



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
Facultad de Medicina

Tesis doctoral

**VESÍCULAS EXTRACELULARES Y MICRO-ARN COMO  
BIOMARCADORES DE DAÑO, REPARACIÓN CEREBRAL Y  
RECUPERACIÓN EN EL INFARTO CEREBRAL AGUDO.**

**ELISA ALONSO LÓPEZ**

Madrid 2021



# **VESÍCULAS EXTRACELULARES Y MICRO-ARN COMO BIOMARCADORES DE DAÑO, REPARACIÓN CEREBRAL Y RECUPERACIÓN EN EL INFARTO CEREBRAL AGUDO.**

Tesis Doctoral presentada por la licenciada

**ELISA ALONSO LÓPEZ**

para optar al grado de **DOCTOR**

Directoras:

Dra. **MARÍA GUTIÉRREZ FERNÁNDEZ**  
Investigadora Miguel Servet  
Coordinadora Laboratorio de Ciencias Neurológicas y Cerebrovascular. IdiPAZ  
Hospital Universitario La Paz  
Universidad Autónoma de Madrid

Dra. **BLANCA FUENTES GIMENO**  
Profesora Asociada. Universidad Autónoma de Madrid  
Jefe de Sección. Unidad de Ictus. Servicio de Neurología y Centro de Ictus  
Hospital Universitario La Paz

**Madrid, 2021**



**Dra. María Gutiérrez Fernández**, Licenciada en Biología, Doctora por la Universidad Autónoma de Madrid, Investigadora Miguel Servet y Coordinadora del Laboratorio de Ciencias Neurológicas y Cerebrovascular del Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ, Universidad Autónoma de Madrid y **Dra. Blanca Fuentes Gimeno**, Profesora Asociada del Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe de Sección de Unidad de Ictus y hospitalización del Servicio de Neurología del Hospital Universitario La Paz, IdiPAZ e Investigadora en el área de Neurociencias del IdiPAZ.

## **CERTIFICAN:**

Que el presente trabajo titulado: **“VESÍCULAS EXTRACELULARES Y MICRO-ARN COMO BIOMARCADORES DE DAÑO, REPARACIÓN CEREBRAL Y RECUPERACIÓN EN EL INFARTO CEREBRAL AGUDO”** ha sido realizado por Dña. Elisa Alonso López bajo su dirección y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis para alcanzar el grado de Doctor ante el Tribunal correspondiente en la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 28 de Marzo de 2021

Fdo:

Dra. María Gutiérrez Fernández

Fdo:

Dra. Blanca Fuentes Gimeno

Este trabajo ha sido financiado por el Instituto de Salud Carlos III con el código de expediente CP15/00069, cofinanciado por la Unión Europea a través del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).



*La curiosidad fue la fuerza inicial, el empuje, el impulso.*

*La voluntad nos mantuvo a flote en el océano de dudas.*

*La esperanza fue aquello que permaneció cuando el tiempo nubló la curiosidad,  
desgastó la voluntad y acrecentó las dudas.*

*El amor, que es eterno, encendió la chispa de la curiosidad, infundió fuerza a la  
voluntad y arrojó luz a la esperanza.*

*A mi hermana María, que desde pequeña impulsaba mi curiosidad.*

*A mi madre y a mi padre, que han sido mi apoyo incondicional cuando la fuerza de  
voluntad se desgastaba.*

*A ti que estás por llegar y eres nuestra esperanza.*

*A David: tu amor me sostiene.*

## **Agradecimientos**

En primer lugar, de forma muy especial, me gustaría mostrar mi agradecimiento a mis directoras de tesis:

A la Dra. Blanca Fuentes Gimeno, por haberme guiado durante todo este camino, dedicándome un tiempo valiosísimo. Con ella una conversación era la llave para abrir nuevas cuestiones y cerrar viejas dudas. En cada corrección me ha otorgado unos conocimientos que siempre guardaré conmigo y se ha convertido en todo un referente en mi trayectoria profesional.

A la Dra. María Gutiérrez Fernández, por haberme abierto las puertas de su laboratorio y haberme integrado en su equipo desde el primer día. La confianza que depositó en mí fue el impulso que me permitió iniciar este proyecto en el que me ha acompañado y orientado hasta estar aquí. Durante este recorrido me ha formado en investigación básica y traslacional logrando que sea posible cumplir mi sueño de poder integrar la clínica y la asistencia con mi vocación investigadora.

Quiero continuar mostrando mi enorme gratitud al Prof. Exuperio Díez Tejedor por ofrecerme la oportunidad de formar parte del prestigioso Servicio de Neurología del Hospital Universitario La Paz y por animarme a llevar a cabo mi interés por la investigación, apoyándome en todo momento desde que empecé la residencia, hasta que me incorporé como adjunta de Neurología. Ha hecho posible que pueda recibir una formación de excelencia, poniendo a nuestro alcance todas las herramientas para ello tanto a nivel nacional como a nivel internacional, facilitando que pudiéramos optar a realizar estancias en el extranjero durante la residencia.

También querría agradecer al Servicio de Cardiología, especialmente a los doctores Eduardo Armada y Esteban López de Sá, y al Servicio de Extracciones, en especial a la enfermera Lorena Buiza, su implicación y ayuda en el reclutamiento de pacientes y a Macarena Rodríguez Serrano del Hospital Ramón y Cajal, su colaboración con nuestro equipo.

En un lugar muy importante, me gustaría dar las gracias a todos y cada uno de mis compañeros de Neurología por su apoyo durante estos años y en especial quiero agradecer a mis compañeros de laboratorio (Laura Otero Ortega, Fernando Laso

García, M. Carmen Gómez de Frutos, Luke Diekhorst y Arturo Martínez Arroyo) todo lo que me han enseñado, desde las técnicas más básicas hasta el manejo con los animales de experimentación. Discutir con ellos los resultados generaba un flujo bidireccional de conocimientos que iban desde las cuestiones más clínicas hasta los procesos más básicos y que sin duda ha sido el motor de este proyecto y de las nuevas líneas futuras que se abren camino en este incesante viaje que es la carrera investigadora.

Finalmente, me gustaría agradecer a aquellas personas que han estado presentes antes de llegar hasta aquí. A mis profesores de Universidad Joaquín Rueda, Jaime Merchán y Pere Berbel Navarro, por iniciarme en el mundo de la investigación y abrirme las puertas de su laboratorio, dándome los primeros cimientos para poder construir una mentalidad científica y la velocidad de escape necesaria para poder seguir dando “vueltas al sol”.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>27</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>35</b>
DEFINICIÓN DE ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR E ICTUS .....	37
EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR.....	37
CLASIFICACIÓN DEL ICTUS ISQUÉMICO .....	39
FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL.....	40
Mecanismos de daño y reparación celular en la isquemia cerebral.....	42
TRATAMIENTO DEL INFARTO CEREBRAL .....	46
BIOMARCADORES EN LA ISQUEMIA CEREBRAL .....	47
VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	48
MICRO-ARN .....	50
VESÍCULAS EXTRACELULARES Y MICRO-ARN COMO BIOMARCADORES EN EL INFARTO CEREBRAL .....	51
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>57</b>
DISEÑO DEL ESTUDIO.....	58
Población y grupos de estudio: .....	58
Variables de estudio .....	59
Covariables.....	61
Cronograma.....	61
Cálculo muestral .....	62
Aspectos éticos.....	62
AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EN SUERO .....	63
CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	63
NanoSight.....	63
Microscopía electrónica .....	64
Western Blot.....	64
CUANTIFICACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	64
COMPOSICIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES .....	64
Proteómica .....	64
Estudio de los miRNA.....	66
ANÁLISIS DE DATOS.....	67
EQUIPOS Y MATERIALES .....	67



<b>RESULTADOS</b> .....	<b>71</b>
RECLUTAMIENTO DE SUJETOS Y SEGUIMIENTO EN EL ESTUDIO.....	73
OBJETIVO 1: Estudiar las vesículas extracelulares en el proceso isquémico, evaluando si existen diferencias en sus niveles séricos o en su contenido en proteínas y miRNA entre pacientes con isquemia (cerebral o de miocardio) y voluntarios sanos .....	75
Cuantificación de los niveles de VE .....	75
Estudio de proteómica .....	76
Expresión de MiRNA .....	77
OBJETIVO 2: Explorar si existen diferencias en los niveles séricos o en el contenido en proteínas y miRNA de las VE dependiendo del órgano afectado por isquemia ..	78
Cuantificación de los niveles de VE .....	78
Estudio de proteómica .....	79
Expresión de MiRNA .....	81
OBJETIVO 3: Analizar las posibles diferencias en los niveles séricos de las vesículas extracelulares o en su contenido en proteínas y miRNA en pacientes con infarto córtico-subcortical en comparación con el infarto cerebral de afectación estrictamente subcortical.....	82
Cuantificación de los niveles de VE .....	82
Estudio de proteómica .....	84
Red de relación de las proteínas halladas en cada grupo específico .....	86
Expresión de MiRNA .....	92
OBJETIVO 4: Estudiar las vesículas extracelulares en la isquemia cerebral y su relación con el volumen de lesión y la recuperación neurológica.....	93
Correlación entre los niveles de VE y el volumen de lesión .....	93
Correlación entre los niveles de VE y la recuperación neurológica a los 3 meses	94
Correlación entre contenido en miRNA de vesículas extracelulares y recuperación neurológica. ....	96
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>102</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>117</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>122</b>
<b>APÉNDICE</b> .....	<b>141</b>
ESCALA NIHSS .....	143
ESCALA DE RANKIN MODIFICADA.....	145
ESCALA DE FAZEKAS .....	146
ESCALA DE CHARLSON .....	147
MIRNA REFERENCIAS .....	148
<b>ANEXO</b> .....	<b>150</b>

## Índice de Tablas:

<b>Tabla 1</b> .....	61
Cronograma con las principales variables que se analizarán en el estudio clínico.....	61
<b>Tabla 2</b> .....	74
Características de los pacientes incluidos en el estudio.....	74
<b>Tabla 3</b> .....	75
Cuantificación VE/mL a las 24-72h en voluntarios sanos y en pacientes con isquemia .....	75
<b>Tabla 4</b> .....	78
Cuantificación VE/mL a las 24-72h en sanos, infarto agudo de miocardio e infarto cerebral. ...	78
<b>Tabla 5:</b> .....	80
Proteínas con máxima y mínima expresión en los distintos grupos .....	80
<b>Tabla 6</b> .....	82
Cuantificación VE/mL a las 24h-72h según topografía de la lesión cerebral .....	82
<b>Tabla 7</b> .....	83
Cuantificación VE/mL a las 24-72h y a los 3 meses según topografía de la lesión cerebral .....	83
<b>Tabla 8</b> .....	94
Niveles de VE en pacientes con recuperación total vs no recuperación total medida por RR NIHSS.....	94
<b>Tabla 9</b> .....	98
Relación entre miRNA y buena recuperación funcional (RR NIHSS>50%) .....	98
<b>Tabla A 1</b> .....	143
Representación de la puntuación en la escala NIHSS .....	143
<b>Tabla A 2</b> .....	145
Representación de la puntuación en la Escala de Rankin Modificada .....	145
<b>Tabla A 3</b> .....	146
Representación de la puntuación de la Escala de Fazekas .....	146
<b>Tabla A 4</b> .....	147
Representación de la puntuación en la Escala de Comorbilidad de Charlson .....	147
<b>Tabla A 5</b> .....	148
MiRNAs y referencias.....	148

## Índice de Figuras:

<b>Figura 1:</b> Instituto Nacional de Estadística: Número nacional de defunciones (2018). .....	38
<b>Figura 2:</b> Flujo sanguíneo cerebral en la isquemia .....	41
<b>Figura 3:</b> Mecanismos de daño en la isquemia cerebral. ....	45
<b>Figura 4:</b> Representación esquemática de los subtipos de vesículas extracelulares.....	50
<b>Figura 5:</b> Diagrama de los sujetos reclutados en cada grupo de estudio. ....	73
<b>Figura 6:</b> Niveles de VE en voluntarios sanos vs isquemia. ....	75
<b>Figura 7:</b> Proteínas comunes del proceso isquémico .....	76
<b>Figura 8:</b> miRNAs con diferente expresión en isquemia y voluntarios sanos, identificados tras validación con qPCR. ....	77
<b>Figura 9:</b> Niveles de VE en sanos, infarto agudo de miocardio e infarto cerebral.....	78
<b>Figura 10:</b> Diagrama de Venn que representa las proteínas por grupos.....	79
<b>Figura 11:</b> miRNAs con diferente expresión en infarto cerebral, infarto de miocardio y voluntarios sanos, identificados tras validación con qPCR.....	81
<b>Figura 12:</b> Niveles de VE según topografía de la lesión cerebral. ....	82
<b>Figura 13:</b> Niveles de VE, evolución temporal en pacientes.....	83
<b>Figura 14:</b> Proteínas halladas específicamente según la topografía de la lesión cerebral. ....	85
<b>Figura 15:</b> Interacciones entre las proteínas halladas en pacientes con infarto cerebral según la topografía de la lesión. ....	86
<b>Figura 16:</b> Funciones moleculares y procesos biológicos de las distintas proteínas según la topografía de la lesión cerebral. ....	88
<b>Figura 17:</b> Funciones moleculares en las que participan las proteínas halladas específicamente en pacientes con IC-cs (A) y en IC-s (B).....	89
<b>Figura 18:</b> Procesos biológicos en los que participan las proteínas halladas específicamente en pacientes con IC-cs (A) y en IC-s (B).....	90
<b>Figura 19:</b> Vías de señalización según la topografía de la lesión cerebral.....	91
<b>Figura 20:</b> miRNAs con diferente expresión en infarto cerebral córtico-subcortical, infarto cerebral subcortical y voluntarios sanos, identificados tras validación con qPCR. ....	92
<b>Figura 21:</b> Diagrama de dispersión (puntos). Relación entre niveles de VE y tamaño de lesión por Resonancia magnética en pacientes. ....	93
<b>Figura 22:</b> Correlación niveles de VE y recuperación neurológica en pacientes.....	94
<b>Figura 23:</b> Cuantificación de VE en pacientes con recuperación total vs no recuperación total. ....	95
<b>Figura 24:</b> Correlación cuantificación de VE y recuperación funcional (ERm). ....	95
<b>Figura 25:</b> Correlación entre miRNA-339_5p y recuperación de los pacientes .....	96
<b>Figura 26:</b> Correlación niveles miRNA-100_5p y la recuperación de los pacientes. ....	97
<b>Figura 27:</b> Correlación niveles miRNA-29b_3p y la recuperación de los pacientes. ....	97
<b>Figura 28:</b> Correlación niveles miRNA-369_3p y la recuperación de los pacientes. ....	98
<b>Figura 29:</b> Curva ROC. Niveles de miRNA-29b_3p y buena recuperación. ....	99
<b>Figura 30:</b> Curva ROC. Niveles de miRNA-100_5p y buena recuperación. ....	100

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos se ha conservado la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico. Las proteínas serán referidas por el gen que las codifica.

**µg:** Microgramos

**µL:** Microlitros

**A2M:** Gen que codifica la proteína alfa-2 macroglobulina

**ABCA1:** Gen que codifica la proteína transportadora de casete unida a ATP A1  
(del inglés *ATP-binding cassette A1*)

**ACM:** Arteria cerebral media

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AMPA:** Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

**ANOVA:** Análisis de la varianza

**ANXA2:** Gen que codifica la proteína Anexina A2

**APOB:** Gen que codifica la proteína Apolipoproteína B-100

**APOC1:** Gen que codifica la proteína Apolipoproteína C1

**APOL1:** Gen que codifica la proteína Apolipoproteína L1

**ARG1:** Gen que codifica la proteína Arginasa-1

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ATP:** Adenosín trifosfato

**AUC:** Área bajo la curva (del inglés *area under the curve*)

**AVAD:** Años de vida ajustados por discapacidad

**BDNF:** Factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés *brain derived neurotrophic factor*)

**BHE:** Barrera hematoencefálica

**°C:** Grados centígrados

**C1QA:** Gen que codifica la proteína Subunidad A del subcomponente C1q del complemento (del inglés, *Complement C1q subcomponent subunit A*)

**C3:** Gen que codifica la proteína del Complemento C3

**C4A:** Gen que codifica la proteína C4a del complemento

**C8G:** Gen que codifica la proteína subunidad gamma del factor 8 del complemento (del inglés *Complement component C8 gamma chain*)

**Ca<sup>2+</sup>:** Ion calcio

**CASP14:** Gen que codifica la proteína Caspasa-14

**CCDC138:** Gen que codifica la proteína 138 que contiene el dominio en espiral  
(del inglés *Coiled-coil domain-containing protein 138*)

**CFB:** Gen que codifica la proteína factor de complemento B (del inglés Complement factor B)

**CFP:** Gen que codifica la proteína properdina

**Cl:** Ion cloruro

**Colect11:** Gen que codifica la proteína Colectina 11

**DCD:** Gen que codifica la proteína Dermicidina

**DE:** Desviación estándar

**Delta CT:** Diferencia en el Ciclo Umbral (del inglés cycle threshold) entre dos muestras en el análisis de PCR

**DHX29:** Gen que codifica la proteína helicasa de ARN dependiente de ATP DHX29

**DNAH5:** Gen que codifica la proteína Cadena pesada axonemal de Dineína 5

**DSC1:** Gen que codifica la proteína Desmocolina-1

**DSG1:** Gen que codifica la proteína Desmogleína-1

**ELISA:** Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés Enzyme linked immunoabsorbant assay)

**ERm:** Escala de Rankin modificada

**F9:** Gen que codifica la proteína factor IX de la coagulación

**FBLN1:** Gen que codifica la proteína Fibulina-1

**FCN2:** Gen que codifica la proteína Ficolina-2

**FERMT3:** Gen que codifica la proteína Homólogo de la familia de fermitina 3

**FGG:** Gen que codifica la proteína cadena gamma del Fibrinógeno (*del inglés Fibrinogeno gamma chain*)

**FLAIR:** Recuperación de la inversión atenuada de fluido (del inglés, Fluid-Attenuated Inversion Recovery)

**FLNA:** Gen que codifica la proteína Filamina-A

**FN1:** Gen que codifica la proteína Fibronectina

**FSC:** Flujo sanguíneo cerebral

**FWHM:** Anchura a media altura (del inglés, *full width at half maximum*)

**g:** Gramos

**GAPDH:** Gen que codifica la proteína Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**GFAP:** Proteína ácida fibrilar glial (del inglés *glial fibrillary acidic protein*)

**GPLD1:** Gen que codifica la proteína Fosfolipasa D específica de fosfatidilinositol-glicano.

**h:** Horas

**HCO3:** Bicarbonato

**HIF-1a:** Gen que codifica la proteína Factor inducible por hipoxia

**HPLC:** Cromatografía líquida de alta eficacia (del inglés *high performance liquid chromatography*).

**HRNR:** Gen que codifica la proteína Hornerina

**IAM:** Infarto agudo de miocardio

**IC-cs:** Infarto cerebral córtico-subcortical

**IC-s:** Infarto cerebral subcortical

**IGHE:** Gen que codifica la región constante de la cadena pesada épsilon de inmunoglobulina (del inglés *Immunoglobulin heavy constant épsilon*)

**IGHM:** Gen que codifica la región constante de la cadena pesada mu de inmunoglobulina (del inglés *Immunoglobulin heavy constant mu*)

**IGHV2-26:** Gen que codifica la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 2-26 (del inglés *Immunoglobulin heavy variable 2-26*)

**IGHV3-43:** Gen que codifica la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-43 (del inglés *Immunoglobulin heavy variable 3-43*)

**IGHV3-73:** Gen que codifica la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-73 (del inglés *Immunoglobulin heavy variable 3-73*)

**IGKC:** Gen que codifica el dominio constante de cadena ligera tipo kappa de inmunoglobulina (del inglés *Immunoglobulin kappa constant*)

**IGKV1-17:** Gen que codifica la región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina 1-17 (del inglés *Immunoglobulin kappa variable 1-17*)

**IGKV2-24:** Gen que codifica la región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina 2-24 (del inglés *Immunoglobulin kappa variable 2-24*)

**IL-1:** Interleuquina-1

**IL-6:** Interleuquina-6

**IL-8:** Interleuquina-8

**ITGA2B:** Gen que codifica la proteína Integrina alfa-IIb

**IQR:** Rango intercuartílico (del inglés, *interquartile range*)

**K<sup>+</sup>:** Ion potasio

**kg:** Kilogramos

**KRT31:** Gen que codifica la proteína queratina, tipo I cuticular Ha1

**L:** Litros

**LIMS2:** Gen que codifica la proteína 2 con dominio LIM similar al antígeno de senescencia

**LOR:** Gen que codifica la proteína loricrina

**LRG1:** Gen que codifica la proteína alfa-2-glicoproteína rica en leucina (del inglés, *Leucine Rich Alpha-2-Glycoprotein 1*)

**LRP1:** Gen que codifica la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (*del inglés Pro-low-density lipoprotein receptor-related protein 1*)

**MBL2:** Gen que codifica la proteína lectina de unión a la manosa

**MES:** 2- (N-morfolino) etanosulfónico

**mg:** Miligramos

**Mg<sup>2+</sup>:** Ion magnesio

**min:** Minutos

**miRNA:** Micro-ARN

**mL:** Mililitros

**mM:** Milimolar

**MMP:** Metaloproteasas

**MS/MS:** Espectrometría de masas tándem

**MS:** Espectrometría de masas

**MYO5b:** Gen que codifica la proteína miosina Vb

**Na<sup>+</sup>:** Ion sodio

**NaCl:** Cloruro de sodio

**NEUROD1:** Gen que codifica el factor de diferenciación neurogénico 1

**NIHSS:** National institute of Health Stroke Scale

**nm:** Nanómetros

**NMDA:** N-Metil-D-Aspartato

**NSAF:** Factor de abundancia espectral normalizado (*del inglés, Normalized Spectral Abundance Index*)

**NTF3:** Gen que codifica la proteína neurotrofina-3

**ORM2:** Gen que codifica la proteína alfa-1 glicoproteína ácida 2

**PBS:** Tampón fosfato salino (*del inglés phosphate buffered saline*)

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PKP1:** Gen que codifica la proteína Placofilina-1

**RE:** Retículo endoplasmático

**RM:** Resonancia Magnética

**ROC curva:** Característica operativa del receptor (*del inglés, Receiver Operating Characteristic*)

**RR:** Reducción relativa

**rtPA:** Activador tisular del plasminógeno recombinante

**RT-qPCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (*del inglés, Reverse transcription polymerase chain reaction*)

**SNC:** Sistema nervioso central

**S100A7:** Proteína S100A7

**S100A9:** Proteína S100A9

**SDS:** Dodecil sulfato sódico

**SELENOP:** Gen que codifica la proteína Seleproteína P

**SERPINA4:** Gen que codifica la proteína Kalistatina

**SERPINB4:** Gen que codifica la proteína Serpina B4

**SERPINF2:** Gen que codifica la proteína alfa-2 antiplasmina

**SLC2A1:** Gen que codifica la proteína transportadora de glucosa tipo 1 (*del inglés, Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1*)

**TC:** Tomografía Computarizada

**THBS4:** Gen que codifica la proteína Trombospondina-4

**TLN1:** Gen que codifica la proteína Talina 1

**TTN:** Gen que codifica la proteína Titina

**TUBA1B:** Gen que codifica la proteína cadena alfa 1b de tubulina

**VE:** Vesículas extracelulares

**VEGF:** Factor de crecimiento del endotelio vascular (*del inglés vascular endothelial growth factor*)

**VS:** Voluntario sano

**VWF:** Gen que codifica la proteína Factor de Von Willebrand (*del inglés Von Willebrand Factor*)

**XP32/c1orf68:** Gen que codifica la proteína 32 piel-especifica



# **RESUMEN**

## **RESUMEN**

### **Introducción**

El infarto cerebral es una de las principales causas de mortalidad y discapacidad en el mundo.

Comprender los mecanismos de daño y reparación que se activan tras la isquemia cerebral aguda es fundamental para poder diseñar tratamientos encaminados a reparar el daño tisular y favorecer la recuperación funcional tras el ictus.

Hasta ahora la mayoría de los estudios se han centrado en investigar el daño cortical neuronal, sin embargo, esta visión es simplista y el estudio de los mecanismos de daño y de reparación que surgen tras la afectación subcortical con lesión en fibras de sustancia blanca, células gliales y endotelio vascular es de suma importancia, puesto que la respuesta neuronal a la isquemia coexiste con respuesta glial y endotelial formando una unidad neuronal-glial-vascular en continua comunicación.

En este sentido, el descubrimiento del importante papel de las vesículas extracelulares (VE) como vía de comunicación intercelular ha abierto un nuevo campo de investigación. Son vesículas de membrana del orden nanométrico secretadas por todos los tipos de células y que contienen una gran variabilidad de moléculas en su interior, entre las que se incluyen micro-ARN (miRNA) capaces de regular la expresión genética de células diana. Han sido halladas en la mayoría de los líquidos corporales y, por su pequeño tamaño, son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, lo que las hace idóneas como biomarcadores de los procesos que están ocurriendo a nivel cerebral, sin necesidad de recurrir a técnicas invasivas. Además, una sola vesícula contiene una amplia variedad de moléculas en su interior, por lo que su estudio ofrecería el análisis de múltiples posibles biomarcadores. Otra ventaja es que su contenido depende de la población celular de la que deriven por lo que, dependiendo de la topografía de la lesión tisular, obtendríamos diferentes biomarcadores de daño y de reparación cerebral, que ayudarían a comprender los mecanismos subyacentes a la lesión isquémica según el tejido afectado.

### **Hipótesis y objetivos**

Las VE que se liberan como parte de la respuesta celular a la isquemia podrían ser identificadas en la sangre de pacientes que hayan sufrido un infarto cerebral agudo. Éstas podrían contener proteínas y miRNA diferentes según la topografía del tejido cerebral dañado (córtico-subcortical o predominantemente subcortical). Su aislamiento,

cuantificación y estudio de su composición podrían ser de utilidad en la predicción de la recuperación de los pacientes, al reflejar tanto los mecanismos patogénicos que subyacen al infarto cerebral, como los mecanismos compensadores y reparadores que se activan específicamente tras la isquemia cerebral.

Para demostrar esta hipótesis nos planteamos los siguientes **objetivos**:

- 1- Estudiar las VE en el proceso isquémico, evaluando si existen diferencias en sus niveles séricos o en su contenido en proteínas y miRNA entre pacientes con isquemia (cerebral o de miocardio) y voluntarios sanos.
- 2- Explorar si existen diferencias en los niveles séricos o en el contenido en proteínas y miRNA de las VE dependiendo del órgano afectado por isquemia.
- 3- Analizar las posibles diferencias en los niveles séricos de las VE o en su contenido en proteínas y miRNA en pacientes con infarto córtico-subcortical en comparación con el infarto cerebral de afectación estrictamente subcortical.
- 4- Evaluar la potencial utilidad de las VE como biomarcadores en la isquemia cerebral, analizando si existe correlación entre sus niveles séricos y el volumen del infarto cerebral o la recuperación neurológica, y si existe algún miRNA que permita predecir buena evolución de los pacientes con ictus isquémico agudo.

## **Materiales y Métodos**

El estudio se ha diseñado como un estudio clínico prospectivo y observacional caso-control.

Población y grupos de estudio: un grupo de casos (infarto cerebral agudo) y dos grupos control: voluntario sano (VS) e infarto agudo de miocardio (IAM). Dentro del grupo de casos distinguimos dos subgrupos: infarto cerebral córtico-subcortical (IC-cs) e infarto cerebral subcortical (IC-s).

Las VE se han aislado del suero por un procedimiento de precipitación. Se han caracterizado por tres métodos (western blot, análisis de seguimiento de nanopartículas y microscopía electrónica). Una vez aisladas, se han cuantificado mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Por último, se ha estudiado el contenido en proteínas por espectrometría de masas (MS) y de miRNA por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-qPCR).

Como marcador de daño cerebral se ha utilizado el volumen de lesión por resonancia magnética (RM).

Para evaluar la recuperación neurológica, se ha utilizado la escala NIHSS a las 24h y a los tres meses y la escala de Rankin modificada (ERm) a los tres meses. Se consideró buena recuperación neurológica una reducción relativa en la escala de NIHSS superior al 50%, utilizando la siguiente fórmula:

$$RR\ NIHSS = (1 - (NIHSS\ a\ los\ 3\ meses \div NIHSS\ inicial)) * 100$$

Donde RR NIHSS es la reducción relativa en la puntuación en la escala de NIHSS, NIHSS a los tres meses es la puntuación en la escala obtenida a los tres meses en la consulta del neurólogo y NIHSS inicial es la puntuación en la escala obtenida en la exploración realizada por el neurólogo de guardia en el momento de la llegada del paciente a Urgencias.

## Resultados

La muestra final del estudio fue de 140 sujetos: 22 VS, 37 IAM y 81 pacientes con infarto cerebral agudo (26 IC-s y 55 IC-cs). Encontramos diferencias en la edad (siendo mayores los pacientes con IC-cs que el resto de grupos), en el sexo (con mayor frecuencia de varones en los grupos IAM e IC-s) y en la presencia de factores de riesgo vascular como la hipertensión arterial y la dislipidemia (más frecuentes en los pacientes con IC-cs, IC-s e IAM en comparación a VS), así como el tabaquismo (más frecuente en los pacientes con IAM en comparación al resto de grupos).

Observamos niveles de VE más elevados en pacientes con isquemia (cerebral o miocárdica) ( $3,07 \times 10^9$  [ $\pm 2,91 \times 10^9$ ] VE/mL) en comparación a VS ( $2,30 \times 10^9$  [ $\pm 2,70 \times 10^9$ ] VE/mL), aunque no se llegó a alcanzar la significación estadística ( $p=0,051$ ). En el análisis de proteómica identificamos diferencias entre los pacientes con isquemia y los VS en la expresión de catorce proteínas (apolipoproteína L1, apolipoproteína C1, proteína C reactiva, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, proteína C4a del complemento, lectina de unión a la manosa, loricrina, cadena alfa 1b de tubulina, desmogleína-1, desmocolina-1, proteína 32 piel-específica, hornerina, alfa-2-glicoproteína rica en leucina, factor IX de la coagulación) y de seis miRNA (miRNA-340\_5p, miRNA-424\_5p, miRNA-199a\_3p, miRNA-369\_3p y miRNA-339\_5p).

Al comparar la isquemia cerebral frente a la miocárdica, no detectamos diferencias entre los niveles de VE en los pacientes con infarto cerebral ( $3,07 \times 10^9$  [ $\pm 3,17 \times 10^9$ ] VE/mL) y en aquellos con IAM ( $3,05 \times 10^9$  [ $\pm 2,36 \times 10^9$ ] VE/mL). Al analizar el contenido de proteínas en las VE de los pacientes con isquemia cerebral y miocárdica, se identificaron 42 proteínas específicas en el grupo de pacientes con infarto cerebral. Se observó mayor expresión de miRNA-340\_5p en pacientes con infarto cerebral en comparación a pacientes con IAM ( $p < 0,05$ ).

Cuando analizamos las diferencias en los niveles séricos de las VE en función de la topografía de la lesión cerebral (afectación córtico-subcortical o afectación estrictamente subcortical) observamos niveles discretamente más elevados en los pacientes con IC-cs ( $3,27 \times 10^9$  [ $\pm 3,3 \times 10^9$ ] VE/mL) frente a pacientes con IC-s ( $2,67 \times 10^9$  [ $\pm 2,91 \times 10^9$ ] VE/mL), pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p = 0,119$ ). En el grupo de pacientes con IC-cs, identificamos siete proteínas específicas de grupo: subunidad A del subcomponente C1q del complemento (C1QA), región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-43 (IGHV3-43), región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 2-26 (IGHV2-26), arginasa-1 (ARG1), proteína 138 que contiene el dominio en espiral (CCDC138), properdina (CFP), caspasa-14 (CASP14). En el grupo de IC-s hallamos 25 proteínas que no se encontraban presentes en el grupo IC-cs: cadena ligera tipo kappa de inmunoglobulina (IGKC), región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina 2-24 (IGKV2-24), alfa-2 antiplasmina (SERPINF2), titina (TTN), talina 1 (TLN1), factor de complemento B (CFB), alfa-1 glicoproteína ácida 2 (ORM2), fibulina-1 (FBLN1), ficolina-2 (FCN2), anexina A2 (ANXA2), dermicidina (DCD), colectina 11 (colec11), placofilina-1 (PKP1), región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina 1-17 (IGKV1-17), trombospondina-4 (THBS4), integrina alfa-IIb (ITGA2B), filamina-A (FLNA), proteína transportadora de casete unida a ATP A1 (ABCA1), proteína 2 con dominio LIM similar al antígeno de senescencia (LIMS2), selenoproteína P (SELENOP), homólogo de la familia de fermitina 3 (FERMT3), subunidad gamma del factor 8 del complemento (C8G), fosfolipasa D específica de fosfatidilinositol-glicano (GPLD1), proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y miosina Vb (MYO5b). En el análisis de miRNA detectamos infraexpresión de cuatro miRNA: miRNA-15a\_5p, miRNA-424\_5p, miRNA-100\_5p y miRNA-339\_5p en el grupo de IC-cs.

Por último, estudiamos si las VE podrían ser de utilidad como biomarcadores de recuperación neurológica en la isquemia cerebral. Aunque los niveles séricos de VE no se correlacionaron con la recuperación en pacientes ni con el volumen de lesión, sí encontramos asociación en el contenido de miRNA de las VE y la recuperación clínica.

En este sentido, la expresión de miRNA-100\_5p por debajo de un punto de corte de 5,47 Delta CT y de miRNA-29b\_3p por debajo de un punto de corte de 2,52 Delta CT, se asociaron a buena recuperación neurológica a los tres meses en pacientes con infarto cerebral agudo.

### **Conclusiones**

En este proyecto de investigación clínica en el que hemos estudiado el papel de las VE y de los miRNA como potenciales biomarcadores pronósticos en pacientes con infarto cerebral agudo, nuestros resultados muestran que:

1. En el daño isquémico (cerebral y miocárdico) existe un incremento de los niveles de VE en suero, con un perfil de expresión en miRNA y proteínas diferente al hallado en controles sanos.
2. No existen diferencias en los niveles séricos de VE en isquemia cerebral y miocárdica, aunque sí en la expresión de proteínas y miRNA. Se han identificado 42 proteínas específicas de pacientes con infarto cerebral y miRNA-340\_5p se encuentra sobreexpresado en el infarto cerebral en comparación con infarto de miocardio. Estas diferencias sugieren que, aunque existan proteínas y miRNA comunes al proceso isquémico, existen diferencias en los mecanismos de daño y de reparación tisular que subyacen a la isquemia cerebral y a la miocárdica.
3. No existen diferencias significativas en los niveles séricos de VE en pacientes con IC-cs en comparación con los de IC-s. Sin embargo, se han identificado proteínas específicas de grupo tanto en el IC-cs como en el IC-s. Además, detectamos infraexpresión de cuatro miRNA: miRNA-15a\_5p, miRNA-424\_5p, miRNA-100\_5p y miRNA-339\_5p en el grupo de IC-cs. Todo ello sugiere diferencias en los mecanismos de daño y de reparación cerebral según la topografía de la lesión cerebral.
4. Los niveles séricos de VE no se correlacionan con el volumen de lesión ni con la recuperación neurológica tras un infarto cerebral. Sin embargo, tanto niveles de miRNA-29b\_3p inferiores a 2,52 Delta CT como de miRNA-100\_5p por debajo de 5,47 Delta CT predicen buena recuperación neurológica a los tres meses, por lo que podrían tener valor como biomarcadores pronósticos en pacientes con infarto cerebral agudo.

# **INTRODUCCIÓN**

## **DEFINICIÓN DE ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR E ICTUS**

La enfermedad cerebrovascular se refiere a todo trastorno en el cual un área del encéfalo se afecta de forma transitoria o permanente por una isquemia o hemorragia, estando uno o más vasos sanguíneos cerebrales afectados por un proceso patológico<sup>1</sup>.

El término “ictus” es un término latino que, al igual que su correspondiente anglosajón “stroke”, significa “golpe”, por su presentación súbita y brusca<sup>1</sup>.

Existen diferentes tipos de ictus. Según su naturaleza, se puede presentar como ictus isquémico o como ictus hemorrágico con una proporción en torno al 85 y 15%, respectivamente<sup>1</sup>.

El ictus isquémico se produce por la disminución del aporte sanguíneo a un territorio encefálico (isquemia focal). Según la duración del proceso isquémico focal se presentará como ataque isquémico transitorio, si el episodio de disfunción neurológica revierte y no se acompaña de lesión isquémica en las pruebas de imagen, o como infarto cerebral<sup>1,2</sup>.

El ictus hemorrágico es la presencia de sangre, bien en el parénquima o en el interior de los ventrículos cerebrales (hemorragia cerebral), bien en el espacio subaracnoideo (hemorragia subaracnoidea)<sup>1,2</sup>.

## **EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR.**

La enfermedad cerebrovascular es la segunda causa de muerte y una de las principales causas de incapacidad adquirida en el adulto en la población mundial<sup>3</sup>.

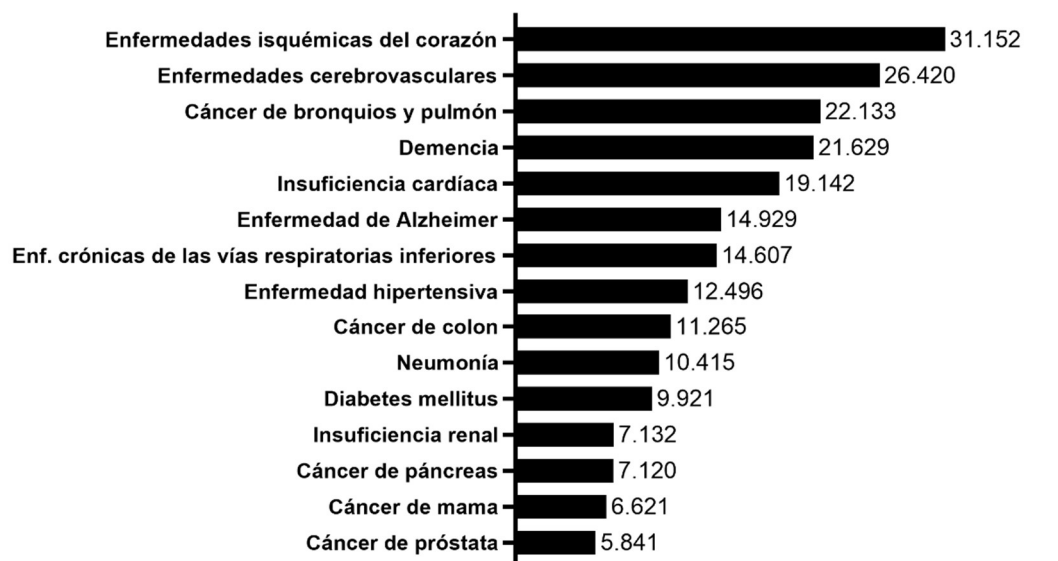
Las tasas de incidencia ajustadas por edad varían considerablemente según su localización geográfica, por lo que deben interpretarse con cautela<sup>4</sup>. En Europa, las tasas de incidencia ajustadas por edad oscilan entre 95-290/100.000 habitantes por año<sup>5</sup>. En concreto en España, los datos del estudio IBERICTUS mostraron una tasa de incidencia anual de ictus de 187/100.000 habitantes<sup>6</sup>.

Un dato de gran relevancia es el que se refiere a su impacto en la calidad de vida. En comparación con otras causas de pérdida de Años de Vida Ajustados por Discapacidad (AVAD) en el mundo, el ictus fue el segundo mayor contribuyente, después de las cardiopatías isquémicas, a nivel mundial y en los países en desarrollo, y el tercer mayor contribuyente a los AVAD en los países desarrollados (después de las cardiopatías isquémicas y el dolor lumbar y cervical)<sup>7</sup>.



Estudios recientes señalan un preocupante incremento en el número absoluto de ictus, supervivientes, muertes y AVAD relacionadas con ictus<sup>3,8</sup> lo que nos indica que no sólo es una enfermedad de gran repercusión en el momento actual, sino que está en aumento y se prevé que su impacto sea mayor en las próximas décadas.

En concreto en España, según los datos del Instituto Nacional de Estadística en el año 2018, la enfermedad cerebrovascular fue la segunda causa de muerte (primera en mujeres). Figura 1.



**Figura 1:** Instituto Nacional de Estadística: Número nacional de defunciones (2018). Se produjeron 26.420 muertes por Enfermedad Cerebrovascular: 14.985 (56,7%) en mujeres; 24.389 (92,3%) en >65 años.

En términos de impacto económico, en la Unión Europea el coste debido a mortalidad por ictus supuso un gasto aproximado de 5000 millones de euros en el año 2015, y las pérdidas de producción debidas a morbilidad alcanzaron un gasto aproximado de 4000 millones de euros. Otra importante partida de coste no sanitario deriva de los cuidados que requieren las personas con ictus, que ascendió a 16 000 millones de euros en la UE en el año 2015<sup>9</sup>. Debido al envejecimiento de la población, se prevé que el costo total de ictus (abarcando costes directos e indirectos) aumentará un 129% para el año 2030<sup>10</sup>.

## CLASIFICACIÓN DEL ICTUS ISQUÉMICO

Aunque existen distintas clasificaciones, la más ampliamente utilizada en la práctica clínica en nuestro medio es la propuesta por el Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología. Así, según la etiología del ictus isquémico, podemos clasificarlos en<sup>11,12</sup>:

### 1. Infarto cerebral aterotrombótico. Aterosclerosis de arteria grande

Infarto cerebral generalmente de tamaño medio o grande, de topografía cortical o subcortical y localización carotídea o vertebrobasilar, en el que se cumple alguno de los dos criterios siguientes:

A. Aterosclerosis con estenosis: estenosis  $\geq 50\%$  del diámetro luminal u oclusión de la arteria extracraneal correspondiente o de la arteria intracraneal de gran calibre (cerebral media, cerebral posterior o tronco basilar), en ausencia de otra etiología.

B. Aterosclerosis sin estenosis: presencia de placas o de estenosis  $< 50\%$  en la arteria cerebral media (ACM), cerebral posterior o basilar, en ausencia de otra etiología y en presencia de más de dos de los siguientes factores de riesgo vascular cerebral: edad  $> 50$  años, hipertensión arterial, diabetes mellitus, tabaquismo o hipercolesterolemia.

### 2. Infarto cerebral cardioembólico

Infarto cerebral generalmente de tamaño medio o grande, de topografía habitualmente cortical, en el que se evidencia, en ausencia de otra etiología, alguna de las siguientes cardiopatías embolígenas: un trombo o tumor intracardiaco, estenosis mitral reumática, prótesis aórtica o mitral, endocarditis, fibrilación auricular, enfermedad del nodo sinusal, aneurisma ventricular izquierdo o acinesia después de un infarto agudo de miocardio (IAM), IAM (menos de tres meses) o hipocinesia cardiaca global o discinesia.

### 3. Enfermedad oclusiva de pequeño vaso arterial. Infarto lacunar

Infarto cerebral de pequeño tamaño ( $< 1,5$  cm de diámetro) en el territorio de una arteria perforante cerebral, que suele ocasionar clínicamente un síndrome lacunar (hemiparesia motora pura, síndrome sensitivo puro, síndrome sensitivo motriz, hemiparesia atáxica y disartria mano torpe) en un paciente con antecedente personal

de hipertensión arterial u otros factores de riesgo vascular cerebral, en ausencia de otra etiología.

#### **4. Infarto cerebral de etiología inhabitual**

Infarto cerebral de tamaño pequeño, mediano o grande, de localización cortical o subcortical, en el territorio carotídeo o vertebrobasilar en un paciente en el que se ha descartado el origen aterotrombótico, cardioembólico o lacunar. Se suele producir por trastornos sistémicos (conectivopatía, infección, neoplasia, síndrome mieloproliferativo, alteraciones metabólicas, de la coagulación, etc.) o por otras enfermedades, como disección arterial, displasia fibromuscular, aneurisma sacular, malformación arteriovenosa, trombosis venosa cerebral, angeítis, migraña, etc.

#### **5. Infarto cerebral de origen indeterminado**

Infarto cerebral de tamaño medio o grande, de localización cortical o subcortical, en el territorio carotídeo o vertebrobasilar, en el cual, tras un exhaustivo estudio diagnóstico, han sido descartados los subtipos aterotrombótico, cardioembólico, lacunar y de causa rara, o bien coexistía más de una posible etiología. Dentro de esta etiología indeterminada se podrían plantear unas subdivisiones que aclararían mejor este apartado; estudio incompleto, más de una etiología y desconocida.

### **FISIOPATOLOGÍA DE LA ISQUEMIA CEREBRAL**

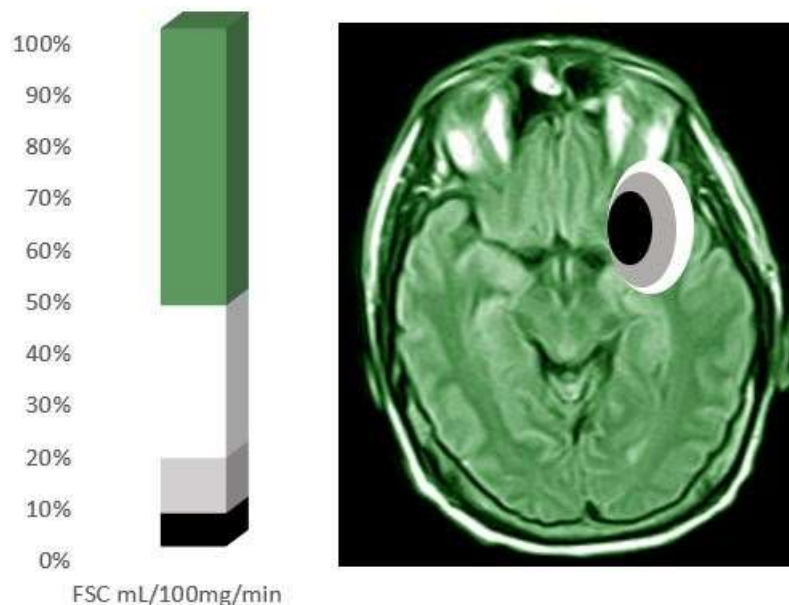
El cerebro adulto representa un 2% del peso corporal total y requiere un suministro ininterrumpido de unos 150 g de glucosa y 72 L de oxígeno cada 24 h, lo que representa un 20% del consumo de oxígeno de todo el organismo. Dado que el cerebro no es capaz de almacenar esas sustancias, la interrupción de su aporte supondrá una alteración en la función cerebral. En estado de reposo cada contracción cardíaca libera unos 70 mL de sangre a la aorta ascendente, de los que 10 mL a 15 mL se destinan al cerebro. Cada minuto, alrededor de 350 mL de sangre fluyen a través de cada arteria carótida interna y de 100 mL a 200 mL a través del sistema vertebrobasilar<sup>13</sup>.

En condiciones normales el flujo sanguíneo cerebral (FSC) normal es de 55-100 mL/100g/min. Cuando se produce una oclusión arterial el FSC disminuye en el territorio afectado distinguiéndose distintas regiones<sup>14</sup>:

El núcleo o *core* del infarto, que se perfunde a 10-12 mL/100 g/min o menos<sup>14</sup>.

La zona denominada penumbra isquémica, situada alrededor del *core*, que está críticamente hipoperfundida (a menos de 18-20 mL/100g/min).<sup>15</sup> Ésta no es un área fija sino un concepto dinámico, que irá disminuyendo de tamaño a medida que aumenta el tiempo de hipoperfusión, integrándose en el *core* del infarto<sup>16</sup>.

A su vez, dicha zona de penumbra está rodeada por tejido cerebral normal que se perfunde a una velocidad más alta que la zona de penumbra, pero menor que la velocidad normal (22-55 mL/100 g/min) (zona de oligohemia) y, por tanto, con menor probabilidad de convertirse en tejido infartado<sup>17,18</sup>. Figura 2.



**Figura 2:** Flujo sanguíneo cerebral en la isquemia

*En negro queda representado el core del infarto; En gris, el área de penumbra isquémica; en blanco, la zona de oligohemia y en verde, el flujo cerebral normal.*

El concepto de penumbra isquémica va a ser crucial porque implica la existencia de un tejido en riesgo que puede ser “salvado” si se reperfundes a tiempo. Esta es la base del concepto “ventana terapéutica” que ha sido fundamental para el desarrollo de los tratamientos en fase aguda del infarto cerebral.

Estos tratamientos de reperfundes están dirigidos a restaurar el FSC pero, de no administrarlos con relativa rapidez, no serán suficientes para inhibir los mediadores de la cascada isquémica o incluso podrían llegar a potenciarlos, causando mayor progresión del territorio infartado, fenómeno conocido como daño por isquemia-reperfundes<sup>19</sup>. Existen, además, fenómenos de muerte neuronal retardada hasta varios días después de la isquemia, a pesar de una reperfundes eficaz, en los que el mecanismo de muerte es la apoptosis<sup>20</sup>.

Los mecanismos patogénicos en la isquemia cerebral son complejos y, aunque se describan de forma secuencial, se superponen. No debemos olvidar que los conceptos de penumbra isquémica, *core* del infarto y ventana terapéutica son conceptos dinámicos que van a estar condicionados por variables fisiológicas (temperatura, glucemia, tensión arterial, saturación de oxígeno). Mantener un adecuado control de las constantes para favorecer la homeostasis, así como iniciar un tratamiento precoz de reperfusión para restaurar el FSC, son las herramientas de las que disponemos en la actualidad para minimizar el daño tras la isquemia cerebral.

### **Mecanismos de daño y reparación celular en la isquemia cerebral**

En la isquemia cerebral, el déficit de oxígeno condiciona el desvío del metabolismo de la glucosa a la vía anaerobia, lo que origina la producción de acidosis láctica y la consiguiente reducción de la disponibilidad de adenosín trifosfato (ATP), que es la fuente energética necesaria para el correcto funcionamiento de las bombas iónicas de las membranas celulares<sup>21</sup>.

La bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , expulsa tres iones de  $\text{Na}^+$  al exterior celular a cambio de dos iones de  $\text{K}^+$ . Dado que la membrana es bastante permeable a  $\text{K}^+$ , la distribución de  $\text{K}^+$  determina en gran medida el potencial de la membrana. El fallo de las bombas de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  origina un aumento de  $\text{Na}^+$  intracelular y de agua (osmóticamente obligada) y una rápida depleción de  $\text{K}^+$  intracelular con la consiguiente despolarización neuronal<sup>21</sup>. Esta despolarización neuronal en el área del infarto se propaga a la zona de penumbra isquémica, aumentando las demandas metabólicas del tejido y contribuyendo a la expansión de la lesión<sup>22</sup>.

A su vez, la despolarización neuronal ocasiona la apertura de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes. El aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular causa una brusca despolarización de la membrana con la liberación de aminoácidos excitadores como el glutamato.

A nivel postsináptico, el glutamato actúa sobre los receptores ionotrópicos del ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y del N-Metil-D-Aspartato (NMDA) permitiendo el paso de cationes. Al unirse el glutamato al receptor AMPA se produce su apertura, permitiendo la entrada de  $\text{Na}^+$  y, por tanto, la despolarización celular (y edema citotóxico).

Por otra parte, la activación del canal NMDA tras la unión de glutamato produce la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. Este canal está normalmente bloqueado por  $\text{Mg}^{2+}$ , que se libera cuando la membrana se despolariza. Por tanto, la despolarización causada por la

activación del canal AMPA por glutamato facilita a su vez la activación del canal NMDA, con la consiguiente entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular.

El aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico produce daño celular por activar diversas enzimas (proteasas, endonucleasas, fosfolipasas, proteinquinasas y óxido nítrico sintetetas) e inducir la expresión de genes de respuesta inmediata relacionados con la apoptosis<sup>23</sup>.

Otro mecanismo de daño neuronal en la isquemia cerebral es la acidosis. En la isquemia cerebral el fallo energético desvía el metabolismo de la glucosa por la vía anaerobia, con la reducción de piruvato a lactato y la consiguiente acidosis.

La cantidad de ácido láctico formado depende de la concentración de glucosa en plasma en el momento de la isquemia. Niveles elevados de glucemia condicionarán mayor acidosis láctica y mayor daño cerebral. La acidosis puede producir edema citotóxico, al inducir la acumulación de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  a través del intercambio acoplado de  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ <sup>24</sup>. Además, la acidosis produce daño celular al fomentar la producción de radicales libres.

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos con un electrón no emparejado en su órbita más externa, lo que les confiere una gran reactividad pudiendo reaccionar con proteínas, ácidos nucleicos o lípidos de membrana. La acidosis favorecería la producción de radicales libres mediante la liberación de hierro de su unión a proteínas como la transferrina o la ferritina<sup>25,26</sup>. Los radicales libres también se han visto implicados en el daño por reperfusión<sup>21,24</sup>.

Por tanto, en la isquemia cerebral se superponen mecanismos de daño y muerte celular. Se ha descrito que el mecanismo predominante de muerte en el *core* (donde la depleción energética es máxima) es por necrosis, mientras que en el área de penumbra isquémica el mecanismo principal de muerte es la apoptosis<sup>27,28</sup>.

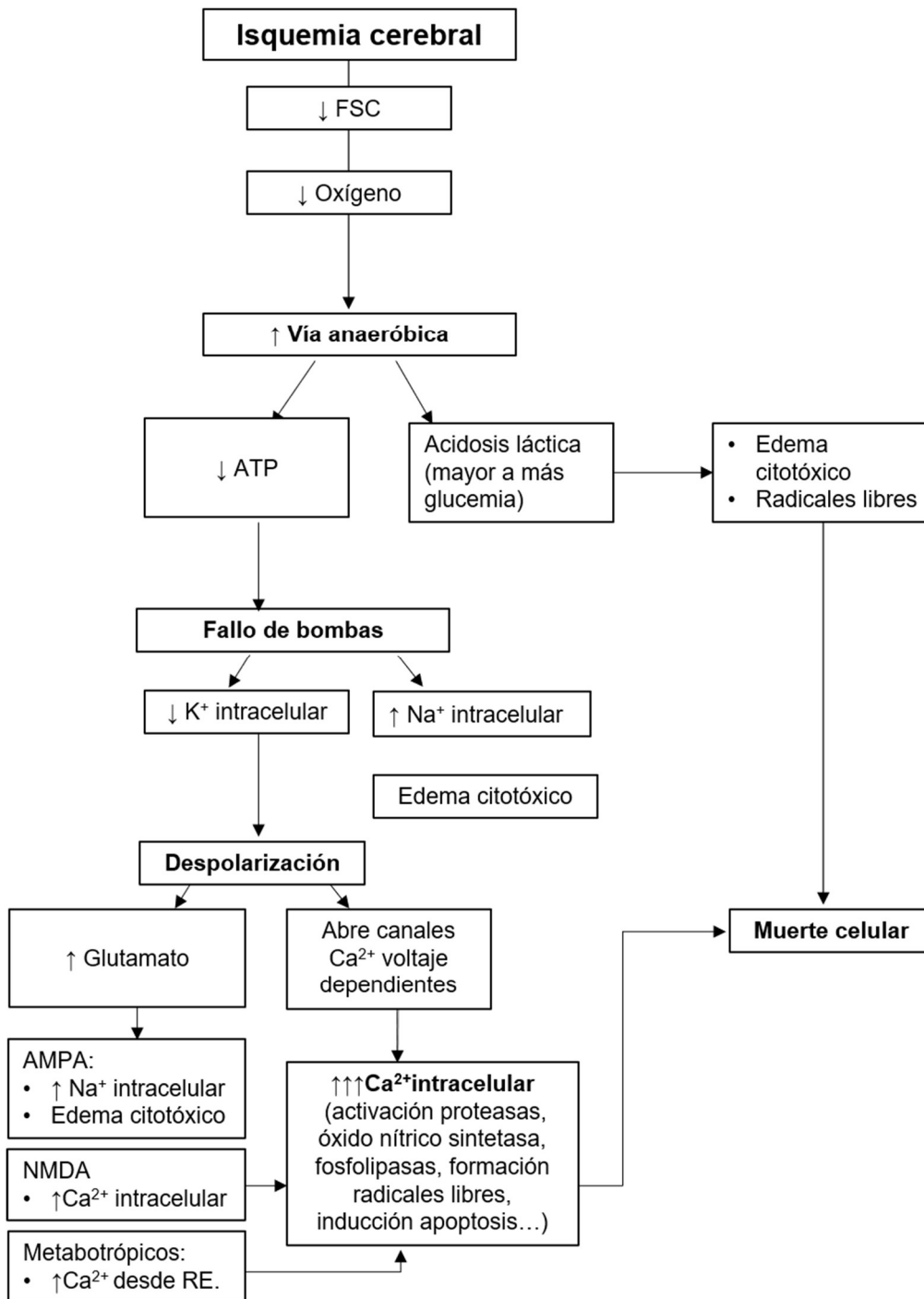
Pese a que la mayoría de los estudios se han centrado en investigar el daño cortical neuronal, el estudio de los mecanismos de daño y reparación que surgen tras la afectación subcortical (en la que se lesionan fibras de sustancia blanca, células gliales y endotelio vascular) es fundamental, ya que neuronas, endotelio y células gliales, constituyen una verdadera unidad en continua comunicación.

En cuanto a la respuesta de las células gliales a la isquemia, los astrocitos, que constituyen las células gliales más abundantes, se transforman en glía reactiva en condiciones de isquemia sobre-expresando receptores GTL-1. Estos receptores permiten la recaptación del exceso de glutamato favoreciendo la tolerancia a la isquemia. También, liberan factores tróficos como el factor neurotrófico derivado de

cerebro (BDNF) y realizan funciones fagocíticas contribuyendo a la limpieza y remodelación post-isquemia<sup>29</sup>. Además, tanto la isquemia como la reperfusión posterior originan una respuesta inflamatoria. Esta respuesta estaría mediada principalmente por las células endoteliales, pero también, por las células gliales y las neuronas, con la liberación de citocinas como la interleuquina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (TNF). Ello facilita que el endotelio normal pase a un estado protrombótico, con acumulación de células inflamatorias a nivel perivascular<sup>30</sup>. Estas citocinas, a su vez, inducen una segunda respuesta inflamatoria más persistente, mediada por interleuquina-6 (IL-6) e interleuquina-8 (IL-8) que inducen la liberación de reactantes de fase aguda (como la proteína C reactiva o el fibrinógeno) y de moléculas conocidas como adhesinas (selectinas, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas e integrinas) que fomentan la agregación leucocitaria y la adherencia de leucocitos a la pared vascular. Estos cambios conducen a la obstrucción de la microvascularización y están implicados en el fenómeno de no-reflujo<sup>31</sup>. Las citocinas IL-6 y TNF estimulan la producción de metaloproteasas (MMP), lo que conduce a la ruptura de la barrera hematoencefálica (BHE) y por consiguiente, desarrollo de edema vasogénico y mayor riesgo de transformación hemorrágica<sup>32</sup>.

En paralelo al daño celular producido durante la cascada isquémica, se ha demostrado que durante la isquemia se activan mecanismos de reparación cerebral mediante la liberación de factores tróficos implicados en la neurogénesis, angiogénesis y sinaptogénesis<sup>33</sup>. Estudios de expresión génica de microarrays realizados en nuestro laboratorio muestran una expresión diferencial de genes relacionados con daño y reparación cerebral en el *core* del infarto y en el área periinfarto<sup>34</sup>.

Por todo lo anterior, los mecanismos que subyacen en la isquemia cerebral son complejos. Se superponen fenómenos de daño y muerte celular por necrosis y apoptosis, así como mecanismos compensadores de reparación cerebral y coexiste respuesta neuronal a la isquemia con respuesta glial y endotelial. Estos procesos son dinámicos y están condicionados por variables fisiológicas. La comprensión de estos mecanismos es fundamental para instaurar tratamientos eficaces. Figura 3.



**Figura 3: Mecanismos de daño en la isquemia cerebral.**  
 FSC (flujo sanguíneo cerebral), ATP (adenosin trifosfato), AMPA (receptor del ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico). NMDA (receptor N-metil-D-Aspartato), RE (retículo endoplasmático)



## TRATAMIENTO DEL INFARTO CEREBRAL

Los mecanismos que se desencadenan tras la isquemia cerebral progresan muy rápidamente, lo que hace que el ictus sea considerado una urgencia neurológica en la que el tratamiento debe instaurarse lo antes posible. En la práctica clínica, el tratamiento en fase aguda del infarto cerebral se basa en promover la reperfusión tisular en las primeras horas, para evitar que el territorio en penumbra se transforme en tejido infartado.

La trombólisis intravenosa, mediante la administración de activador tisular de plasminógeno recombinante (rtPA) dentro de las primeras 4.5 horas desde el inicio de los síntomas, ha demostrado eficacia en diversos ensayos clínicos, metaanálisis y estudios clínicos observacionales <sup>35-41</sup>.

El tratamiento endovascular con trombectomía mecánica, añadido al tratamiento con trombólisis intravenosa, mejora los resultados funcionales en pacientes con ictus y oclusión de la arteria intracraneal cuando la intervención se realiza dentro de las 6 horas de la aparición de los síntomas y hasta 24 horas en pacientes seleccionados <sup>42-47</sup>.

Sin embargo, no todos los pacientes son subsidiarios de estas terapias de reperfusión por presentar contraindicaciones o encontrarse fuera de la ventana terapéutica. Por otra parte, muchos pacientes, a pesar de recibir el tratamiento de reperfusión, persisten con secuelas neurológicas. Por lo tanto, es fundamental desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que potencien los procesos endógenos de reparación cerebral. En este sentido, existen estudios en investigación basados en la administración de factores tróficos y terapia celular <sup>48</sup>.

Los factores tróficos son moléculas capaces de estimular el ciclo celular y la proliferación y migración de células progenitoras. Estudios preclínicos en modelos animales de infarto cerebral han mostrado que la administración de distintos factores tróficos, como el factor de crecimiento básico de fibroblastos y el BDNF, estimulan la neurogénesis y la migración neuronal desde la zona subventricular<sup>49,50</sup>, así como la oligodendrogénesis, con una mejora en la conectividad de las fibras nerviosas en el infarto cerebral con afectación subcortical en rata<sup>51</sup>, y que el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) estimula la angiogénesis mejorando la recuperación funcional<sup>52</sup>.

Dada la heterogeneidad tisular existente en el cerebro (cuerpos neuronales, fibras axonales, oligodendrocitos, astrocitos, células endoteliales), la elección de los factores tróficos más adecuados para administración terapéutica podría depender de la

topografía de la lesión. Sin embargo, no disponemos de información suficiente para determinar qué mecanismos de daño y reparación subyacen en la isquemia cerebral según el territorio afectado.

En cuanto a la terapia celular, numerosos estudios han demostrado que las células madre participan en procesos de reparación cerebral (neurogénesis, sinaptogénesis, angiogénesis, oligodendrogénesis). Además, en modelos animales de infarto cerebral, se ha demostrado que la administración de células madre disminuye el tamaño de lesión y mejora la recuperación funcional <sup>53-58</sup>.

Aunque inicialmente se creía que las células madre actuaban por reemplazamiento de tejido dañado, los estudios sugieren que lo hacen mediante la liberación de factores tróficos y de vesículas extracelulares (VE) al espacio extracelular <sup>53,57</sup>.

En un estudio realizado en nuestro laboratorio en un modelo experimental de infarto cerebral en ratas se demostró que los grupos tratados con células madre mostraron una mejor recuperación funcional que los animales de los grupos control. No se observó migración ni anidamiento de las células en el área de lesión cuando la administración de las células madre fue por vía intravenosa<sup>57</sup>, lo que indicaría que no es necesaria la formación de nichos celulares ni la implantación en el tejido lesionado para conseguir una buena recuperación funcional. Esto refuerza la hipótesis de que probablemente las células madre liberen factores tróficos y VE al medio extracelular que serían responsables de la reparación cerebral y la recuperación funcional, estimulando la plasticidad cerebral. Por ello, se están desarrollando ensayos clínicos de terapia celular con administración sistémica<sup>59</sup>.

## **BIOMARCADORES EN LA ISQUEMIA CEREBRAL**

El mayor conocimiento de la fisiopatología de la isquemia cerebral ha abierto la búsqueda de biomarcadores, entendiendo éstos como indicadores moleculares, celulares o de neuroimagen, que pueden ser objetivamente medibles y que sirven como señalizadores de procesos fisiológicos, patológicos o de respuesta a intervenciones terapéuticas<sup>60</sup>.

La búsqueda de biomarcadores en pacientes con infarto cerebral agudo que pudieran ser detectados en diferentes fluidos biológicos, fácilmente medibles y con alta sensibilidad y especificidad, podría aportar información diagnóstica como pronóstica. Al ser estos biomarcadores representativos de los procesos desencadenados por la isquemia cerebral, podrían ser también considerados potenciales dianas terapéuticas.

Los biomarcadores se utilizan en la práctica clínica para el diagnóstico, seguimiento y estimación pronóstica en numerosas enfermedades, como el cáncer<sup>61</sup>, y en enfermedades isquémicas agudas como el IAM<sup>62</sup>. En el campo de la neurología, algunos han demostrado utilidad en el diagnóstico en enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer<sup>63</sup>.

En las últimas décadas se han estudiado posibles biomarcadores de isquemia cerebral relacionados con los distintos procesos que se desencadenan en la cascada isquémica (excitotoxicidad, inflamación, angiogénesis, neurogénesis, apoptosis)<sup>64</sup>. La complejidad de estos mecanismos ha llevado a que, a pesar de los esfuerzos realizados, todavía no se ha conseguido identificar marcadores biológicos aplicables en la práctica clínica en pacientes con ictus. Una de las dificultades para encontrar biomarcadores en ictus es la falta de especificidad, ya que algunos de ellos podrían estar presentes también en otras enfermedades isquémicas agudas.

## **VESÍCULAS EXTRACELULARES**

En las últimas décadas, el descubrimiento de una nueva forma de comunicación celular mediante VE ha abierto un extenso campo de investigación.

Las VE son pequeñas vesículas de membrana del orden nanométrico, que son secretadas por casi todos los tipos de células. Están constituidas por una bicapa lipídica que contiene proteínas (incluidos enzimas y factores de transcripción), lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos (incluyendo ADN y ARN codificante y no codificante)<sup>65</sup>.

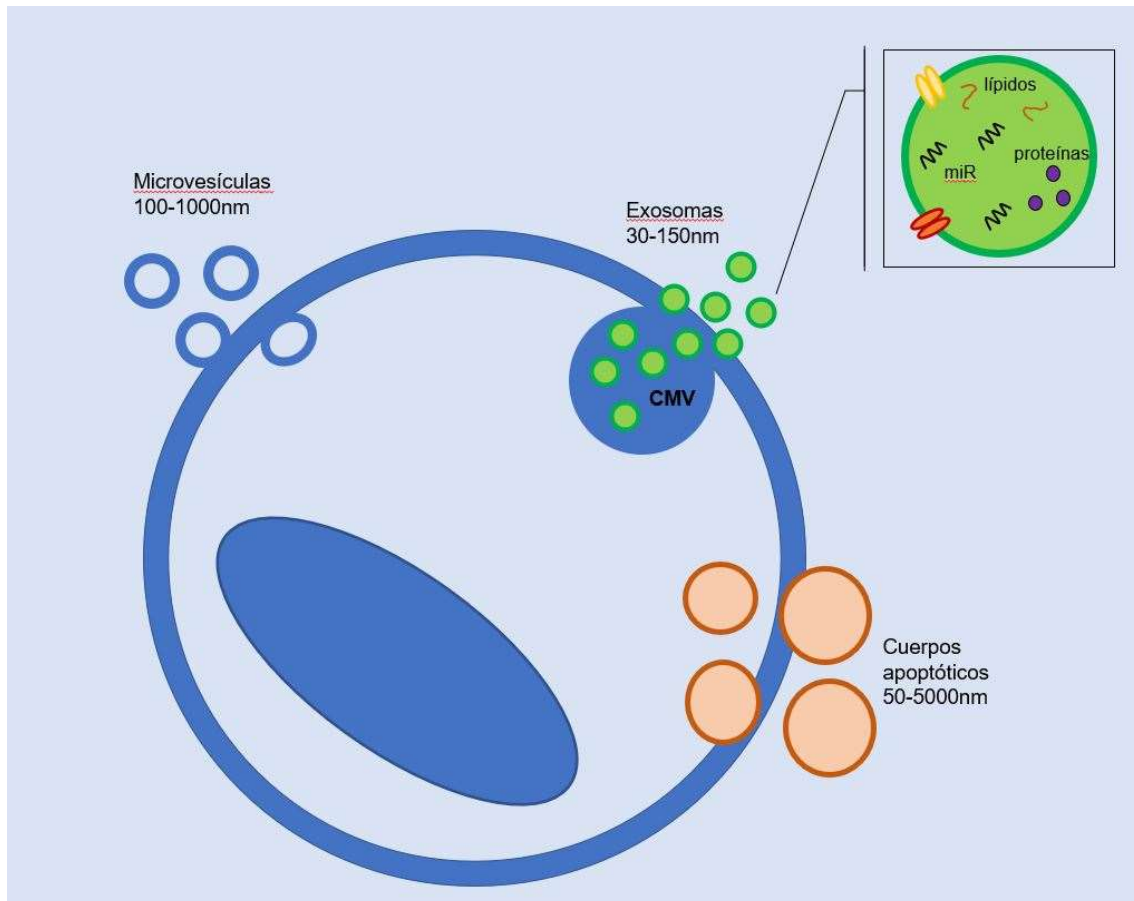
De acuerdo con su origen, pueden distinguirse distintos tipos: ectosomas o microvesículas, cuerpos apoptóticos y exosomas. Los cuerpos apoptóticos tienen un tamaño que va desde 50-5000 nm y son liberados por las células moribundas durante las últimas etapas de la apoptosis. Las microvesículas o ectosomas tienen un tamaño de 100-1000 nm y son liberadas por el borde externo de la membrana plasmática. Los exosomas tienen un tamaño aproximado de entre 30-150 nm y se forman por invaginación del borde interno de la membrana plasmática, lo que resulta en la acumulación progresiva de vesículas intraluminales, que maduran dentro de grandes cuerpos multivesiculares y que, al fusionarse con la membrana plasmática, son secretados al medio extracelular (Figura 4) <sup>66</sup>.

Las VE se pueden detectar en la mayoría de los fluidos corporales (sangre, líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, semen, líquido amniótico, leche materna)<sup>67</sup>. Estas VE

contienen proteínas y ARN que están siendo estudiados como posibles biomarcadores en distintas enfermedades, la mayoría relacionadas con procesos oncológicos<sup>68-71</sup>.

Una importante ventaja de las VE es que, debido a su pequeño tamaño, son capaces de atravesar la BHE lo que las hace idóneas como posibles biomarcadores de daño y reparación cerebral puesto que podrían ser detectadas en sangre periférica<sup>72,73</sup>. Además, una sola VE contiene una amplia variedad de moléculas en su interior, por lo que su estudio ofrecería el análisis de múltiples potenciales biomarcadores. Otra ventaja, en cuanto a su posible utilidad como biomarcadores, es que el contenido de las VE varía según la población celular de la que deriven<sup>74</sup>. Por ello, dependiendo de la topografía de la lesión tisular obtendríamos diferentes biomarcadores de daño y reparación cerebral, que ayudarían a investigar los mecanismos patogénicos subyacentes al daño isquémico según el tejido cerebral afectado (corteza cerebral o sustancia blanca). Finalmente, estas VE tendrán receptores diferentes dependiendo de su célula de origen<sup>74</sup>, por lo que sería posible identificar VE derivadas de distintas poblaciones celulares del sistema nervioso central (SNC) (neuronas, oligodendrocitos), lo que aumentaría la especificidad en la búsqueda de biomarcadores de infarto cerebral.

Hasta el momento se han publicado algunos estudios que analizan la utilidad de las VE como biomarcadores en enfermedades neurodegenerativas<sup>75,76</sup>. Sin embargo, muy pocos han evaluado el papel de las VE como biomarcadores en isquemia cerebral focal<sup>77-81</sup>.



**Figura 4:** Representación esquemática de los subtipos de vesículas extracelulares. Las vesículas extracelulares (tamaño entre 30-150 nm) se acumulan en los cuerpos multivesiculares (CMV) y son liberados por exocitosis. Las microvesículas (100-1000 nm) se liberan del borde externo de la membrana plasmática, y los cuerpos apoptóticos (50-5000 nm) son liberados en las últimas etapas de muerte celular por apoptosis.

## MICRO-ARN

Los miRNAs son pequeños ARN de una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos, no codificantes, capaces de regular la expresión génica. Fueron descubiertos en 1993 por Lee y su grupo de investigación mientras estudiaban la función del gen Lin-4 en el desarrollo de *C-elegans*<sup>82</sup>, pero el término miRNA no fue acuñado hasta el año 2001<sup>83</sup>. Desde su descubrimiento, se han identificado 38.589 miRNAs precursores en 271 especies<sup>84</sup>.

Los miRNA desempeñan un papel clave en la comunicación intercelular ya que muchos de los miRNA hallados en suero están vehiculizados en VE mediando la comunicación paracrina entre diferentes tejidos y regulando la expresión de genes y funciones celulares a distancia<sup>85,86</sup>.

La importancia de los miRNA radica en que, aunque no codifiquen proteínas, están implicados en la regulación de genes diana, que son claves en procesos fisiológicos y patológicos. Además, los miRNA liberados a suero y otros fluidos, pueden servir como biomarcadores de enfermedades. Aunque la mayoría de los estudios se centra en enfermedades oncológicas, en los últimos años se está estudiando su papel en las enfermedades cerebrovasculares y se han identificado algunos miRNA que podrían ser útiles como biomarcadores diagnósticos, pronósticos y como posibles dianas terapéuticas<sup>87</sup>.

### **VESÍCULAS EXTRACELULARES Y MICRO-ARN COMO BIOMARCADORES EN EL INFARTO CEREBRAL**

En la actualidad, existen pocos estudios que hayan evaluado el posible papel de las VE y miRNA como biomarcadores predictivos de la recuperación neurológica en el infarto cerebral.

Sin embargo, las VE que se liberan en respuesta a un proceso isquémico cerebral, al atravesar la BHE podrían aportar información en directo de los mecanismos de daño y reparación que se inician tras daño isquémico.

Algunos estudios han analizado el contenido de las VE en la isquemia cerebral en modelos animales<sup>88</sup> y en pacientes, revelando algunos miRNA que podrían servir como biomarcadores diagnósticos<sup>77-79,81,89,90</sup>. En este sentido, la expresión de miRNA-30a-5p, está aumentada en las primeras horas del infarto cerebral<sup>77</sup>; la expresión de miRNA MiR-9 y MiR-124 se relaciona con la puntuación basal en la escala de NIHSS, así como con el volumen de lesión cerebral y con marcadores de daño como IL-6<sup>78</sup>; también la expresión de miR-223 se relacionan con infarto cerebral y con la gravedad del mismo<sup>79</sup> y la expresión de miRNA-134 está elevada en pacientes con infarto cerebral y se relaciona con la gravedad y con una peor recuperación<sup>89</sup>.

Sin embargo, carecemos de información suficiente en cuanto al papel de las VE y miRNA como biomarcadores predictores pronósticos en pacientes con ictus. Por otra parte, es posible que el contenido en miRNA de las VE varíe dependiendo de si la lesión tisular afecta a la corteza cerebral, sustancia blanca o ambas.

El estudio de la correlación entre la liberación de VE y miRNA en suero con el volumen de lesión cerebral y con la recuperación funcional de los pacientes con infarto cerebral agudo sería de gran interés para una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes a la isquemia cerebral.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

## **HIPÓTESIS**

Las VE que se liberan como parte de la respuesta celular a la isquemia cerebral podrían ser identificadas en la sangre de pacientes que hayan sufrido un infarto cerebral agudo. Éstas podrían contener proteínas y miRNA diferentes según la topografía del tejido cerebral dañado (córtico-subcortical o predominantemente subcortical). Su aislamiento, cuantificación y el estudio de su composición podría ser de utilidad en la predicción de la recuperación de los pacientes, al reflejar tanto los mecanismos patogénicos que subyacen al infarto cerebral, como los mecanismos compensadores y reparadores que se activan específicamente tras la isquemia cerebral.

Para demostrar esta hipótesis nos planteamos los siguientes **objetivos**:

- 1- Estudiar las VE en el proceso isquémico, evaluando si existen diferencias en sus niveles séricos o en su contenido en proteínas y miRNA entre pacientes con isquemia (cerebral o de miocardio) y voluntarios sanos.
- 2- Explorar si existen diferencias en los niveles séricos o en el contenido en proteínas y miRNA de las VE dependiendo del órgano afectado por isquemia.
- 3- Analizar las posibles diferencias en los niveles séricos de las VE o en su contenido en proteínas y miRNA en pacientes con infarto córtico-subcortical en comparación con el infarto cerebral de afectación estrictamente subcortical.
- 4- Evaluar la potencial utilidad de las VE como biomarcadores en la isquemia cerebral, analizando si existe correlación entre sus niveles séricos y el volumen del infarto cerebral o la recuperación neurológica, y si existe algún miRNA que permita predecir buena evolución de los pacientes con ictus isquémico agudo.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio prospectivo y observacional caso-control.

### **Población y grupos de estudio:**

La selección de los participantes en el estudio se ha realizado en los Servicios de Neurología (Unidad de ictus y Sala de Hospitalización), Cardiología (Unidad Coronaria) y en el Centro de Extracciones Sanguíneas del Hospital Universitario La Paz.

Tras comprobar los criterios de inclusión y exclusión, y tras la firma del consentimiento informado, se han considerado los siguientes grupos de estudio:

- Casos: pacientes con infarto cerebral agudo que cumplieran los siguientes criterios de inclusión:
  - Edad mayor de 18 años
  - Ingreso en la Unidad de ictus en las primeras 24h tras el ictus
  - Estudio de neuroimagen cerebral, tomografía computarizada (TC) o RM, compatible con el diagnóstico clínico de infarto cerebral agudo de territorio anterior (córtico-subcortical o subcortical puro)
  - Puntuación en la ERm  $\leq 1$  previa al ictus
  - Obtención de firma de consentimiento informado

Dentro de este grupo, consideramos dos subgrupos:

-Infarto cerebral córtico-subcortical (IC-cs). Pacientes que hayan presentado infarto cerebral con lesión con afectación tanto cortical como subcortical en el territorio de ACM o de la arteria cerebral anterior.

-Infarto cerebral subcortical (IC-s). Pacientes que hayan presentado un infarto cerebral estrictamente subcortical que ocasione clínicamente un síndrome lacunar.

- Grupo control IAM: pacientes ingresados en la Unidad Coronaria que cumplieran los siguientes criterios de inclusión:
  - Edad mayor de 18 años
  - IAM de menos de 3 días de evolución

- Exploración neurológica normal
- Obtención de firma de consentimiento informado
- Grupo control voluntarios sanos (VS): Sujetos que acudían al centro de extracciones sanguíneas y que cumplían los siguientes criterios de inclusión:
  - Edad mayor de 18 años
  - Obtención de firma de consentimiento informado

### **Criterios de exclusión**

Los criterios de exclusión fueron comunes a casos y controles:

- Antecedente de infarto cerebral.
- Evidencia en las pruebas de neuroimagen de tumor cerebral, hemorragia intraventricular, intraparenquimatosa o subaracnoidea (sólo en casos).
- Consumo habitual de drogas o de alcohol.
- Demencia pre-existente.
- Cualquier condición clínica que interfieran en el proceso diagnóstico adecuado, tratamiento o seguimiento del estudio.
- Participación en un ensayo clínico.
- Incapacidad o falta de voluntad para dar consentimiento informado por escrito por parte del paciente (o de su familiar en los casos de incapacidad del paciente para comprender o consentir su participación en el estudio).

### **Variables de estudio**

#### **- Escalas clínicas en pacientes**

- Escala de ictus del National Institutes of Health (NIHSS). Esta es la escala más empleada para la valoración neurológica de los pacientes con ictus. Está constituida por 11 ítems que permiten explorar de forma rápida, funciones corticales, nervios craneales, función motora, sensibilidad, coordinación y lenguaje (Véase tabla A1 en apéndice). Permite detectar fácilmente mejoría o empeoramiento neurológico.

Para medir la recuperación funcional en pacientes se calculó la reducción relativa del NIHSS, ya utilizada en otros estudios para valorar evolución de distintos tratamientos en infarto cerebral<sup>91,92</sup>. La fórmula utilizada fue la siguiente:

$$RR\ NIHSS = (1 - (NIHSS\ a\ los\ 3\ meses \div NIHSS\ inicial)) * 100$$

Donde RR NIHSS es la reducción relativa en la puntuación en la escala de NIHSS, NIHSS a los tres meses es la puntuación en la escala obtenida a los tres meses en la consulta del neurólogo y NIHSS inicial es la puntuación en la escala obtenida en la exploración realizada por el neurólogo de guardia en el momento de la llegada del paciente a Urgencias.

Consideramos buena evolución la reducción relativa en esta escala mayor al 50%, y mala evolución la reducción relativa en esta escala igual o inferior al 50%. Cuando la reducción relativa del NIHSS fue del 100% se consideró recuperación total en esta medida.

-Escala de Rankin modificada (ERm). Escala que valora el grado de dependencia de actividades diarias tras el ictus. Está constituida por 7 ítems (desde el cero, asintomático; hasta el seis, muerte) (Véase Tabla A2, apéndice).

### **Neuroimagen**

En todos los pacientes se realizó TC basal en el momento del ingreso. Para analizar posibles diferencias en la carga vascular previa de los pacientes, se utilizó la escala de Fazekas (Véase Tabla A3, apéndice) y se cuantificaron los infartos silentes<sup>93,94</sup>. En el subgrupo de pacientes en los que, por criterio médico, se realizó RM cerebral durante la primera semana de ingreso, se analizó el volumen de infarto cerebral en las secuencias axiales de difusión y de recuperación de la inversión atenuada de fluido (FLAIR). Para el cálculo del volumen total del infarto se delimitó manualmente el área de infarto en todos los cortes axiales adquiridos en secuencia de difusión y FLAIR por separado. Mediante el programa MRlcron (Chris Rorden; CA, EEUU) se calculó el volumen total en centímetros cúbicos a partir del número de vóxeles y la dimensión de la imagen.

### Cuantificación de VE en suero

Se caracterizaron y se cuantificaron los niveles de VE en suero tal y como se describe en los apartados caracterización y cuantificación de VE (véase más adelante, páginas 65 y 66).

### Composición de VE

-Estudio de la composición de proteínas y miRNA en VE aisladas en suero tal y como se describe en el apartado composición de VE (véase más adelante, página 66).

### Covariables

Se recogieron las siguientes: edad, sexo, antecedentes de hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia, fibrilación auricular, consumo de tabaco y alcohol, tratamientos previos para el ictus (antiagregantes plaquetarios, anticoagulantes, antihipertensivos, estatinas, inhibidores de la recaptación de serotonina), glucemia a la llegada a urgencias. La comorbilidad fue medida en pacientes con el Índice de Charlson<sup>95</sup>. (Véase Tabla A4, apéndice).

### Cronograma

El cronograma de los procedimientos del estudio clínico queda representado en la Tabla 1.

**Tabla 1**

*Cronograma con las principales variables que se analizarán en el estudio clínico*

Procedimientos	Visita basal	V1 (24/72h)	V2 (3 meses)
<b>Criterios</b>			
<b>inclusión y exclusión</b>	X(casos/controles)		
<b>Firma CI</b>	X (casos/controles)		
<b>NIHSS</b>	X (casos)		X (casos)
<b>ERm</b>	X (casos)		X (casos)
<b>Neuroimagen</b>	X (casos)		
<b>VE en suero</b>		X (casos/controles)	X (casos)
<b>Composición VE</b>		X (casos/controles)	

*CI (Consentimiento informado), NIHSS (National institute of Health Stroke Scale), ERm (Escala de Rankin modificada), VE (Vesículas extracelulares). En el caso de los voluntarios sanos, en una única visita se comprobaron criterios de inclusión y exclusión y se extrajo la muestra sanguínea.*

### **Cálculo muestral**

Uno de los métodos más comúnmente usados para determinar el tamaño muestral en un contraste de hipótesis bilateral es calcularlo a partir de la potencia estadística, del nivel de significancia y del tamaño del efecto también conocido como D de Cohen<sup>96</sup>.

El tamaño del efecto o D de Cohen es una medida de cómo un tratamiento o un acontecimiento (en nuestro caso, la isquemia cerebral) afecta a la variable de estudio (en nuestro caso, el número de VE). Esta medida se define como:

$$\frac{\mu_1 - \mu_2}{\sigma}$$

Donde el numerador es la diferencia entre las medias poblacionales del grupo de estudio y del grupo de control y el denominador es la desviación estándar (DE) esperada.

Dado que estos datos al inicio de nuestro estudio son desconocidos, utilizaremos el valor que Cohen utiliza como tamaño del efecto medio que es D=0,05.

Asumiendo un riesgo beta de 0,1 (poder estadístico 0,9) y un nivel de significancia de 0,05, el tamaño muestral mínimo es de 170 individuos (85 casos y 85 controles).

Teniendo en cuenta las posibles pérdidas de seguimiento, que en estudios de pacientes con ictus se estima entre el 10-30%<sup>97,98</sup>, el objetivo de reclutamiento es de un total de 200 sujetos (100 casos y 100 controles).

### **Aspectos éticos**

Toda la gestión de datos se ha regido por los principios de la ley 14/2007, de 3 de julio, de investigación biomédica, que garantiza la confidencialidad de todos los datos de carácter personal. El estudio clínico ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (Ref. PI-2562). Para la obtención del consentimiento informado, en caso de que el paciente no pudiese firmar (afasia, disminución del nivel de consciencia), se disponía de un modelo de consentimiento informado para el familiar o representante del paciente.

## **AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES EN SUERO**

Las muestras para la determinación y aislamiento de las VE se extrajeron a las 24/72h del inicio de los síntomas tanto en casos como en los controles del grupo IAM y se obtuvo una segunda determinación de VE a los tres meses en el grupo de casos. En el caso de los voluntarios sanos, en una única visita se extrajo la muestra sanguínea.

Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 g durante 15 minutos para eliminar cualquier residuo celular y se congelaron a -80°C hasta su procesamiento.

Las VE se aislaron por un procedimiento de precipitación utilizando reactivos comerciales, ExoQuick ULTRA (System Biosciences, Mountain View, CA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para ello, se añadieron 67µL de ExoQuick a 250µL de suero y se dejó durante 30 min a 4°C. La mezcla ExoQuick/Suero fue entonces centrifugada a 3000g durante 10 min a 4°C. Después de retirar el sobrenadante, el pellet se suspendió y se añadió a columnas de resina para filtrar la albúmina y las inmunoglobulinas. Con este paso se logra eliminar más del 90% de proteínas contaminantes. Las columnas se centrifugaron a 1000g durante 30 segundos para obtener VE purificadas. Las VE se almacenaron a -80°C hasta su uso.

## **CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES**

Para la caracterización de VE utilizamos tres métodos distintos: la tecnología NanoSight (NanoSight Ltd, Reino Unido), la visualización por microscopía electrónica y el análisis por Western Blot.

### **NanoSight**

Esta tecnología se basa en el movimiento browniano que tienen las partículas en una suspensión líquida y en la dispersión de la luz para obtener la distribución de su tamaño. Una vez las VE están aisladas, se resuspenden en tampón fosfato salino (PBS), tras la realización de lavados con agua destilada y alcohol, se inyecta nuestra muestra. Un haz de luz láser pasa a través de la muestra, de manera que las partículas en suspensión dispersan la luz. Estos puntos de dispersión son captados por un microscopio conectado a una cámara. El Software de análisis de seguimiento de nanopartículas (NanoSight NTA 3.1) analiza la trayectoria de cada punto individual. El movimiento browniano de estas partículas en suspensión será mayor cuanto menor sea el tamaño de las partículas

y la viscosidad del medio, y mayor sea la temperatura. Así, a partir de la viscosidad y de la temperatura, el Software calcula las ecuaciones de Stokes-Einstein para obtener una distribución de las partículas en suspensión según su tamaño.

### **Microscopía electrónica**

Se utilizó microscopía electrónica de transmisión para visualizar las VE y verificar que su tamaño se encontraba entre 30 y 150 nm. Para ello, las VE se fijaron en una solución de 2.5% de glutaraldehído en tampón Cacodilato de sodio 0.1 M durante 1 hora a 4°C. La post-fijación se llevó a cabo utilizando un tetraóxido de osmio al 2% durante 1 hora a 4°C. Se cortaron secciones de 60nm de grosor y se observaron bajo microscopía electrónica de transmisión a 80kV.

### **Western Blot**

Se analizó la presencia o ausencia de proteínas características de VE (CD63, CD81 y Alix) por Western blot. Las VE se lisaron utilizando un tampón RIPA (89900, Thermo scientific) y se sometieron a la técnica de Western blot utilizando un gel de poliacrilamida de 4-10% SDS para electroforesis cargado con 20µg de proteína. Los anticuerpos utilizados fueron anti-CD63 (AB134045, Abcam), anti-CD81 (AB109201, Abcam), anti-Alix (2171, Cell Signal) y como control negativo se utilizó anti-albúmina (AB106582, Abcam)

## **CUANTIFICACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES**

Una vez aisladas las VE tras precipitación por Exo-Quick ULTRA (System Biosciences, Mountain View, CA, EE.UU.), se cuantificaron en 50 µl de suero de cada paciente utilizando el kit ELISA EXOEL-CD63A-1 (SBI System Bioscience). Este kit permite calcular la cantidad de VE en función de la presencia del marcador CD63 (marcador de VE). El protocolo se realizó siguiendo las instrucciones de fabricación.

## **COMPOSICIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES**

### **Proteómica**

Debido al alto coste de la técnica de proteómica, agrupamos las muestras en cuatro pools diferentes<sup>99</sup> (IC-cs, IC-s, IAM, VS) y analizamos el contenido proteico de VE en dichos grupos.

Tras su aislamiento en suero mediante Exo-Quick ULTRA (System Biosciences, Mountain View, CA, EE.UU.), analizamos el contenido de las VE utilizando la técnica de



Espectrometría de Masas (MS) y espectrometría de masas en tándem (MS/MS) (bioNova científica, SBI). Para la preparación de las muestras utilizamos un buffer con la siguiente composición: 2% SDS, 150mM NaCl, 50mM Tris pH8. Una vez preparadas, procesamos las muestras con una sonda sónica (Q Sonica) para lisar las VE y las calentamos durante 10 minutos a 100°C. Posteriormente determinamos la concentración de proteína mediante fluorimetría de Qubit. Procesamos 10µg de cada muestra mediante SDS-PAGE, utilizando un mini-gel 10% Bis Tris NuPage (Invitrogen) con el sistema tampón MES. Eliminamos las ventanas de migración (carril de gel de 1 cm) y procesamos las muestras por digestión con tripsina utilizando un robot ProGest (DigiLab) con el siguiente protocolo:

- Lavado con 25mM de bicarbonato de amonio seguido de acetonitrilo.
- Reducción con 10mM de ditioneitol a 60°C seguido de alquilación con 50mM de yodoacetamida a RT.
- Digestión con tripsina (Promega) a 37°C durante 4h.
- Apagado con ácido fórmico.

El sobrenadante fue analizado directamente, sin procesamiento adicional.

Para la MS, utilizamos un sistema HPLC Waters NanoAcquity con interfaz a un espectrómetro de masas ThermoFisher Q Exactive. Los péptidos se cargaron en una columna de captura y se eluyeron sobre una columna analítica de 75 µm a 350 nL/min; ambas columnas se rellenaron con resina Luna C18 (Phenomenex). Se empleó un gradiente de 2 horas. El espectrómetro de masas opera de forma dependiente de datos, con el Orbitrap trabajando a 70,000 FWHM y 17,500 FWHM para MS y MS/MS respectivamente. Seleccionamos los quince iones más abundantes para la MS/MS.

Analizamos los datos con el programa informático Scaffold 4 (Proteome Software) para su validación, filtrado y para crear una lista no redundante por muestra. Utilizamos el programa PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships) para determinar la clase de proteína. La red de interacciones se obtuvo con el software STRING (Search Tool for the Retrieval of INteracting Genes/proteins).

En colaboración con el Instituto de Investigación de Santiago de Compostela, realizamos una validación de los resultados obtenidos, en 10 pacientes por grupo, por la técnica SWATH (del inglés, Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra), mediante un sistema LC-MS/MS Triple TOF 6600 (AB SCIEX).

## **Estudio de los miRNA**

Realizamos la extracción de RNA total enriquecido en miRNAs a partir de 200 µL de suero utilizando el kit de extracción miRNeasy Serum/Plasma Advanced Kit (Ref. 217204, Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Durante el proceso de extracción añadimos UniSp2 para su posterior amplificación como control técnico del aislamiento de RNA, utilizando el kit RNA Spike-in Kit (Ref. 339390, Qiagen). La síntesis de ADN complementario se realizó a partir de 7ul de RNA utilizando el kit miRCURY LNA RT Kit (Referencia 339340, Qiagen), en un volumen final de 35ul, siguiendo las indicaciones del fabricante. Durante el proceso de retrotranscripción añadimos cel-miR-39-3p para su posterior amplificación como control técnico de la síntesis de ADN complementario, utilizando el kit RNA Spike-in Kit (Ref. 339390, Qiagen).

En un primer paso utilizamos las muestras de 16 pacientes (4 pacientes por grupo), que fueron seleccionados pareados en términos de edad y sexo. En este cribado por array analizamos 752 miRNAs utilizando los paneles de PCR miRCURY LNA miRNome I+II (YAHS-312 YG-8, Qiagen). Los datos se normalizaron utilizando la expresión media de todos los miRNAs que presentaban valores de CT  $\leq 34$  y analizamos los resultados con el software GenEx v.6.

En un segundo paso, seleccionamos un total de diez miRNA por presentar diferencias significativas entre los grupos y en base a su función biológica, para validación por qPCR. Los miRNA seleccionados fueron: miRNA-339\_5p, miRNA-29b\_3p, miRNA-15a\_5p, miRNA-424\_5p, miRNA-369\_3p, miRNA-1537\_3p, miRNA-340\_5p, miRNA-199a\_5p, miRNA-376a\_3p y miRNA-100\_5p. Realizamos una validación de los miRNA seleccionados en 80 muestras de pacientes (20 por grupo). Para el estudio de validación de expresión de miRNAs mediante PCR cuantitativa utilizamos los ensayos individuales miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay y miRCURY SYBR Green PCR Kit (Ref. 339347, Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. (Las referencias específicas de cada miRNA estudiado se muestran en la Tabla A5, apéndice). Para la normalización de los datos estudiamos la expresión de 3 miRNAs: hsa-miRNA-103a\_3p, hsa-miRNA-30c\_5p y hsa-miRNA-191\_5p en todas las muestras y posteriormente evaluamos la estabilidad de la expresión de cada miRNA mediante los softwares Normfinder y Bestkeeper, demostrando que los valores más estables se consiguieron utilizando la media de miRNA-103 y miRNA-30 con un valor de estabilidad de 0,003. Tras la normalización de los datos, realizamos análisis estadísticos de comparación de expresión de miRNAs entre los grupos biológicos.

## **ANÁLISIS DE DATOS**

El análisis de los datos se realizó bajo la supervisión y el asesoramiento de la Unidad de Bioestadística del Hospital Universitario La Paz.

La distribución normal de las variables se evaluó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov para grupos con más de 30 grados de libertad y con la prueba de Shapiro-Wilk para los grupos con menos de 30 grados de libertad. Para los datos con distribución normal utilizamos la prueba T-Student y ANOVA con posterior análisis de comparaciones múltiples entre los grupos mediante Bonferroni, previa evaluación de la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene. Para la comparación entre los grupos cuyos datos no presentaban una distribución normal, utilizamos la prueba de Kruskal-Wallis evaluando las diferencias intergrupales mediante la prueba U de Mann-Whitney. Para estudiar las diferencias entre grupos en variables cualitativas utilizamos la prueba exacta de Fisher. La relación entre variables cuantitativas fue evaluada mediante métodos de correlación, principalmente la Rho de Spearman.

Finalmente, en el análisis de las diferencias entre muestras relacionadas en distribuciones no paramétricas utilizamos la prueba de Wilcoxon. Los valores de  $p < 0,05$  fueron considerados como estadísticamente significativos.

## **EQUIPOS Y MATERIALES**

- Unidad de Ictus, Servicio de Neurología, Hospital Universitario La Paz: Donde se atiende una media de 750 pacientes con ictus al año. Esta unidad está dotada con equipos de monitorización no invasiva, bombas de infusión y ecógrafos para estudio de la circulación cerebral. Además, dispone de un equipo de neurólogos expertos en enfermedades cerebrovasculares, enfermeras especialmente entrenadas en esta patología y con experiencia en ensayos clínicos y en proyectos de investigación traslacional.
- Unidad Coronaria Servicio de Cardiología, Hospital Universitario La Paz: la Unidad de Cuidados Agudos Cardiológicos atiende unos 800 pacientes al año, de los que aproximadamente la mitad son IAM en cualquiera de sus variedades. Está dotada de los medios técnicos necesarios y es atendida por personal facultativo y de enfermería experimentados en el manejo de las urgencias cardiológicas.

- Centro de Extracciones sanguíneas, Hospital Universitario La Paz, donde se realizan al día más de 1700 análisis.

Para el estudio clínico se empleó el material habitual para extracción de muestras sanguíneas por venopunción de uso hospitalario, utilizando 3 tubos BD Vacutainer® SST gel amarillos en cada paciente.

En el caso del subgrupo de pacientes a los que, a criterio clínico, se realizó estudio de RM se utilizaron las diferentes máquinas de RM disponibles en el Hospital Universitario La Paz (Magnetom Avanto 1.5 Tesla, Siemens; Signa TM Explorer 1.5 Tesla, GE Healthcare; Panorama HFO 1 Tesla, Philips; Magnetom Skyra 3 Tesla, Siemens), asignándose en cada caso de acuerdo con la fecha de citación disponible.

### **Infraestructura propia del Laboratorio de Ciencias Neurológicas y Cerebrovascular**

- Centrífuga alta velocidad Sorvall Evolution RC
- Nanosight (NanoSight Ltd, Reino Unido)
- 2 agitadores Shaker DOS-10M
- Frigorífico de 4°C, -20°C, 2 congeladores -80°C Nuair (Nirco, Madrid, España), Eppendorf (Madrid, España) para el almacenamiento de muestras

### **Equipos y material informático**

- Programa de procesamiento de imágenes Image J2 (National Institutes of Health, Estados Unidos)
- Programa estadístico IBM-SPSS 23.0 (IBM, Estados Unidos) para realizar las bases de datos y los estudios estadísticos
- Programa informático MRICron (Chris Rorden; CA, EEUU) para analizar el volumen en RM
- Programa informático Scaffold 4 (Proteome Software, Estados Unidos), para cuantificar los datos de proteómica

- Software PANTHER (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships), para análisis de ontología genética.
- Software STRING (Search Tool for the Retrieval of INteracting Genes/proteins), para analizar la red de interacciones en las proteínas estudiadas.
- Software MirTarget (miRDB) para analizar las dianas predichas de los miRNA.
- Programa informático GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, Estados Unidos) para representar gráficamente los datos estadísticos.

**Laboratorios SBI bioNova científica**

- Estudio de proteómica por espectrometría de masas (Orbitrap).

**Instituto de investigación de Santiago de Compostela**

- Validación de los resultados de proteómica por SWATH (Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra).

**Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria**

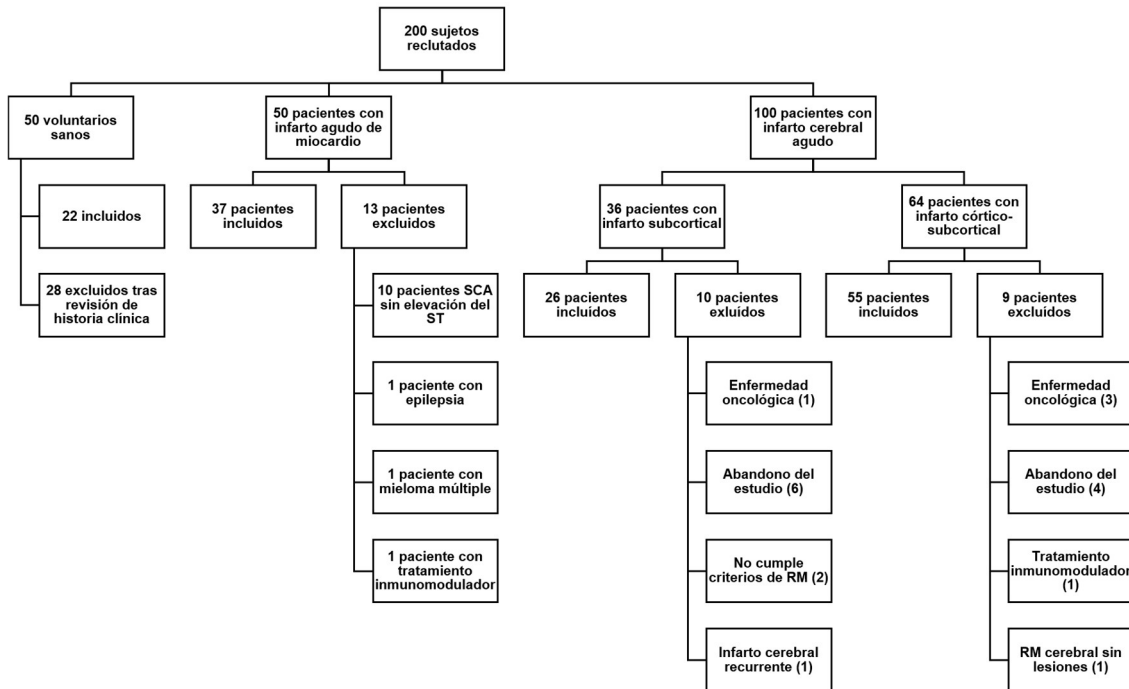
- Validación de los resultados de miRNA por qRT-PCR.

## **RESULTADOS**

## RECLUTAMIENTO DE SUJETOS Y SEGUIMIENTO EN EL ESTUDIO.

Del total de los 200 sujetos reclutados, finalmente 140 permanecieron en el estudio.

Los motivos de exclusión y las pérdidas de seguimiento se detallan en la Figura 5:



**Figura 5:** Diagrama de los sujetos reclutados en cada grupo de estudio. Se detallan los motivos de exclusión y las pérdidas de seguimiento en cada grupo.

Las características demográficas de los pacientes que completaron el estudio se muestran en la Tabla 2.

Como se puede observar, la edad media fue significativamente mayor en el grupo de IC-cs que el resto de los grupos y hubo un predominio de varones en los grupos de IAM y de IC-s. Los pacientes con infarto cerebral y aquellos con IAM presentaron con mayor frecuencia factores de riesgo vascular como hipertensión arterial y dislipidemia que los VS y los pacientes con IAM fueron con más frecuencia fumadores que el resto los de grupos. Aunque no hubo diferencias en la carga vascular previa medida por la escala de Fazekas entre pacientes con IC-cs y pacientes con IC-s, sí que se observaron con mayor frecuencia infartos silentes en estos últimos.

**Tabla 2**  
**Características de los pacientes incluidos en el estudio**

	IC-cs N=55	IC-s N=26	IAM N=37	VS N=22	<i>p</i>
Edad, media (DE)	70,65(15,39)	61,65 (11,83)	55,95 (13,95)	61(12,50)	0,0001
Sexo varón, N (%)	24 (43,6)	18 (69,2)	27 (73)	7 (30,4)	0,002
HTA, N (%)	35 (63,6)	19 (73,1)	17 (45,9)	3 (13)	0,0001
DM, N (%)	10 (18,2)	5 (19,2)	4 (10,8)	2 (8,7)	0,53
DL, N (%)	25 (45,5)	11 (42,3)	18 (48,6)	3 (13)	0,018
Fumador, N (%)	9 (16,4)	9 (34)	22 (59,5)	3 (13)	0,0001
Cardiopatía isquémica previa, N (%)	7 (12,7)	2 (7,69)	4 (10,8)	0 (0)	0,312
Índice de Charlson,	1 (2)	1 (2,25)	1(1)	0 (1)	0,004
Sólo fibrinólisis iv, N (%)	18 (32,7)	5 (19,2)	-	-	0,491
Sólo trombectomía, N (%)	3 (5,45)	0 (0)	-	-	0,564
Fibrinólisis iv + trombectomía, N (%)	13 (23,6)	0 (0)	-	-	0,008
PCI, N (%)	-	-	37 (100)	-	-
Fazekas PV score, mediana (IQR)	1(2)	1(2)	-	-	0,8
Fazekas DWM score, mediana (IQR)	1(2)	1(2)	-	-	0,759
Infartos silentes, N (%)	4 (7,27)	9 (34,6)	-	-	0,002

*IC-cs (infarto cerebral córtico-subcortical), IC-s (infarto cerebral subcortical), IAM (infarto agudo de miocardio), VS (voluntarios sanos), DE (desviación estándar), N (número), HTA (hipertensión arterial), DM (diabetes mellitus), DL (dislipidemia), iv (intravenosa), PCI (intervención coronaria percutánea), IQR (rango intercuartílico), PV (periventriculares), DWM (Deep white matter)*



**OBJETIVO 1:** Estudiar las vesículas extracelulares en el proceso isquémico, evaluando si existen diferencias en sus niveles séricos o en su contenido en proteínas y miRNA entre pacientes con isquemia (cerebral o de miocardio) y voluntarios sanos

### Cuantificación de los niveles de VE

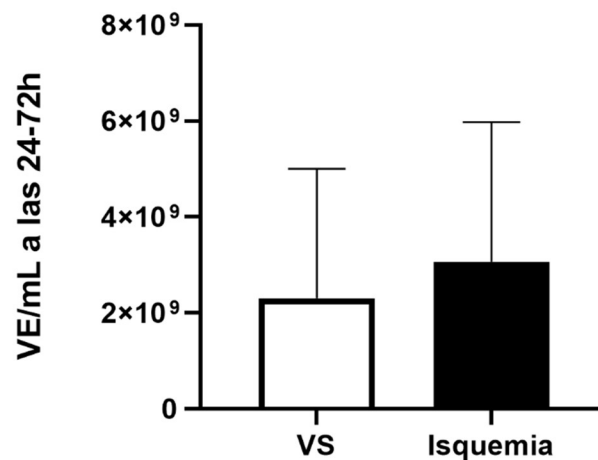
Se observaron niveles más altos de VE en el grupo de pacientes con isquemia (cerebral o de miocardio) que en VS, aunque las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas ( $p=0,051$ ) (ver Tabla 3 y Figura 6).

**Tabla 3**

*Cuantificación VE/mL a las 24-72h en voluntarios sanos y en pacientes con isquemia*

Grupo	VE/mL (media)	VE/mL (DE)
VS (n=22)	$2,30 \times 10^9$	$2,70 \times 10^9$
Pacientes con isquemia (n=118)	$3,07 \times 10^9$	$2,91 \times 10^9$

VE (vesículas extracelulares), DE (desviación estándar), VS (voluntario sano)



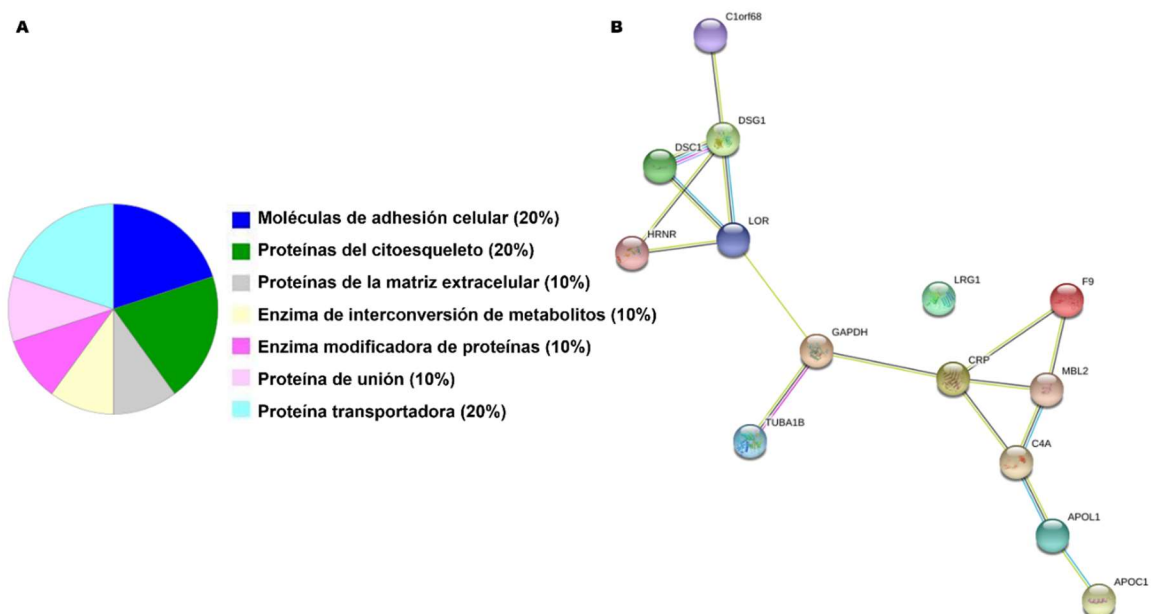
**Figura 6:** Niveles de VE en voluntarios sanos vs isquemia.  
Prueba de U de Mann-Whitney ( $p=0,051$ ).

## Estudio de proteómica

El contenido proteico de las VE se analizó en un total de 140 pacientes: 118 pacientes con isquemia (81 pacientes con infarto cerebral, 37 con IAM) y 22 VS.

Se identificaron catorce proteínas presentes en los pacientes con isquemia cerebral y de miocardio que no se hallaron en VS: apolipoproteína L1 (APOL1), apolipoproteína C1 (APOC1), proteína C reactiva, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), proteína C4a del complemento (C4A), lectina de unión a la manosa (MBL2), loricrina (LOR), cadena alfa 1b de tubulina (TUBA1B), desmogleína-1 (DSG1), desmocolina-1 (DSC1), proteína 32 piel-específica (XP32/c1orf68), hornerina (HRNR), alfa-2-glicoproteína rica en leucina (LRG1), factor IX de la coagulación (F9).

Estas proteínas pertenecían a distintas clases: moléculas de adhesión celular (DSG1, DSC1), proteínas del citoesqueleto (HRNR, TUBA1B), proteínas de la matriz extracelular (MBL2), proteínas de interconversión de metabolitos (GAPDH), enzimas modificadoras de proteínas (F9), proteínas de unión (C4A) y proteínas transportadoras (APOL1 y APOC1) (ver Figura 7A). Estas proteínas mostraron una interacción muy fuerte entre sí (ver Figura 7B).

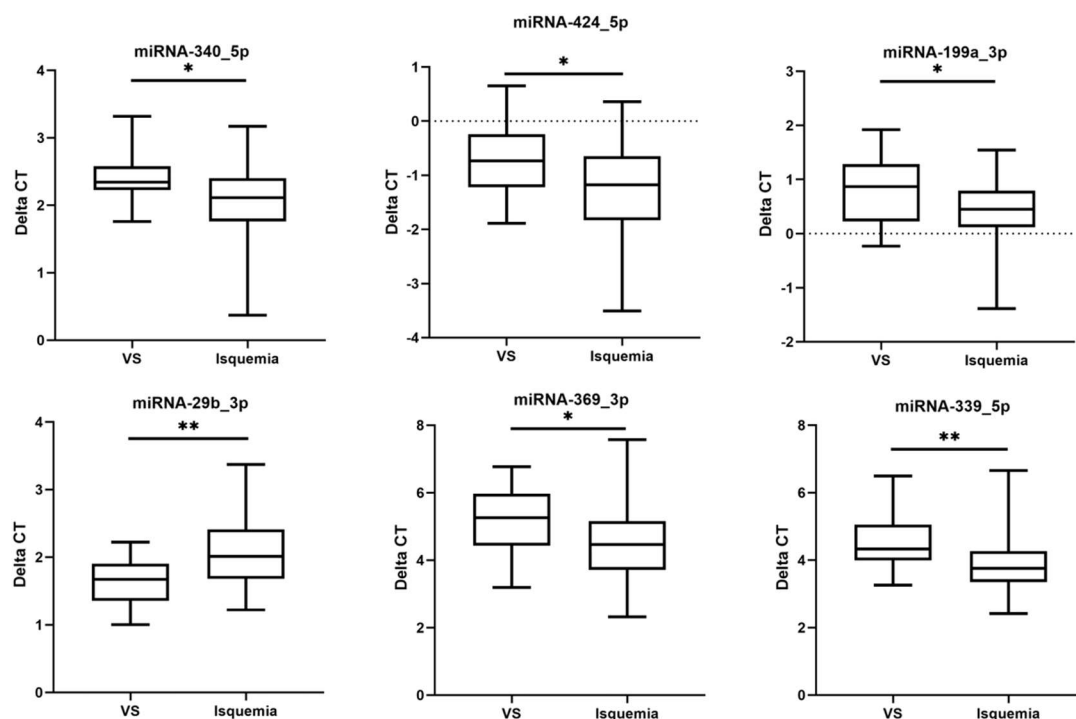


**Figura 7: Proteínas comunes del proceso isquémico**

(A: Clase de proteína, B: Red de relación e interacciones; La clase de proteína se ha obtenido con el programa PANTHER (Protein ANalysis Through Evolutionary Relationships); La red de interacciones se ha obtenido con el programa STRING).

## Expresión de MiRNA

Encontramos 6 miRNA que se expresaron de forma diferente entre pacientes con isquemia y VS: miRNA-340\_5p, miRNA-424\_5p, miRNA-199a\_3p, miRNA-29b\_3p, miRNA-369\_3p y miRNA-339\_5p. Todos ellos presentaron menor expresión en los pacientes con isquemia que en VS, salvo miRNA-29b\_3p que presentó mayor expresión en los pacientes con isquemia. (Ver Figura 8).



**Figura 8:** miRNAs con diferente expresión en isquemia y voluntarios sanos, identificados tras validación con qPCR.

Prueba de la U de Mann-Whitney \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Abreviaturas: VS, voluntarios sanos; Delta CT (Delta Ciclo umbral, del inglés Cycle Threshold).

**OBJETIVO 2: Explorar si existen diferencias en los niveles séricos o en el contenido en proteínas y miRNA de las VE dependiendo del órgano afectado por isquemia**

#### Cuantificación de los niveles de VE

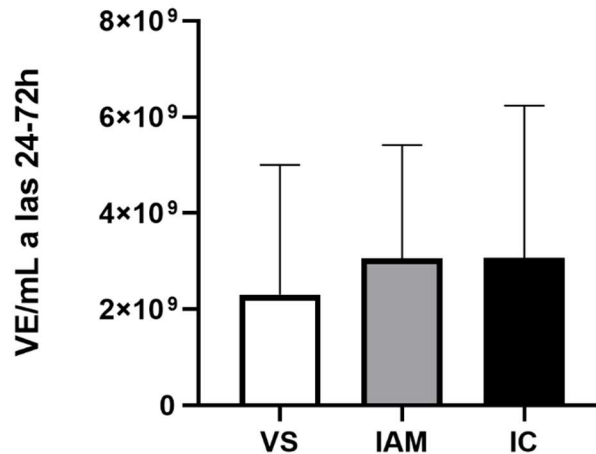
No hubo diferencias entre los niveles de VE en pacientes con infarto cerebral agudo y pacientes con IAM. (Ver Tabla 4 y Figura 9).

**Tabla 4**

*Cuantificación VE/mL a las 24-72h en sanos, infarto agudo de miocardio e infarto cerebral.*

Grupo	VE/mL (media)	VE/mL (DE)
VS (n=22)	$2,30 \times 10^9$	$2,70 \times 10^9$
IAM (n=37)	$3,05 \times 10^9$	$2,36 \times 10^9$
IC (n=81)	$3,07 \times 10^9$	$3,17 \times 10^9$

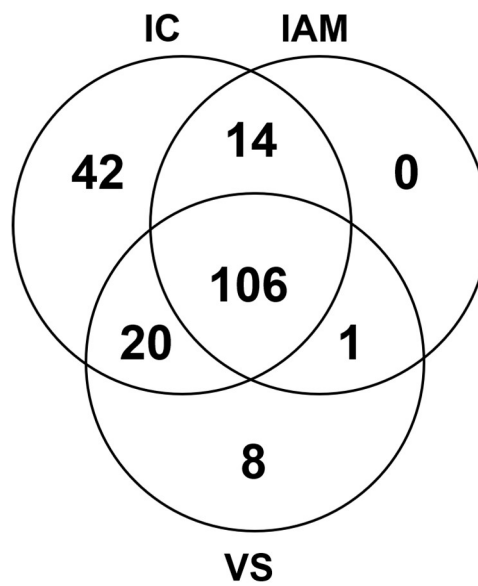
*VE (vesículas extracelulares), DE (desviación estándar), VS (voluntario sano), IAM (infarto agudo de miocardio), IC (infarto cerebral)*



**Figura 9: Niveles de VE en sanos, infarto agudo de miocardio e infarto cerebral**  
Prueba de Kruskal-Wallis ( $p=0,104$ )

**Estudio de proteómica**

En total se detectaron 191 proteínas, de las que 106 eran comunes a todos los grupos (infarto cerebral, IAM, VS). Mientras que 42 proteínas fueron encontradas sólo en el grupo de pacientes de infarto cerebral. No hubo ninguna proteína hallada sólo en el grupo de pacientes con IAM que no estuviera presente en otros grupos. Los datos están representados en la Figura 10:



**Figura 10:** Diagrama de Venn que representa las proteínas por grupos. IC (Infarto cerebral), IAM (Infarto agudo de miocardio), VS (voluntario sano).

Al estudiar las proteínas según el recuento espectral por grupos, aunque la mayoría de las proteínas más abundantes fueron comunes en todos los grupos, la proteína factor de Von Willebrand (VWF), tuvo alta expresión en pacientes con infarto cerebral y de miocardio, pero no en VS.

Otras proteínas como la proteína S100A7 y la proteína S100A9 fueron detectadas en mínima expresión (recuentos espectrales inferiores a 3) en pacientes con infarto cerebral pero no en IAM ni en VS. Por el contrario, las proteínas cadena gamma del fibrinógeno (FGG) y cadena alfa de fibrinógeno (FGA) fueron detectadas entre las proteínas de mínima expresión en VS y no en pacientes con infarto cerebral ni en pacientes con IAM. (Ver Tabla 5).

**Tabla 5:**

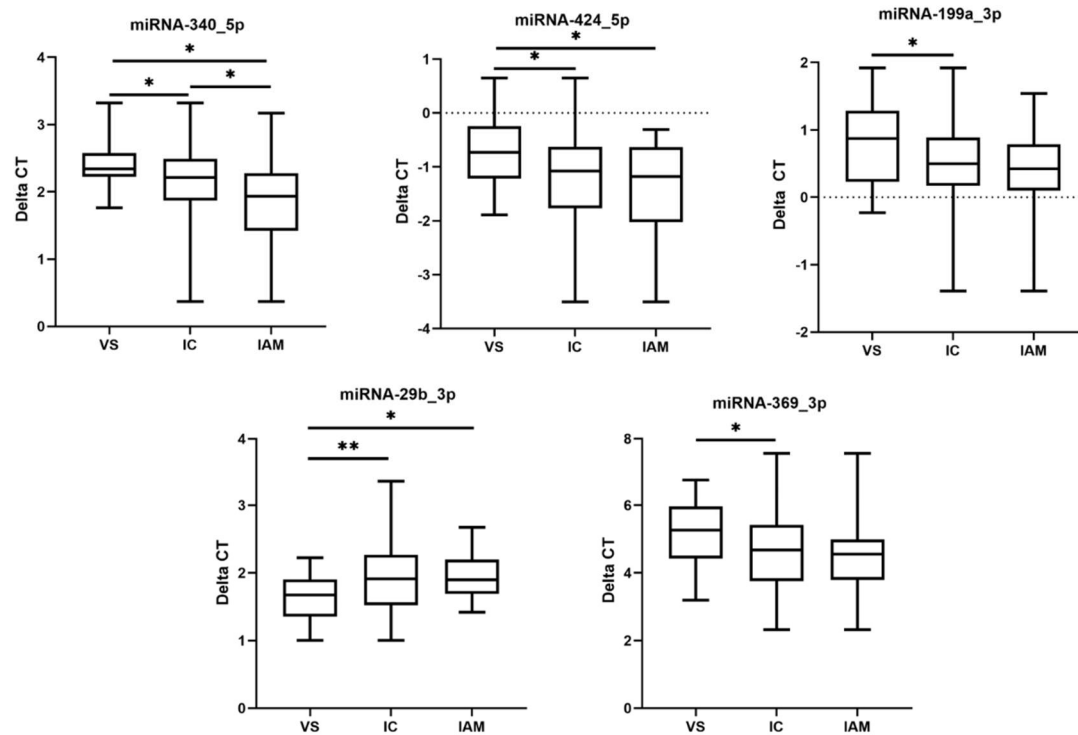
*Proteínas con máxima y mínima expresión en los distintos grupos*

VS		IC		IAM	
Más abundantes	Menos abundantes	Más abundantes	Menos abundantes	Más abundantes	Menos abundantes
APOB	ORM1	APOB	S100A9	APOB	C4BPB
C3	SLC2A	C3	S100A7	C3	IGLV1-51
A2M	DHX29	A2M	F9	A2M	IGLV3-10
IGHM	DNAH5	FN1	HPX	IGHM	GAPDH
C4BPA	SERPINA4	IGHM	SELENOP	VWF	XP32
FN1	FGA	C4BPA	MYO5B	FN1	IGLV7-43
ITIH4	FGG	VWF	DCD	KRT1	GSN

*VS (voluntario sano), IC (infarto cerebral), IAM (infarto agudo de miocardio)*

## Expresión de MiRNA

Encontramos infraexpresión de miRNA-340\_5p en pacientes con IAM en comparación a pacientes con infarto cerebral. (Ver Figura 11).



**Figura 11:** miRNAs con diferente expresión en infarto cerebral, infarto de miocardio y voluntarios sanos, identificados tras validación con qPCR.

Prueba de la U de Mann-Whitney \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . Abreviaturas: VS, voluntarios sanos; IC, infarto cerebral; IAM, infarto agudo de miocardio; Delta CT (Delta Ciclo umbral, del inglés Cycle Threshold).

**OBJETIVO 3: Analizar las posibles diferencias en los niveles séricos de las vesículas extracelulares o en su contenido en proteínas y miRNA en pacientes con infarto córtico-subcortical en comparación con el infarto cerebral de afectación estrictamente subcortical**

### Cuantificación de los niveles de VE

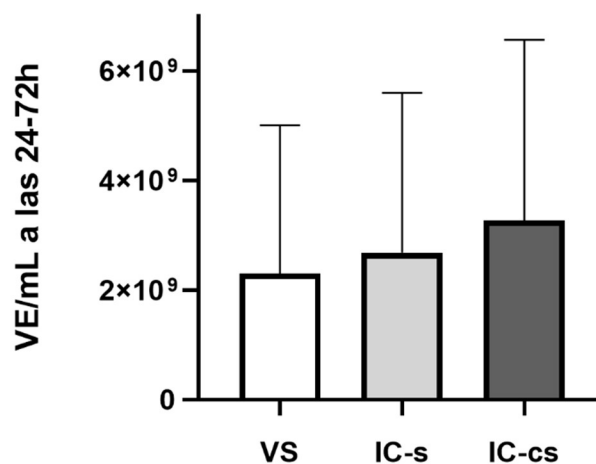
Para evaluar si existen cambios en la liberación de las VE en la isquemia cerebral en función de la topografía de la lesión cerebral, hemos comparado los niveles de VE entre VS, pacientes con IC-s y pacientes con IC-cs, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,119$ ) (ver Tabla 6 y Figura 12)

**Tabla 6**

*Cuantificación VE/mL a las 24h-72h según topografía de la lesión cerebral*

Grupo	VE/mL (media)	VE/mL (DE)
VS (n=22)	$2,30 \times 10^9$	$2,70 \times 10^9$
IC-s (n=26)	$2,67 \times 10^9$	$2,91 \times 10^9$
IC-cs (n=55)	$3,27 \times 10^9$	$3,3 \times 10^9$

VE (vesículas extracelulares), DE (desviación estándar), VS (voluntario sano), IC-s (infarto cerebral subcortical), IC-cs (infarto cerebral córtico-subcortical).



**Figura 12: Niveles de VE según topografía de la lesión cerebral.**  
Prueba de Kruskal-Wallis ( $p=0,119$ ).



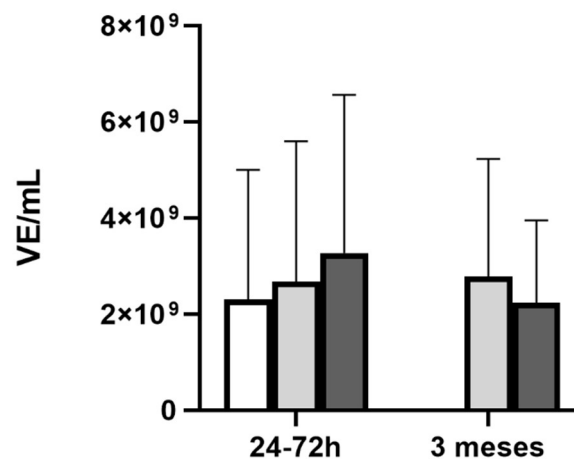
En pacientes con IC-cs se observó que los niveles de VE disminuyeron con el tiempo, pero no se observaron diferencias en los niveles de VE entre pacientes con IC-s y pacientes con IC-cs a los tres meses ( $p=0,944$ ) (ver Tabla 7 y Figura 13).

**Tabla 7**

*Cuantificación VE/mL a las 24-72h y a los 3 meses según topografía de la lesión cerebral*

Evolución	Grupo	VE/mL (media)	VE/mL (DE)
24h	IC-s	$2,67 \times 10^9$	$2,91 \times 10^9$
	IC-cs	$3,27 \times 10^9$	$3,29 \times 10^9$
3 meses	IC-s	$2,78 \times 10^9$	$2,44 \times 10^9$
	IC-cs	$2,23 \times 10^9$	$1,71 \times 10^9$

VE (vesículas extracelulares), DE (desviación estándar), IC-s (infarto cerebral subcortical), IC-cs (infarto cerebral córtico-subcortical)



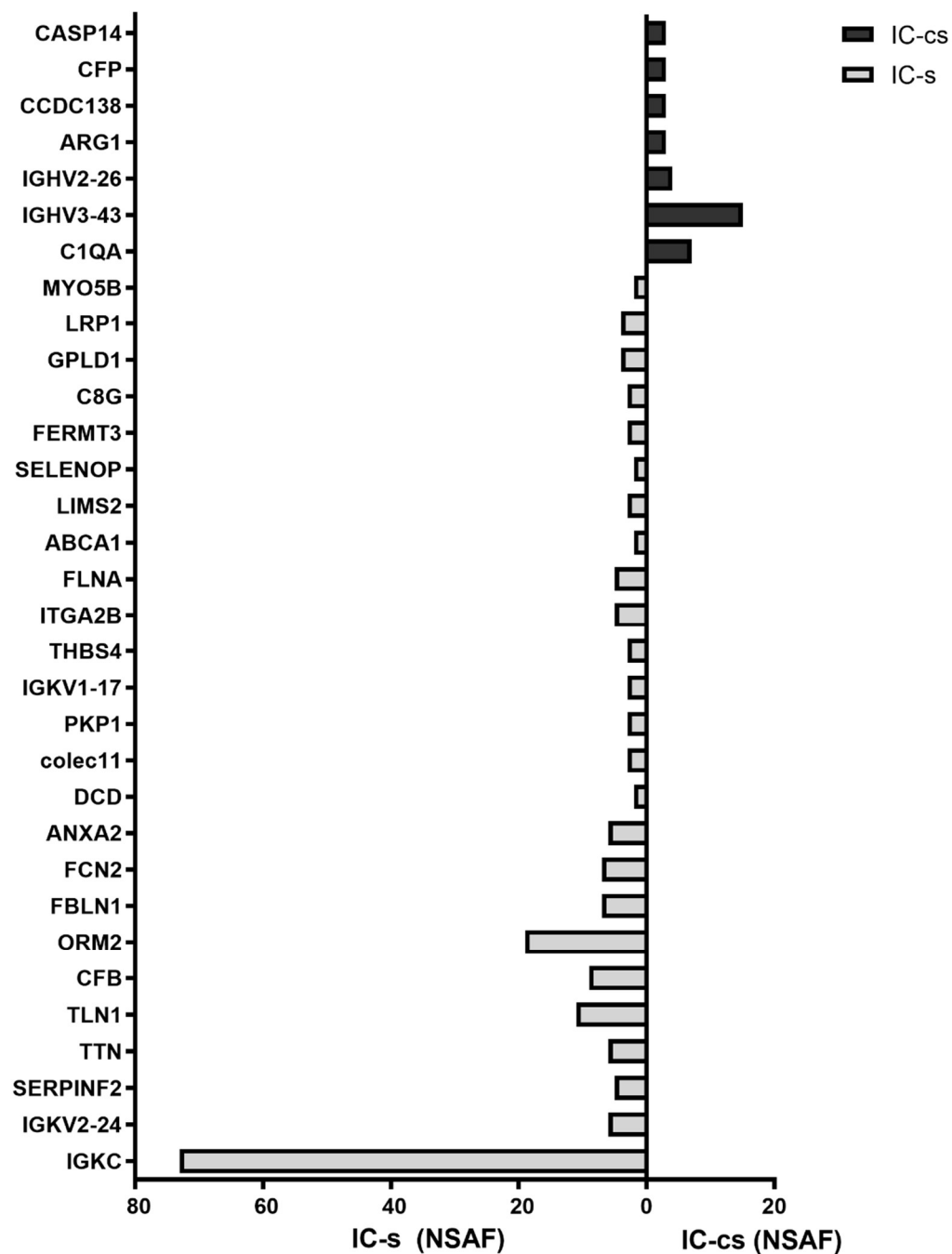
**Figura 13:** Niveles de VE, evolución temporal en pacientes.  
 Prueba de Kruskal-Wallis: 24h,  $p=0,119$ ; 3m  $p=0,944$ ;  
 Prueba de Wilcoxon: IC-s (24h vs 3m)  $p=0,833$ ; IC-cs (24h vs 3m)  $p=0,164$   
 Blanco (VS); Gris claro (IC-s), Gris oscuro (IC-cs)

## Estudio de proteómica

Para estudiar las diferencias en la proteómica de pacientes con isquemia cerebral en función de la topografía de la lesión, identificamos las proteínas que se hallaban únicamente en muestras de IC-cs e IC-s. En las siguientes gráficas se muestran las proteínas específicas por grupos y los datos de su recuento espectral (véase Figura 14).

Las proteínas halladas únicamente en el grupo de pacientes con IC-cs fueron: subunidad A del subcomponente C1q del complemento (C1QA), región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 3-43 (IGHV3-43), región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina 2-26 (IGHV2-26), arginasa-1 (ARG1), proteína 138 que contiene el dominio en espiral (CCDC138), properdina (CFP), caspasa-14 (CASP14).

Las proteínas halladas únicamente en el grupo de pacientes con IC-s fueron: cadena ligera tipo kappa de inmunoglobulina (IGKC), región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina 2-24 (IGKV2-24), alfa-2 antiplasmina (SERPINF2), titina (TTN), talina 1 (TLN1), factor de complemento B (CFB), alfa-1 glicoproteína ácida 2 (ORM2), fibulina-1 (FBLN1), ficolina-2 (FCN2), anexina A2 (ANXA2), dermicidina (DCD), colectina 11 (colec11), placofilina-1 (PKP1), región variable de cadena ligera kappa de inmunoglobulina 1-17(IGKV1-17), trombospondina-4 (THBS4), integrina alfa-IIb (ITGA2B), filamina-A (FLNA), proteína transportadora de casete unida a ATP A1 (ABCA1), proteína 2 con dominio LIM similar al antígeno de senescencia (LIMS2), selenoproteína P (SELENOP), homólogo de la familia de fermitina 3 (FERMT3), subunidad gamma del factor 8 del complemento (C8G), fosfolipasa D específica de fosfatidilinositol-glicano (GPLD1), proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LRP1) y miosina Vb (MYO5b).



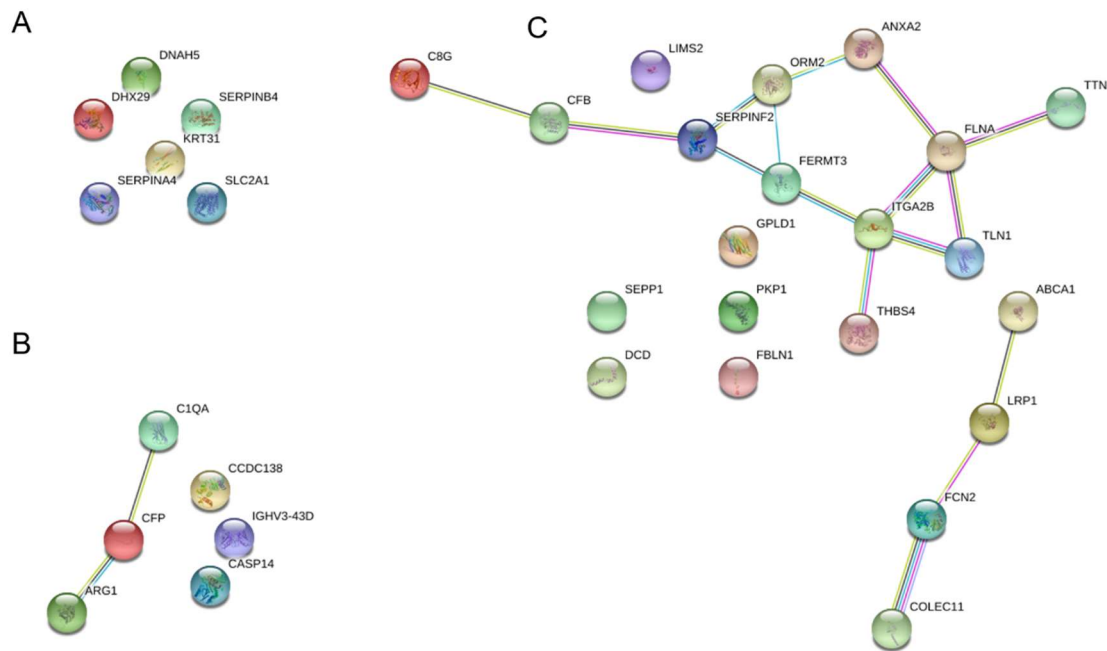
**Figura 14:** Proteínas halladas específicamente según la topografía de la lesión cerebral.

IC-s (Infarto cerebral subcortical); IC-cs (infarto cerebral córtico-subcortical); NSAF (Normalized Spectral Abundance Index).

### Red de relación de las proteínas halladas en cada grupo específico.

En cuanto a las interacciones entre las proteínas, sólo tres proteínas encontradas específicamente en el grupo de pacientes con IC-cs presentaron interacciones entre sí. Estas proteínas fueron C1QA, CFP y ARG1 (véase Figura 15B).

La mayoría de las proteínas halladas sólo en el grupo de pacientes con IC-s mostraron interacción con otras proteínas específicas de dicho grupo (véase Figura 15C).



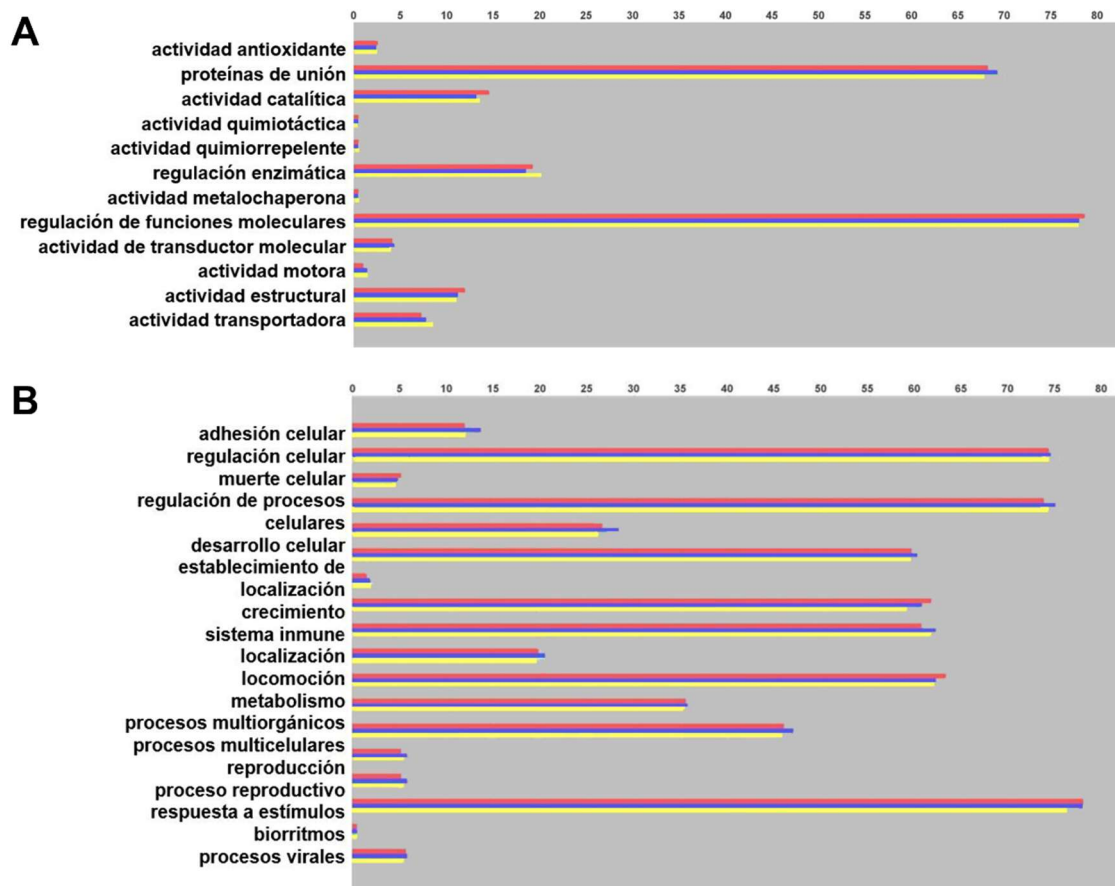
**Figura 15:** Interacciones entre las proteínas halladas en pacientes con infarto cerebral según la topografía de la lesión.

A) voluntarios sanos; B) Infarto cerebral córtico- subcortical; C) infarto cerebral subcortical  
Se ha utilizado el programa STRING

**Funciones moleculares, procesos biológicos y vías de señalización en las que participan las proteínas halladas en infarto cerebral córtico-subcortical y en el infarto cerebral subcortical**

Como se puede apreciar en la Figura 16, en los distintos grupos de infarto cerebral, las funciones moleculares en las que participaban las proteínas fueron comunes, y éstas fueron: actividad antioxidante, proteínas de unión, actividad catalítica, actividad quimiotáctica, actividad quimiorrepelente, regulación enzimática, actividad metalochaperona, regulación de funciones moleculares, actividad de transductor molecular, actividad motora, actividad estructural y actividad transportadora (véase Figura 16A).

En cuanto a los procesos biológicos, también fueron comunes en los distintos tipos de infarto cerebral y fueron los siguientes: adhesión celular, regulación biológica, muerte celular, procesos celulares, desarrollo celular, localización celular, crecimiento celular, sistema inmune, locomoción, metabolismo, procesos multiorgánicos, procesos multicelulares, reproducción celular, respuesta a estímulos, biorritmos, procesos virales (véase Figura 16B).



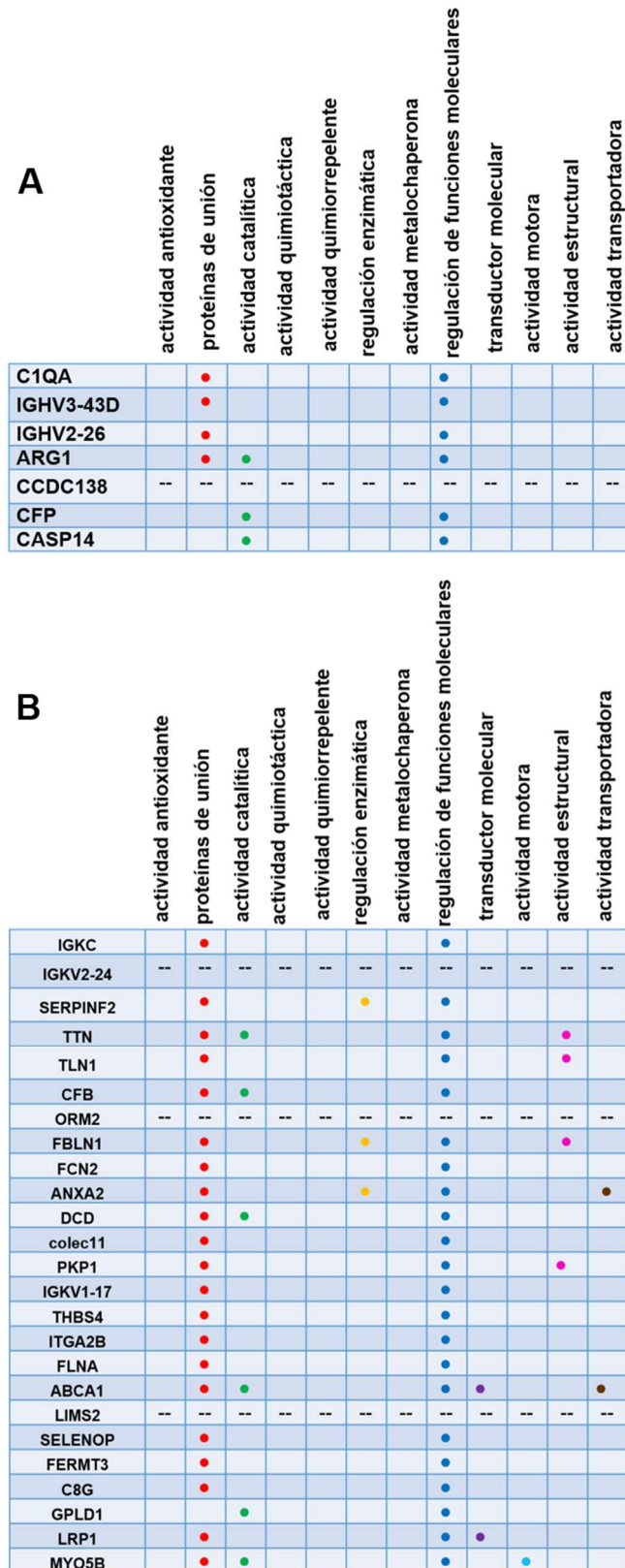
**Figura 16:** Funciones moleculares y procesos biológicos de las distintas proteínas según la topografía de la lesión cerebral.

A) Funciones moleculares; B) Procesos biológicos.

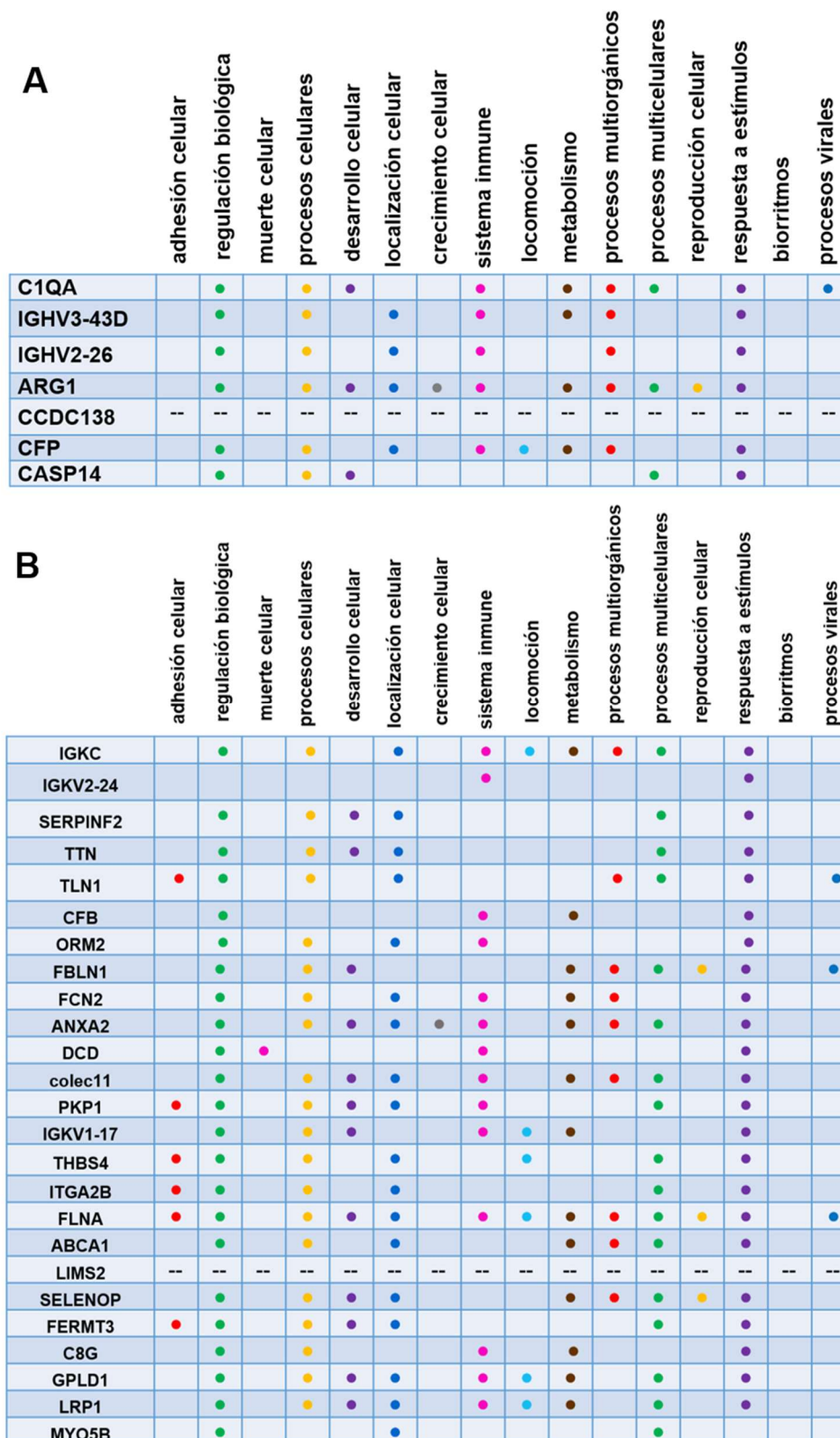
Rojo: IC-cs; Azul: IC-s; amarillo: VS.

Los números corresponden al porcentaje de las proteínas mostradas. La imagen se ha obtenido con el programa de Ontología genética Scaffold.

Las funciones moleculares y los procesos biológicos en los que participan las proteínas halladas específicamente en los pacientes con IC-s y en los pacientes con IC-cs quedan representados en las siguientes figuras (Ver Figura 17 y Figura 18):



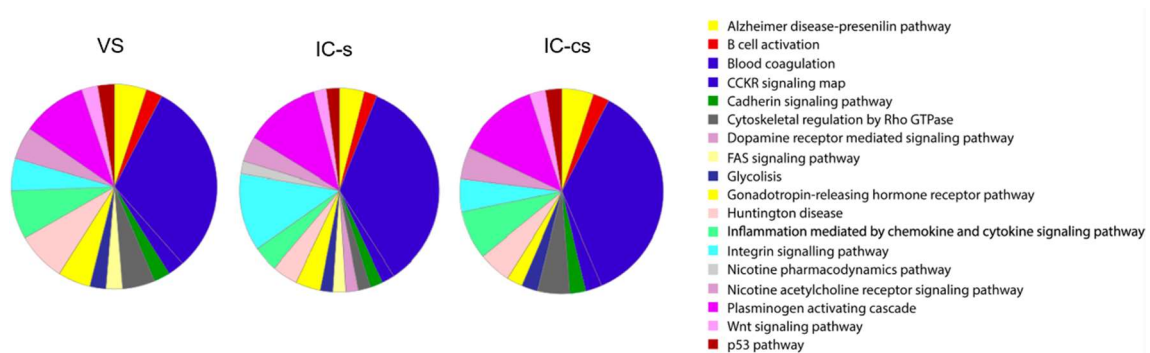
**Figura 17:** Funciones moleculares en las que participan las proteínas halladas específicamente en pacientes con IC-cs (A) y en IC-s (B). Los círculos indican la participación en la función. Las líneas horizontales, indican que no se ha descrito función asociada. Los datos se han obtenido con el programa de Ontología genética Scaffold



**Figura 18:** Procesos biológicos en los que participan las proteínas halladas específicamente en pacientes con IC-cs (A) y en IC-s (B). Los círculos indican la participación en el proceso. Las líneas horizontales, indican que no se ha descrito proceso asociado. Los datos se han obtenido con el programa de Ontología genética Scaffold



Muchas proteínas compartían vías de señalización comunes. Sin embargo, hubo algunas vías de señalización específicas que sólo se hallaron en el grupo de pacientes con IC-s, como la vía farmacodinámica de la nicotina y la vía de señalización mediada por el receptor de dopamina regulada por la proteína filamina (FLNA). Por otra parte, hubo algunas vías de señalización que no se hallaron en uno de los grupos específicamente y sí en el resto, como la vía de señalización de Fas, mediada por la proteína gelsolina, que no se halló en pacientes con IC-cs (véase Figura 19).

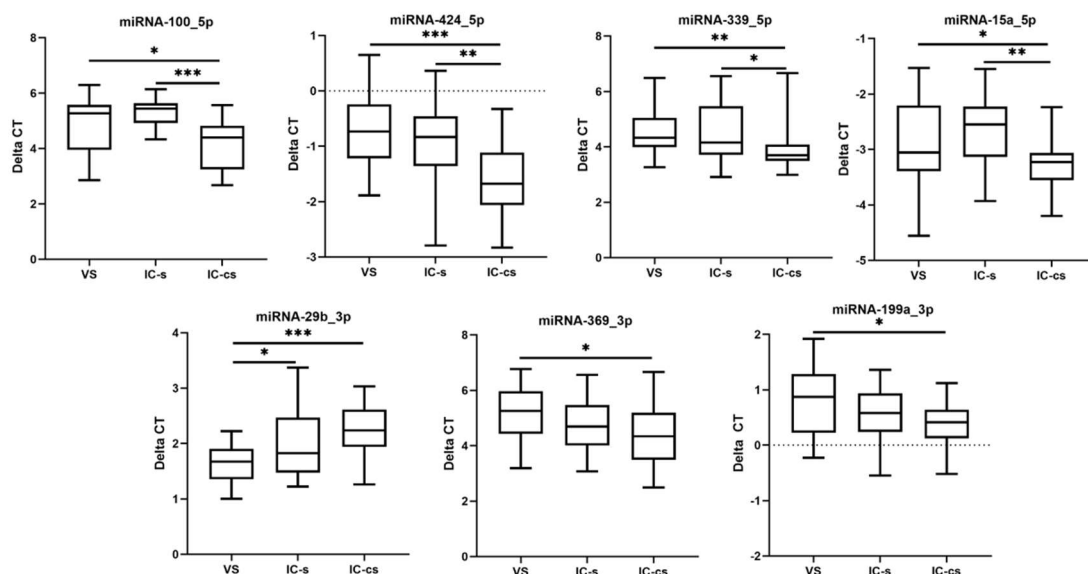


**Figura 19:** Vías de señalización según la topografía de la lesión cerebral.  
(VS: voluntarios sanos, IC-s: pacientes con infarto cerebral subcortical; IC-cs: pacientes con infarto córtico-subcortical).

Las vías de señalización de las distintas proteínas se han obtenido con el programa PANTHER (Protein ANALysis THrough Evolutionary Relationships).

## Expresión de MiRNA

En el grupo de IC-cs se observó menor expresión de los miRNA-100\_5p, miRNA-424\_5p, miRNA-339\_5p y miRNA-15a\_5p, en comparación con el grupo IC-s. (Ver Figura 20).



**Figura 20:** miRNAs con diferente expresión en infarto cerebral córtico-subcortical, infarto cerebral subcortical y voluntarios sanos, identificados tras validación con qPCR.

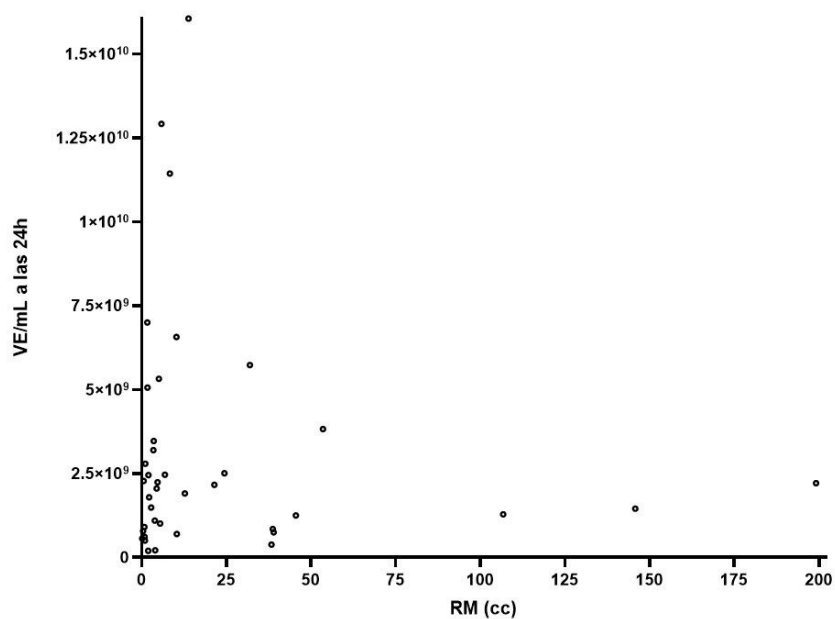
Prueba de la U de Mann-Whitney \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Abreviaturas: VS, voluntarios sanos; IC-s, infarto cerebral subcortical; IC-cs, infarto cerebral córtico-subcortical; Delta CT (Delta Ciclo umbral, del inglés Cycle Threshold).

**OBJETIVO 4: Estudiar las vesículas extracelulares en la isquemia cerebral y su relación con el volumen de lesión y la recuperación neurológica****Correlación entre los niveles de VE y el volumen de lesión**

Se realizó estudio de RM en la primera semana del ingreso en 39 pacientes, de los cuales 23 pertenecían al grupo IC-cs y 16 al IC-s

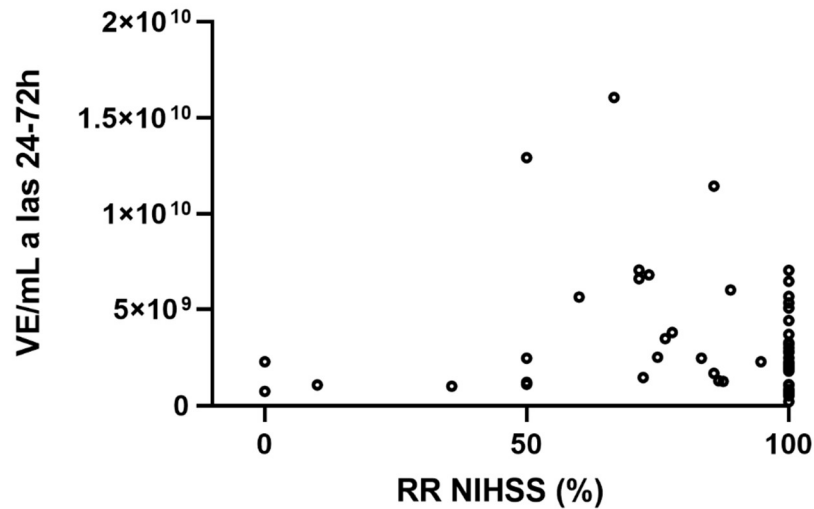
No hubo relación entre los niveles de VE y el tamaño de lesión, como se observa en la Figura 21.



**Figura 21:** Diagrama de dispersión (puntos). Relación entre niveles de VE y tamaño de lesión por Resonancia magnética en pacientes.  
*Rho de Spearman ( $p=0,406$ )*

### Correlación entre los niveles de VE y la recuperación neurológica a los 3 meses

No hubo correlación entre los niveles de VE y la recuperación neurológica medida con la reducción relativa de NIHSS (RR NIHSS) ( $p=0,1$ ), como se observa en la Figura 22.



**Figura 22:** Correlación niveles de VE y recuperación neurológica en pacientes  
Rho de Spearman ( $p=0,1$ )

Se observó que los niveles de VE a las 24-72h fueron más bajos en el grupo de pacientes que presentaron recuperación total medida por esta escala (RR NIHSS=100), aunque las diferencias no fueron significativas ( $p=0,061$ ). (Ver Tabla 9 y Figura 23).

#### Tabla 8

Niveles de VE en pacientes con recuperación total vs no recuperación total medida por RR NIHSS.

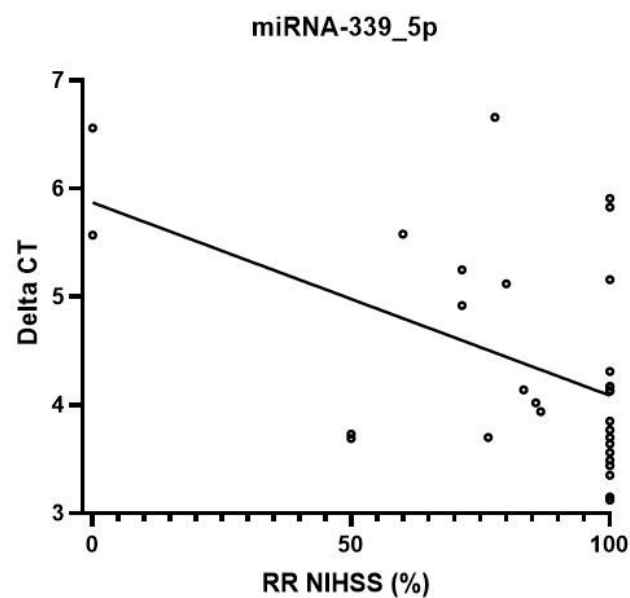
Grupo	VE/mL (media)	VE/mL (DE)
Recuperación total (RR NIHSS=100)	2,43x10 <sup>9</sup>	1,86x10 <sup>9</sup>
No recuperación total (RR NIHSS<100)	4,28x10 <sup>9</sup>	4,125 x10 <sup>9</sup>

VE (vesículas extracelulares), DE (desviación estándar), RR NIHSS (reducción relativa de NIHSS)

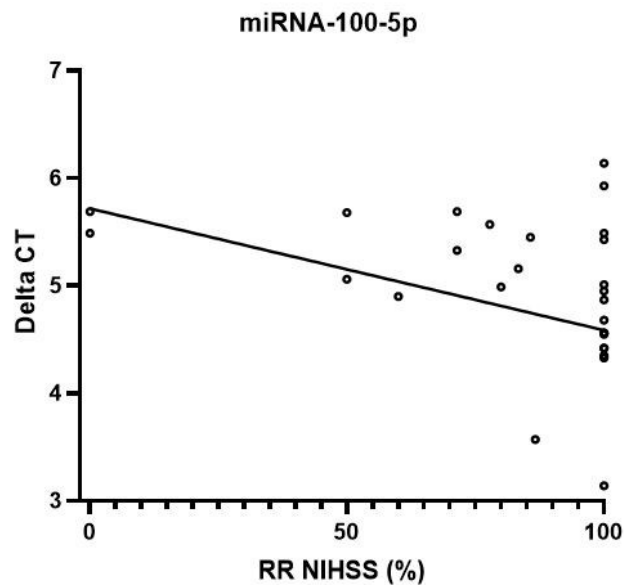


### Correlación entre contenido en miRNA de vesículas extracelulares y recuperación neurológica.

De los 10 miRNA estudiados, hubo dos que se correlacionaron con la recuperación neurológica de los pacientes, encontrándose una correlación negativa entre la expresión de miRNA-339\_5p y de miRNA-100\_5p con la RR NIHSS (ver Figura 24 y Figura 25).

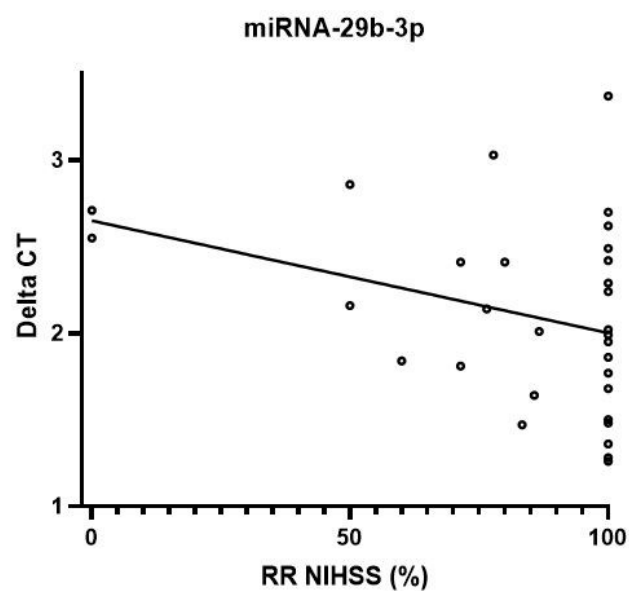


**Figura 25:** Correlación entre miRNA-339\_5p y recuperación de los pacientes  
 Rho de Spearman: Coeficiente de correlación=-0,395 ( $p=0,028$ )  
 RR NIHSS (reducción relativa en la escala de NIHSS)  
 Delta CT (Delta Ciclo umbral, del inglés Cycle Threshold)

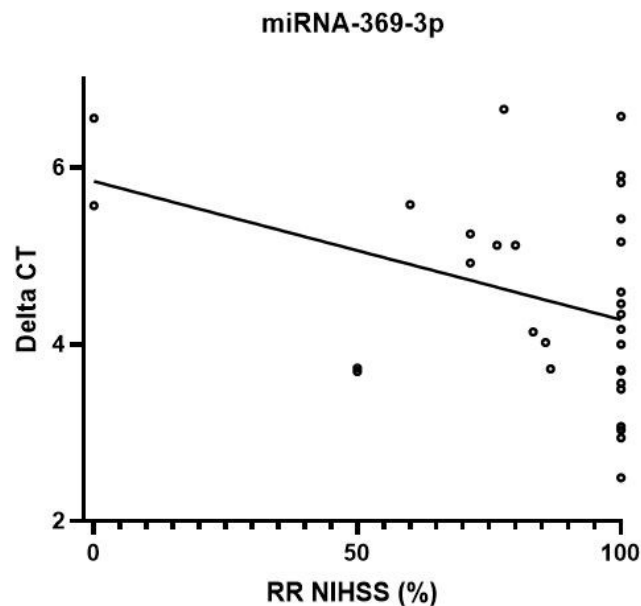


**Figura 26:** Correlación niveles miRNA-100\_5p y la recuperación de los pacientes.  
*Rho de Spearman: Coeficiente de correlación=-0,424 (p=0,017)*  
 RR NIHSS (reducción relativa en la escala de NIHSS)  
 Delta CT (Delta Ciclo umbral, del inglés Cycle Threshold)

Por otra parte, los niveles de expresión de miRNA-29b\_3p y de miRNA-369\_3p presentaron una tendencia no significativa a correlacionarse negativamente con la recuperación neurológica como se muestra en las siguientes figuras (Figura 27 y Figura 28).



**Figura 27:** Correlación niveles miRNA-29b\_3p y la recuperación de los pacientes.  
*Rho de Spearman: Coeficiente de correlación=-0,297 (p=0,1)*  
 RR NIHSS (reducción relativa en la escala de NIHSS)  
 Delta CT (Delta Ciclo umbral, del inglés Cycle Threshold)



**Figura 28:** Correlación niveles miRNA-369\_3p y la recuperación de los pacientes.  
*Rho de Spearman: Coeficiente de correlación=-0,334 (p=0,066)*  
*RR NIHSS (reducción relativa en la escala de NIHSS)*  
*Delta CT (Delta Ciclo umbral, del inglés Cycle Threshold)*

No se encontró correlación entre la expresión de los otros miRNA estudiados (miRNA-15a\_5p, miRNA-424\_5p, miRNA-1537\_3p, miRNA-340\_5p, miRNA-199a\_5p, miRNA-376a\_3p) y la recuperación neurológica de los pacientes.

Una vez estudiada la correlación entre la expresión de miRNA y la recuperación funcional medida por la reducción relativa en la escala de NIHSS, analizamos si existía algún miRNA que se relacionara con buena recuperación (RR NIHSS>50%).

De los diez miRNA estudiados, hubo dos (miRNA 100-5p y miRNA 29b-3p) que se asociaron a buena recuperación (RR NIHSS>50%) (véase Tabla 10).

**Tabla 9**

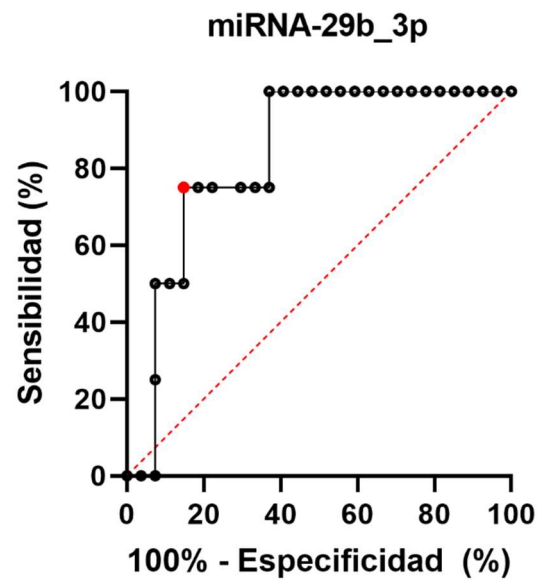
*Relación entre miRNA y buena recuperación funcional (RR NIHSS>50%)*

miRNA	15a-5p	376a-3p	424-5p	339-5p	29b-3p	369-3p	340-5p	199a-3p	100-5p	1537
U de Mann-Whitney	29	53	46	43	18	46	32	44,5	19	50
<i>p</i>	0,15	0,98	0,67	0,55	<b>0,03</b>	0,67	0,21	0,59	<b>0,04</b>	0,84

Por último, una vez estudiados los miRNA que se asociaban a buena recuperación (miRNA-100\_5p y miRNA-29b\_3p), estudiamos si existía un punto de corte en la expresión de dichos miRNA que permitiese predecir la buena recuperación neurológica.

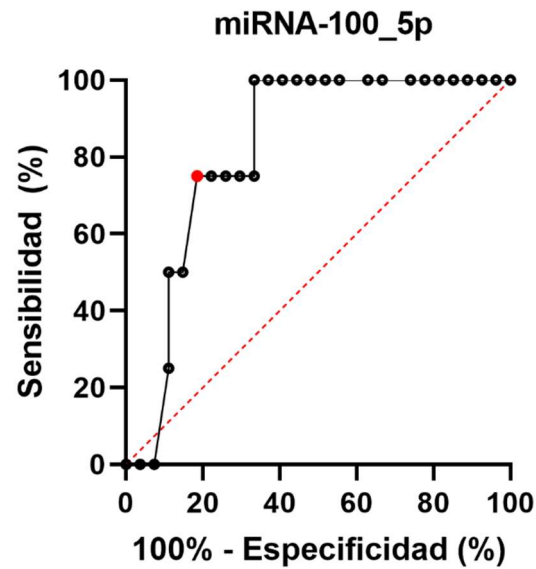


Los niveles de expresión de miRNA-29b\_3p por debajo del punto de corte de 2,52 Delta CT predicen buena recuperación (RR NIHSS >50%) a los tres meses (AUC 0,833, sensibilidad 75%, especificidad 85,2%,  $p=0,034$ ) (véase Figura 29).



**Figura 29:** Curva ROC. Niveles de miRNA-29b\_3p y buena recuperación.  
 Punto de corte: 2,52 Delta CT (área bajo la curva 0,833, sensibilidad 75%, especificidad 85,2%)  
 IC 95% (0,669 a 0,997)

Los niveles de expresión de miRNA-100\_5p por debajo de un punto de corte de 5,47 Delta CT predicen también buena recuperación (RR NIHSS >50%) a los tres meses (AUC= 0,824, sensibilidad 75%, especificidad 81,5%,  $p=0,039$ ) (véase Figura 30).



**Figura 30:** Curva ROC. Niveles de miRNA-100\_5p y buena recuperación.  
Punto de corte: 5,47 Delta CT (área bajo la curva 0,824, sensibilidad 75%, especificidad 81,5%)  
IC 95% (0,67 a 0,98)

## **DISCUSIÓN**

El ictus es una de las principales causas de discapacidad y mortalidad a nivel mundial. Actualmente sólo disponemos de estrategias de prevención y de tratamientos de reperusión en fase aguda, con una ventana terapéutica limitada. Sin embargo, no existe ningún tratamiento efectivo basado en reparar el daño cerebral tras el ictus. Debido tanto a la alta incidencia como a las grandes consecuencias sociosanitarias que suponen las enfermedades cerebrovasculares, son muy necesarias las estrategias encaminadas a reparar el daño celular y favorecer la recuperación funcional tras el ictus.

En este sentido, resulta fundamental conocer los mecanismos de daño y de reparación que subyacen a la isquemia cerebral. Unos mecanismos que son complejos, dada la enorme riqueza anatómica del cerebro, donde coexisten distintas poblaciones celulares en continua comunicación que responden de forma diferente al daño isquémico.

Es por ello, que surge la necesidad de la búsqueda de biomarcadores que arrojen información de los procesos que ocurren en la isquemia cerebral y puedan tener utilidad clínica a la hora de predecir el grado de recuperación neurológica de los pacientes.

El descubrimiento de las VE ha abierto un nuevo campo de investigación, ya que suponen una nueva vía de comunicación intercelular. Gracias a su pequeño tamaño son capaces de atravesar la BHE y ser detectadas en sangre periférica. Su contenido puede aportar una información muy útil de los procesos que están ocurriendo a nivel cerebral sin necesidad de realizar técnicas invasivas.

En el presente trabajo hemos estudiado el papel de las VE, de sus niveles en suero y su contenido, como potenciales biomarcadores de daño, de reparación cerebral y de recuperación en pacientes con infarto cerebral agudo. Nuestros principales hallazgos han sido que: (1) en el proceso isquémico existe una liberación de VE con un contenido en proteínas y miRNA diferente al hallado en controles sanos; (2) aunque el aumento en los niveles de VE durante la isquemia no es específico del infarto cerebral, puesto que también ocurre en el IAM, su contenido en miRNA y proteínas sí es diferente; (3) la elevación de niveles de VE durante la isquemia cerebral no permite diferenciar la topografía de la lesión cerebral, pero su contenido en proteínas y miRNA es diferente en el daño córtico-subcortical y en el daño estrictamente subcortical; y (4) los niveles de VE en la isquemia cerebral no se correlacionan con el volumen de lesión ni con la recuperación neurológica, pero sí su contenido en miRNA pudiendo ayudar a predecir recuperación a los tres meses.

Para poder discernir si durante la isquemia se produce una liberación de VE, nuestro primer paso fue cuantificar sus niveles en pacientes con isquemia (cerebral o de miocardio) en comparación con voluntarios sanos, y observamos niveles más altos de

VE en el grupo de pacientes con isquemia. Estos resultados confirman los hallazgos de estudios previos que han encontrado niveles elevados de VE tras infarto agudo de miocardio y tras infarto cerebral agudo<sup>78,100,101</sup>.

La siguiente cuestión fue preguntarnos si había diferencias en la composición de las VE de pacientes con isquemia y voluntarios sanos, para ello estudiamos su contenido en proteínas y miRNA.

En cuanto a los análisis de proteómica en los pacientes con isquemia, se encontraron 14 proteínas comunes al proceso isquémico. Todas estas proteínas tuvieron una interacción muy fuerte entre sí. De estas 14 proteínas, el análisis de ontología genética de nuestro estudio identificó a la proteína GAPDH como mediadora de la vía de señalización de glicólisis, que fue identificada exclusivamente en los grupos de isquemia (y no en sanos), por lo que podría convertirse en una diana terapéutica en isquemia. En este sentido, algunos estudios sugieren que la GAPDH juega un papel clave en la excitotoxicidad neuronal inducida por el glutamato y en la muerte celular post-isquemia y su bloqueo mediante un péptido de interferencia protege de la muerte celular en modelo animal de infarto cerebral en rata<sup>102</sup>. Otras proteínas identificadas en pacientes con isquemia y no en sanos fueron las apolipoproteínas APOL1 y APOC1, implicadas en el metabolismo de los lípidos y en la formación de la mayoría de los ésteres de colesterol. Los trastornos en la síntesis de colesterol predisponen a los pacientes a desarrollar aterosclerosis<sup>103-105</sup>, que es la etiología más frecuente de IAM y está implicada en hasta el 25% de los casos de ictus isquémico<sup>106,107</sup>. En este trabajo, hemos hallado por primera vez a las proteínas APOL1 y APOC1 encapsuladas en las VE que se liberan en isquemia aguda cerebral y miocárdica. Encontrar proteínas relacionadas con factores de riesgo clave como la aterosclerosis, no sólo aporta información sobre posibles biomarcadores en isquemia aguda, sino que podría tener implicaciones en tratamiento preventivo de los pacientes. Siguiendo con las proteínas halladas exclusivamente en pacientes con isquemia aguda, identificamos a la proteína C reactiva y C4. La proteína C reactiva es una proteína perteneciente a los “reactantes de fase aguda” que se aumenta en respuesta a procesos inflamatorios. Sus niveles han sido relacionados con un mayor riesgo vascular<sup>108</sup>. Pero no sólo es un marcador inflamatorio aislado, sino que está involucrada en la activación de otras vías inflamatorias como el sistema del complemento<sup>109</sup>. Niveles elevados de proteína C reactiva se han relacionado con peor pronóstico en pacientes con infarto cerebral<sup>110</sup>. La proteína C4 es un factor clave en el sistema del complemento. Diversos artículos han estudiado el papel del sistema del complemento en el daño isquémico cerebral<sup>111</sup>. Los niveles de C4 se han relacionado como factor de riesgo independiente de recurrencia de eventos

vasculares<sup>112,113</sup>. En nuestro trabajo hemos identificado estas proteínas claves en procesos inflamatorios encapsuladas en VE liberadas en isquemia aguda, lo que sugiere que ambas participan en la inflamación que se activa tras isquemia cerebral y miocárdica.

Estos resultados muestran que, en condiciones de isquemia, existe un perfil proteínas vehiculizadas en VE distinto al encontrado en voluntarios sanos, y que se relaciona con el sistema inmune y la inflamación (proteína C reactiva, proteína C4 del complemento), con la aterosclerosis (apolipoproteína L1, apolipoproteína C1) y con el daño celular postisquemia (GAPDH).

En cuanto al estudio de miRNA, observamos 5 miRNA que se infraexpresaron en pacientes con isquemia con respecto a sanos (miRNA-340\_5p, miRNA-424\_5p, miRNA-199a\_3p, miRNA-369\_3p y miRNA-339\_5p) y un miRNA (miRNA-29b\_3p) que se encontró sobreexpresado en isquemia frente a sanos. Todos ellos participan en mecanismos de protección y reparación como discutiremos más adelante.

El segundo objetivo que nos planteamos fue estudiar las VE en la isquemia en función del órgano afectado. Para ello comparamos los niveles de VE en pacientes con infarto cerebral, pacientes con IAM y VS. Aunque se observaron niveles más altos de VE en pacientes con infarto cerebral y pacientes con IAM en comparación a VS, las diferencias no fueron estadísticamente significativas, por lo tanto, los niveles de VE no permiten distinguir entre isquemia cerebral e isquemia miocárdica.

El siguiente paso fue preguntarnos si el contenido de las VE era diferente en isquemia cerebral y miocárdica para poder identificar si existían moléculas con liberación específica en la isquemia cerebral no presentes en otros procesos isquémicos.

En cuanto a los estudios de proteómica, cabe destacar que no se identificó ninguna proteína hallada únicamente en pacientes con IAM y sí encontramos, hasta 42 proteínas halladas únicamente en pacientes con infarto cerebral. Esto sugiere que, aunque existan proteínas comunes al proceso isquémico, existen diferencias en los mecanismos que subyacen a la isquemia cerebral y a la isquemia miocárdica.

Con respecto al contenido en miRNA en pacientes con isquemia cerebral e isquemia miocárdica, encontramos una mayor expresión de miRNA-29b\_3p y una menor expresión de miRNA-424\_5p y miRNA-340\_5p en los pacientes con infarto cerebral e IAM en comparación con los VS. Estos resultados podrían mostrar que las VE circulantes participan en procesos comunes en respuesta a la isquemia tanto a nivel cerebral como miocárdico. Pero, además, al comparar el contenido de VE en infarto

cerebral e IAM, también identificamos diferencias en la expresión de miRNA-340\_5p entre isquemia cerebral y miocárdica, lo que sugiere que, aunque se compartan mecanismos comunes, existen diferencias en la respuesta de cada órgano a la isquemia.

Encontramos mayor expresión de miRNA-29b\_3p en las VE de los pacientes con infarto cerebral e IAM que en VS. Otros estudios han demostrado que la sobreexpresión de miRNA-29b\_3p induce protección mediante la regulación negativa de la apoptosis asociada a p53<sup>114</sup>, lo que podría indicar que miRNA-29b\_3p está implicado en la protección frente a la apoptosis inducida por la isquemia tanto en el tejido cerebral como miocárdico. Este hallazgo hace que el miRNA-29b\_3p derivado de las VE pueda ser una diana terapéutica interesante para disminuir el daño celular tras isquemia.

Por otra parte, hemos encontrado niveles más bajos de miRNA-424\_5p en pacientes con infarto cerebral y en pacientes con IAM en comparación con VS. La regulación de miRNA-424\_5p se ha visto relacionada con la inducción de la angiogénesis<sup>115</sup>. Esto podría indicar que, en pacientes con isquemia cerebral y miocárdica se activan mecanismos comunes, disminuyendo la expresión de miRNA-424\_5p, lo cual regularía al alza los genes diana implicados en la angiogénesis, favoreciendo la perfusión del tejido isquémico.

Pero más importante es el hecho de que exista una mayor expresión de miRNA-340\_5p en los pacientes con infarto cerebral que en los pacientes con IAM. Algunos estudios han mostrado que miRNA-340\_5p podría inhibir la apoptosis y el estrés oxidativo tras daño por isquemia-reperfusión<sup>116-118</sup>, por lo que el estudio de su expresión, podría servir tanto como biomarcador en pacientes que han sido sometidos a un tratamiento de reperfusión en fase aguda, como posible diana terapéutica para disminuir el daño por isquemia-reperfusión.

Futuros estudios deberían analizar si la administración de VE enriquecidas con miRNA-424\_5p y miRNA-340\_5p podría mejorar la protección y los mecanismos de reparación tras isquemia cerebral e isquemia miocárdica, descubriendo así nuevas dianas para el tratamiento de ambos eventos isquémicos.

El tercer objetivo que nos propusimos fue estudiar si los niveles o el contenido de las VE liberadas en suero de pacientes con infarto cerebral agudo era diferente en función de la topografía de la lesión cerebral (cortico-subcortical o exclusivamente subcortical).

Para ello, en primer lugar, comparamos los niveles de VE en pacientes con IC-cs, IC-s y VS. Observamos un gradiente de VE entre VS (niveles más bajos), pacientes con IC-

s (niveles intermedios) y pacientes con IC-cs (niveles más altos), aunque no hubo diferencias estadísticamente significativas. Además, observamos que los niveles de VE en suero descendieron a los 3 meses. Hasta el momento existe cierta controversia en cuanto a los niveles de VE tras un ictus<sup>78,90,100</sup>. Las diferencias en los resultados entre los distintos estudios podrían explicarse por las características basales de los pacientes y por la variación en el tiempo de recogida de las muestras (con una media de 16,5 h<sup>78</sup>, de <48 h<sup>90</sup> y de <24 h<sup>100</sup>). Estudios previos han seleccionado pacientes con NIHSS>5<sup>100</sup> o que presentaron volúmenes de infarto mayores en RM<sup>78</sup>, mientras que en nuestro trabajo no hubo límite inferior de NIHSS para incluir a los pacientes. Dado que los cambios en los niveles de VE están condicionados por múltiples variables individuales, la falta de diferencias estadísticamente significativas podría también explicarse por el pequeño tamaño muestral. No obstante, puesto que existen múltiples factores que pueden condicionar un cambio en los niveles de VE, consideramos que analizar el perfil de expresión del contenido de las VE, podría arrojar más información acerca de los cambios que ocurren a nivel cerebral en los pacientes con ictus.

A la hora de estudiar el contenido de las VE en los pacientes con ictus, la hipótesis de la que partimos fue que, en la isquemia cerebral, dada la complejidad anatómica y la diversidad celular, podríamos encontrar un perfil de expresión de miRNA y proteínas diferente en el IC-cs (con afectación neuronal cortical) y el IC-s (con afectación predominantemente glial).

Aunque la mayoría de los estudios se ha centrado en investigar la cascada isquémica cortical neuronal, el patrón de daño es muy distinto cuando la lesión es subcortical con afectación predominantemente glial. En el IC-s el daño afecta principalmente a oligodendrocitos, astrocitos, células progenitoras de oligodendrocitos y axones. Por lo tanto, las proteínas y miRNA vehiculizados en VE, serían también diferentes, lo que podría arrojar información sobre los distintos mecanismos de daño y de reparación que subyacen a la lesión cerebral según su topografía.

El análisis del contenido proteico de las VE de pacientes con IC-s identificó 25 proteínas que no estaban presentes en el IC-cs, la mayoría relacionadas con el sistema inmunológico. Estas proteínas parecen construir una red molecular con fuertes interacciones entre sí que se activaría tras daño isquémico. Esta hipótesis vendría apoyada por otro estudio que muestra una liberación de VE que contienen proteínas pro-inflamatorias en pacientes con ictus agudo<sup>100</sup>.

Otras proteínas identificadas en las VE de pacientes con IC-s fueron ANXA-2, TLN-1, FLNA, ITGA2B y LRP1. ANXA-2 pertenece a la superfamilia de proteínas de unión a



calcio y fosfolípidos que tienen diversas funciones biológicas que incluyen la transducción de señales de la inflamación. Estudios previos de proteómica han mostrado aumento de la expresión de ANXA-2 en modelos *in vitro* de isquemia cerebral<sup>119</sup>. ANXA-2 es una proteína de la superficie celular que forma un receptor heterotetramérico tanto para el plasminógeno, el precursor inactivo de la plasmina, como para su activador, el tPA. Al ensamblar el tPA, ANXA-2 y el plasminógeno, este complejo (ANXA-2-plasminógeno-tPA), aumenta la eficiencia catalítica del tPA, permitiéndole convertir el plasminógeno en plasmina de manera más eficiente. En modelos animales de infarto cerebral en ratas, la administración de ANXA-2 junto a rTPA reduce el volumen de infarto cerebral, disminuye la respuesta inflamatoria mediada por astrocitos y microglía ejerciendo un efecto protector al preservar la integridad de la BHE<sup>120</sup>.

TLN-1, FLNA e ITGA2B ya habían sido descritas en microvesículas de pacientes con IC-s<sup>80</sup>. Estas tres proteínas participan en la vía de señalización de la integrina.

La ITGA2B es una glicoproteína de la membrana plaquetaria y un receptor para diversos ligandos, como la fibronectina, el fibrinógeno, el plasminógeno, la protrombina y la trombospondina. La activación de ITGA2B interviene en la agregación plaquetaria durante la hemostasia y la trombosis. Se ha demostrado que TLN1 puede activar de forma independiente la integrina b al unirse a su cola citoplasmática. FLNA puede competir con TLN1 por la unión a las integrinas, regulando así su activación. La vía de la integrina es diana de los fármacos que utilizamos en la prevención secundaria de ictus, como la aspirina (que actúa bloqueando esta vía)<sup>80</sup>.

En nuestro trabajo, hemos encontrado estas proteínas contenidas en VE de pacientes con IC-s, por lo que podrían servir como biomarcadores de daño subcortical y sus niveles podrían monitorizarse para valorar respuesta a tratamiento preventivo. Pero, además, el análisis de ontología genética de nuestro estudio confirma que tanto TLN-1 como FLNA, están potencialmente asociadas con los sistemas funcionales del cerebro como la vía dopaminérgica y las vías de la nicotina en el caudado y el putamen y con la neurogénesis, participando así en los mecanismos de reparación cerebral a nivel subcortical.

LRP1 está altamente expresado en neuronas y células gliales y su activación se ha relacionado con protección cerebral, disminuyendo el daño de sustancia blanca al regular la activación de la microglía<sup>121</sup> y protegiendo frente a la apoptosis neuronal en condiciones de isquemia<sup>122</sup>, por lo que podría ser una posible candidata como diana terapéutica en pacientes con ictus.

Por otra parte, en las VE de pacientes con IC-cs, se identificaron 7 proteínas no presentes en IC-s. Entre ellas, C1qa inicia la vía clásica del complemento y contribuye a la eliminación de agentes infecciosos, células apoptóticas y complejos inmunes<sup>123</sup>. C1qa puede ser sintetizado en el cerebro en respuesta a distintos tipos de lesiones como infecciones virales<sup>124</sup> o tras daño isquémico<sup>125</sup>. En condiciones normales, existe expresión de C1qa en el neuropilo, la microglía y un subconjunto de interneuronas<sup>126</sup>. En algunos estudios, se ha observado que, en la isquemia cerebral, las neuronas sobreexpresan C1qa, lo que puede favorecer la eliminación de las neuronas dañadas y los desechos celulares<sup>127</sup>.

Otros estudios han implicado a C1qa como modulador de la expresión de los genes que participan en el crecimiento neurítico y en la supervivencia neuronal<sup>128</sup> así como en la migración y diferenciación de neuronas y glía<sup>129</sup> y en la formación de nuevos vasos<sup>130</sup>.

En nuestro estudio, encontramos C1qa en VE derivadas de SNC en pacientes con infarto córtico-subcortical. Este hallazgo, refuerza la hipótesis de que la liberación de C1qa ocurre en respuesta a daño neuronal isquémico, pudiendo ser un biomarcador de utilidad en isquemia cerebral aguda y una futura vía terapéutica, encaminada a favorecer los mecanismos de reparación cerebral tras daño isquémico.

Además de la expresión de C1qa, iniciadora de la vía clásica del complemento, hemos identificado exclusivamente en pacientes con IC-cs otra proteína implicada en la regulación positiva de la vía alternativa del complemento: la properdina (CFP). La properdina puede ser sintetizada por las células endoteliales en condiciones de estrés de cizallamiento de pared<sup>131</sup>; esto podría explicar que en pacientes con oclusión trombótica, donde el endotelio se somete a cambios en las condiciones hemodinámicas, aumente la liberación de properdina pudiendo ser un biomarcador de infarto cerebral.

También, en nuestro estudio, hemos hallado exclusivamente en pacientes con IC-cs a la proteína arginasa-1 (ARG-1). ARG-1 es una proteína citosólica expresada predominantemente en el hígado, donde juega un papel clave en el ciclo de la urea, que convierte la L-arginina en urea y la L-ornitina, que se metaboliza más adelante en los metabolitos prolina y poliamidas, que impulsan la síntesis de colágeno y las vías bioenergéticas críticas para la proliferación celular. Pero, además, en tejidos no hepáticos, ARG-1 participa en la respuesta inmunológica al competir con la óxido nítrico sintasa (NOS) por la L-arginina, suprimiendo la proliferación de células Th1 y aumentando la proliferación de células Th2<sup>132,133</sup>. El efecto antiinflamatorio de ARG podría desempeñar un papel clave en la isquemia cerebral siendo de utilidad no sólo como biomarcador sino como diana terapéutica. Además, ARG-1 actuaría como diana

de miRNA-340\_5p<sup>134</sup>. En nuestro estudio, hemos encontrado infraexpresión de miRNA-340\_5p en pacientes con infarto cerebral con respecto a sanos.

Un estudio reciente, refuerza nuestros hallazgos habiendo encontrado sobreexpresión de ARG-1 e infraexpresión de miRNA-340 en sangre periférica de pacientes con ictus frente a pacientes sanos. Un posible mecanismo molecular de esta regulación sería que miRNA-340\_5p se uniría en el 3'UTR del ARG1, regulando negativamente la expresión de dicha proteína<sup>135</sup>. La infraexpresión de miRNA-340 con la subsiguiente regulación al alza de su diana ARG-1, podría desempeñar un papel clave al regular la respuesta inflamatoria desencadenada tras la isquemia cerebral. Otros posibles mecanismos de acción de miRNA-340\_5p en el daño por isquemia-reperfusión son sus efectos antiinflamatorios (disminuyendo la liberación de TNF e interleucinas), antiapoptóticos (a través del aumento de la expresión de Bcl-2, y disminuyendo los de Bax y caspasa-3) y protector cerebral (reduciendo la expresión de NADPH y la producción de óxido nítrico)<sup>116</sup>.

Otras proteínas que se han identificado sólo en pacientes con IC-cs, son las inmunoglobulinas IGHV3-43 e IGHV2-26. Están relacionadas con el sistema inmunológico participando en el reconocimiento de antígenos, en la expansión clonal y diferenciación de linfocitos B y en la activación de la vía clásica del complemento, por lo que podrían tener un papel importante como reguladoras de la respuesta inmunitaria desencadenada tras IC-cs. Estas proteínas no habían sido identificadas en VE hasta el momento.

También en VE de pacientes con IC-cs, se ha hallado a la proteína CCDC-138, de función desconocida. El análisis bioinformático identificó a esta proteína como diana de los sitios de unión de miRNA-29b-3p<sup>134</sup>. Algunos estudios han relacionado a miRNA-29b como marcador de isquemia. La sobreexpresión de miRNA-29b en condiciones de isquemia, regularía a la baja genes relacionados con la síntesis de proteínas de la matriz extracelular (metaloproteasas MMP2, genes de colágeno COL1A2, COL2A1) y con la angiogénesis (VEGF o HIF3A) condicionando el fracaso en la remodelación vascular<sup>136</sup>. En modelos animales de infarto cerebral en rata, se demostró sobreexpresión de miRNA-29b<sup>137</sup>. También en nuestro estudio hemos objetivado sobreexpresión de miRNA-29b\_3p en pacientes con infarto cerebral con respecto a sanos, lo que podría estar condicionando una regulación a la baja de genes diana relacionados con procesos de reparación cerebral y que repercutiría en la recuperación neurológica de los pacientes.

Finalmente, otra proteína identificada exclusivamente en pacientes con IC-cs fue la CASP14. Las caspasas (“cisteinil aspartato proteasas”) están involucradas en las vías de transducción de señales de apoptosis, necrosis e inflamación. Numerosos estudios han revisado el papel de las caspasas en el infarto cerebral, sin embargo, para nuestro conocimiento, nunca se había identificado a la CASP14 en procesos de isquemia cerebral. Los estudios con CASP14 la relacionan con diferenciación y cornificación de queratinocitos jugando un papel en la maduración epidérmica. Por primera vez, en nuestro estudio, se ha identificado a la CASP14 en VE derivadas de SNC en pacientes con infarto cerebral.

En cuanto a los miRNA identificados en VE de pacientes con infarto cerebral hemos objetivado infraexpresión de miRNA-339\_5p, miRNA-199a\_3p y miRNA-369\_3p en pacientes con IC-cs frente a sanos. Un estudio en modelo animal de daño hipóxico-isquémico, mostró que la infraexpresión de miRNA-339 se relacionó con un aumento de la supervivencia neuronal y supresión de la apoptosis en condiciones de isquemia<sup>138</sup>. El análisis bioinformático ha relacionado a miRNA-339 con proteínas implicadas en la angiogénesis (VEGF) y en la cicatriz glial (GFAP).<sup>134</sup> Por su parte, miRNA-199 se ha relacionado en varios estudios con la angiogénesis en respuesta a la isquemia en tejido cerebral mediante la regulación del factor inducible por hipoxia (HIF-1a) y del VEGF<sup>139,140</sup>. Finalmente, miRNA-369\_3p nunca antes se había relacionado con isquemia cerebral, pero sí con otras patologías del SNC como el glioblastoma, donde los niveles sobreexpresados de miRNA-369 se asociaron a inhibición de la proliferación y migración *in vitro* y a mayor supervivencia en modelo animal<sup>141</sup>. Los análisis bioinformáticos han relacionado miRNA-369 con proteínas que se expresan en el SNC y actúan como factores de transcripción como son la neurogenina-2 y el factor de diferenciación neurogénico 1 (NEUROD1), involucradas en la neurogénesis y en la diferenciación neuronal o como la neurotrofina-3 (NTF3), que desempeña un papel en la supervivencia y en la diferenciación de las neuronas de los mamíferos. Los resultados de nuestro estudio sugieren que miRNA-339\_5p, miRNA-199a\_3p y miRNA-369\_3p, podrían servir como posibles dianas terapéuticas en pacientes con IC-cs al regular genes clave en procesos de daño y de reparación cerebral.

Cabe destacar que hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la expresión de miRNA en pacientes con IC-cs y pacientes con IC-s, lo que sugiere que los mecanismos de daño y de reparación cerebral tras la isquemia cerebral son complejos y distintos en la enfermedad de pequeño vaso, donde se afectan fibras de sustancia blanca, y en la enfermedad de gran vaso, con afectación cortical y subcortical. Los miRNA que hemos identificado con expresión diferencial en IC-cs e IC-s son:

miRNA-15a\_5p, miRNA-424\_5p, miRNA-100\_5p y miRNA-339\_5p. Estos cuatro miRNA se hallan infraexpresados en pacientes con IC-cs con respecto a IC-s. En cuanto al papel de estos miRNA en la isquemia cerebral, diversos estudios han asociado a miRNA-15a\_5p como un regulador de la angiogénesis al inhibir VEGF y el factor de crecimiento fibroblástico 2. En modelos animales, la expresión del miRNA-15a\_5p aumenta significativamente en el área penumbra, siete días después de la oclusión de la ACM, lo que se asocia a una disminución de la angiogénesis y a un mayor tamaño de infarto cerebral y peor pronóstico funcional<sup>142</sup>. Por otra parte, miRNA-424 se ha relacionado con un papel protector al suprimir la activación de la microglía en la isquemia cerebral<sup>143</sup>. Pero, al igual que miRNA-15a\_5p, también se ha relacionado con la regulación de la angiogénesis al interaccionar con VEGF y FGF-2<sup>142</sup>. Además, el análisis bioinformático ha relacionado a ambos miRNA con la proteína VWF<sup>134</sup>. La asociación con esta proteína es interesante, ya que en modelos animales se ha visto involucrada en la remodelación vascular tras infarto cerebral<sup>144</sup> y en nuestro estudio hemos encontrado niveles aumentados de VWF en pacientes con isquemia en comparación con controles sanos. Finalmente, miRNA-100\_5p se ha asociado a un efecto anti-ateromatoso relacionándose inversamente los niveles locales de miRNA-100\_5p con el contenido de células inflamatorias en muestras de endarterectomía carotídea<sup>145</sup>, por lo que podría convertirse en una nueva diana terapéutica para el control de la aterosclerosis.

Las diferencias en la expresión de estos cuatro miRNA en IC-cs e IC-s no sólo les hace útiles como biomarcadores, sino que ayudan a comprender la fisiopatología de la isquemia cerebral cortical y subcortical, lo que amplía nuestro horizonte a futuras dianas terapéuticas para mejorar la recuperación funcional en los pacientes con infarto cerebral.

Aunque harían falta más estudios para confirmar nuestros resultados, parece que, en los pacientes con infarto cerebral, el contenido de las VE revela alteraciones en la expresión de proteínas y miRNAs relacionados con el sistema inmunológico e inflamatorio: C1qa, ARG-1, IGHV3-43 e IGHV2-26 y miRNA-100\_5p, en IC-cs y ANXA-2 en IC-s; con la angiogénesis: miRNA-15a\_5p, y miRNA-199a\_3p, en IC-cs y miRNA-29b\_3p en ambos (IC-cs e IC-s) y con la regulación de la apoptosis y la protección frente al daño neuronal: CASP14, miRNA-339\_5p, miRNA-369\_3p y miRNA-424\_5p, en IC-cs y LRP1, FLNA, TLN, en IC-s.

El último de los objetivos de nuestro trabajo fue estudiar las VE como biomarcadores en la isquemia cerebral. Para ello, lo primero que analizamos fue si los niveles de VE

liberados en las primeras 24h tras el ictus, podían correlacionarse con el tamaño de la lesión cerebral y con la recuperación neurológica.

En cuanto al tamaño de lesión, no encontramos correlación entre el volumen del infarto en RM y los niveles de VE. Esto puede ser debido a que las VE se elevan como parte de una respuesta sistémica frente a la isquemia, independientemente de la localización y tamaño de la lesión. Aunque algunos estudios han reportado que el tratamiento con VE reduce el volumen del infarto cerebral en modelos animales<sup>146</sup> no existen estudios que evalúen si existe correlación entre los niveles de VE y el tamaño del infarto cerebral.

Con respecto a la relación entre los niveles de VE liberados en las primeras 24h de la isquemia cerebral y la recuperación de los pacientes, nuestra primera cuestión fue determinar cómo evaluar la recuperación en los pacientes con infarto cerebral. Se han propuesto diferentes fórmulas para medir buena evolución en pacientes con ictus (puntuación en la ERm  $\leq 2$ , NIHSS de 0-1 o  $\geq 8$  puntos de mejora a las 24 h)<sup>147,148</sup>. Sin embargo, estas fórmulas no son útiles para evidenciar cambios en la evolución de pacientes con síntomas leves desde el inicio. Dado que en nuestro estudio se incluían tanto ictus leves como moderados y graves, era necesario utilizar una fórmula que tuviera en cuenta estas diferencias. En este sentido, la reducción relativa de NIHSS, mostró más exactitud a la hora de medir la recuperación funcional cuando se incluían pacientes de ictus moderados a graves<sup>149</sup>. Esta fórmula ha sido utilizada para medir evolución en ensayos clínicos de tratamiento intravenoso y endovascular en pacientes tras ictus<sup>91,92</sup>.

Nuestros resultados sugieren que, niveles más altos de VE en las primeras 24h se asocian a peor recuperación, medida con la reducción relativa en la puntuación de la escala de NIHSS en pacientes. Si bien deben realizarse más estudios donde se incluya mayor número de pacientes para verificar estos resultados, nuestros datos apoyan la hipótesis inicial de que la liberación de VE ocurre como respuesta a la isquemia de manera que, a mayor gravedad de la isquemia, se alcanzarían mayores niveles de VE en suero. Estos niveles se irían normalizando con el tiempo.

Más interesante resulta la correlación entre el contenido en miRNA de las VE liberadas tras isquemia cerebral y la recuperación neurológica de los pacientes. En este sentido, por primera vez, hemos hallado un punto de corte en los niveles de miRNA-29b\_3p y miRNA-100\_5p por debajo del cual se predice buena recuperación neurológica a los tres meses en pacientes que han sufrido un ictus, lo que apoya la necesidad de ahondar en su posible papel como protectores en isquemia cerebral.

La principal limitación de nuestro trabajo es el pequeño tamaño muestral, especialmente teniendo en cuenta la heterogeneidad de las características clínicas de los pacientes. Las variables demográficas de nuestro estudio que fueron significativamente diferentes fueron la edad (mayor en pacientes con IC-cs), el sexo (predominio de varones en IAM) y el tabaquismo (más frecuente en IAM), sin embargo, un estudio previo indica que el contenido de VE no difiere según edad, sexo o tabaquismo<sup>150</sup>. Debido al pequeño tamaño muestral no fue posible analizar la influencia del subtipo etiológico ni del tratamiento recibido en la fase aguda de la isquemia, aspectos no estudiados hasta el momento por ningún otro autor. Una de nuestras líneas futuras es ampliar nuestra cohorte para poder analizar estas cuestiones. Otra de las limitaciones de nuestro estudio es el método de aislamiento de las VE. La ultracentrifugación se considera a menudo como el estándar de oro; sin embargo, la técnica tiene importantes inconvenientes, como la baja reproducibilidad y el bajo rendimiento de ARN y proteínas de las VE<sup>151</sup>. Los métodos de aislamiento de VE basados en la precipitación tienen una reproducibilidad y un rendimiento mucho mayores<sup>152</sup>, aunque con una menor pureza<sup>153</sup>. En nuestro estudio, mediante el método ExoQuick-ULTRA, hemos utilizado un paso posterior al aislamiento, eliminando cantidades significativas de contaminantes, como la albúmina y las inmunoglobulinas. Sin embargo, no disponemos de ninguna comparación directa entre el método ExoQuick-ULTRA y la ultracentrifugación en suero. Otra limitación a tener en cuenta, es la variabilidad inherente a la técnica de proteómica donde, debido a la complejidad de los análisis, pequeñas variaciones (por ejemplo, en la ionización o en la fragmentación de los péptidos) afectan a la identificación de las proteínas y de los péptidos en cada experimento, por lo que la reproducibilidad es menor que en otras técnicas de determinación de biomarcadores, como la detección de ácidos nucleicos por micro-array<sup>154</sup>. También sería interesante, para confirmar el potencial predictivo de recuperación neurológica de los miRNA-29b\_3p y de miRNA-100\_5p, desarrollar estudios de validación externa. Otro punto de interés es estudiar la relación entre las proteínas y los miRNA hallados en cada muestra y a diferentes tiempos. Puesto que una de las ventajas de la biopsia líquida es que puede analizarse en distintos puntos de la evolución, sería interesante examinar el perfil de VE tras 3-6 meses, lo cual permitiría un mejor conocimiento de los mecanismos relacionados con la recuperación de los pacientes. Éste sería nuestro siguiente paso a seguir para poder profundizar en el conocimiento de los biomarcadores predictivos en isquemia cerebral.

## **CONCLUSIONES**



En este proyecto de investigación clínica donde hemos estudiado el papel de las VE y de los miRNA como biomarcadores pronósticos en pacientes con infarto cerebral agudo, nuestros resultados muestran que:

1. En el daño isquémico (cerebral y miocárdico) existe un incremento de los niveles de VE en suero, con un perfil de expresión en miRNA y proteínas diferente al hallado en controles sanos.
2. No existen diferencias en los niveles séricos de VE en isquemia cerebral y miocárdica, aunque sí en la expresión de proteínas y miRNA. Se han identificado 42 proteínas específicas de pacientes con infarto cerebral y miRNA-340\_5p se encuentra sobreexpresado en el infarto cerebral en comparación con infarto de miocardio. Estas diferencias sugieren que, aunque existan proteínas y miRNA comunes al proceso isquémico, existen diferencias en los mecanismos de daño y de reparación tisular que subyacen a la isquemia cerebral y a la isquemia miocárdica.
3. No existen diferencias significativas en los niveles séricos de VE en pacientes con IC-cs en comparación con los de IC-s. Sin embargo, se han identificado proteínas específicas de grupo tanto en el IC-cs como en el IC-s. Además, detectamos infraexpresión de cuatro miRNA: miRNA-15a\_5p, miRNA-424\_5p, miRNA-100\_5p y miRNA-339\_5p en el grupo de IC-cs. Todo ello sugiere diferencias en los mecanismos de daño y de reparación cerebral según la topografía de la lesión cerebral.
4. Los niveles séricos de VE no se correlacionan con el volumen de lesión ni con la recuperación neurológica tras un infarto cerebral. Sin embargo, tanto niveles de miRNA-29b\_3p inferiores a 2,52 Delta CT como de miRNA-100\_5p por debajo de 5,47 Delta CT predicen buena recuperación neurológica a los tres meses, por lo que podrían tener valor como biomarcadores pronósticos en pacientes con infarto cerebral agudo.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Díez-Tejedor E, Del Brutto O, Álvarez-Sabín J, Muñoz M, Abiusi G. Clasificación de las enfermedades cerebrovasculares. Sociedad Iberoamericana de Enfermedades Cerebrovasculares. *Rev Neurol*. 2001;33(5):455-464.
2. Comité ad hoc del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares. *Guía Para El Diagnóstico y Tratamiento Del Ictus*. (Díez-Tejedor E, ed.). Barcelona: Prous Science, S.A; 2006.
3. Feigin VL, Abajobir AA, Abate KH, et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol*. 2017;16(11):877-897. doi:10.1016/S1474-4422(17)30299-5
4. Thrift AG, Thayabaranathan T, Howard G, et al. Global stroke statistics. *Int J Stroke*. 2017;12(1):13-32. doi:10.1177/1747493016676285
5. Béjot Y, Bailly H, Durier J, Giroud M. Epidemiology of stroke in Europe and trends for the 21st century. *Press Medicale*. 2016;45(12):e391-e398. doi:10.1016/j.lpm.2016.10.003
6. Díaz-Guzmán J, Egido JA, Gabriel-Sánchez R, Barberá-Comes G, Fuentes-Gimeno B, Fernández-Pérez C. Stroke and transient ischemic attack incidence rate in Spain: The IBERICTUS study. *Cerebrovasc Dis*. 2012;34(4):272-281. doi:10.1159/000342652
7. Katan M, Luft A. Global burden of stroke. *Semin Neurol*. 2018;38(2):208-211. doi:10.1055/s-0038-1649503
8. Feigin VL, Krishnamurthi RV, Parmar P, et al. Update on the Global Burden of ischaemic and haemorrhagic stroke in 1990–2013: THE GBD 2013 STUDY. *Neuroepidemiology*. 2016;45(3):161-176. doi:10.1159/000441085.
9. Wilkins E, Wilson L, Wickramasinghe K, et al. European Cardiovascular Disease Statistics 2017. *Eur Hear Network, Brussels*. 2017:192. doi:978-2-9537898-1-2
10. Ovbiagele B, Goldstein LB, Higashida RT, et al. Forecasting the future of stroke in the united states: A policy statement from the American heart association and American stroke association. *Stroke*. 2013;44(8):2361-2375. doi:10.1161/STR.0b013e31829734f2

11. Verónica C, Bogousslavsky J. Early classification of stroke. *Cerebrovasc Dis*. 1997;7:5-11.
12. Arboix A, Díaz J, Pérez-Sempere A, Alvarez-Sabín J. Ictus. Tipos etiológicos y criterios diagnósticos. *Neurología*. 2002;17 (supl 3:3-12).
13. Rowland LP, Pedley TA. *Neurología de Merritt*. 12th ed. Wolters Kluwer, 2011.
14. Pulsinelli W. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet*. 1992;339(8792):533-536. doi:10.1016/0140-6736(92)90347-6
15. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia-the ischemic penumbra. *Stroke*. 1981;12(6):723-725. doi:10.1161/01.STR.12.6.723
16. Jones TH, Morawetz RB, Crowell RM, et al. Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *J Neurosurg*. 1981;54(6):773-782. doi:10.3171/jns.1981.54.6.0773
17. Lassen NA. Pathophysiology of brain ischemia as it relates to the therapy of acute ischemic stroke. *Clin Neuropharmacol*. 1990;13 Suppl 3:S1-S8. doi:10.1097/00002826-199013003-00001
18. Baron JC. Mapping the ischaemic penumbra with PET: Implications for acute stroke treatment. *Cerebrovasc Dis*. 1999;9(4):193-201. doi:10.1159/000015955
19. Hallenbeck JM, Dutka AJ. Background Review and Current Concepts of Reperfusion Injury. *Arch Neurol*. 1990;47(11):1245-1254. doi:10.1001/archneur.1990.00530110107027
20. Velier JJ, Ellison JA, Kikly KK, Spera PA, Barone FC, Feuerstein GZ. Caspase-8 and caspase-3 are expressed by different populations of cortical neurons undergoing delayed cell death after focal stroke in the rat. *J Neurosci*. 1999;19(14):5932-5941. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-14-05932.1999
21. Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia: Part I Pathophysiology. *J Neurosurg*. 1992;77:169-184. doi:10.3171/jns.1992.77.2.0169
22. Hossmann K -A. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol*. 1994;36(4):557-565. doi:10.1002/ana.410360404
23. Trump BF, Berezsky IK. Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J*. 1995;9:219-228. doi:10.1096/fasebj.9.2.7781924

24. Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia Part II. *J Neurosurg*. 1992;77:337-354. doi:10.3171/jns.1992.77.3.0337
25. Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke*. 1990;21(7):1086-1090. doi:10.1161/01.STR.21.7.1086
26. Davalos A, Fernandez-Real JM, Ricart W, et al. Iron-related damage in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1994;25(8):1543-1546. doi:10.1161/01.STR.25.8.1543
27. Martin LJ, Al-Abdulla NA, Brambrink AM, Kiesch JR, Sieber FE, Portera-Cailliau C. Neurodegeneration in excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: A perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Brain Res Bull*. 1998;46(4):281-309. doi:10.1016/S0361-9230(98)00024-0
28. Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, et al. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*. 1997;15(13):1573-1581. doi:10.1038/sj.onc.1201324
29. Koizumi S, Hirayama Y, Morizawa YM. New roles of reactive astrocytes in the brain; an organizer of cerebral ischemia. *Neurochem Int*. 2018;119:107-114. doi:10.1016/j.neuint.2018.01.007
30. DeGraba TJ. The role of inflammation after acute stroke: Utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology*. 1998;51(3 Suppl 3.):S62-S68. doi:10.1212/wnl.51.3\_suppl\_3.s62
31. Castillo J, Leira R. Predictors of deteriorating cerebral infarct: Role of inflammatory mechanisms. Would its early treatment be useful? *Cerebrovasc Dis*. 2001;11(SUPPL. 1):40-48. doi:10.1159/000049124
32. Rodríguez-Yáñez M, Castillo J. Role of inflammatory markers in brain ischemia. *Curr Opin Neurol*. 2008;21:353-357. doi:10.1097/WCO.0b013e3282ffafbf
33. Gutiérrez M, Merino JJ, Alonso De Leciñana M, Díez-Tejedor E. Cerebral protection, brain repair, plasticity and cell therapy in ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2009;27(SUPPL. 1):177-186. doi:10.1159/000200457
34. Ramos-Cejudo J, Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, et al. Spatial and Temporal Gene Expression Differences in Core and Periinfarct Areas in Experimental Stroke: A Microarray Analysis. *PLoS One*. 2012;7(12). doi:10.1371/journal.pone.0052121

35. Jauch EC, Saver JL, Adams HP, et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: A guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013;44(3):870-947. doi:10.1161/STR.0b013e318284056a
36. Wardlaw J, Murray V, Berge E, GJ Z. Thrombolysis for acute ischaemic stroke ( Review ). *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;7(4):CD000213. doi:10.1002/14651858.CD000213.pub3.Thrombolysis
37. Emberson J, Lees KR, Lyden P, et al. Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: A meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet*. 2014;384(9958):1929-1935. doi:10.1016/S0140-6736(14)60584-5
38. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, et al. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). *Lancet*. 1998;352(9136):1245-1251. doi:0.1016/s0140-6736(98)08020-9
39. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E. Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med*. 2008;359(13):1317-1329. doi:10.1056/NEJMoa0804656
40. National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med*. 1995;333(24):1581-1587. doi:10.1056/NEJM199512143332401
41. Wahlgren N, Ahmed N, Davalos A, et al. Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. *Lancet*. 2007;369:275-282. doi:10.1016/S0140-6736(07)60149-4
42. Berkhemer OA, Fransen PSS, Beumer D, et al. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2015;372(4):11-20. doi:10.1056/NEJMoa1411587
43. Bracard S, Ducrocq X, Mas JL, et al. Mechanical thrombectomy after intravenous alteplase versus alteplase alone after stroke (THRACE): a randomised controlled trial. *Lancet Neurol*. 2016;15(12):1138-1147. doi:10.1016/S1474-4422(16)30177-6

44. Campbell BCV, Mitchell PJ, Kleinig TJ, et al. Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med*. 2015;372(11):1009-1018. doi:10.1056/NEJMoa1414792
45. Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, et al. Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2015;372(11):1019-1030. doi:10.1056/NEJMoa1414905
46. Jovin TG, Chamorro A, Cobo E, et al. Thrombectomy within 8 hours after symptom onset in ischemic stroke. *N Engl J Med*. 2015;372(24):2296-2306. doi:10.1056/NEJMoa1503780
47. Saver JL, Goyal M, Bonafe A, et al. Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke. *N Engl J Med*. 2015;372(24):2285-2295. doi:10.1056/NEJMoa1415061
48. Alonso de Leciana M, Gutiérrez-Fernández M, Romano M, et al. Strategies to improve recovery in acute ischemic stroke patients: Iberoamerican Stroke Group Consensus. *Int J Stroke*. 2014;9(4):503-513. doi:10.1111/ijss.12070
49. Wada K, Sugimori H, Bhide PG, Moskowitz MA, Finklestein SP. Effect of Basic Fibroblast Growth Factor Treatment on Brain Progenitor Cells After Permanent Focal Ischemia in Rats. *Stroke*. 2003;34(11):2722-2728. doi:10.1161/01.STR.0000094421.61917.71
50. Schäbitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke*. 2007;38(7):2165-2172. doi:10.1161/STROKEAHA.106.477331
51. Ramos-Cejudo J, Gutiérrez-Fernández M, Otero-Ortega L, et al. Brain-derived neurotrophic factor administration mediated oligodendrocyte differentiation and myelin formation in subcortical ischemic stroke. *Stroke*. 2015;46(1):221-228. doi:10.1161/STROKEAHA.114.006692
52. Shimotake J, Derugin N, Wendland M, Vexler ZS, Ferreiro DM. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Inhibition Promotes Cell Death and Limits Endothelial Cell Proliferation in a Neonatal Rodent Model of Stroke. *Stroke*. 2010;41(2):343-349. doi:10.1161/STROKEAHA.109.564229.

53. Ikegame Y, Yamashita K, Hayashi SI, et al. Comparison of mesenchymal stem cells from adipose tissue and bone marrow for ischemic stroke therapy. *Cytotherapy*. 2011;13(6):675-685. doi:10.3109/14653249.2010.549122
54. Leu S, Lin YC, Yuen CM, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells markedly attenuate brain infarct size and improve neurological function in rats. *J Transl Med*. 2010;8:11-14. doi:10.1186/1479-5876-8-63
55. Zhang HT, Liu ZL, Yao XQ, Yang ZJ, Xu RX. Neural differentiation ability of mesenchymal stromal cells from bone marrow and adipose tissue: A comparative study. *Cytotherapy*. 2012;14(10):1203-1214. doi:10.3109/14653249.2012.711470
56. Otero-Ortega L, Gutiérrez-Fernández M, Ramos-Cejudo J, et al. White matter injury restoration after stem cell administration in subcortical ischemic stroke. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):1-12. doi:10.1186/s13287-015-0111-4
57. Gutiérrez-Fernández M, Rodríguez-Frutos B, Alvarez-Grech J, et al. Functional recovery after hematic administration of allogenic mesenchymal stem cells in acute ischemic stroke in rats. *Neuroscience*. 2011;175:394-405. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.11.054
58. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Chopp M. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res*. 2002;90(3):284-288. doi:10.1161/hh0302.104460
59. ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/>.
60. Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001;69(3):89-95. doi:10.1067/mcp.2001.113989
61. Sturgeon CM, Diamandis EP. Use of tumor markers in clinical practice: quality requirements. *Am Assoc Clin Chem*. 2009.
62. Chen Y, Tao Y, Zhang L, Xu W, Zhou X. Diagnostic and prognostic value of biomarkers in acute myocardial infarction. *Postgrad Med J*. 2019;95(1122):210-216. doi:10.1136/postgradmedj-2019-136409
63. Jack Jr CR, Bennett DA, Blennow K, et al. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2018;14(4):535-562. doi:10.1016/j.jalz.2018.02.018



64. Ramiro L, Simats A, García-Berrocso T, Montaner J. Inflammatory molecules might become both biomarkers and therapeutic targets for stroke management. *Ther Adv Neurol Disord*. 2018;11(6):1-24. doi:10.1177/1756286418789340
65. Nawaz M, Shah N, Zanetti B, et al. Extracellular Vesicles and Matrix Remodeling Enzymes: The Emerging Roles in Extracellular Matrix Remodeling, Progression of Diseases and Tissue Repair. *Cells*. 2018;7(10):167. doi:10.3390/cells7100167
66. Kalra H, Drummen GPC, Mathivanan S. Focus on extracellular vesicles: Introducing the next small big thing. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2). doi:10.3390/ijms17020170
67. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013;200(4):373-383. doi:10.1083/jcb.201211138
68. Barile L, Vassalli G. Exosomes: Therapy delivery tools and biomarkers of diseases. *Pharmacol Ther*. 2017;174:63-78. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.02.020
69. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. Exosomes in Rectal Cancer ClinicalTrials.gov/NCT03874559. Marzo 2019. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03874559>
70. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. Circulating Exosome RNA in Lung Metastases of Primary High-Grade Osteosarcoma. ClinicalTrials.gov/NCT03108677. Abril 2017. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03108677>
71. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. ncRNAs in Exosomes of Cholangiocarcinoma. ClinicalTrials.gov/NCT03102268. Abril 2017. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03102268>
72. Kanninen KM, Bister N, Koistinaho J, Malm T. Exosomes as new diagnostic tools in CNS diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862(3):403-410. doi:10.1016/j.bbadis.2015.09.020
73. Chen J, Chopp M. Exosome therapy for stroke. *Stroke*. 2018;49(5):1083-1090. doi:10.1161/STROKEAHA.117.018292
74. Xin H, Li Y, Chopp M. Exosomes/miRNAs as mediating cell-based therapy of stroke. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:1-11. doi:10.3389/fncel.2014.00377

75. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. LRRK2 and Other Novel Exosome Proteins in Parkinson's Disease. ClinicalTrials.gov/NCT01860118. Mayo 2013. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01860118>.
76. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. Longitudinal Innate Immunity and Aging Study (LIIA). ClinicalTrials.gov/NCT03944603. Mayo 2019. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03944603>
77. Wang W, Li D Bin, Li RY, et al. Diagnosis of hyperacute and acute ischaemic stroke: The potential utility of exosomal microRNA-21-5p and MicroRNA-30a-5p. *Cerebrovasc Dis*. 2018;45(5-6):204-212. doi:10.1159/000488365
78. Ji Q, Ji Y, Peng J, et al. Increased brain-specific MiR-9 and MiR-124 in the serum exosomes of acute ischemic stroke patients. *PLoS One*. 2016;11(9):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0163645
79. Chen Y, Song Y, Huang J, et al. Increased circulating exosomal miRNA-223 is associated with acute ischemic stroke. *Front Neurol*. 2017;8(57):1-8. doi:10.3389/fneur.2017.00057
80. Datta A, Chen CP, Sze SK. Discovery of prognostic biomarker candidates of lacunar infarction by quantitative proteomics of microvesicles enriched plasma. *PLoS One*. 2014;9(4). doi:10.1371/journal.pone.0094663
81. Agouni A, Parray AS, Akhtar N, et al. There Is Selective Increase in Pro-thrombotic Circulating Extracellular Vesicles in Acute Ischemic Stroke and Transient Ischemic Attack: A Study of Patients From the Middle East and Southeast Asia. *Front Neurol*. 2019;10(251):1-10. doi:10.3389/fneur.2019.00251
82. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843-854. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y
83. Ruvkun G. Molecular biology: Glimpses of a tiny RNA world. *Science*. 2001;294(5543):797-799. doi:10.1126/science.1066315
84. Griffiths-Jones lab. miRBase.org. Octubre 2018. Disponible en: <http://mirbase.org>
85. Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):654-659. doi:10.1038/ncb1596

86. Mori MA, Ludwig RG, Garcia-Martin R, Brandão BB, Kahn CR. Extracellular miRNAs: From Biomarkers to Mediators of Physiology and Disease. *Cell Metab.* 2019;30(4):656-673. doi:10.1016/j.cmet.2019.07.011
87. Vasudeva K, Munshi A. miRNA dysregulation in ischaemic stroke: Focus on diagnosis, prognosis, therapeutic and protective biomarkers. *Eur J Neurosci.* 2020;52(6):3610-3627. doi:10.1111/ejn.14695
88. Li D Bin, Liu JL, Wang W, et al. Plasma exosomal miRNA-122-5p and miR-300-3p as potential markers for transient ischaemic attack in rats. *Front Aging Neurosci.* 2018;10(24):1-10. doi:10.3389/fnagi.2018.00024
89. Zhou J, Chen L, Chen B, et al. Increased serum exosomal miR-134 expression in the acute ischemic stroke patients. *BMC Neurol.* 2018;18(1):1-9. doi:10.1186/s12883-018-1196-z
90. van Kralingen JC, McFall A, Ord ENJ, et al. Altered Extracellular Vesicle MicroRNA Expression in Ischemic Stroke and Small Vessel Disease. *Transl Stroke Res.* 2019;10(5):495-508. doi:10.1007/s12975-018-0682-3
91. Goyal N, Tsivgoulis G, Frei D, et al. Comparative Safety and Efficacy of Modified TICI 2b and TICI 3 Reperfusion in Acute Ischemic Strokes Treated with Mechanical Thrombectomy. *Clin Neurosurg.* 2019;84(3):680-686. doi:10.1093/neuros/nyy097
92. Tsivgoulis G, Katsanos AH, Kadlecová P, et al. Intravenous thrombolysis for ischemic stroke in the golden hour: propensity-matched analysis from the SITS-EAST registry. *J Neurol.* 2017;264(5):912-920. doi:10.1007/s00415-017-8461-8
93. Smith EE, Saposnik G, Biessels GJ, et al. Prevention of Stroke in Patients with Silent Cerebrovascular Disease: A Scientific Statement for Healthcare Professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2017;48(2):e44-e71. doi:10.1161/STR.000000000000116
94. Rudilosso S, San Román L, Blasco J, Hernández-Pérez M, Urra X, Chamorro Á. Evaluation of white matter hypodensities on computed tomography in stroke patients using the Fazekas score. *Clin Imaging.* 2017;46:24-27. doi:10.1016/j.clinimag.2017.06.011
95. Goldstein LB, Samsa GP, Matchar DB, Horner RD. Charlson Index comorbidity adjustment for ischemic stroke outcome studies. *Stroke.* 2004;35(8):1941-1945. doi:10.1161/01.STR.0000135225.80898.1c

96. Kenny DA. Statistics for the Social and Behavioral Sciences. (Little B, ed.); 1987.
97. Mar J, Álvarez-Sabín J, Oliva J, et al. Los costes del ictus en España según su etiología. El protocolo del estudio CONOCES. *Neurología*. 2013;28(6):332-339. doi:10.1016/j.nrl.2012.07.004
98. Sennfält S, Norrving B, Petersson J, Ullberg T. Long-Term Survival and Function after Stroke: A Longitudinal Observational Study from the Swedish Stroke Register. *Stroke*. 2019;50(1):53-61. doi:10.1161/STROKEAHA.118.022913
99. Diz AP, Truebano M, Skibinski DOF. The consequences of sample pooling in proteomics: An empirical study. *Electrophoresis*. 2009;30(17):2967-2975. doi:10.1002/elps.200900210
100. Couch Y, Akbar N, Davis S, et al. Inflammatory Stroke Extracellular Vesicles Induce Macrophage Activation. *Stroke*. 2017;48(8):2292-2296. doi:10.1161/STROKEAHA.117.017236
101. Hevia D, Cifuentes J, Alvarado O, et al. En el Infarto agudo al miocardio los niveles plasmáticos de microvesículas extracelulares se elevan más precozmente que el aumento de la Troponina-I. *Rev Chil Cardiol*. 2017;36(1):24-33. doi:10.4067/s0718-85602017000100003
102. Zhai D, Chin K, Wang M, Liu F. Disruption of the nuclear p53-GAPDH complex protects against ischemia-induced neuronal damage. *Mol Brain*. 2014;7(1):1-12. doi:10.1186/1756-6606-7-20
103. Akinyemi R, Tiwari H, Arnett D, Ovbiagele B, Irvin M. APOL1, CDKN2A/CDKN2B, and HDAC9 polymorphisms and small vessel ischemic stroke. *Acta Neurol Scand*. 2018;137(1):133-141. doi:10.1111/ane.12847.
104. Hughson MD, Hoy WE, Mott SA, et al. APOL1 Risk Alleles Are Associated With More Severe Arteriosclerosis in Renal Resistance Vessels With Aging and Hypertension. *Kidney Int Reports*. 2016;1(1):10-23. doi:10.1016/j.ekir.2016.03.002
105. Olsson B, Gigante B, Mehlig K, et al. Apolipoprotein C-I genotype and serum levels of triglycerides, C-reactive protein and coronary heart disease. *Metabolism*. 2010;59(12):1736-1741. doi:10.1016/j.metabol.2010.04.017

106. HP A, Bendixen B, Kappelle L, et al. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24(1):35-41. doi:10.1161/01.str.24.1.35.
107. Kurkowska-Jastrzębska I, Karliński MA, Błazejewska-Hyzorek B, Sarzyńska-Długosz I, Filipiak KJ, Członkowska A. Carotid intima media thickness and blood biomarkers of atherosclerosis in patients after stroke or myocardial infarction. *Croat Med J*. 2016;57(6):548-557. doi:10.3325/cmj.2016.57.548
108. Ridker PM. Inflammatory Biomarkers and Risks of Myocardial Infarction, Stroke, Diabetes, and Total Mortality: Implications for Longevity. *Nutr Rev*. 2007;65(SUPPL.3):253-259. doi:10.1111/j.1753-4887.2007.tb00372.x
109. Ma YJ, Garred P. Pentraxins in Complement Activation and Regulation. *Front Immunol*. 2018;9:3046. doi:10.3389/fimmu.2018.03046
110. Kim S, Yi H, Lee D, Sung J. Association of High-sensitivity C-reactive Protein with Patient Prognosis Following Mechanical Thrombectomy for Acute Ischemic Stroke. *Curr Neurovasc Res*. 2020;17(4):402-410. doi:10.2174/1567202617666200517110949.
111. Ma Y, Liu Y, Zhang Z, Yang GY. Significance of complement system in ischemic stroke: A comprehensive review. *Aging Dis*. 2019;10(2):429-462. doi:10.14336/AD.2019.0119
112. Engström G, Hedblad bo, Janzon L, Lindgärde F. Complement C3 and C4 in plasma and incidence of myocardial infarction and stroke: A population-based cohort study. *Eur J Prev Cardiol*. 2007;14(3):392-397. doi:10.1097/01.hjr.0000244582.30421.b2
113. Cavusoglu E, Eng C, Chopra V, et al. Usefulness of the Serum Complement Component C4 as a Predictor of Stroke in Patients With Known or Suspected Coronary Artery Disease Referred for Coronary Angiography. *Am J Cardiol*. 2007;100(2):164-168. doi:10.1016/j.amjcard.2007.02.075
114. Cao L, Zhang Y, Zhang S, et al. MicroRNA-29b alleviates oxygen and glucose deprivation/reperfusion-induced injury via inhibition of the p53-dependent apoptosis pathway in N2a neuroblastoma cells. *Exp Ther Med*. 2018;15(1):67-74. doi:10.3892/etm.2017.5410

115. Nakashima T, Jinnin M, Etoh T, et al. Down-regulation of mir-424 contributes to the abnormal angiogenesis via MEK1 and cyclin E1 in senile hemangioma: Its implications to therapy. *PLoS One*. 2010;5(12). doi:10.1371/journal.pone.0014334
116. Wang J, Liu G. Protective effect of microRNA-340-5p against oxygen-glucose deprivation/reperfusion in PC12 cells through targeting neuronal differentiation 4. *Mol Med Rep*. 2020;22(2):964-974. doi:10.3892/mmr.2020.11174
117. Wu X, Liu Y, Mo S, Wei W, Ye Z, Su Q. LncRNA TUG1 competitively binds to miR-340 to accelerate myocardial ischemia-reperfusion injury. *FASEB J*. 2021;35(1):1-14. doi:10.1096/fj.202000827RR
118. Li D, Zhou J, Yang B, Yu Y. microRNA-340-5p inhibits hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis and oxidative stress in cardiomyocytes by regulating the Act1/NF- $\kappa$ B pathway. *J Cell Biochem*. 2019;120(9):14618-14627. doi:10.1002/jcb.28723
119. Datta A, Park JE, Li X, et al. Phenotyping of an in vitro model of ischemic penumbra by iTRAQ-based shotgun quantitative proteomics. *J Proteome Res*. 2010;9(1):472-484. doi:10.1021/pr900829h
120. Fan X, Jiang Y, Yu Z, et al. Annexin A2 Plus Low-Dose Tissue Plasminogen Activator Combination Attenuates Cerebrovascular Dysfunction After Focal Embolic Stroke of Rats. *Transl Stroke Res*. 2017;8(6):549-559. doi:10.1007/s12975-017-0542-6
121. Peng J, Pang J, Huang L, et al. LRP1 activation attenuates white matter injury by modulating microglial polarization through Shc1/PI3K/Akt pathway after subarachnoid hemorrhage in rats. *Redox Biol*. 2019;21:101121. doi:10.1016/j.redox.2019.101121
122. Lok KZ, Manzanero S, Arumugam T V. Neuronal low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) enhances the anti-apoptotic effect of intravenous immunoglobulin (IVIg) in ischemic stroke. *Brain Res*. 2016;1644:192-202. doi:10.1016/j.brainres.2016.05.023
123. Nayak A, Pednekar L, Reid KBM, Kishore U. Complement and non-complement activating functions of C1q: A prototypical innate immune molecule. *Innate Immun*. 2012;18(2):350-363. doi:10.1177/1753425910396252

124. Dietzschold B, Schwaeble W, Schäfer MKH, et al. Expression of C1q, a subcomponent of the rat complement system, is dramatically enhanced in brains of rats with either Borna disease or experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurol Sci.* 1995;130(1):11-16. doi:10.1016/0022-510X(94)00269-T
125. Huang J, Kim LJ, Mealey R, et al. Neuronal protection in stroke by an sLex-glycosylated complement inhibitory protein. *Science.* 1999;285(5427):595-599.
126. Fonseca MI, Chu SH, Hernandez MX, et al. Cell-specific deletion of C1qa identifies microglia as the dominant source of C1q in mouse brain. *J Neuroinflammation.* 2017;14(1):1-15. doi:10.1186/s12974-017-0814-9
127. Fraser DA, Pisalyaput K, Tenner AJ. C1q enhances microglial clearance of apoptotic neurons and neuronal blebs, and modulates subsequent inflammatory cytokine production. *J Neurochem.* 2010;112(3):733-743. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.06494.x
128. Benoit ME, Tenner AJ. Complement protein C1q-mediated neuroprotection is correlated with regulation of neuronal gene and microRNA expression. *J Neurosci.* 2011;31(9):3459-3469. doi:10.1523/JNEUROSCI.3932-10.2011
129. Hooshmand MJ, Nguyen HX, Piltti KM, et al. Neutrophils Induce Astroglial Differentiation and Migration of Human Neural Stem Cells via C1q and C3a Synthesis. *J Immunol.* 2017;199(3):1069-1085. doi:10.4049/jimmunol.1600064
130. Bossi F, Tripodo C, Rizzi L, et al. C1q as a unique player in angiogenesis with therapeutic implication in wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(11):4209-4214. doi:10.1073/pnas.1311968111
131. Bongrazio M, Pries AR, Zakrzewicz A. The endothelium as physiological source of properdin: Role of wall shear stress. *Mol Immunol.* 2003;39(11):669-675. doi:10.1016/S0161-5890(02)00215-8
132. Wang XP, Zhang W, Liu XQ, et al. Arginase i enhances atherosclerotic plaque stabilization by inhibiting inflammation and promoting smooth muscle cell proliferation. *Eur Heart J.* 2014;35(14):911-919. doi:10.1093/eurheartj/eh329
133. Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, et al. Differential Regulation of Nitric Oxide Synthase-2 and Arginase-1 by Type 1/Type 2 Cytokines In Vivo: Granulomatous Pathology Is Shaped by the Pattern of L-Arginine Metabolism. *J Immunol.* 2001;167(11):6533-6544. doi:10.4049/jimmunol.167.11.6533

134. Chen Y, Wang X. miRDB: an online database for prediction of functional microRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D127-D131. doi:10.1093/nar/gkz757
135. Yoo H, Kim J, Lee AR, et al. Alteration of microRNA 340-5p and Arginase-1 Expression in Peripheral Blood Cells during Acute Ischemic Stroke. *Mol Neurobiol.* 2019;56(5):3211-3221. doi:10.1007/s12035-018-1295-2
136. Dell'aversana C, Cuomo F, Botti C, et al. Hypoxia-regulated miRNAs in human mesenchymal stem cells: Exploring the regulatory effects in ischemic disorders. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6). doi:10.3390/ijms20061340
137. Liu DZ, Tian Y, Ander BP, et al. Brain and blood microRNA expression profiling of ischemic stroke, intracerebral hemorrhage, and kainate seizures. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30(1):92-101. doi:10.1038/jcbfm.2009.186
138. Zhao J, He L, Yin L. lncRNA NEAT1 Binds to MiR-339-5p to Increase HOXA1 and Alleviate Ischemic Brain Damage in Neonatal Mice. *Mol Ther - Nucleic Acids.* 2020;20:117-127. doi:10.1016/j.omtn.2020.01.009
139. Wang Z, Wang R, Wang K, Liu X. Upregulated long non-coding RNA Snhg1 promotes the angiogenesis 1 of brain 2 microvascular endothelial cells after oxygen–glucose deprivation treatment by 3 targeting miR-199a. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018:909-915. doi:10.1139/cjpp-2018-0107
140. Mei Z, Huang B, Zhang Y, Qian X, Mo Y, Deng N. Histone deacetylase 6 negatively regulated microRNA-199a-5p induces the occurrence of preeclampsia by targeting VEGFA in vitro. *Biomed Pharmacother.* 2019;114:108805. doi:10.1016/j.biopha.2019.108805
141. Shahar T, Granit A, Zrihan D, et al. Expression level of miRNAs on chromosome 14q32.31 region correlates with tumor aggressiveness and survival of glioblastoma patients. *J Neurooncol.* 2016;130(3):413-422. doi:10.1007/s11060-016-2248-0
142. Yin K-J, Hamblin M, Chen YE. Angiogenesis-regulating microRNAs and ischemic stroke. *Curr Vasc Pharmacol.* 2015;13(3):352-365. doi:10.1016/j.physbeh.2017.03.040
143. Zhao H, Wang J, Gao L, et al. MiRNA-424 protects against permanent focal cerebral ischemia injury in mice involving suppressing microglia activation. *Stroke.* 2013;44(6):1706-1713. doi:10.1161/STROKEAHA.111.000504



144. Xu H, Cao Y, Yang X, et al. ADAMTS13 Controls Vascular Remodeling by Modifying VWF Reactivity during Stroke Recovery. *Blood*. 2017;130(1):11-22. doi:10.1182/blood-2016-10-747089
145. Pankratz F, Hohnloser C, Bemtgen X, et al. MicroRNA-100 suppresses chronic vascular inflammation by stimulation of endothelial autophagy. *Circ Res*. 2018;122(3):417-432. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311428
146. Chen KH, Chen CH, Wallace CG, et al. Intravenous administration of xenogenic adipose-derived mesenchymal stem cells (ADMSC) and ADMSC-derived exosomes markedly reduced brain infarct volume and preserved neurological function in rat after acute ischemic stroke. *Oncotarget*. 2016;7(46):74537-74556. doi:10.18632/oncotarget.12902
147. Kharitonova T, Mikulik R, Roine RO, et al. Association of early national institutes of health stroke scale improvement with vessel recanalization and functional outcome after intravenous thrombolysis in ischemic stroke. *Stroke*. 2011;42(6):1638-1643. doi:10.1161/STROKEAHA.110.606194
148. Nam HS, Lee KY, Han SW, et al. Prediction of long-term outcome by percent improvement after the first day of thrombolytic treatment in stroke patients. *J Neurol Sci*. 2009;281(1-2):69-73. doi:10.1016/j.jns.2009.02.365
149. Wouters A, Nysten C, Thijs V, Lemmens R. Prediction of outcome in patients with acute ischemic stroke based on initial severity and improvement in the first 24 h. *Front Neurol*. 2018;9:308. doi:10.3389/fneur.2018.00308
150. Enjeti AK, Ariyaratnam A, D'Crus A, Seldon M, Lincz LF. Circulating microvesicle number, function and small RNA content vary with age, gender, smoking status, lipid and hormone profiles. *Thromb Res*. 2017;156:65-72. doi:10.1016/j.thromres.2017.04.019
151. Taylor DD, Shah S. Methods of isolating extracellular vesicles impact downstream analyses of their cargoes. *Methods*. 2015;87:3-10. doi:10.1016/j.ymeth.2015.02.019
152. Prendergast EN, De Souza Fonseca MA, Dezem FS, et al. Optimizing exosomal RNA isolation for RNA-Seq analyses of archival sera specimens. *PLoS One*. 2018;13(5):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0196913

153. Konoshenko MY, Lekchnov EA, Vlassov A V., Laktionov PP. Isolation of Extracellular Vesicles: General Methodologies and Latest Trends. *Biomed Res Int.* 2018;2018: 8545347 doi:10.1155/2018/8545347
154. Tabb DL, Vega-montoto L, Rudnick PA, et al. Repeatability and Reproducibility in Proteomic Identifications by Liquid Chromatography—Tandem Mass Spectrometry. *J Proteome Res.* 2010;9(2):761-776. doi:10.1021/pr9006365

## **APÉNDICE**

## ESCALA NIHSS

**Tabla A 1**

*Representación de la puntuación en la escala NIHSS*

---

1a. Nivel de conciencia	0 Alerta. 1 Somnoliento 2 Obnubilación 3 Coma
1b. Nivel de conciencia: mes y edad	0 Responde bien ambas 1 Responde una pregunta 2 No responde ninguna pregunta
1c. Nivel de conciencia: órdenes	0 Realiza ambas correctamente 1 Realiza una correctamente 2 No realiza ninguna orden
2. Mirada horizontal	0 Normal 1 Parálisis parcial de la mirada 2 Parálisis total (desviación forzada)
3. Campo visual	0 Normal 1 Hemianopsia parcial 2 Hemianopsia completa 3 Hemianopsia bilateral
4. Parálisis facial	0 Normal, movimientos simétricos 1 Parálisis menor (asimetría al sonreír) 2 Parálisis parcial (macizo inferior) 3 Parálisis completa uni o bilateral
5. Fuerza en extremidades superiores (se puntúa cada lado)	0 Mantiene 10 segundos 1 Caer lentamente antes de 10 segundos 2 Esfuerzo contra gravedad. 3 Movimiento sin vencer gravedad 4 Ausencia de movimiento 9 No evaluable (amputación) no puntúa
6. Fuerza en extremidades inferiores (se puntúa cada lado)	0 Mantiene 5 segundos 1 Caer lentamente antes de 5 segundos 2 Esfuerzo contra gravedad 3 Movimiento sin vencer gravedad 4 Ausencia de movimiento 9 No evaluable (amputación) no puntúa

---

---

7. Ataxia de extremidades	0 No ataxia 1 Ataxia en una extremidad 2 Ataxia en dos extremidades
8. Sensibilidad	0 Normal 1 Déficit leve 2 Déficit total o bilateral
9. Lenguaje	0 Normal 1 Afasia moderada (comunicación) 2 Afasia grave (no comunicación)
10. Disartria	0 Normal 1 Leve o moderada (se comprende) 2 Grave (no se comprende), anartria, mudo
11. Extinción	0 Normal 1 Extinción en una modalidad 2 Extinción en más de una modalidad o hemiatención

---

**ESCALA DE RANKIN MODIFICADA****Tabla A 2***Representación de la puntuación en la Escala de Rankin Modificada*

Puntuación	Descripción
0	Asintomático
1	Síntomas o signos neurológicos, sin incapacidad.
2	Incapacidad leve de realizar alguna de sus actividades previas, que las realiza con dificultad, pero sin precisar ayuda.
3	Incapacidad moderada. Necesita alguna ayuda.
4	Incapacidad moderadamente grave. Sin necesidad de atención continua.
5	Incapacidad grave. Totalmente dependiente, necesitando asistencia constante día y noche
6	Muerte

**ESCALA DE FAZEKAS****Tabla A 3***Representación de la puntuación de la Escala de Fazekas*

---

Periventricular (PV score)
0 = ausente
1 = delgada, en “línea de lápiz”
2 = halo
3 = señal periventricular irregular que se extiende a la sustancia blanca profunda

---

Sustancia blanca profunda (DWM score)
0 = ausente
1 = focos puntiformes
2 = comienzo de confluencia
3 = extensas áreas confluentes

---

*PV score (puntuación periventricular), DWM score (puntuación sustancia blanca profunda, del inglés Deep White Matter).*

**ESCALA DE CHARLSON****Tabla A 4***Representación de la puntuación en la Escala de Comorbilidad de Charlson*

Infarto de Miocardio (se excluye cambios ECG sin antecedentes médicos)	<b>1</b>
Enfermedad coronaria	1
Insuficiencia cardíaca congestiva	1
Enfermedad Vascular Periférica (incluye Aneurisma de Aorta >6cm)	1
Enfermedad Cerebrovascular	1
Hipertensión arterial	1
Alcoholismo	1
Enfermedad tromboembólica	1
Arritmia	1
Demencia	1
EPOC	1
Enfermedad del tejido conectivo	1
Úlcus péptico	1
Hepatopatía leve (sin hipertensión portal, incluye hepatitis crónica).	1
Diabetes mellitus sin evidencia de afectación de órganos diana.	1
Hemiplejía	2
Enfermedad renal moderada-grave	2
Diabetes con afectación de órganos diana (retinopatía, nefropatía, etc)	2
Tumor sin metástasis (excluir si >5 años desde el diagnóstico).	2
Leucemia (Aguda o Crónica)	2
Linfoma	2
Enfermedad hepática moderada o grave	3
Tumor sólido con metástasis	6
SIDA (no únicamente VIH positivo).	6

*ECG (electrocardiograma), EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica), SIDA (síndrome de inmunodeficiencia adquirida), VIH (virus de la inmunodeficiencia humana)*



**MIRNA REFERENCIAS****Tabla A 5***MiRNAs y referencias*

miRNA (humano)	Referencia
hsa-miR-339-5p miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	YP00206007
hsa-miR-376a-3p miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	YP00204508
hsa-miR-29b-3p miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	YP00204679
hsa-miR-15a-5p miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	YP00204066
hsa-miR-424-5p miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	YP00204736
hsa-miR-369-3p miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	YP00206028
hsa-miR-1537-3p miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	YP00205994
hsa-miR-340-5p miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	YP00206068
hsa-miR-199a-3p miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	YP00204536
hsa-miR-100-5p miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	YP00205689
UniSp2 miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	YP00203950
cel-miR-39-3p miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	YP00203952
hsa-miR-451a miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	YP02119305
hsa-miR-23a-3p miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	YP00204772
hsa-miR-103a-3p miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	YP00204063
hsa-miR-30c-5p miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	YP00204783
hsa-miR-191-5p miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	YP00204306

**ANEXO**

Esta tesis ha dado lugar a la siguiente publicación:

**Similarities and Differences in Extracellular Vesicle Profiles between Ischaemic Stroke and Myocardial Infarction.** Otero-Ortega L, Alonso-López E, Pérez-Mato M, Laso-García F, Gómez-de Frutos MC, Diekhorst L, García-Bermejo ML, Conde-Moreno E, Fuentes B, Alonso de Leciana M, Armada E, Buiza-Palomino L, Díez-Tejedor E, Gutiérrez-Fernández M. *Biomedicines*. 2020 Dec 24;9(1):8. doi: 10.3390/biomedicines9010008. PMID: 33374290; PMCID: PMC7824002.