in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 2003; 102: 916-8.
88. Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, et al. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 2007; 356: 1317-26.
89. Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, et al. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 7552-7.
90. Alder JK, Chen JJ, Lancaster L, et al. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 13051-6.
91. Calado RT, Regal JA, Kleiner DE, et al. A spectrum of severe familial liver disorders associate with telomerase mutations. *PLoS One* 2009;4:e7926.
92. Gonzalez-Huezo MS, Villela LM, Zepeda-Florencio Mdel C, Carrillo-Ponce CS, Mondragon-Sanchez RJ. Nodular regenerative hyperplasia associated to aplastic anemia: a case report and literature review. *Ann Hepatol* 2006; 5: 166-9.
93. Rocha V, Devergie A, Socie G, et al. Unusual complications after bone marrow transplantation for dyskeratosis congenita. *Br J Haematol* 1998; 103: 243-8.

94. Talbot-Smith A, Syn WK, MacQuillan G, Neil D, Elias E, Ryan P. Familial idiopathic pulmonary fibrosis in association with bone marrow hypoplasia and hepatic nodular regenerative hyperplasia: a new "trimorphic" syndrome. *Thorax* 2009; 64: 440-3.
95. Gramatges MM, Telli ML, Balise R, Ford JM. Longer relative telomere length in blood from women with sporadic and familial breast cancer compared with healthy controls. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2010; 19: 605-13
96. Wentzensen IM, Mirabello L, Pfeiffer RM, Savage SA. The association of telomere length and cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011; 20: 1238-50.
97. Willeit P, Willeit J, Kloss-Brandstätter A, Kronenberg F, Kiechl S. Fifteen-year follow-up of association between telomere length and incident cancer and cancer mortality. *JAMA.* 2011; 306: 42-4.
98. Ma H, Zhou Z, Wei S, Liu Z, Pooley KA, Dunning AM, et al. Shortened telomere length is associated with increased risk of cancer: a meta-analysis. *PLoS One.* 2011; 6: e20466.
99. Liu J, Yang Y, Zhang H, Zhao S, Liu H, Ge N, Yang H. Longer leukocyte telomere length predicts increased risk of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: a case-control analysis. *Cancer.* 2011 15; 117: 4247-56.
100. Shen M, Cawthon R, Rothman N, Weinstein SJ, Virtamo J, Hosgood HD 3rd, et al. A prospective study of telomere length measured by monochrome multiplex quantitative PCR and risk of lung cancer. *Lung Cancer.* 2011; 73: 133-7.
101. Müezziner A, Zaineddin AK, Brenner H. A systematic review of leukocyte telomere length and age in adults. *Ageing Res Rev.* 2013; 12: 509-19.
102. Mu Y, Zhang Q, Mei L, Liu X, Yang W, Yu J. Telomere shortening occurs early during gastroduodenal carcinogenesis. *Med Oncol.* 2012; 29: 893-8.
103. Mandal P. Recent advances of Blood telomere length (BTL) shortening: A potential biomarker for development of cancer. *Pathol Oncol Res.* 2018. Epub ahead of print.

104. Shay JW. Aging and cancer: are telomeres and telomerase the connection? *Mol Med Today*. 1995; 1: 378-84.
105. Gaspar TB, Sá A, Lopes JM, Sobrinho-Simões M, Soares P, Vinagre J. Telomere Maintenance Mechanisms in Cancer. *Genes (Basel)*. 2018; 9(5).
106. Schmitt H, Blin N, Zankl H, Scherthan H. Telomere length variation in normal and malignant human tissues. *Genes Chromosomes Cancer*. 1994; 11: 171-7.
107. Tahara H, Nakanishi T, Kitamoto M, Nakashio R, Shay JW, Tahara E, et al. Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1995 ;55: 2734-6.
108. Apiwat M, Pakpoom S, Saengsoon T, Virate S, Anavaj S, Saowanee Y, et al. Telomerase Activity in Oral Leukoplakia and Head and Neck squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 3530-3.
109. Maruyama Y, Hanai H, Fujita M, Kaneko E. Telomere length and telomerase activity in carcinogenesis of the stomach. *Jpn J Clin Oncol*. 1997; 27: 216-20.
110. Calado RT, Cooper JN, Padilla-Nash HM, Sloand EM, Wu CO, Scheinberg P, et al. Short telomeres result in chromosomal instability in hematopoietic cells and precede malignant evolution in human aplastic anemia. *Leukemia*. 2012; 26: 700-7.
111. Nan H, Du M, De Vivo I, Manson JE, Liu S, McTiernan A, et al. Shorter telomeres associate with a reduced risk of melanoma development. *Cancer Res*. 2011; 71: 6758-63.
112. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA and Shay JW: Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1995; 1: 249-255.
113. Hiyama E and Hiyama K: Clinical utility of telomerase in cancer. *Oncogene* 2002; 21: 643-649.
114. Shay JW: Telomerase in cancer: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *Cancer J Sci Am* 1998; 4: 26-34.

115. Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, Hiyama K, Imamura Y, Murakami Y, et al. Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 3258-3262.
116. Hiyama E, Kodama T, Shinbara K, Iwao T, Itoh M, Hiyama K, et al. Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors. *Cancer Res* 1997; 57: 326-331.
117. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA and Reddel RR: Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* 1997; 3: 1271-1274.
118. Bryan TM and Reddel RR: Telomere dynamics and telomerase activity in in vitro immortalised human cells. *Eur J cancer* 1997; 33: 767-773.
119. Melin BS, Nordfjäll K, Andersson U, Roos G. hTERT cancer risk genotypes are associated with telomere length. *Genet Epidemiol.* 2012; 36: 368-72.
120. Varadi V, Brendle A, Brandt A, Johansson R, Enquist K, Henriksson R, et al. Polymorphisms in telomere-associated genes, breast cancer susceptibility and prognosis. *Eur J Cancer.* 2009; 45: 3008-16.
121. Jones AM, Beggs AD, Carvajal-Carmona L, Farrington S, Tenesa A, Walker M, et al. TERC polymorphisms are associated both with susceptibility to colorectal cancer and with longer telomeres. *Gut.* 2012; 61: 248-54.
122. Liu Z, Ma H, Wei S, Li G, Sturgis EM, Wei Q. Telomere length and TERT functional polymorphisms are not associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011; 20: 2642-5.
123. Lobstein, JG. *Tratie d'anatomiepathologique.* Paris, 1833.
124. Marchand F. Über Arteriosklerose (atherosklerose). *Verhandlungen des Kongress für innere medizin 21 st Kongress, Leipzig, 1904.*
125. Real Academia Española. *Diccionario de la lengua española.* 22a ed. [Madrid]: Real Academia Española; [Espasa]; 2001.
126. Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. Coronary atherosclerosis: a multifactorial disease. *Circulation* 1993; 87: II3-II6.

127. Strong JP, Malcom GT, McMahan CA, et al. Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: implications for prevention from the Pathobiological Determinants of Atherosclerosis in Youth Study. *JAMA* 1999; 281: 727-35.
128. Davies MJ, Woolf N, Rowles PM, Pepper J. Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Br Heart J* 1988; 60: 459-64.
129. Li H, Horke S, Förstermann U. Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2014; 237: 208-19.
130. Matthews C, Gorenne I, Scott S, et al. Vascular smooth muscle cells undergo telomere-based senescence in human atherosclerosis: effects of telomerase and oxidative stress. *Circ Res* 2006; 99: 156-64.
131. Panayiotou AG, Nicolaides AN, Griffin M, et al. Leukocyte telomere length is associated with measures of subclinical atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2010; 211: 176-81.
132. Khan S, Chuturgoon AA, Naidoo DP. Telomeres and atherosclerosis. *Cardiovasc J Afr*. 2012; 23: 563-71.
133. Huzen J, Peeters W, de Boer RA, et al. Circulating leukocyte and carotid atherosclerotic plaque telomere length: interrelation, association with plaque characteristics, and restenosis after endarterectomy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011; 31: 1219-25.
134. Samani NJ, Boulton R, Butler R, Thompson JR, Goodall AH. Telomere shortening in atherosclerosis. *Lancet* 2001; 358: 472-3.
135. Ogami M, Ikura Y, Ohsawa M, et al. Telomere shortening in human coronary artery diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 546-50.
136. Brouillette S, Singh RK, Thompson JR, Goodall AH, Samani NJ. White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 842-6.
137. Matsubara Y, Murata M, Watanabe K, et al. Coronary artery disease and a functional polymorphism of hTERT. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348: 669-72.

138. Nordfjall K, Osterman P, Melander O, Nilsson P, Roos G. hTERT (-1327)T/C polymorphism is not associated with age-related telomere attrition in peripheral blood. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 215-8.
139. Brouillette SW, Moore JS, McMahon AD, et al. Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet* 2007; 369: 107-14.
140. Olivieri F, Mazzanti I, Abbatecola AM, et al. Telomere/Telomerase system: a new target of statins pleiotropic effect? *Curr Vasc Pharmacol* 2012; 10: 216-24.
141. Needham BL, Diez Roux AV, Bird CE, Bradley R, Fitzpatrick AL, et al. A test of biological and behavioral explanations for gender differences in telomere length: the multi-ethnic study of atherosclerosis. *Biodemography Soc Biol.* 2014 ;60: 156-73.
142. Sanders JL, Newman AB. Telomere length in epidemiology: a biomarker of aging, age-related disease, both, or neither? *Epidemiol Rev.* 2013; 35: 112-31.
143. Von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci.* 2002; 27: 339-44.
144. Bayne S, Jones ME, Li H, Liu JP. Potential roles for estrogen regulation of telomerase activity in aging. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1114: 48-55.
145. Barrett EL, Richardson DS. Sex differences in telomeres and lifespan. *Aging Cell.* 2011; 10: 913-21.
146. Courtenay WH. Constructions of masculinity and their influence on men's well-being: a theory of gender and health. *Soc Sci Med.* 2000; 50: 1385-401.
147. McGrath M, Wong JY, Michaud D, Hunter DJ, De Vivo I. Telomere length, cigarette smoking, and bladder cancer risk in men and women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16: 815–819.
148. Nettleton JA, Diez-Roux A, Jenny NS, Fitzpatrick AL, Jacobs DR Jr. Dietary patterns, food groups, and telomere length in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Am J Clin Nutr.* 2008; 88: 1405–1412.

149. Lee M, Martin H, Firpo MA, Demerath EW. Inverse association between adiposity and telomere length: the Fels Longitudinal Study. *Am J Hum Biol.* 2011; 23(1): 100–6.
150. Demissie S, Levy D, Benjamin EJ, et al. Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study. *Aging Cell* 2006; 5: 325-30.
151. Gardner JP, Li S, Srinivasan SR, et al. Rise in insulin resistance is associated with escalated telomere attrition. *Circulation* 2005; 111: 2171-7.
152. Chen W, Gardner JP, Kimura M, et al. Leukocyte telomere length is associated with HDL cholesterol levels: The Bogalusa heart study. *Atherosclerosis* 2009; 205: 620-5.
153. Richards JB, Valdes AM, Gardner JP, et al. Homocysteine levels and leukocyte telomere length. *Atherosclerosis* 2008; 200: 271-7.
154. van der Harst P, Wong LS, de Boer RA, et al. Possible association between telomere length and renal dysfunction in patients with chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2008; 102: 207-10.
155. Epel ES, Lin J, Wilhelm FH, et al. Cell aging in relation to stress arousal and cardiovascular disease risk factors. *Psychoneuroendocrinology* 2006; 31: 277-87.
156. Lung FW, Chen NC, Shu BC. Genetic pathway of major depressive disorder in shortening telomeric length. *Psychiatr Genet* 2007; 17: 195-9.
157. Cherkas LF, Aviv A, Valdes AM, et al. The effects of social status on biological aging as measured by white-blood-cell telomere length. *Aging Cell* 2006; 5: 361-5.
158. Shammass MA. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2011; 14: 28-34.
159. Paul L. Diet, nutrition and telomere length. *J Nutr Biochem.* 2011 ; 22: 895-901
160. Crous-Bou M, Fung TT, Prescott J, Julin B, Du M. Mediterranean diet and telomere length in Nurses' Health Study: population based cohort study. *BMJ.* 2014; 349: g6674.

161. Sun Q, Shi L, Prescott J, Chiuve SE, Hu FB, De Vivo I, et al. Healthy lifestyle and leukocyte telomere length in U.S. women. *PLoS One* 2012; 7: e38374.
162. Warlow CP. Epidemiology of stroke. *Lancet* 1998; 352 Suppl 3: SIII1–4.
163. O’Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet* 2010; 376: 112–123.
164. Allende M, Molina E, González-Porras JR, Toledo E, Lecumberri R, Hermida J. Short Leukocyte Telomere Length Is Associated With Cardioembolic Stroke Risk in Patients With Atrial Fibrillation. *Stroke*. 2016; 47: 863-5.
165. Ding H, Chen C, Shaffer JR, Liu L, Xu Y, et al. Telomere length and risk of stroke in Chinese. *Stroke* 2012; 43: 658–663.
166. Zhang W, Chen Y, Wang Y, Liu P, Zhang M, et al. Short telomere length in blood leucocytes contributes to the presence of atherothrombotic stroke and haemorrhagic stroke and risk of post-stroke death. *Clin Sci (Lond)*. 2013; 125: 27-36
167. Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Kimura M, Gardner JP, Psaty BM, et al. Leukocyte telomere length and mortality in the Cardiovascular Health Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2011; 66: 421–429.
168. Fyhrquist F, Silventoinen K, Saijonmaa O, Kontula K, Devereux RB, et al. Telomere length and cardiovascular risk in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: the LIFE study. *J Hum Hypertens*. 2011; 25: 711–718.
169. Zee RY, Castonguay AJ, Barton NS, Ridker PM. Relative leukocyte telomere length and risk of incident ischemic stroke in men: a prospective, nested case-control approach. *Rejuvenation Res*. 2010; 13: 411-4.
170. Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 2008; 451: 1069-75.
171. Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging Dis*. 2015; 6: 109-20.
172. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008; 132: 27-42.

173. Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*. 2003; 426: 895-9.
174. Mortimore GE, Pösö AR. Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. *Annu Rev Nutr*. 1987; 7: 539-64.
175. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2010; 90: 1383-435.
176. Yen WL, Klionsky D. How to live long and prosper: autophagy, mitochondria, and aging. *Physiology* 2008; 23: 248-262.
177. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*. 2009; 43: 67-93.
178. Behrends C, Fulda S. Receptor proteins in selective autophagy. *Intern J Cell Biol* 2012; 1-9.
179. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10: 458-67.
180. Levine B, Mizushima N, Virgin HW. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*. 2011; 469: 323-35.
181. Deretic V. Autophagy in infection. *Curr Opin Cell Biol*. 2010; 22: 252-62.
182. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta*. 2013 ; 1833: 3448-59.
183. Reggiori F. 1. Membrane origin for autophagy. *Curr Top Dev Biol*. 2006; 74: 1-30.
184. Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature*. 1998; 395: 395-8.
185. Shintani T, Mizushima N, Ogawa Y, Matsuura A, Noda T, et al. Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO J*. 1999; 18: 5234-41.
186. Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T, et al. The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell*. 2008; 19: 2092-100.

187. Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, et al. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol.* 2001; 152: 657-68.
188. Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci.* 2003; 116: 1679-88.
189. Yousefi S1, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2006; 8: 1124-32.
190. Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2010; 90: 1383-435.
191. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med.* 2013; 368: 1845-6.
192. Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev.* 2011; 25: 795–800.
193. Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev.* 2007; 21: 1367–1381.
194. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell.* 2006; 10: 51–64.
195. Chen HY, White E. Role of autophagy in cancer prevention. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011; 4: 973–983
196. White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012; 12: 401-10.
197. Levy JMM, Towers CG, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2017; 17: 528–542
198. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nature Rev Cancer.* 2007; 7: 961–967.

199. Amaravadi RK, Lippincott-Schwartz J, Yin XM, Weiss WA, Takebe N, et al. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res.* 2011; 17: 654–666.
200. White E, DiPaola RS. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin Cancer Res.* 2009; 15: 5308–5316.
201. Jellinger KA. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *J Cell Mol Med* 2010; 14: 457-87.
202. Goedert M, Clavaguera F, Tolnay M. The propagation of prion-like protein inclusions in neurodegenerative diseases. *Trends Neurosci* 2010; 33: 317-25.
203. Ma JF, Huang Y, Chen SD, Halliday G. Immunohistochemical evidence for macroautophagy in neurones and endothelial cells in Alzheimer’s disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2010; 36: 312-9.
204. Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, et al. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005; 64: 113-22.
205. Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1107-17.
206. Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Wong E, Tang G, Koga H, et al. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington’s disease. *Nat Neurosci* 2010; 13: 567-76.
207. Lynch-Day MA, Mao K, Wang K, Zhao M, Klionsky DJ. The role of autophagy in Parkinson’s disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2(4): a009357.
208. Trancikova A, Tsika E, Moore DJ. Mitochondrial dysfunction in genetic animal models of Parkinson’s disease. *Antioxid Redox Signal* 2012; 16: 896-919.
209. Schaeffer V, Lavenir I, Ozcelik S, Tolnay M, Winkler DT, Goedert M. Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human tauopathy. *Brain* 2012; 135: 2169-77.

210. Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 2004; 36: 585-95.
211. Jellinger KA. Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *J Cell Mol Med* 2010; 14: 457-87.
212. Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, Peterhoff CM, Schmidt SD, et al. Macroautophagy — a novel beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol* 2005; 171: 87-98.
213. Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 119-31.
214. Wong E, Cuervo AM. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci* 2010; 13: 805-11
215. Rubinsztein DC, Mariño G, Kroemer G. Autophagy and aging. *Cell* 2011; 146: 682-95.
216. Tian XL, Li Y. Endothelial cell senescence and age-related vascular diseases. *J Genet Genomics*. 2014; 41: 485-95.
217. Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, Yamamoto A, Yamaguchi H, et al. Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. *Science*. 2004; 306: 1037-40.
218. Gutierrez MG, et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell*. 2004; 119: 753–766.
219. Ogawa M, et al. Escape of intracellular Shigella from autophagy. *Science*. 2005; 307: 727–731.
220. Netea-Maier RT, Plantinga TS, Van De Veerdonk FL, Smit JW, Netea MG. Modulation of inflammation by autophagy: consequences for human disease. *Autophagy*. 2016; 12: 245-60.
221. Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11: 709-30.

222. Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe* 2009; 5: 527-49.
223. Watson RO, Manzanillo PS, Cox JS. Extracellular *M. tuberculosis* DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway. *Cell* 2012; 150: 803-5.
224. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L. *Nat Genet* 2007; 39: 207-11.
225. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007; 39: 596-604.
226. Barrett JC, Hansoul S, Nicolae DL, Cho JH, Duerr RH, et al. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat Genet* 2008; 40: 955-62.
227. Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ, Tremelling M, Anderson CA, et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 2007; 39: 830-2.
228. Kirshenbaum LA. Regulation of autophagy in the heart in health and disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 2012; 60: 109.
229. Matsui Y, Takagi H, Qu X, Abdellatif M, Sakoda H, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res* 2007; 100: 914-22.
230. Verheye S, Martinet W, Kockx MM, Knaapen MW, Salu K, et al. Selective clearance of macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49: 706-15.
231. Liao X, Sluimer JC, Wang Y, Subramanian M, Brown K, et al. Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis. *Cell Metab* 2012; 15: 545-53.

232. Gong Y, He Y, Gu Y, Keep RF, Xi G, et al. Effects of aging on autophagy after experimental intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl.* 2011; 111: 113-7.
233. Hu S, Xi G, Jin H, He Y, Keep RF, et al. Thrombin-induced autophagy: a potential role in intracerebral hemorrhage. *Brain Res.* 2011; 1424: 60-6.
234. Ouyang YB, Giffard RG. ER-Mitochondria Crosstalk during Cerebral Ischemia: Molecular Chaperones and ER-Mitochondrial Calcium Transfer. *Int J Cell Biol.* 2012;2012:493934.
235. Kim KA, Shin D, Kim JH, Shin YJ, Rajanikant GK, et al. Role of Autophagy in Endothelial Damage and Blood-Brain Barrier Disruption in Ischemic Stroke. *Stroke.* 2018; 49: 1571-1579.
236. Puyal J, Clarke PG. Targeting autophagy to prevent neonatal stroke damage. *Autophagy.* 2009; 5: 1060-1.
237. Adhami F, Liao G, Morozov YM, Schloemer A, Schmithorst VJ, et al. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. *Am J Pathol.* 2006; 169: 566-83.
238. Rami A, Langhagen A, Steiger S. Focal cerebral ischemia induces upregulation of Beclin 1 and autophagy-like cell death. *Neurobiol Dis.* 2008 ; 29: 132-41.
239. Wen YD, Sheng R, Zhang LS, Han R, Zhang X, et al. Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. *Autophagy.* 2008; 4: 762-9.
240. Wei K, Wang P, Miao CY. A double-edged sword with therapeutic potential: an updated role of autophagy in ischemic cerebral injury. *CNS Neurosci Ther* 2012; 18: 879-886.
241. Carloni S, Buonocore G, Balduini W. Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiol Dis.* 2008; 32: 329-39.
242. Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, Gotoh K, Komatsu M, et al. Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol.* 2008; 172: 454-69.

243. Chen W, Sun Y, Liu K, Sun X. Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia. *Neural Regen Res.* 2014; 9: 1210-6.
244. Pérez A. Ictus de causa desconocida: epidemiología. *Neurología* 2000; 15 (Suppl 3): 5-7.
245. Hachinski VC, Potter P, Merskey H. Leukoaraiosis. *Arch Neurol.* 1987; 44 (1): 1-23.
246. Jiménez I, Agulla J, Pouso M, Sabucedo M, Rodríguez-Yáñez M, et al. Deterioro cognitivo asociado a la Leucoaraiosis: fisiopatología, manifestaciones clínicas y tratamiento. *Rev Neurol.* 2008; 47: 536-544.
247. Fazekas, F., Kléinert, R., Offenbácher, H, Schmidt, R., Kléinert, G et al. Pathological correlates of incidental MRI white matter signal hyperintensities. *Neurology* 1993; 43: 1683-1689.
248. Valdueza JM, Schreiber SJ, Roehl J-E, Klingebiel R. *Neurosonology and neuroimaging of stroke.* Stuttgart-New York:Thieme, 2008.
249. Fyhrquist F, Saijonmaa O, Strandberg T. The roles of senescence and telomere shortening in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol* 2013; 10: 274-85.
250. Butler MG, Tilburt J, DeVries A, Muralidhar B, Aue G, et al. Comparison of chromosome telomere integrity in multiple tissues from subjects at different ages. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 105: 138-44.
251. Boulay JL, Reuter J, Ritschard R, Terracciano L, Herrmann R, Rochlitz C. Gene dosage by quantitative real-time PCR. *Biotechniques* 1999; 27:228-30, 32.
252. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e47.
253. Gil ME, Coetzer TL. Real-time quantitative PCR of telomere length. *Mol Biotechnol* 2004; 27: 169-72.
254. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR-a perspective. *J Mol Endocrinol* 2005; 34: 597-601.

255. Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995; 4: 357-362.
256. O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, et al. Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet.* 2010; 376:112-23.
257. Krishnamurthi RV, Feigin VL, Forouzanfar MH, Mensah GA, Connor M, et al. Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990-2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Glob Health.* 2013; 1(5): 259-81.
258. Feigin VL, Lawes CM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol* 2009; 8: 355–69.
259. Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J, Warlow C. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. *Lancet.* 1991; 337: 1521-6.
260. Paci M, Nannetti L, D'Ippolito P, Lombardi B. Outcomes from ischemic stroke subtypes classified by the Oxfordshire Community Stroke Project: a systematic review. *Eur J Phys Rehabil Med.* 2011; 47: 19-23.
261. DeGraba TJ, Hallenbeck JM, Pettigrew KD, Dutka AJ, Kelly BJ. Progression in acute stroke: value of the initial NIH Stroke Scale score on patient stratification in future trials. *Stroke.* 1999; 30: 1208–1212.
262. Fiorelli M, Alpe'rovitch A, Argentino C, Sacchetti ML, Toni D, Sette G, Cavalletti C, Gori MC, Fieschi C, for the Italian Acute Stroke Study Group. Prediction of long-term outcome in the early hours following acute ischemic stroke. *Arch Neurol.* 1995; 52: 250–255.
263. Dávalos A, Toni D, Iweins F, Lesaffre E, Bastianello S, for the ECASS group. Neurological deterioration in acute ischemic stroke: potential predictors and associated factors in the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS) I. *Stroke.* 1999; 30: 2631–2636.

264. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2008; 359: 1317-29.
265. Berkhemer OA, Fransen PS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, et al. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2015; 372: 11-20
266. Campbell BC, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, et al. Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med.* 2015; 372: 1009-18.
267. Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, Eesa M, Rempel JL, et al. Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2015; 372: 1019-30.
268. Saver JL, Goyal M, Bonafe A, Diener HC, Levy EI, et al. Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N Engl J Med.* 2015; 372:2285-95.
269. Jovin TG, Chamorro A, Cobo E, de Miquel MA, Molina CA, et al. Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2015; 372: 2296-306.
270. Nakamura K, Saku Y, Ibayashi S, Fujishima M. Progressive motor deficits in lacunar infarction. *Neurology.* 1999; 52: 29–33.
271. Caplan LR. Intracranial branch atheromatous disease: a neglected, understudied, and underused concept. *Neurology.* 1989; 39: 1246–1250.
272. Kaps M, Klostermann W, Wessel K, Bruckmann H. Basilar branch disease presenting with progressive pure motor stroke. *Acta Neurol Scand.* 1997; 96: 324–327.
273. Pinto AN, Melo TP, Lourenco ME, Leandro MJ, Brázio A, et al. Can a clinical classification of stroke predict complications and treatments during hospitalization? *Cerebrovasc Dis.* 1998; 8: 204–209.
274. Andersen KK, Olsen TS, Dehlendorff C, Kammergaard LP. Hemorrhagic and ischemic strokes compared: stroke severity, mortality, and risk factors. *Stroke.* 2009; 40: 2068-72.

275. Jørgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS. Intracerebral hemorrhage versus infarction: Stroke severity, risk factors and prognosis. *Ann Neurol.* 1995; 38: 45–50.
276. Jamrozik K, Broadhurst RJ, Anderson CS, Stewart-Wynne EG. The role of lifestyle factors in the etiology of stroke. A population-based case control study in Perth, Western Australia. *Stroke.* 1994; 25: 51–59.
277. Andersen KK, Andersen ZJ, Olsen TS. Predictors of early and late case-fatality in a nationwide Danish study of 26,818 patients with first-ever ischemic stroke. *Stroke.* 2011; 42: 2806–2812.
278. Corso G, Bottacchi E, Giardini G, Di Giovanni M, Meloni T, et al. Epidemiology of stroke in northern Italy: the Cerebrovascular Aosta Registry, 2004–2008. *Neurol Sci.* 2013; 34: 1071–1081.
279. Janes F, Gigli GL, D’Anna L, Cancelli I, Perelli A, Canal G, et al. Stroke incidence and 30-day and six-month case fatality rates in Udine, Italy: a population-based prospective study. *Int J Stroke.* 2013; 8:100–105.
280. Kelly PJ, Crispino G, Sheehan O, Kelly L, Marnane M, Merwick A, et al. Incidence, event rates, and early outcome of stroke in Dublin, Ireland: the North Dublin population stroke study. *Stroke.* 2012; 43: 2042–2047.
281. Luengo-Fernandez R, Paul NL, Gray AM, Pendlebury ST, Bull LM, Welch SJ, et al; Oxford Vascular Study. Population-based study of disability and institutionalization after transient ischemic attack and stroke: 10-year results of the Oxford Vascular Study. *Stroke.* 2013; 44: 2854–286.
282. Koton S, Tanne D, Green MS, Bornstein NM. Mortality and predictors of death 1 month and 3 years after first-ever ischemic stroke: data from the first national acute stroke Israeli survey (NASIS 2004). *Neuroepidemiology.* 2010; 34: 90–96.
283. Hardie K, Hankey GJ, Jamrozik K, Broadhurst RJ, Anderson C. Ten-year risk of first recurrent stroke and disability after first-ever stroke in the Perth Community Stroke Study. *Stroke.* 2004; 35: 731–735.

284. Feigin VL, Barker-Collo S, Parag V, Senior H, Lawes CM, Ratnasabapathy Y, et al; ASTRO study group. Auckland Stroke Outcomes Study. Part 1: Gender, stroke types, ethnicity, and functional outcomes 5 years poststroke. *Neurology*. 2010; 75: 1597–1607.
285. Ullberg T, Zia E, Petersson J, Norrving B. Changes in functional outcome over the first year after stroke: an observational study from the Swedish stroke register. *Stroke*. 2015; 46: 389-94.
286. Zhan Y, Song C, Karlsson R, Tillander A, Reynolds CA, Pedersen NL, Hägg S. Telomere Length Shortening and Alzheimer Disease-A Mendelian Randomization Study. *JAMA Neurol*. 2015; 72: 1202-3.
287. Guan JZ, Guan WP, Maeda T, Makino N. Analysis of telomere length and subtelomeric methylation of circulating leukocytes in women with Alzheimer's disease. *Aging Clin Exp Res*. 2013; 25: 17-23.
288. Cai Z, Yan LJ, Ratka A. Telomere shortening and Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*. 2013; 15: 25-48.
289. Honig LS, Kang MS, Schupf N, Lee JH, Mayeux R. Association of shorter leukocyte telomere repeat length with dementia and mortality. *Arch Neurol*. 2012; 69: 1332-9.
290. Hochstrasser T, Marksteiner J, Humpel C. Telomere length is age-dependent and reduced in monocytes of Alzheimer patients. *Exp Gerontol*. 2012; 47:160-3.
291. Löf-Ohlin ZM1, Hagnelius NO, Nilsson TK. Relative telomere length in patients with late-onset Alzheimer's dementia or vascular dementia. *Neuroreport*. 2008; 19: 1199-202.
292. Halaschek-Wiener J, Vulto I, Fornika D, Collins J, Connors JM. Reduced telomere length variation in healthy oldest old. *Mech Ageing Dev*. 2008; 129: 638-41.
293. De Lange T1, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol*. 1990; 10: 518-27.

294. Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, et al. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 685-91.
295. Rufer N1, Brümmendorf TH, Kolvraa S, Bischoff C, Christensen K, et al. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J Exp Med* 1999; 190: 157-67.
296. Bendix L, Horn PB, Jensen UB, Rubelj I, Kolvraa S. The load of short telomeres, estimated by a new method, Universal STELA, correlates with number of senescent cells. *Aging Cell* 2010; 9: 383-97.
297. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458-460.
298. Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9857-9860.
299. Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet* 1994; 55: 876-882.
300. Lindsey J., McGill NI, Lindsey LA, Green DK, Cooke HJ. In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mutat Res* 1991; 256: 45-48.
301. Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson AM, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990; 346: 866-868
302. Chang E, Harley CB. Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 11190-11194.
303. Ma L, Li Y, Wang J. Telomeres and essential hypertension. *Clin Biochem.* 2015; 48: 1195-9.
304. Salpea KD, Talmud PJ, Cooper JA, Maubaret CG, Stephens JW, et al. Association of telomere length with type 2 diabetes, oxidative stress and UCP2 gene variation. *Atherosclerosis*. 2010; 209: 42-50.

305. Shen Q, Zhao X, You L, Zhang Z, Shou D, et al. Association of leukocyte telomere length with type 2 diabetes in Mainland Chinese Populations. *J Clin Endocrinol Metab.* .2012; 97: 1371–1374.
306. Harte AL, DaSilva NF, Miller MA, Cappuccio FP, Kelly A, et al. Telomere length attrition, a marker of biological senescence, is inversely correlate with triglycerides and cholesterol in South Asian males with type 2 diabetes mellitus. *Exp Diabetes Res.*2012; 2012: 895185.
307. Müezzinler A, Zaineddin AK, Brenner H. Body mass index and leukocyte telomere length in adults :a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev.*2014; 15: 192–201.
308. Latifovic L, Peacock SD, Massey TE, King WD. The influence of alcohol consumption, cigarette smoking, and physical activity on leukocyte telomere length. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016; 25: 374-80.
309. Farzaneh-Far R, Cawthon RM, Na B, Browner WS, Schiller NB, et al. Prognostic value of leukocyte telomere length in patients with stable coronary artery disease: data from the Heart and Soul Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1379-84.
310. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* 2003; 361: 393-5.
311. Mirabello L, Huang WY, Wong JY, Chatterjee N, Reding D, et al. The association between leukocyte telomere length and cigarette smoking, dietary and physical variables, and risk of prostate cancer. *Aging Cell.* 2009; 8:405-13.
312. Sun Q, Shi L, Prescott J, Chiuve SE, Hu FB, et al. Healthy lifestyle and leukocyte telomere length in U.S. women. *PLoS One.* 2012; 7: e38374.
313. Song Z, von Figura G, Liu Y, Kraus JM, Torrice C, et al. Lifestyle impacts on the aging-associated expression of biomarkers of DNA damage and telomere dysfunction in human blood. *Aging Cell.* 2010; 9: 607– 615.
314. Werner C, Fürster T, Widmann T, Pöss J, Roggia C, et al. Physical exercise prevents cellular senescence in circulating leukocytes and in the vessel wall. *Circulation.* 2009; 120: 2438–244.

315. Jennings BJ, Ozanne SE, Dorling MW, Hales CN. Early growth determines longevity in male rats and may be related to telomere shortening in the kidney. *FEBS Lett.* 1999; 448: 4–8.
316. Jennings BJ, Ozanne SE, Hales CN. Nutrition, oxidative damage, telomere shortening, and cellular senescence: individual or connected agents of aging? *Mol Genet Metab.* 2000; 71: 32–42.
317. Xu Q, Parks CG, DeRoo LA, Cawthon RM, Sandler DP, et al. Multivitamin use and telomere length in women. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89: 1857-63.
318. Gardner JP, Li S, Srinivasan SR, Chen W, Kimura M, et al. Rise in insulin resistance is associated with escalated telomere attrition. *Circulation* 2005; 111: 2171–2177.
319. Demissie S, Levy D, Benjamin EJ, Cupples LA, Gardner JP, et al. Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study. *Aging Cell* 2006; 5: 325–330.
320. Schütze M, Boeing H, Pischon T, Rehm J, Kehoe T, et al. Alcohol attributable burden of incidence of cancer in eight European countries based on results from prospective cohort study. *BMJ.* 2011; 342: d1584.
321. Ronksley PE, Brien SE, Turner BJ, Mukamal KJ, Ghali WA. Association of alcohol consumption with selected cardiovascular disease outcomes: a systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2011; 342: d671.
322. Peters R, Peters J, Warner J, Beckett N, Bulpitt C. Alcohol, dementia and cognitive decline in the elderly: a systematic review. *Age Ageing.* 2008; 37: 505-12.
323. Lee SJ, Sudore RL, Williams BA, Lindquist K, Chen HL, et al. Functional limitations, socioeconomic status, and all-cause mortality in moderate alcohol drinkers. *J Am Geriatr Soc.* 2009; 57:955-62.
324. Lang IA, Melzer D. Moderate alcohol consumption in later life: time for a trial? *J Am Geriatr Soc.* 2009; 57: 1110-2.
325. Pavanello S, Hoxha M, Dioni L, Bertazzi PA, Snenghi R, et al. Shortened telomeres in individuals with abuse in alcohol consumption. *Int J Cancer.* 2011 ; 129(4): 983-92.

326. Strandberg TE, Strandberg AY, Saijonmaa O, Tilvis RS, Pitkälä KH, et al. Association between alcohol consumption in healthy midlife and telomere length in older men. The Helsinki Businessmen Study. *Eur J Epidemiol.* 2012; 27: 815-22.
327. Perez-Rivera JA, Pabon-Osuna P, Cieza-Borrella C, Duran-Bobin O, Martin-Herrero F, et al. Effect of telomere length on prognosis in men with acute coronary syndrome. *Am J Cardiol.* 2014; 113: 418-21.
328. Babizhayev MA, Yegorov YE. Smoking and health: association between telomere length and factors impacting on human disease, quality of life and life span in a large population-based cohort under the effect of smoking duration. *Fundam Clin Pharmacol.* 2011; 25: 425-42.
329. Zee RY, Castonguay AJ, Barton NS, Germer S, Martin M. Mean leukocyte telomere length shortening and type 2 diabetes mellitus: a case-control study. *Transl Res.* 2010; 155: 166-9.
330. Perez-Rivera JA, Pabon-Osuna P, Cieza-Borrella C, Lugo-Godoy C, Martin-Herrero F, et al. The role of the TERC-63G>A and TERT-1327C>T telomerase polymorphisms in the study of men with acute coronary syndrome. *Minerva Cardioangiol.* 2015 ; 63 :467-74.
331. Pérez-Rivero G, Ruiz-Torres MP, Rivas-Elena JV, Jerkic M, Díez-Marques ML, et al. Mice deficient in telomerase activity develop hypertension because of an excess of endothelin production. *Circulation* 2006; 114: 309-17.
332. Matarin M, Brown WM, Dena H, Britton A, De Vrieze FW, et al. Candidate gene polymorphisms for ischemic stroke. *Stroke.* 2009; 40:3436-42.
333. Sudlow C, Martínez González NA, Kim J, Clark C. Does apolipoprotein E genotype influence the risk of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, or subarachnoid hemorrhage? Systematic review and meta-analyses of 31 studies among 5961 cases and 17,965 controls. *Stroke.* 2006; 37: 364-70.
334. Codd V, Mangino M, van der Harst P, Braund PS, Kaiser M, et al. Common variants near TERC are associated with mean telomere length. *Nat Genet.* 2010; 42: 197-9.

335. Bressler J, Franceschini N, Demerath EW, Mosley TH, Folsom AR, et al. Sequence variation in telomerase reverse transcriptase (TERT) as a determinant of risk of cardiovascular disease: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *BMC Med Genet.* 2015; 16: 52.
336. Zee RY, Ridker PM, Chasman DI. Genetic variants in eleven telomere-associated genes and the risk of incident cardio/cerebrovascular disease: The Women's Genome Health Study. *Clin Chim Acta.* 2011; 412: 199-202.
337. Hu Z, Yang B, Mo X, Xiao H. Mechanism and regulation of autophagy and its role in neuronal diseases. *Mol Neurobiol.* 2015; 52: 1190–1209.
338. Yang Z, Zhong L, Zhong S, Xian R, Yuan B. Hypoxia induces microglia autophagy and neural inflammation injury in focal cerebral ischemia model. *Exp Mol Pathol.* 2015; 98: 219–24.
339. Shang J, Deguchi K, Yamashita T, Ohta Y, Zhang H, et al. Antiapoptotic and antiautophagic effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and hepatocyte growth factor after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Neurosci Res.* 2010; 88: 2197–206.
340. Wen YD, Sheng R, Zhang LS, Han R, Zhang X, et al. Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. *Autophagy.* 2008; 4: 762–9.
341. Zhang T, Liu X, Li Q, Wang J, Jia W, et al. Exacerbation of ischemia-induced amyloid-beta generation by diabetes is associated with autophagy activation in mice brain. *Neurosci Lett.* 2010; 479: 215–20
342. Puyal J, Vaslin A, Mottier V, Clarke PG. Postischemic treatment of neonatal cerebral ischemia should target autophagy. *Ann Neurol.* 2009; 66: 378–89.
343. Carloni S, Buonocore G, Balduini W. Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiol Dis.* 2008; 32: 329–39.
344. Wang P, Guan YF, Du H, Zhai QW, Su DF, et al. Induction of autophagy contributes to the neuroprotection of nicotinamide phosphoribosyl-transferase in cerebral ischemia. *Autophagy.* 2012; 8: 77–87.

345. Mehta SL, Lin Y, Chen W, Yu F, Cao L, et al. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates ischemic brain damage under hyperglycemic conditions by altering autophagy. *Transl Stroke Res.* 2011; 2: 42–50.
346. Tanabe F, Yone K, Kawabata N, Sakakima H, Matsuda F, et al. Accumulation of p62 in degenerated spinal cord under chronic mechanical compression: functional analysis of p62 and autophagy in hypoxic neuronal cells. *Autophagy.* 2011; 7: 1462–71.
347. Levine B, Abrams J. p53: the Janus of autophagy? *Nat Cell Biol.* 2008; 10: 637–9.
348. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 2007; 21: 2861–73.
349. Adhami F, Schloemer A, Kuan CY. The roles of autophagy in cerebral ischemia. *Autophagy.* 2007; 3: 42–4.
350. Yue Z, Friedman L, Komatsu M, Tanaka K. The cellular pathways of neuronal autophagy and their implication in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2009; 1793: 1496–507.
351. Carloni S, Buonocore G, Balduini W. Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury. *Neurobiol Dis.* 2008; 32: 329–39.
352. Mengesdorf T, Jensen PH, Mies G, Aufenberg C, Paschen W. Down-regulation of parkin protein in transient focal cerebral ischemia: a link between stroke and degenerative disease? *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 15042–7.
353. Li H, Qiu S, Li X, Li M, Peng Y. Autophagy biomarkers in CSF correlates with infarct size, clinical severity and neurological outcome in AIS patients. *J Transl Med.* 2015; 13: 359.