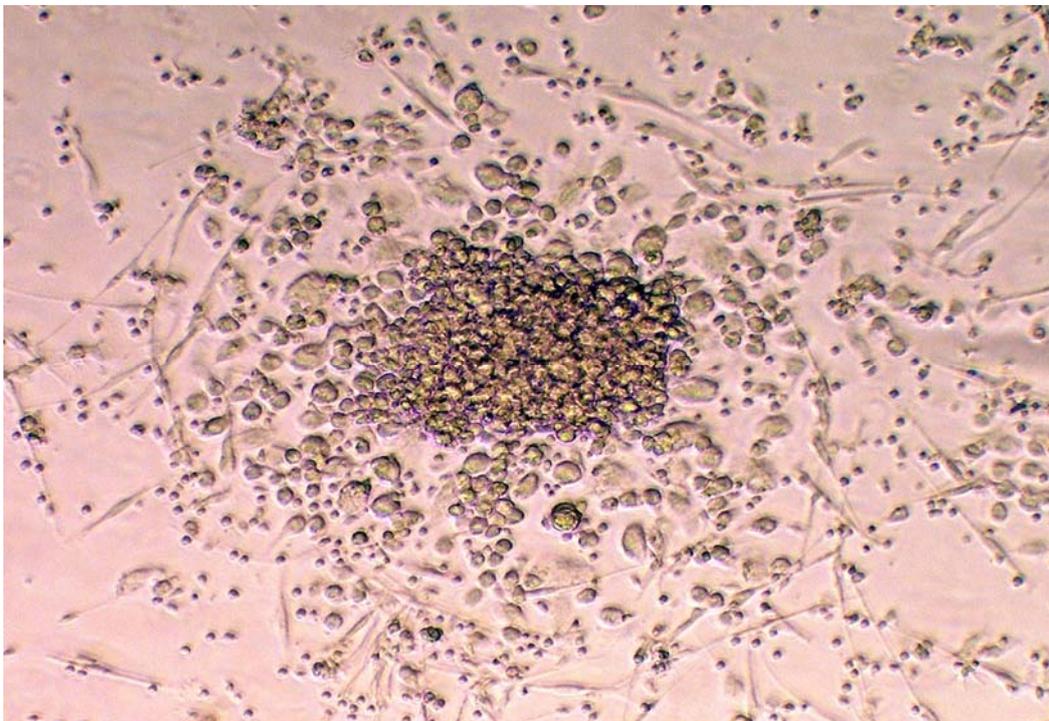




UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
Facultad de Medicina
Departamento de Medicina

**NEURORREPARACIÓN MEDIADA POR CÉLULAS
PROGENITORAS ENDOTELIALES EN EL ICTUS ISQUÉMICO:
INFLUENCIA DE FACTORES DE PROLIFERACIÓN Y
MIGRACIÓN CELULAR ENDÓGENOS**



Tesis doctoral
Tomás Sobrino Moreiras
2007

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA**

FACULTADE DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**NEURORREPARACIÓN MEDIADA POR
CÉLULAS PROGENITORAS
ENDOTELIALES EN EL ICTUS
ISQUÉMICO: INFLUENCIA DE
FACTORES DE PROLIFERACIÓN Y
MIGRACIÓN CELULAR ENDÓGENOS**

TESIS DOCTORAL

Tomás Sobrino Moreiras

2007

D. JOSÉ CASTILLO SÁNCHEZ, Catedrático de Neurología del Departamento de Medicina de la Universidad de Santiago de Compostela y Jefe de Sección de Neurología y de la Unidad de Ictus del Hospital Clínico Universitario de Santiago,

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado “ **NEURORREPARACIÓN MEDIADA POR CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES EN EL ICTUS ISQUÉMICO: INFLUENCIA DE FACTORES DE PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN CELULAR ENDÓGENOS**” ha sido realizada bajo mi dirección por el Licenciado en Biología Molecular **D. TOMÁS SOBRINO MOREIRAS** y se encuentra en condiciones de ser presentado y defendido como Tesis Doctoral ante el Tribunal correspondiente en la Universidad de Santiago de Compostela.

Santiago de Compostela, Enero de 2007

Prof. José Castillo Sánchez

Este trabajo ha sido financiado con subvenciones concedidas por: el Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2005-00359); la Consellería de Innovación e Industria de la Xunta de Galicia (PGIDIT06BTF91801PR); la Consellería de Educación y Ordenación Universitaria de la Xunta de Galicia (Programa de consolidación y estructuración de unidades de investigación competitivas, número de expediente 2006/80); la Fundación de Investigación Médica Mútua Madrileña; y por el Grupo Ferrer Internacional, S.A.

AGRADECIMIENTOS

Plasmar en un papel un conjunto de sentimientos de enorme gratitud, escrito por una persona instruida en ciencias puras, no es tarea fácil y, ya lo comprobaréis, poco aconsejable. Seguramente, este conglomerado de palabras carezca de metáforas y otras herramientas gramaticales esenciales a la hora de reflejar sentimientos, pero espero que las palabras que utilice a continuación realicen su único cometido, que no es otro que daros las gracias:

Cuando buscamos en un diccionario las distintas acepciones de la palabra **maestro**, podemos encontrar: persona que enseña un arte, una ciencia o un oficio; persona muy diestra o con profundos conocimientos en alguna materia; persona que ha adquirido una gran sabiduría o experiencia en una materia; y por último, persona que ha alcanzado un alto grado en su oficio. Ahora sé que cuando escriba que el Prof. José Castillo ha sido y será mi maestro en este mundillo de la investigación no estaré cometiendo un error gramatical. Pero lo que significa para mí el Prof. Castillo supera con creces el significado de la palabra maestro. Por ello, le agradezco enormemente la oportunidad que me ha ofrecido y me está ofreciendo, así como su amabilidad y acogida, su voto de confianza, sus consejos, su ayuda, e infinidad de detalles, la mayoría inmerecidos. Sinceramente, no encuentro las palabras adecuadas que expresen la enorme gratitud, admiración y cariño que tengo a Pepe Castillo.

Gran parte de mi agradecimiento va dirigido a las personas que cariñosamente llamo “clínicos”, por su gran acogida, su ayuda incondicional, su complicidad y amistad. Muchísimas gracias al Dr. Rogelio Leira, otro gran maestro, y a los Drs. Miguel Blanco y Manuel Rodríguez Yáñez, futuros maestros, así como a Isabel Jiménez. Con ellos he aprendido a dilucidar el significado de las distintas variables clínicas y a comprender la compleja y angustiosa realidad clínica y social que representan enfermedades como el ictus. Gracias por vuestros consejos, puntualizaciones, consideraciones y sobre todo amistad.

Gracias a los residentes de Neurología: Diego Santos, Xiana Rodríguez Osorio, Susana Arias y Ana Torea. Para prevenir cualquier tipo de perspicacia, debo decir que el orden de los citados se debe a aspectos puramente cronológicos, y como tal no altera el resultado. Muchas gracias por vuestra colaboración a la hora de incluir pacientes en los poco deseados protocolos del GPS.com. No debo olvidarme de dos antiguos compañeros, los Drs. Javier Abella y Jorge García.

Una dedicatoria especial debe ir dirigida a mis compañeros de laboratorio: Iván Cristobo, Raquel Rodríguez González, David Brea, Octavio Moldes, Jesús Agulla y a los Drs. Pedro Ramos y Olivia Hurtado; ellos son mis grandes colegas, confidentes y sobre todo amigos.

Gracias a toda la gente del GPS.com, especialmente a los Drs. Lizasoain, Moro, Dávalos, Serena, Vivancos, Castellanos, Nombela, Millán y Arenillas. Con ellos, y no a través de los bocetos informativos de las distintas administraciones públicas, he aprendido lo que significa la “Investigación Traslacional”, y que esta no es posible sin la amistad.

La dedicatoria más especial, sentida y emotiva es para mi familia, especialmente para mi mujer Laura. Si digo que es la persona más importante de mi vida suena a tópico; pero, cuando veo que es mi mayor confidente, mi mejor amiga, mi mejor consejera, mi mayor admiradora y la persona que más me da sin pedirme nada a cambio, entonces me doy cuenta que toda mi vida gira entorno a ella. Muchas gracias a mis padres y hermanos porque sé que son las personas que más me quieren y apoyan. Sin ellos nada de esto sería posible. A mi ahijado Brais que con su dulzura y al mismo tiempo picardía hace de la risoterapia el mejor tratamiento contra el estrés. A mis suegros y cuñadas, así como a mi abuela Esperanza, ya que son piezas imprescindibles en el engranaje de mi vida.

A todos vos,

.....GRACIÑAS

ÍNDICE

Abreviaturas y acrónimos	1
1. Introducción	3
1.1 Enfermedad cerebrovascular: ictus.....	5
1.1.1 Concepto.....	5
1.1.2 Epidemiología.....	5
1.1.3 Clasificación.....	7
1.1.4 Factores de riesgo vascular (FRV).....	12
1.1.4.1 Factores de riesgo no modificables.....	12
1.1.4.2 Factores de riesgo modificables.....	13
1.1.5 Fisiopatología del ictus isquémico.....	16
1.1.5.1 Factores relacionados con la isquemia cerebral.....	19
1.1.5.1.1 Hipoxia.....	19
1.1.5.1.2 Hipoglucemia.....	20
1.1.5.1.3 Flujo sanguíneo cerebral.....	20
1.1.5.1.4 Circulación colateral.....	23
1.1.5.2 Fisiopatología de la isquemia en el tejido cerebral.....	23
1.1.5.2.1 Isquemia en la sustancia gris.....	24
1.1.5.2.2 Isquemia en la sustancia blanca.....	32
1.1.5.3 Mecanismos fisiopatológicos del edema cerebral.....	34
1.1.5.4 Mecanismos bioquímicos de la progresión del ictus isquémico....	37
1.1.5.5 Inflamación en el ictus isquémico.....	40
1.1.5.6 Marcadores moleculares de utilidad diagnóstica y pronóstica....	43
1.2 Células Progenitoras Endoteliales.....	48
1.2.1 Definición y caracterización.....	48
1.2.2 Función y propiedades de las EPCs.....	50
1.2.2.1 EPCs y Reendotelización.....	50
1.2.2.2 EPCs y Neovascularización.....	51
1.2.3 Factores que influyen en el número de EPCs.....	53
1.2.3.1 Reclutamiento y movilización de EPCs.....	53
1.2.3.2 Autodirección y diferenciación de las EPCs.....	56
1.2.3.3 Influencia de los factores de riesgo vascular en las EPCs.....	58
1.2.3.4 Fármacos que aumentan la movilización y diferenciación de las EPCs	59
1.2.4 EPCs y enfermedad cerebrovascular.....	60
2. Hipótesis	61
3. Objetivos	65

4. Pacientes y métodos	69
4.1 Criterios de selección.....	71
4.1.1 Criterios de inclusión.....	72
4.1.2 Criterios de exclusión.....	72
4.1.3 Consentimiento informado.....	72
4.2 Descripción de parámetros analizados y técnicas.....	73
4.2.1 Evaluación clínica del ictus.....	74
4.2.1.1 Clasificación etiológica.....	75
4.2.1.2 Evaluación clínica.....	76
4.2.1.3 Valoración del tamaño del infarto.....	76
4.2.1.4 Evaluación pronóstica.....	76
4.2.2 Evaluación molecular.....	77
4.2.3 Evaluación celular.....	78
4.2.3.1 Extracción, conservación y procesamiento de las muestras.....	78
4.2.4 Método estadístico.....	82
5. Resultados	85
5.1 Análisis descriptivo.....	87
5.2 Análisis comparativos.....	89
5.2.1 Influencia del sexo y de los FRV en el número de CFU-EC al ingreso.....	89
5.2.2 Relación entre el número de CFU-EC y el pronóstico funcional a los 3 meses.....	91
5.2.3 Estudio de los Factores que condicionan un Incremento del número de CFU-EC ≥ 4 en la primera semana.....	96
5.2.4 Relación entre el número de CFU-EC y los marcadores moleculares endógenos de proliferación y migración celular.	100
5.2.5 Influencia de fármacos en fase aguda sobre el Incremento del número de CFU-EC en la primera semana.....	110
6. Discusión	117
7. Conclusiones	127
8. Bibliografía	131

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- ❖ AMPA: 2 - amino - 3 (hidroxi - 5 - metil - 5 - metilisoxazol - 4 - il) propionato.
- ❖ ATP: Trifosfato de adenosina.
- ❖ BDNF: Factor de crecimiento derivado del cerebro.
- ❖ Ca^{+2} : Calcio.
- ❖ CAD: Daño de la arteria coronaria.
- ❖ cAMP: Adenosina monofosfato cíclico.
- ❖ cFn: Fibronectina celular.
- ❖ CFU-EC: Unidades formadoras de colonias de células endoteliales.
- ❖ Cl⁻: Cloruro.
- ❖ CO₂: Dióxido de Carbono.
- ❖ dL: Decilitro.
- ❖ DNA: Ácido desoxirribonucleico.
- ❖ EAAT: Transportador de aminoácidos excitatorios.
- ❖ ELISA: Enzyme - Linked Immunosorbent Assay.
- ❖ EPCs: Células progenitoras endoteliales. Endothelial Progenitor cells.
- ❖ FSC: Flujo sanguíneo cerebral.
- ❖ FRV: Factores de riesgo vascular.
- ❖ G: Gramo.
- ❖ GAB: Descarboxilasa del ácido glutámico.
- ❖ GABA: Ácido gamma-aminobutírico.
- ❖ G-CSF: Factor estimulante de colonias de granulocitos.
- ❖ GM-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos.
- ❖ GMPc: Monofosfato de guanosina cíclico.
- ❖ H₂O₂: Peróxido de hidrogeno.
- ❖ H⁺: Protón.
- ❖ Hg: Mercurio.
- ❖ HSCs: Células madre hematopoyéticas. Hematopoietic stem cells.
- ❖ ICAM-1: Molécula de adhesión intracelular - 1.
- ❖ IL: Interleucina.
- ❖ K⁺: Potasio.
- ❖ mg: Miligramo.
- ❖ mGlu: Receptor de glutamato.
- ❖ min: minuto.
- ❖ mL: mililitro.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

- ❖ mm: milímetro.
- ❖ MMPs: Metaloproteasas de matriz.
- ❖ mRS: Escala de Rankin modificada. Modified Rankin Scale.
- ❖ Na⁺: Sodio.
- ❖ NGF: Factor de crecimiento neural.
- ❖ NIHSS: Escala de Ictus del National Institute of Health.
- ❖ NMDA: N – metil – D – aspartato.
- ❖ NO: Óxido nítrico.
- ❖ NOS: Sintasa del óxido nítrico.
- ❖ O₂⁻: Anión superóxido.
- ❖ OH·: Radical hidroxilo.
- ❖ ONOO⁻: Peroxinitrito.
- ❖ PAD: Presión arterial diastólica.
- ❖ PAS: Presión arterial sistólica.
- ❖ PECAM-1: Molécula de adhesión plaquetoesotelial – 1.
- ❖ PET: Tomografía por emisión de positrones.
- ❖ RM-DWI: Resonancia magnética de difusión.
- ❖ ROS: Especies reactivas de oxígeno.
- ❖ ROC: Del inglés, receiver operating characteristics.
- ❖ rpm: Revoluciones por minuto.
- ❖ r-tPA: Activador tisular del plasminógeno recombinante.
- ❖ SCF: Factor de células madre. Stem cell factor.
- ❖ SDF-1: Del inglés, stromal cell - derived factor – 1.
- ❖ TAC: Tomografía axial computarizada.
- ❖ TNF-α: Factor de necrosis tumoral alpha.
- ❖ μm: Micromoles.
- ❖ VCAM-1: Molécula de adhesión vascular 1.
- ❖ VEGF: Factor de crecimiento de endotelio vascular.
- ❖ VEGFR: Receptor del VEGF.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR: ICTUS.

1.1.1. CONCEPTO

La isquemia cerebral es el resultado de una disminución del flujo sanguíneo cerebral hasta un nivel suficiente como para provocar alteraciones metabólicas y bioquímicas que producen necrosis celular y alteran el funcionamiento del sistema nervioso. Dependiendo del territorio afectado hablamos de isquemia cerebral focal cuando existe un área de disminución de flujo limitada a una zona del encéfalo, y de isquemia cerebral global cuando se afecta la totalidad del tejido, como ocurre en el caso de paro cardíaco o shock prolongado.

La Organización Mundial de la Salud define ictus como el desarrollo clínico rápido de signos focales de alteración de la función cerebral sin otra causa aparente que no sea el origen vascular **(1)**.

1.1.2. EPIDEMIOLOGÍA

El ictus es una de las principales causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. Según la OMS representa la tercera causa de muerte y la primera de invalidez en la población adulta en el mundo. En España, según los datos del INE (Instituto Nacional de Estadística) correspondientes al año 2002, el ictus isquémico es la primera causa de

Neurorreparación mediada por Células Progenitoras Endoteliales en el Ictus Isquémico: influencia de Factores de Proliferación y Migración Celular Endógenos

Tomás Sobrino Moreiras

muerte en mujeres y la segunda en varones, suponiendo el 10% de la mortalidad global **(2)**. Mientras la mayoría de los países desarrollados muestran tasas estables de mortalidad por ictus, los países en desarrollo incrementan sus tasas anuales de prevalencia y mortalidad; 4.5 de los 10 millones de fallecimientos anuales por ictus pertenecen a los países no industrializados. En España, su incidencia es de 174 casos nuevos por 100.000 habitantes y año **(3)**, y su tasa de mortalidad de 97.7 por cada 100.000 habitantes y año, siendo ligeramente superior en mujeres (111.9 por 100.000 habitantes/año) que en hombres (82.9 por 100.000 habitantes/año) **(4)**.

El ictus es la primera causa de discapacidad en los adultos. De los supervivientes, aproximadamente el 31% necesita ayuda para realizar sus actividades de la vida diaria, el 20% necesita ayuda para caminar, el 16% requieren cuidados institucionales y hasta un 25% presentará después del ictus un deterioro cognitivo en mayor o menor grado. Todo ello conlleva a un gasto económico muy elevado, estimado en 41 billones de dólares al año en los Estados Unidos. Por esto, el ictus supone un auténtico problema de salud que obliga a establecer las mejores pautas de prevención y tratamiento para reducir su incidencia y el grado de discapacidad que origina. Además, teniendo en cuenta que la incidencia aumenta en personas mayores de 65 años y que, debido a la mejora en la calidad de vida, se está produciendo un incremento notable en la esperanza de vida y un envejecimiento progresivo de la

Tomás Sobrino Moreiras

población mundial, la prevalencia de esta enfermedad aumenta y consecuentemente también lo hace la magnitud del problema sociosanitario que supone.

1.1.3. CLASIFICACIÓN

Existen dos tipos principales de ictus: el isquémico, en el que un flujo sanguíneo inadecuado provoca un área circunscrita de infarto cerebral, y el hemorrágico, en el que una extravasación sanguínea en el parénquima cerebral o en el espacio subaracnoideo produce lesión y desplazamiento de las estructuras cerebrales. Los ictus isquémicos se dividen a su vez en ataques isquémicos transitorios e infartos cerebrales. Los ictus hemorrágicos se dividen en hemorragias intracerebrales y hemorragias subaracnoideas.

Los ataques isquémicos transitorios (AIT) se definen como la disfunción cerebral focal o monocular, con una duración de los síntomas inferior a 24 horas, causada por la alteración cualitativa o cuantitativa vascular debida a trombosis o embolia arterial en relación con enfermedad arterial, cardíaca o hematológica **(5)**.

El infarto cerebral está ocasionado por la alteración cualitativa o cuantitativa del aporte circulatorio a un territorio encefálico, que determina un déficit neurológico de más de 24 horas de duración, lo cual es expresión de una necrosis tisular.

Dependiendo del mecanismo de producción, el infarto cerebral se subdivide, según los criterios TOAST **(6)**, en:

- *Infarto aterotrombótico*: Presencia de estenosis igual o mayor al 50% del diámetro luminal u oclusión de una arteria extracraneal o intracraneal de gran calibre que supla la región clínicamente afectada, en ausencia de otra etiología.
- *Infarto cardioembólico*: Presencia de fuente embolígena inequívoca (trombo o tumor intracardíaco, estenosis mitral reumática, prótesis aórtica o mitral, endocarditis, fibrilación auricular, enfermedad del nodo sinusal, aneurisma ventricular izquierdo, infarto agudo de miocardio de menos de 3 meses de evolución, o presencia de hipocinesia cardíaca global o discinesia) en ausencia de otra etiología.
- *Infarto lacunar*: Infarto de menos de 15 mm de diámetro en el territorio de una arteria perforante cerebral, que suele ocasionar clínicamente un síndrome lacunar (síndrome motor, sensitivo, sensitivo-motor, hemiparesia ataxia, disartria-mano torpe), en ausencia de otra etiología.
- *Infarto de origen inhabitual*: infarto de pequeño, mediano o gran tamaño, de localización cortical o subcortical, en territorio carotídeo o vertebrobasilar, habiendo descartado origen aterotrombótico, cardioembólico o lacunar. Suele estar producido

Tomás Sobrino Moreiras

por enfermedades sistémicas (conectivopatías, infecciones, neoplasias, síndrome mieloproliferativo, alteraciones metabólicas o de la coagulación) o por otras enfermedades como disección arterial, displasia fibromuscular, aneurisma sacular, malformaciones arteriovenosas, trombosis venosa cerebral, vasculitis, migraña, etc.

- *Infarto de origen indeterminado*: Infarto cerebral en el que tras un exhaustivo estudio diagnóstico, han sido descartados los subtipos aterotrombótico, cardioembólico, lacunar o inhabitual, o bien coexista más de una posible etiología. En este caso se pueden subdividir en indeterminado por estudio incompleto, por más de una etiología o por causa desconocida.

Según la clasificación OCSP (Oxfordshire Community Stroke Project) **(7)** los infartos cerebrales se dividen en función de su localización clínica en:

- *Infarto total de la circulación anterior* o *TACI* (Total anterior circulation infarction): Cuando se cumplen estos tres criterios:
 1. Disfunción cerebral superior (afasia, disclaculia o alteraciones viso espaciales).
 2. Déficit motor y/o sensitivo en al menos dos extremidades (valorando cara, brazo y pierna).
 3. Hemianopsia homónima.

- *Infarto parcial de la circulación anterior* o *PACI* (Partial anterior circulation infarction): Cuando se cumple alguno de los siguientes criterios:
 1. Disfunción cerebral superior (afasia, disclaculia o alteraciones visoespaciales); o
 2. Cuando se cumplen 2 de los 3 criterios de TACI; o
 3. Déficit motor y/o sensitivo más restringido que el clasificado como LACI (déficit limitado a una sola extremidad, o a cara y mano pero sin afectación del resto del brazo).

- *Infartos lacunares* o *LACI* (Lacunar infarction): Cuando no existe disfunción cerebral superior ni hemianopsia y se cumple uno de los siguientes criterios:
 1. Hemisíndrome motor puro que afecte al menos a dos extremidades (valorando cara, brazo y pierna).
 2. Hemisíndrome sensitivo puro que afecte al menos a dos extremidades (valorando cara, brazo y pierna).
 3. Hemisíndrome sensitivo-motor que afecte al menos a dos extremidades (valorando cara, brazo y pierna).
 4. Hemiparesia-ataxia ipsilateral.
 5. Disartria-mano torpe u otro síndrome lacunar.

Tomás Sobrino Moreiras

- *Infartos de la circulación posterior* o *POCI* (Posterior circulation infarction): Cuando se cumple alguno de los criterios siguientes:
 1. Afectación ipsilateral de pares craneales con déficit motor y/o sensitivo contralateral.
 2. Déficit motor y/o sensitivo bilateral.
 3. Patología oculomotora.
 4. Disfunción cerebelosa sin déficit de vías largas ipsilaterales.
 5. Hemianopsia homónima aislada.

En la **figura 1** se muestra la correlación en neuroimagen de los distintos tipos de infartos cerebrales según la clasificación OCSP.

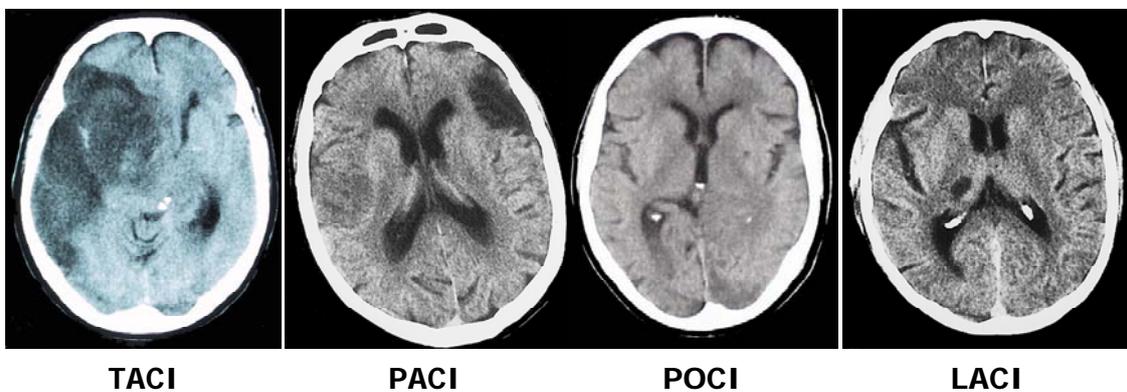


Figura 1. Tipos de infartos cerebrales según su localización clínica (clasificación OCSP).

En cuanto a los ictus hemorrágicos, constituyen el 20 % de las enfermedades cerebrovasculares. Consisten en la extravasación de sangre dentro de la cavidad craneal, secundaria a la rotura de un vaso

sanguíneo, arterial o venoso. A su vez, se pueden dividir en hemorragia intracerebral o hemorragia subaracnoidea (8). Dentro de las hemorragias intracerebrales se pueden distinguir la hemorragia intraventricular primaria y la hemorragia parenquimatosa, a su vez subdividida en lobar, profunda, troncoencefálica o cerebelosa.

1.1.4. FACTORES DE RIESGO VASCULAR (FRV)

Los factores de riesgo para el ictus cerebral se clasifican en factores que no se pueden modificar (como el sexo, la edad o la raza), y factores modificables, y por lo tanto prevenibles. Dentro de los factores modificables los más frecuentes son la hipertensión arterial (52.1%), la fibrilación auricular (27.4%), la diabetes mellitus (20%), la hiperlipemia (16.8%), el infarto cerebral previo (16.4%), la cardiopatía isquémica (13.3%), el ataque isquémico transitorio (12.4%), el tabaquismo (11.5%) y la arteriopatía periférica (7.8%) (9).

1.1.4.1. Factores de riesgo no modificables:

- *Edad:* El envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo para el la enfermedad cerebrovascular. La incidencia del ictus aumenta exponencialmente con la edad, alcanzando sus valores máximos por encima de los 65 años.

Tomás Sobrino Moreiras

- *Sexo:* Se ha visto que los varones tienen mayor incidencia de ictus que las mujeres.
- *Raza:* La ateromatosis de grandes vasos afecta con mayor frecuencia a los individuos de raza caucásica, mientras que la patología de pequeño vaso es más frecuente en africanos y asiáticos.
- *Herencia y genética:* Existe una clara predisposición familiar a padecer ictus, tanto por vía materna como paterna. Puede ser que esta tendencia se deba a la asociación de los factores de riesgo fundamentales, como son la hipertensión arterial, la diabetes mellitus y la hipercolesterolemia. Sin embargo, sobre todo en personas jóvenes, en ocasiones el único antecedente que se recoge es un familiar de primer grado afecto de ictus.

1.1.4.2. Factores de riesgo modificables:

- *Hipertensión arterial:* Es el principal factor de riesgo para cualquier tipo de ictus, tanto isquémico como hemorrágico. Todos los tipos de hipertensión, tanto sistólica como diastólica o combinada, incrementan el riesgo de ictus a partir de cifras moderadas. Cifras de tensión arterial sistólica en torno a 140-160 mm Hg o diastólica de 90-94 mm Hg incrementan el riesgo de ictus en 1.5 veces.

- *Cardiopatía:* Las enfermedades cardíacas tienen una clara asociación con los ictus, especialmente la fibrilación auricular, las valvulopatías, el infarto de miocardio, la hipertrofia ventricular izquierda y la cardiomegalia.
- *Diabetes mellitus:* Se ha estimado que el riesgo de ictus en pacientes diabéticos aumenta 1.8 veces en varones y en 2.2 veces en mujeres. La diabetes predispone a los ictus isquémicos debido a su influencia en el desarrollo de aterosclerosis.
- *Hiperlipemia:* La hiperlipemia favorece el desarrollo de la ateromatosis y de la isquemia, tanto coronaria como carotídea.
- *Tabaquismo:* El consumo de cigarrillos predispone a la aparición de aterosclerosis en hombres y mujeres, con un incremento del riesgo de 2-3 veces. El tabaco facilita el espasmo arterial y el daño endotelial. Se ha visto que este riesgo añadido del tabaco desaparece tras cinco años de abstinencia.
- *Otros factores:* El sedentarismo, la obesidad, el ronquido nocturno, el síndrome de apneas del sueño, los anticonceptivos orales y el consumo excesivo de alcohol también se han relacionado con un incremento del riesgo de ictus.

Para ver cuales son los factores de riesgo que más influyen en la enfermedad cerebrovascular, es importante conocer su prevalencia y su riesgo relativo, ya que un factor con un riesgo relativo elevado, puede tener poca relevancia si no es muy frecuente. En la **tabla 1** se resumen

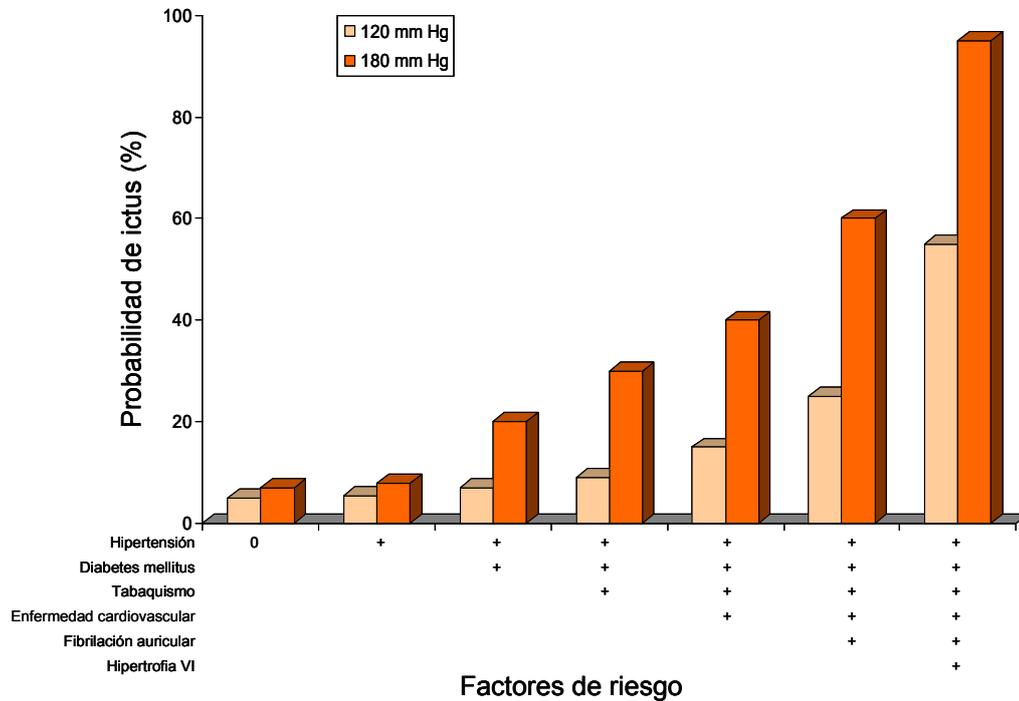
Tomás Sobrino Moreiras

la prevalencia y el riesgo relativo de los principales factores modificables.

Factor de riesgo	Prevalencia (%)	Riesgo relativo
Hipertensión arterial	25 a 40	x 3 a 5
Fibrilación auricular	1 a 2	x 5 a 18
Dislipemia	6 a 40	x 1 a 2
Tabaquismo	20 a 40	x 1.5 a 2.5
Diabetes mellitus	4 a 20	x 1.5 a 3
Alcoholismo	5 a 30	x 1 a 3
Inactividad física	20 a 40	x 2.7

Tabla 1. Prevalencia y riesgo relativo de los principales factores de riesgo modificables para el ictus.

Otra peculiaridad importante es la asociación de diferentes factores de riesgo, ya que a medida que se van sumando, el riesgo de padecer un ictus aumenta de manera exponencial. En la **gráfica 1** se resumen los resultados de un estudio en el que ha sido valorada la probabilidad de desarrollar un ictus a los 10 años, en relación con la asociación de diferentes factores de riesgo en hombres de 70 años **(9)**. Los datos se muestran en relación a dos niveles de presión arterial, 120 mm Hg y 180 mm Hg.



Gráfica 1. Probabilidad de desarrollar ictus a los 10 años a dos niveles de presión arterial. Impacto de otros factores de riesgo en varones de 70 años. (*Stroke 1991; 22: 312-318*).

1.1.5. FISIOPATOLOGÍA DEL ICTUS ISQUÉMICO

La isquemia cerebral se origina por la disminución del flujo sanguíneo hasta un nivel suficiente capaz de interferir con la función del sistema nervioso. Este proceso es el resultado de una alteración del equilibrio de numerosos factores hemodinámicos, lo cual puede producir una serie de alteraciones metabólicas y bioquímicas en las neuronas y en la glía, que conducirán a la necrosis celular **(11)**.

Cuando se obstruye un vaso sanguíneo cerebral se produce un gradiente de perfusión sanguínea. La disminución del flujo sanguíneo

Tomás Sobrino Moreiras

cerebral (FSC) en una determinada zona de tejido cerebral por debajo de 10 mL/100 g/min produce una rápida muerte neuronal **(12)**. Sin embargo, entre este núcleo intensamente isquémico y el parénquima normalmente perfundido (FSC > 50 mL/100 g/min), existe una zona moderadamente hipoperfundida, cuya extensión depende del mejor o peor funcionamiento de la circulación colateral **(13, 14)**. Estudios recientes de tomografía por emisión de positrones (PET) han logrado diferenciar en la zona hipoperfundida dos regiones con pronóstico claramente diferenciado: una ligeramente hipoperfundida (FSC > 22 mL/100 g/min) en la que la transformación en infarto sólo sucede en circunstancias especialmente adversas (zona oligohémica), y otra, denominada de penumbra isquémica **(15, 16)**, con una perfusión cerebral críticamente disminuida (FSC < 22 mL/100 g/min), pero en la que el consumo de oxígeno es todavía suficiente para preservar la supervivencia tisular (perfusión de miseria) **(figura 2)**. Sin embargo, la penumbra isquémica no tiene que estar necesariamente alrededor de una zona de necrosis neuronal, sino que puede constituir por sí misma un territorio cerebral con aporte sanguíneo comprometido pero con un metabolismo energético preservado **(17)**.

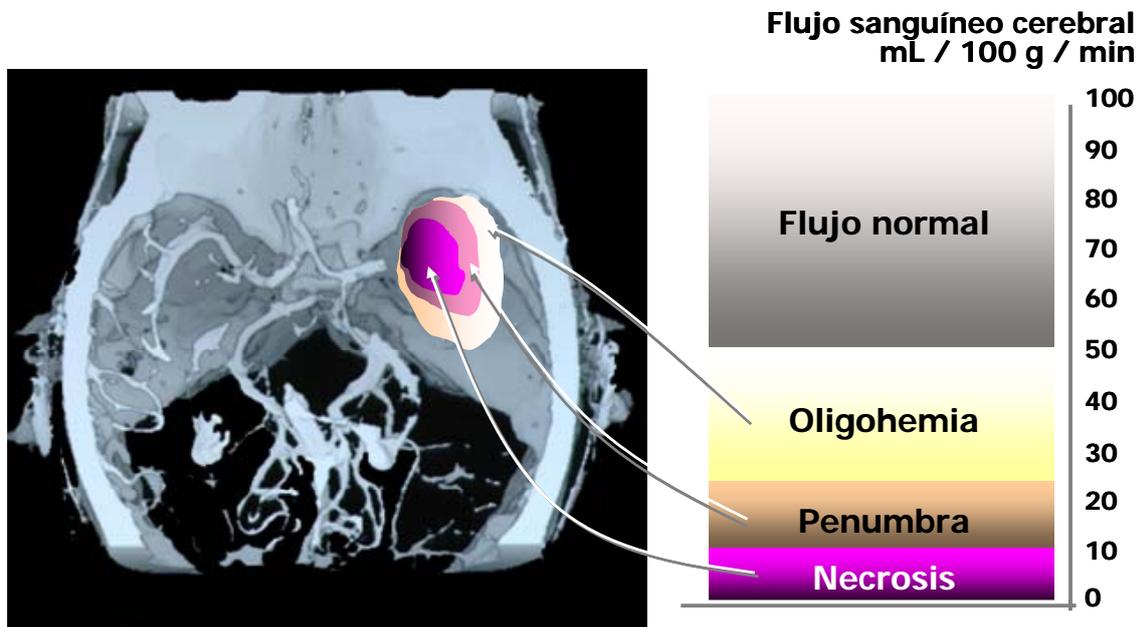


Figura 2. Zonas de tejido cerebral en relación al flujo sanguíneo tras la obstrucción de un vaso.

La penumbra isquémica se define como el tejido cerebral en el cual el flujo sanguíneo cerebral ha disminuido hasta el punto de causar silencio electrofisiológico y pérdidas pasajeras pero recurrentes de los gradientes de membrana y metabolitos energéticos **(18)**. En la penumbra isquémica hay alteración de la actividad funcional de las neuronas, pero se conserva una actividad metabólica mínima que preserva la integridad estructural durante algún tiempo. En esta zona el tejido resulta dañado, se altera el mecanismo de autorregulación, se mantiene parcialmente la reactividad al CO_2 , la transmisión sináptica y el contenido de ATP son normales y disminuye el contenido de glucosa. Esto produce la aparición de síntomas neurológicos, pero no de daños irreversibles **(11)**. Lo importante, y que constituye la base para el

Tomás Sobrino Moreiras

tratamiento de la isquemia cerebral, es que las neuronas de la penumbra isquémica sobreviven, y podrán recuperarse cuando se mejoren las condiciones hemodinámicas y se restaure el flujo sanguíneo cerebral que aporte de nuevo la glucosa y el oxígeno necesarios **(19)**.

1.1.5.1. Factores relacionados con la isquemia cerebral

Existen diferentes factores que pueden condicionar la aparición de un infarto cerebral, como la hipoxia, la hipoglucemia, las alteraciones del flujo sanguíneo cerebral o el estado de la circulación colateral.

1.1.5.1.1. Hipoxia

Un descenso moderado en la presión parcial de oxígeno conlleva un ligero aumento del flujo cerebral, pero cifras inferiores a 40 mm Hg producen confusión, y cifras por debajo de 20 mm Hg ocasionan coma.

La hipoxia aislada, sin la presencia de acidosis o isquemia simultáneas, no ocasiona daño cerebral agudo **(20)**. Sin embargo, los efectos de la hipoxia son potenciados por la presencia simultánea de hipotensión arterial, como ocurre durante el shock o la parada cardiorrespiratoria. Cuando se produce esta situación durante unos minutos, se produce un daño cerebral irreversible, con afectación

fundamentalmente de la sustancia gris de los territorios arteriales más distales o de las zonas fronterizas **(21)**.

1.1.5.1.2. Hipoglucemia

La hipoglucemia es responsable de la aparición de alteraciones funcionales y estructurales en el sistema nervioso central, originando confusión con cifras inferiores a 20 mg/dL, o coma por debajo de 10 mg/dL. Inicialmente el cerebro consume los depósitos de glucosa y glucógeno, sin llegar a producir secuelas neurológicas, siendo la situación reversible. Al cabo de un tiempo, el cerebro empieza a consumir otras sustancias, apareciendo lesiones estructurales, con necrosis neuronal selectiva, preservando el tejido glial **(22)**.

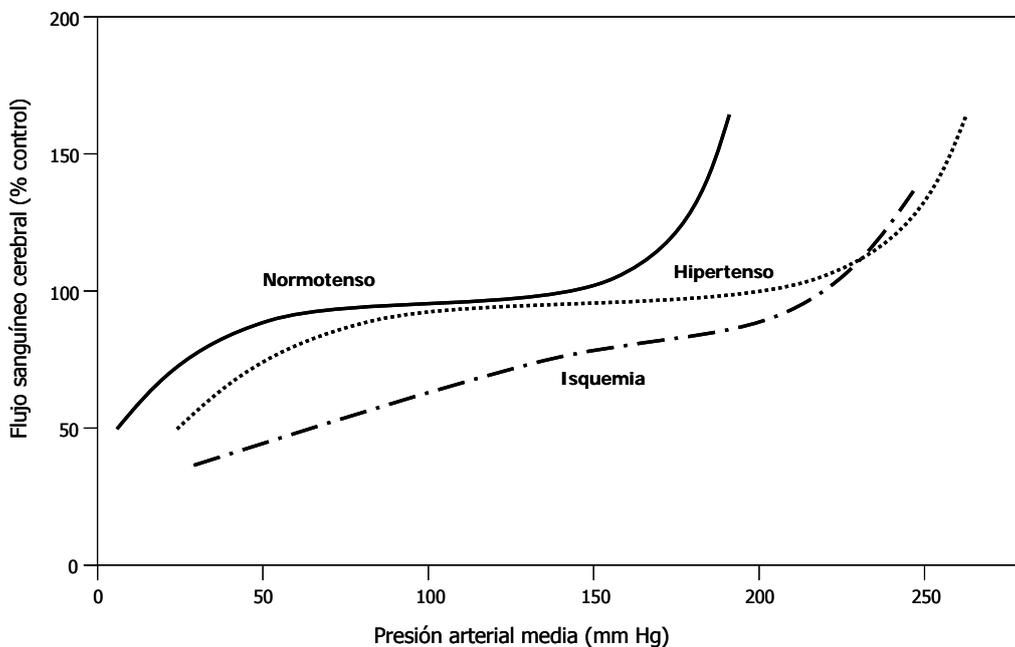
1.1.5.1.3. Flujo sanguíneo cerebral

El flujo sanguíneo cerebral es una variable que depende del gradiente de presión de la perfusión sanguínea y de la resistencia vascular, que depende a su vez de la viscosidad de la sangre y del diámetro de los vasos sanguíneos. Estas variables se pueden afectar de forma compleja durante el desarrollo del infarto cerebral. La presión de perfusión cerebral está determinada por la diferencia entre la presión media de las arterias cerebrales y las presiones intracraneal y venosa **(23)**. En condiciones fisiológicas la presión venosa y la presión

Tomás Sobrino Moreiras

intracraneal son muy pequeñas, por lo que la presión de perfusión cerebral es equiparable a la presión sanguínea de las arterias de mediano calibre. Cuando se produce hipertensión intracraneal, trombosis venosa o respiración artificial se modifica de manera importante la presión de perfusión cerebral, lo que puede condicionar la aparición de infartos cerebrales.

En situaciones fisiológicas, la regulación del flujo sanguíneo cerebral es independiente de variaciones amplias de la presión de arterial, gracias a un complejo mecanismo de autorregulación de la circulación cerebral (**gráfica 2**), en el que intervienen factores miogénicos, bioquímicos, neurogénicos y peptidérgicos (**11**).



Gráfica 2. Autorregulación del flujo sanguíneo cerebral normal, en pacientes hipertensos y en el tejido isquémico.

En pacientes hipertensos, la curva de autorregulación se desplaza a la derecha, por lo que los límites superior e inferior de la autorregulación se desplazan hacia presiones medias más altas. Durante la isquemia cerebral se produce una alteración de los mecanismos de autorregulación del flujo cerebral. Dicho mecanismo desaparece en el territorio isquémico y la presión de perfusión se hace dependiente de la tensión arterial (esta falta de regulación aparece con disminuciones superiores al 40% del flujo cerebral). Esta dependencia es más intensa con la disminución de la tensión arterial que con el aumento, debido a que en el tejido isquémico la presión de perfusión está por debajo del límite inferior de la capacidad autorregulatoria del lecho vascular, y por esta razón los vasos están dilatados al máximo. Una disminución de la presión arterial, en este caso, no puede compensarse con una mayor reducción de la resistencia vascular **(24)**.

Durante el infarto cerebral también se altera la regulación funcional, y se produce una abolición de la reactividad al CO₂ en el centro del territorio afectado. En algunas ocasiones se produce una disminución del flujo al aumentar la concentración de CO₂ por un fenómeno de “robo intracerebral” originado por la vasodilatación de las arterias normales como respuesta a la hipercapnia, que roba sangre del tejido isquémico donde los vasos ya están dilatados al máximo **(25)**. El área con abolición del mecanismo de autorregulación en la isquemia cerebral focal es mayor que la zona de arreactividad al CO₂. Esto origina

Tomás Sobrino Moreiras

en la periferia del infarto un desequilibrio entre el control hemodinámico y metabólico responsable de la “circulación de lujo” cerebral aumentado por encima de las necesidades titulares de oxígeno, lo que conduce a una extracción de oxígeno reducida y a la aparición de una red de sangre venosa **(26)**.

1.1.5.1.4. Circulación colateral

El cerebro se protege contra la isquemia focal mediante la circulación colateral, que constituye un factor adicional de seguridad en la vascularización del cerebro.

La principal anastomosis a nivel extracraneal está situada entre las dos carótidas primitivas. Entre la circulación intracraneal y la carótida externa se establece una comunicación a través de la arteria oftálmica. Dentro de la circulación intracraneal se establecen comunicaciones por medio del polígono de Willis y a través de las anastomosis leptomeníngicas.

1.1.5.2. Fisiopatología de la isquemia en el tejido cerebral

El cerebro consume una tercera parte de su energía en el mantenimiento de la transmisión sináptica, otra tercera parte en el transporte de iones y otro tercio en la preservación de su integridad estructural. Cuando disminuye la perfusión cerebral, se alteran

progresivamente estas funciones, hasta conducir a la muerte celular. Sin embargo, no todas las neuronas reaccionan de la misma manera a la isquemia, existiendo una vulnerabilidad selectiva en relación con la densidad neuronal. Las neuronas de la corteza cerebral, del hipocampo, núcleo amigdalino y cerebelo son más sensibles a la isquemia que el resto de las neuronas o las células gliales, y sufren cambios estructurales de manera más precoz **(27)**.

La mayoría de los infartos cerebrales se produce en la sustancia gris, pero hasta un 20% de los casos se produce en la sustancia blanca como consecuencia de la oclusión de una arteria perforante **(28)**. La fisiopatología de la isquemia cerebral es diferente en la sustancia gris y en la sustancia blanca del cerebro, debido a que ésta no contiene cuerpos neuronales ni sinapsis, pero sí axones mielinizados con una compleja estructura especializada **(29)**.

1.1.5.2.1. Isquemia en la sustancia gris

La hipoxia produce una disminución del ATP, lo que ocasiona un fallo en las bombas de Na^+ y K^+ , con lo que se origina una rápida depleción del K^+ intracelular, con la consecuente despolarización neuronal. Este hecho es responsable de la apertura de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes y el desbloqueo de algunos canales de Ca^{2+} receptor-dependientes, produciendo un incremento de la concentración

Tomás Sobrino Moreiras

de Ca^{2+} intracelular de aproximadamente el doble de su valor, que aunque no es capaz de producir la muerte neuronal por sí sola, lo es de originar una despolarización de la membrana **(12, 13, 30, 31)**. Esto produce una cascada citotóxica en la que intervienen diferentes sustancias, desencadenando una respuesta inflamatoria.

Glutamato

El fallo energético y la consecuente despolarización de la membrana neuronal condiciona el aumento de la liberación de cantidades excesivas de glutamato y otros aminoácidos excitadores **(30, 31)**. Esto se debe, en parte, a la inversión de los transportadores de glutámico **(32)**. Existen 5 transportadores de glutamato, 2 gliales (EAAT1 y EAAT2), y 3 neuronales (EAAT3, EAAT4 y EAAT5). Estos transportadores intercambian Na^+ e H^+ por K^+ , y recaptan glutamato hacia el interior de la célula, a través de un mecanismo dependiente de energía. Tras la caída de ATP, los transportadores neuronales de glutamato dejan de recaptar, por lo que aumenta la concentración extracelular de glutamato, que estimula receptores de membrana ionotrópicos (fundamentalmente AMPA y NMDA) y receptores metabotrópicos. La estimulación del receptor AMPA produce una mayor despolarización de membrana al aumentar la concentración intracelular de Na^+ , induciendo la liberación de más glutamato, lo que produce

edema celular y abre canales no específicos voltaje-dependientes permeables al Ca^{2+} . La estimulación de los receptores NMDA es responsable del aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular, desencadenando la cascada isquémica que conducirá a la muerte neuronal (**figura 3**).

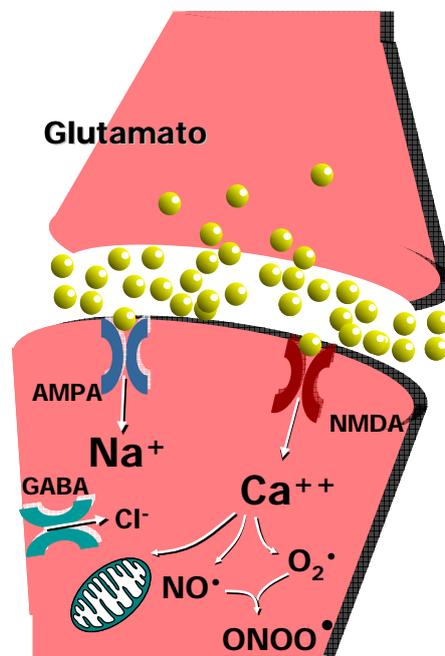


Figura 3. Acción del glutamato. Estimulación de los receptores AMPA y NMDA.

El papel de los receptores metabotrópicos no está totalmente aclarado. Existen tres grupos de receptores metabotrópicos distintos para el glutamato: Grupo I (mGlu1a, b, c, d, e y mGlu5a, b), cuya activación libera Ca^{2+} intracelular y activa la protein-quinasa C; Grupo II (mGlu2 y mGlu3), que reduce la formación de AMPc y el Grupo III

Tomás Sobrino Moreiras

(mGlu4a, b, mGlu6, mGlu7a, b y mGlu8a, b), que disminuye la concentración intracelular de Ca^{2+} y GMPc. El estímulo de los receptores del grupo I aumenta la liberación de glutámico, mientras que el estímulo de los receptores del grupo II y III la disminuye.

Sustancias reactivas de oxígeno

La elevación de la concentración intracelular de Ca^{2+} es un factor clave en el desarrollo del daño neuronal irreversible. El aumento del Ca^{2+} intracelular activa una serie de enzimas (proteínquinasas, proteasas, endonucleasas, proteínfosfatasas y sintasa de óxido nítrico) y condiciona la expresión de varios genes de respuesta inmediata **(33)**.

En la isquemia cerebral, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede exceder la capacidad antioxidante de las neuronas, provocando alteraciones de algunos constituyentes celulares, como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Las ROS responsables del estrés oxidativo de las neuronas son los radicales libres como el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y el óxido nítrico (NO^{\bullet}), y otras especies reactivas que no son radicales libres, pero son sustancias muy tóxicas, como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el peroxinitrito (ONOO^-) **(34)**.

El anión superóxido se genera a través de múltiples vías metabólicas, e inicia la cascada del estrés oxidativo en la isquemia

cerebral. La activación del receptor NMDA estimula la fosfolipasa A₂, liberando ácido araquidónico, prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos. Durante el metabolismo del ácido araquidónico se forma el O₂^{•-}, que estimula de nuevo la fosfolipasa A₂, estableciendo un sistema de retroalimentación positiva. También se puede generar O₂^{•-} por otros mecanismos, como la conversión de la xantina-deshidrogenasa en xantina-oxidasa, los neutrófilos infiltrados y las mitocondrias dañadas. El O₂^{•-} se produce en el interior de la neurona, y allí es donde actúa, ya que es incapaz de atravesar la membrana neuronal. Sin embargo, mediante la actuación del enzima superóxido dismutasa, el O₂^{•-} se transforma en H₂O₂, que difunde fácilmente en la célula donde se origina y en las neuronas situadas en la proximidad **(34)**.

El óxido nítrico (NO[•]) es un gas inorgánico permeable, difusible, con gran capacidad reactiva **(35)**. Se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina por medio del enzima sintetasa del óxido nítrico (NOS). En condiciones normales, el NO[•] actúa como mensajero neuronal, pero en situaciones especiales como la isquemia, se origina una elevada producción de NO[•], que se ha puesto en relación con mecanismos antagónicos de neurotoxicidad y de neuroprotección. La acción diferente del incremento del NO[•] depende del tipo de NOS que actúe. Existen tres isoformas del enzima NOS: la neuronal (nNOS), la endotelial (eNOS) y una forma inmunológicamente inducida (iNOS). El aumento de NO[•]

Tomás Sobrino Moreiras

producido por la acción de la nNOS produce una lesión neuronal inmediata, mientras que el producido por la iNOS contribuye al daño neuronal retardado. Sin embargo, la producción de NO• mediada por la eNOS actúa como neuroprotector, al inducir la relajación de la fibra muscular lisa y el mantenimiento del flujo sanguíneo cerebral (36).

La formación de NO• interviene en la excitotoxicidad por estímulo del NMDA (37, 38). En situaciones de isquemia, la activación de los receptores NMDA y la entrada de Ca²⁺ estimula la nNOS, produciendo un aumento de la síntesis de NO•.

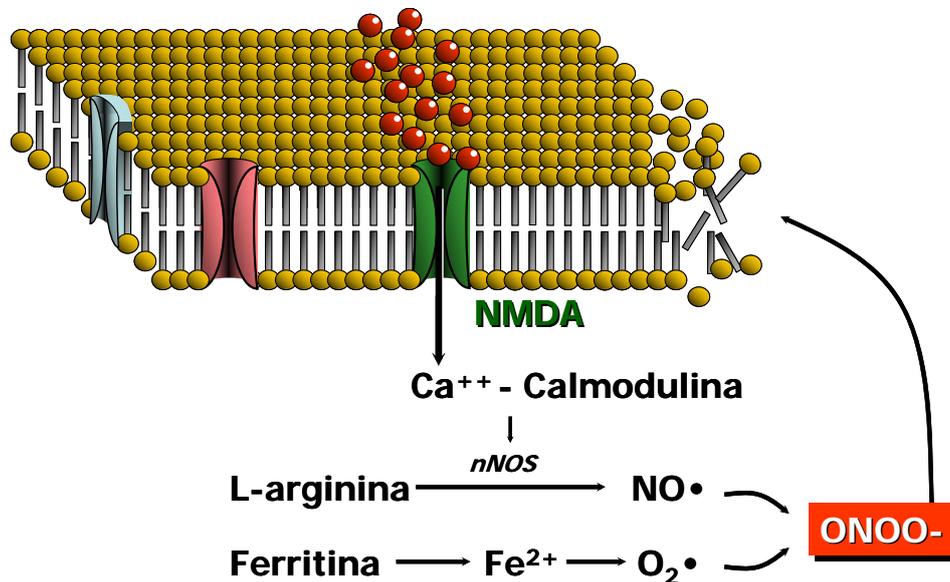


Figura 4. Acción del NO• sobre la membrana celular.

La toxicidad del NO• depende de su reacción con el O₂• (figura 4). Cuando se forma NO• en presencia de O₂• se origina el anión

ONOO⁻, que es el responsable directo de la lisis neuronal, al reaccionar con grupos sulfidrilo, proteínas, lípidos y con los ácidos nucleicos **(39)**.

Glicina y GABA

Durante la isquemia cerebral, además del glutamato, aparecen otros neurotransmisores en el espacio extracelular, principalmente la glicina y el ácido γ -aminobutírico (GABA).

La glicina es un coactivador del receptor NMDA. Su excesiva liberación durante la isquemia origina un aumento de la estimulación del receptor, ocasionando un mayor daño neuronal **(40)**.

El GABA ejerce una acción inhibitoria. Los niveles de GABA en el cerebro son controlados por el enzima descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), que sintetiza GABA a partir del glutamato, y por el enzima GABA-transaminasa (GABA-T), que lo degrada. El GABA actúa a través de dos receptores, el GABA-A, más abundante en la sustancia gris, y el GABA-B, más activo en sustancia blanca. El receptor GABA-A es ionotrópico, y su estimulación condiciona la entrada de Cl⁻ en el interior de la neurona, facilitando su repolarización. El receptor GABA-B es metabotrópico, acoplado a la proteína G, que actúa a través de un segundo mensajero modificando la conductancia del Ca²⁺ y del K⁺.

Durante la isquemia cerebral se produce un aumento de la síntesis del GABA, por un lado favorecido por el aumento de la

Tomás Sobrino Moreiras

concentración de glutamato (por el aumento de actividad del GAD, que es independiente del ATP y más activo en presencia de acidosis) y por otro debido a la inhibición del enzima GABA-T (más activa en presencia de alcalosis). A su vez, la despolarización de la membrana neuronal producida por la isquemia, conduce a la liberación del GABA en el espacio extracelular, donde alcanza niveles hasta 250 veces superior que en condiciones fisiológicas.

Apoptosis

La muerte neuronal que se produce en la zona de penumbra isquémica es también, en parte, el resultado de un proceso apoptótico. La lesión del DNA que se produce por las endonucleasas o las ROS, inicia un complejo mecanismo de autodestrucción en el que se produce una alteración de la expresión génica **(41)**, en el que están implicadas las mitocondrias **(42)**. Reducciones moderadas del ATP mitocondrial originan la liberación de caspasas, citocromo-c y de un factor de inducción de la apoptosis, que actúa como iniciadores de la muerte neuronal apoptótica **(43)**.

También se ha relacionado a la apoptosis con una forma de neuroprotección fisiológica, como la tolerancia isquémica. En las neuronas de la zona de penumbra isquémica, que sobreviven al daño isquémico inicial, la estimulación del receptor NMDA y el aumento de la

concentración intracelular de Ca^{2+} , activan a una familia de genes de respuesta inmediata (c-fos, c-jun), que pueden regular la síntesis proteica en otros genes efectores. Esta síntesis proteica (proteínas de estrés, factores de crecimiento neuronal, factor de necrosis tumoral- α , etc.) puede ejercer un papel promotor de la supervivencia y recuperación neuronal, o bien activar la muerte celular programada o apoptosis **(44)**.

1.1.5.2.2. Isquemia en la sustancia blanca

Aunque la entrada de Ca^{2+} es el factor común de la lesión isquémica, tanto en la sustancia gris como en la sustancia blanca, las vías que conducen a este proceso son diferentes **(28)**. Por un lado, la sustancia blanca hemisférica es menos sensible a la hipoxia/isquemia que la sustancia gris, sin embargo, la sustancia blanca es mucho más sensible a la anoxia. Además, la hipótesis excitotóxica, que está más que demostrada en la sustancia gris, posiblemente es mucho menos importante en la sustancia blanca, la cual no tiene sinapsis ni las complejas estructuras pre y post-sinápticas, donde actúan el glutamato y otros aminoácidos neuroexcitadores.

En situaciones fisiológicas, los astrocitos desarrollan una actividad fundamental para controlar la acción neurotransmisora del glutamato. La recaptación del glutamato por parte de los astrocitos se

Tomás Sobrino Moreiras

realiza por medio de diferentes transportadores (fundamentalmente EAAT1 y EAAT2), que consiguen concentraciones de glutamato dentro de los astrocitos entre 3000 y 10000 veces superiores a las del espacio extracelular **(45)**. Para introducir el glutamato al interior del astrocito, estos transportadores emplean el gradiente de membrana de Na⁺. Dentro del astrocito el glutamato se transforma en glutamina a través de la glutamín-sintetasa, que será de nuevo reutilizada por las neuronas para la síntesis de glutamato y GABA.

Durante la isquemia cerebral, el primer cambio que se observa es el edema de los astrocitos. Dicho edema está condicionado por el fallo energético (caída de ATP) que origina la despolarización y la apertura de varios canales iónicos, dependientes o no del glutamato, con la consiguiente entrada de Na⁺ y agua **(46)**. El edema astrocítico es responsable de la disminución de la recaptación de glutamato, además de otros factores como la disminución de los transportadores, el ácido araquidónico, radicales libres, ácido láctico y la presencia de concentraciones elevadas de NO•.

La microglía también contribuye al daño tisular isquémico a través de varios mecanismos, como la producción de citocinas, NO• y otros radicales libres **(47)**.

En los oligodendrocitos, la disminución de energía ocasiona una pérdida de los gradientes iónicos que revierten el funcionamiento de

algunas bombas de intercambio de Na^+ y Ca^{2+} , con la consiguiente acumulación de ambos iones en el interior de la célula **(47)**.

Las células de la glia que sobreviven a un episodio isquémico sufren un proceso de hipertrofia y proliferación, fundamentalmente en astrocitos, conocido como gliosis reactiva, que se ha puesto en relación con mecanismos de neuroprotección y reparación de la lesión isquémica. Los astrocitos son una de las fuentes más importantes de factores de crecimiento, que pueden desempeñar un papel importante en la tolerancia isquémica, como el factor de crecimiento neural (NGF), el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) y del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) **(48)**.

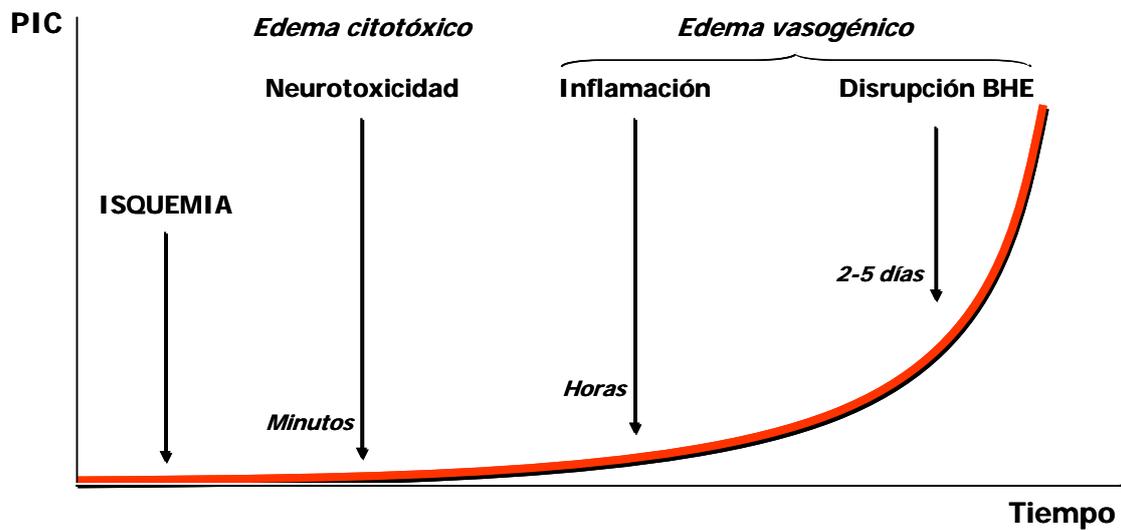
1.1.5.3. Mecanismos fisiopatológicos del edema cerebral

El factor que más contribuye en la morbilidad y mortalidad del ictus es el desarrollo de edema cerebral **(49)**. En pacientes con infartos graves el edema producido puede ocasionar un aumento de la presión intracraneal que conduzca a la herniación, disminución del nivel de conciencia y muerte **(50)**. Incluso en infartos más pequeños, el edema puede producir un aumento de la presión intracraneal, lo que incrementa la isquemia **(51)**.

Tomás Sobrino Moreiras

El edema que se produce en la isquemia cerebral puede ser citotóxico (acúmulo de líquido en el interior de la célula), vasogénico (acúmulo de líquido en el intersticio) o ambos.

El perfil temporal del desarrollo del edema en el tejido isquémico se refleja en la **gráfica 3**. Inicialmente se produce un edema citotóxico, ya que las neuronas y la glía son más sensibles a la isquemia que el endotelio capilar. El edema citotóxico se origina por alteración de la permeabilidad celular y por el aumento de la osmolaridad intracelular. La alteración de la permeabilidad celular es consecuencia del fallo energético, al ser incapaz de mantener las bombas de intercambio iónico. Como consecuencia de la liberación del glutamato se produce un aumento de la osmolaridad. Posteriormente a la activación de los receptores de glutamato se desarrollan una serie de mecanismos **(52)**, que incluyen desde la entrada inicial de Na⁺ **(53, 54)** a la activación de procesos secundarios, como la disfunción endotelial, entrada de Ca²⁺ y producción de ROS **(55-57)**, lo que conducirá a la incorporación de Na⁺ y agua en el interior de las células.



Gráfica 3. Perfil temporal del desarrollo del edema y su relación con la presión intracraneal (PIC).

El edema vasogénico se produce por la alteración de la barrera hematoencefálica debido a la persistencia de la isquemia cerebral. Como consecuencia de esta alteración de la barrera hematoencefálica se produce una extravasación de proteínas en el parénquima cerebral, lo que da lugar al acúmulo de líquido en el espacio intercelular **(58)**. Días después del desarrollo de la isquemia, el acúmulo de proteínas en la sustancia blanca es más intensa que en el propio tejido isquémico, donde la mayoría de las proteínas han sido digeridas por enzimas proteolíticas. Esta localización del edema vasogénico con predominio por la sustancia blanca contrasta con el edema citotóxico, que se localiza fundamentalmente en la sustancia gris **(59)**.

La microembolia cerebral origina una forma peculiar de edema. El impacto de un émbolo en un territorio vascular sano no produce una

Tomás Sobrino Moreiras

disminución global del flujo sanguíneo cerebral, sino una redistribución del mismo. En estas circunstancias, se produce una alteración inmediata de la barrera hematoencefálica y un edema vasogénico masivo localizado en la sustancia gris, donde habitualmente impactan los émbolos. Pocas horas después, el edema se desplaza a la sustancia blanca adyacente **(60)**.

1.1.5.4. Mecanismos bioquímicos de la progresión del ictus isquémico

Uno de los mecanismos que conduce a la progresión del ictus es la transformación de la penumbra isquémica en una zona de lesión irreversible. En la zona de la penumbra isquémica se produce una mayor demanda de energía debido a que aumentan las necesidades metabólicas al producirse ondas de despolarización recurrentes. Estas mayores necesidades de aporte de nutrientes no pueden ser cubiertas debido a una disminución del flujo sanguíneo cerebral, por lo que el umbral de perfusión se hace cada vez más crítico, y zonas de penumbra se incorporan progresivamente al parénquima cerebral no viable. Sin embargo, la zona de penumbra isquémica es clínicamente expresiva, por lo que es probable que el deterioro neurológico implique, además, el reclutamiento de la región de oligohemia más periférica **(17)**.

Con niveles de flujo sanguíneo cerebral inferiores a 22 ml/100 g/min se produce la liberación de grandes cantidades de glutamato y de otros aminoácidos neuroexcitadores, capaces de inducir ondas de despolarización recurrentes en la zona de penumbra isquémica **(17)**. El predictor más potente de progresión de infarto cerebral es el glutamato. Niveles plasmáticos de glutamato por encima de 200 $\mu\text{M/L}$ en las primeras 24 horas desde el inicio de la sintomatología predicen el deterioro neurológico con una probabilidad del 92% **(61)**. También se han asociado niveles elevados de glicina con el aumento de la frecuencia de deterioro neurológico precoz **(61)**. La disminución de la concentración del GABA en plasma también es un predictor importante de deterioro neurológico en las primeras 48 horas desde el inicio de la clínica en los infartos lacunares, sobre todos los localizados en los núcleos de la base **(62)**.

Pero para la progresión de la isquemia cerebral son necesarios otros mecanismos secundarios. Se ha demostrado una relación entre el aumento de los depósitos de hierro (como fuente de radicales libres) y el deterioro neurológico **(63)**. También se ha visto que el NO^\bullet es un factor importante en la progresión de la zona de penumbra isquémica, especialmente en las zonas más periféricas, donde la presencia de oxígeno facilita la producción de peroxinitrilo **(38)**. Los mecanismos inflamatorios también desempeñan un papel fundamental en la

Tomás Sobrino Moreiras

progresión del infarto, y concentraciones plasmáticas elevadas de IL-6 son un potente predictor de deterioro neurológico precoz **(64)**.

La hiperglucemia, la hipertermia, la cefalea y las crisis comiciales en las primeras horas del ictus se han relacionado con el infarto cerebral progresivo. Los niveles plasmáticos de glucosa elevados durante la fase aguda del ictus isquémico aumentan la concentración de ácido láctico. Se ha visto que el efecto de la hipertermia sobre la progresión del infarto es dependiente de la neurotoxicidad del glutamato **(65)**, y posiblemente de la IL-6 y del TNF- α . La cefalea al inicio del ictus isquémico está mediada por el glutamato, por el NO \bullet y por la IL-6 **(66)**. Las crisis convulsivas al inicio del ictus aparecen en los infartos corticales, y se relacionan con un empeoramiento neurológico como resultado del aumento de concentración de glutamato extracelular liberado en esta zona **(67)**.

También existen marcadores de neuroimagen del ictus progresivo. La presencia de hipodensidad precoz en la tomografía axial computarizada (TAC) o de hiperseñal en la resonancia magnética de difusión (RM-DWI) se relaciona con la progresión del infarto cerebral. Este hecho se debe a la presencia de edema citotóxico relacionado con el glutamato **(46)** o de edema vasogénico relacionado con el aumento de la permeabilidad vascular originado por el NO \bullet y por los mecanismos de inflamación **(38, 64, 68, 69)**.

1.1.5.5. Inflamación en el ictus isquémico

Diferentes estudios han demostrado la asociación entre la inflamación sistémica y un riesgo aumentado de padecer infarto de miocardio e ictus **(70, 71)**.

La isquemia cerebral y la posterior reperfusión inducen una respuesta inflamatoria que se inicia en la microcirculación, que ayudará a la destrucción celular **(37, 64, 72)**. En la periferia de la zona isquémica se activan las células endoteliales, las neuronas, los astrocitos y la glia, para iniciar una respuesta inflamatoria a través de la liberación de citocinas **(69, 73)**, unas glicoproteínas que poseen la capacidad de interactuar entre ellas mismas y con muchas estirpes celulares.

Las citocinas que inician la inflamación son la interleucina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) **(figura 5) (73)**. La activación de estas citocinas en la isquemia cerebral ocurre de manera precoz, aunque de forma transitoria **(64, 74)**.

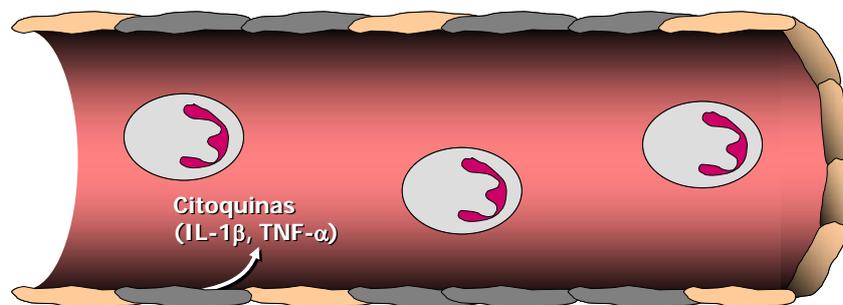


Figura 5. Inicio de la respuesta inflamatoria. Acción de la IL-1 β y TNF- α .

Tomás Sobrino Moreiras

La IL-1 β y el TNF- α inducen una segunda respuesta inflamatoria, mucho más persistente, mediada por otras citocinas, la interleucina-6 (IL-6) y la interleucina-8 (IL-8) (**figura 6**). La IL-6 y la IL-8 juegan un papel importante en el desarrollo de reactantes de fase aguda, incluyendo la fiebre, la proteína C reactiva y el fibrinógeno (**75**), y en la liberación de un grupo de moléculas, conocidas como moléculas de adhesión celular o adhesinas, que originan la agregación leucocitaria y posteriormente su adherencia al tejido conjuntivo de la pared vascular (**76**).

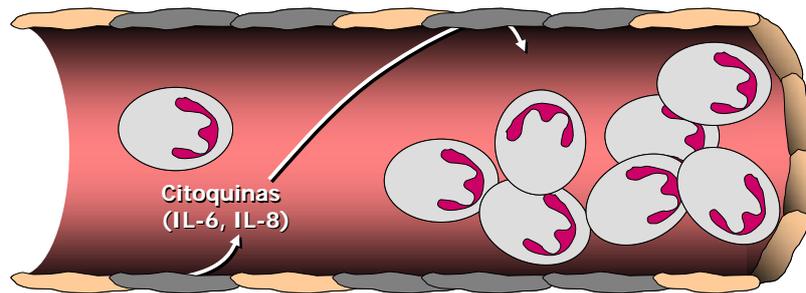


Figura 6. Segunda respuesta inflamatoria. Acción de IL-6 e IL-8

Dentro del grupo de las moléculas de adhesión se conocen diferentes grupos: las selectinas, miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas, y las integrinas. Las selectinas son glicoproteínas que contribuyen a la interacción inicial entre leucocitos y células endoteliales en la periferia del infarto. Su acción es transitoria y reversible, y conduce a otras interacciones celulares secundarias mediadas por otros grupos de adhesinas. Las principales moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas son la molécula de adhesión

intracelular-1 (ICAM-1), la molécula de adhesión vascular-1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión plaquetoendotelial-1 (PECAM-1). Las integrinas intervienen en la adhesión intracelular y en la interacción de estas células con elementos de la matriz extracelular. Estas moléculas se activan por la IL-8, a diferencia de las selectinas y la superfamilia de las inmunoglobulinas, que se activan por la IL-6, y su acción es mucho más tardía (77) (figura 7).

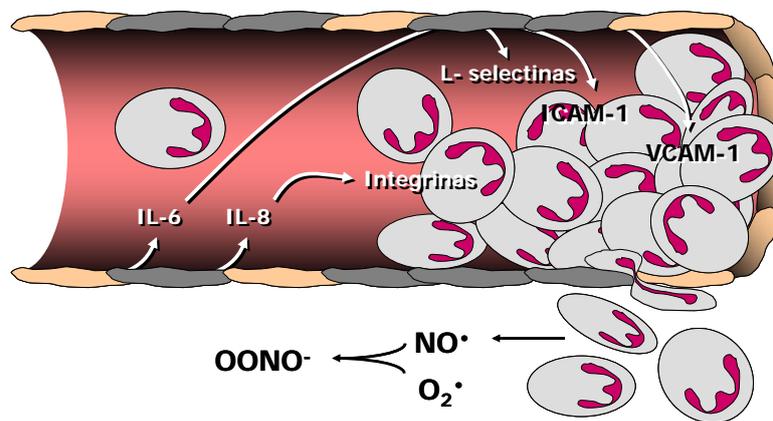


Figura 7. Acción de las moléculas de adhesión celular.

Debido a la activación de las moléculas de adhesión se produce un reclutamiento de leucocitos, y posteriormente, su agregación y adherencia a la pared vascular, lo cual es responsable de la obstrucción de la microvascularización.

Se ha visto que algunas metaloproteasas de matriz (MMPs) intervienen en la lesión tisular tras la isquemia. Los leucocitos que se acumulan y se adhieren por la acción de las citocinas en la isquemia cerebral utilizan la producción de MMPs para migrar a través del

endotelio, desestructurar la barrera hematoencefálica y contribuir a la producción del edema (**figura 8**).

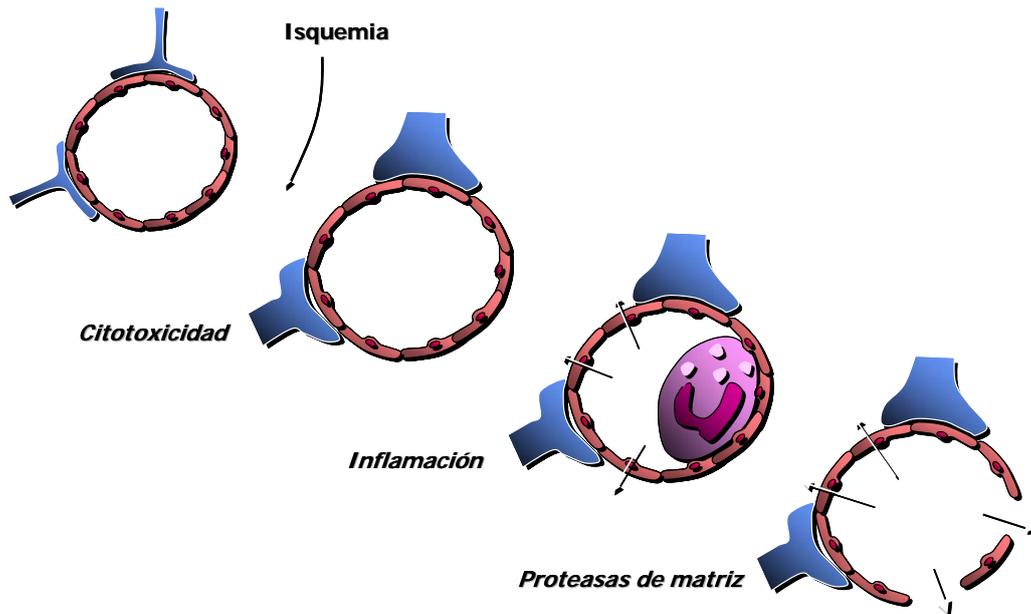


Figura 8. Acción de las metaloproteasas de matriz sobre el endotelio.

1.1.5.6. Marcadores moleculares de utilidad diagnóstica y pronóstica

Los mecanismos bioquímicos de neurotoxicidad e inflamación han resultado de utilidad como marcadores asociados a signos precoces de isquemia, deterioro neurológico, volumen del infarto, transformación hemorrágica y con la eficacia del tratamiento trombolítico.

El edema citotóxico que se origina como consecuencia de la activación de los receptores AMPA por los aminoácidos excitatorios es responsable de los cambios más precoces que se pueden identificar en

Neurorreparación mediada por Células Progenitoras Endoteliales en el Ictus Isquémico: influencia de Factores de Proliferación y Migración Celular Endógenos

Tomás Sobrino Moreiras

la tomografía computerizada, conocidos como signos precoces. Posteriormente, otros factores como los diferentes mecanismos inflamatorios y la disrupción de la barrera hematoencefálica son responsables del edema vasogénico. Se ha visto que existe una asociación secuencial entre los marcadores de excitotoxicidad (glutamato), inflamación (IL-6 y TNF- α) y ruptura de la barrera hematoencefálica (MMP-9) según la intensidad de los marcadores precoces de isquemia (78). (Figura 9)

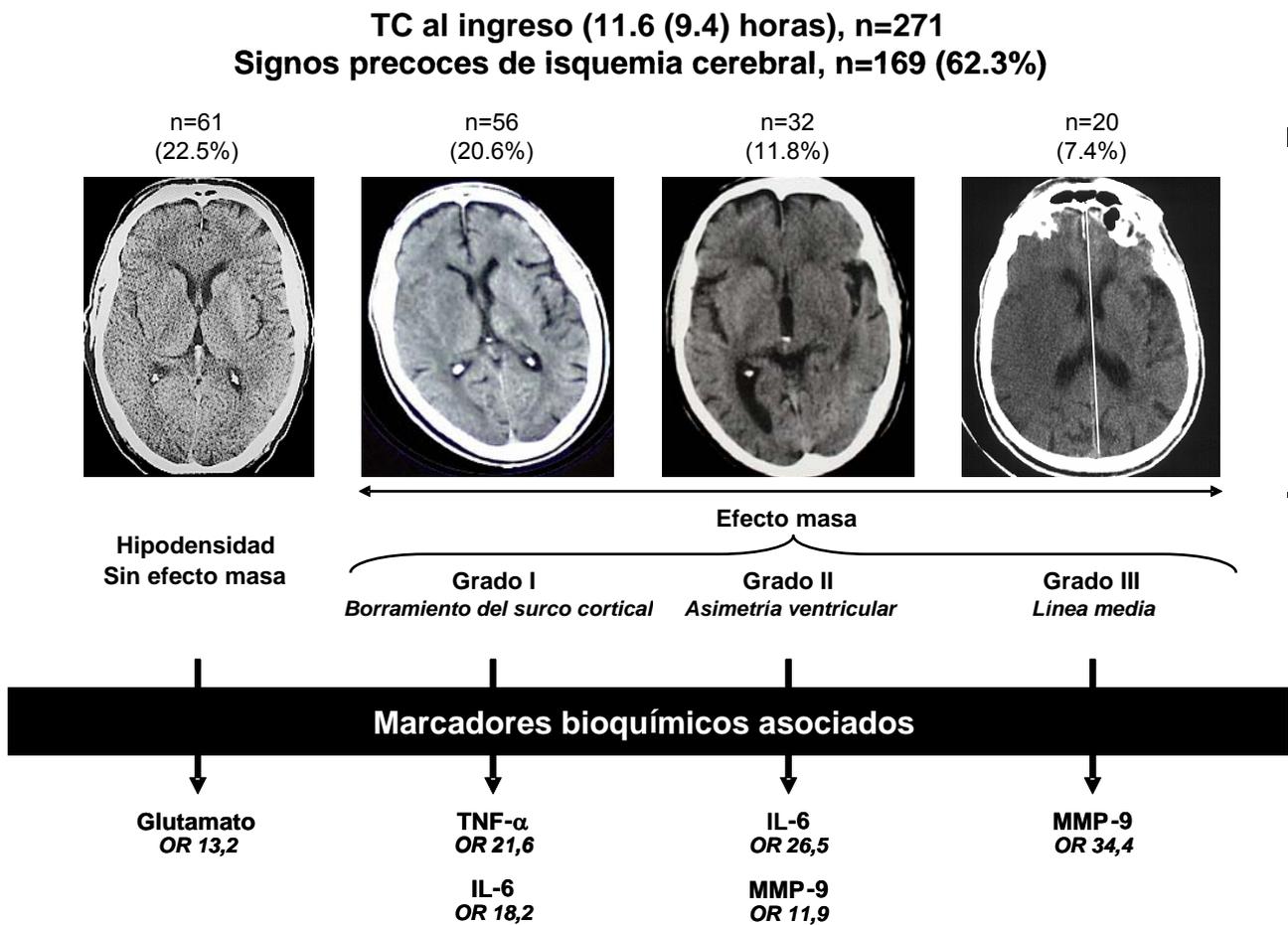


Figura 9. Asociación de los signos precoces de isquemia cerebral con marcadores bioquímicos.

Tomás Sobrino Moreiras

Uno de los mecanismos responsables del deterioro neurológico precoz es la transformación del tejido isquémico periférico a la zona de infarto, denominado penumbra isquémica, en tejido necrótico. El glutamato es el marcador bioquímico predictivo más potente de progresión del infarto **(61)**, aunque también se ha visto que las concentraciones elevadas de glicina, así como los niveles bajos de GABA en plasma son predictores del deterioro neurológico que se produce en las primeras 48 horas **(62)**. Existe una fuerte relación entre los depósitos de hierro, una fuente de radicales libres, y el deterioro neurológico **(63)**, al igual que con los marcadores moleculares de inflamación, como la IL-6 **(64,68,72)**.

El volumen final del infarto es consecuencia de la interacción de factores vasculares, hemodinámicas y bioquímicos. Algunos marcadores moleculares poseen un efecto neuroprotector, como el GABA y la IL-10, mientras que otros, como el ICAM-1, VCAM-1, TNF- α , IL-6, glutamato, ferritina, MMP-9 y NO \bullet se asocian con un mayor volumen del infarto **(79)**. **(Figura 10)**

Neurorreparación mediada por Células Progenitoras Endoteliales en el Ictus Isquémico: influencia de Factores de Proliferación y Migración Celular Endógenos

Tomás Sobrino Moreiras

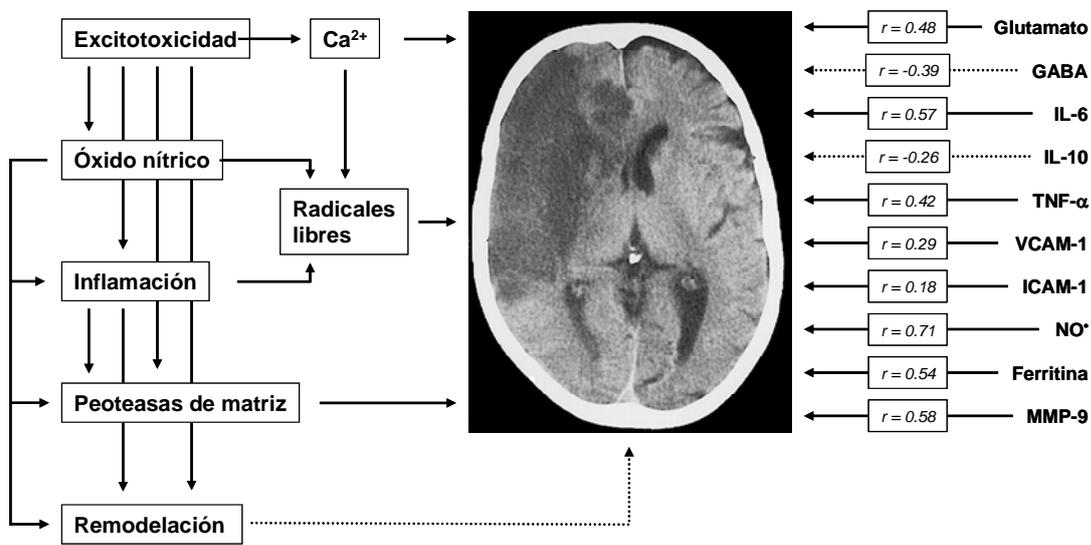


Figura 10. La interacción entre los marcadores bioquímicos y el volumen del infarto presenta una gran complejidad. Los marcadores con acción neurotóxica se reflejan mediante línea continua, mientras que aquellos que poseen acción neuroprotectora se reflejan mediante línea discontinua.

La transformación hemorrágica de un infarto cerebral es una complicación evolutiva con implicaciones clínicas significativas. El tamaño de la lesión, la hipertensión arterial, el tratamiento con anticoagulantes, la edad, la presencia de signos precoces en neuroimagen o la hiperglucemia se asocian con un mayor riesgo de transformación hemorrágica **(80,81)**. Parece que la causa de la transformación hemorrágica es la pérdida de la integridad de la lámina basal de la microcirculación cerebral debido a la isquemia **(82)**. La activación de las MMPs en modelos animales produce el deterioro de los componentes de la lámina basal, como la laminina, el colágeno y la fibronectina, originando la transformación hemorrágica **(83)**. Se ha observado que la concentración de MMP-9 es tres veces mayor en

Tomás Sobrino Moreiras

aquellos pacientes que presentan transformación hemorrágica (84). Asimismo las concentraciones elevadas de fibronectina celular (cFn) pueden predecir transformación hemorrágica en aquellos pacientes que reciben tratamiento trombolítico (85) (Figura 11).

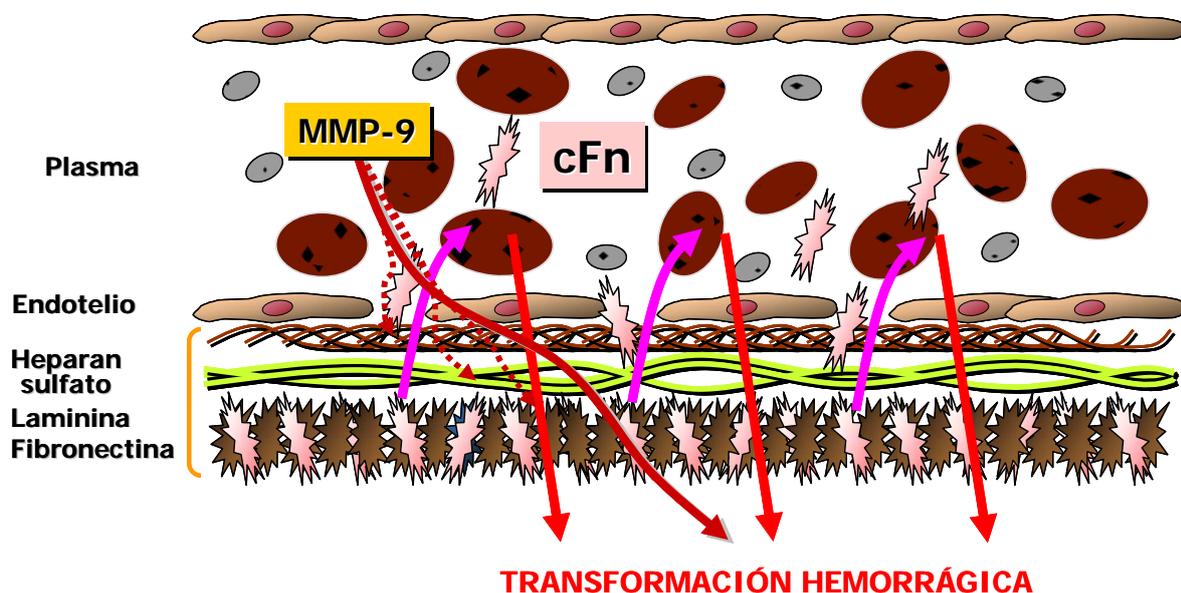


Figura 11. Mecanismos moleculares de transformación hemorrágica en la isquemia cerebral.

El tratamiento trombolítico con r-tPA es el único fármaco que ha demostrado ser eficaz en el tratamiento del ictus isquémico, sin embargo, la respuesta a dicho tratamiento no es homogénea, y la mayor complicación que se produce es la transformación hemorrágica. Los niveles plasmáticos de IL-6, TNF- α y MMP-9 obtenidos basalmente se relacionan con la eficacia del tratamiento trombolítico y con la incidencia de complicaciones como la transformación hemorrágica (79).

1.2. CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES.

1.2.1. DEFINICIÓN Y CARACTERIZACIÓN

Las células progenitoras son células primitivas derivadas de la médula ósea que poseen la capacidad de proliferación, migración y diferenciación hacia diversas estirpes celulares de la etapa adulta. Las EPCs, en particular, poseen la capacidad de diferenciación hacia células del lumen de los vasos sanguíneos **(86)**. La primera evidencia indicadora de la presencia de EPCs en la circulación adulta emergió en 1997, cuando Asahara y colaboradores observaron que células mononucleadas sanguíneas aisladas de individuos sanos adquirirían un fenotipo endotelial *in vitro* y se incorporaban en capilares *in vivo* **(87)**. Las EPCs fueron caracterizadas vía expresión de CD34 y el “vascular endothelial growth factor receptor – 2” (VEGFR-2); dos antígenos presentes en las células progenitoras endoteliales embrionarias y en las células madre hematopoyéticas (HSCs, hematopoietic stem cells). Posteriores estudios confirmaron que las células CD34⁺ aisladas de la médula ósea y de la sangre del cordón umbilical muestran capacidad de diferenciación hacia células endoteliales maduras **(88,89,90)**. Sin embargo, tanto el CD34 como el VEGFR-2 son expresados por células endoteliales adultas **(91)**.

Además de CD34, las células progenitoras hematopoyéticas tempranas expresan CD133, marcador no expresado después de su

Tomás Sobrino Moreiras

diferenciación **(91,92)**. Usando la expresión de CD133 como un marcador específico de células progenitoras hematopoyéticas en estadio temprano de su diferenciación, Peichev y colaboradores aislaron una subpoblación de células capaces de diferenciarse a células endoteliales maduras, caracterizadas por la expresión de VEGFR-2⁺/CD133⁺/CD34⁺ **(93)**. Más recientemente, las células progenitoras hematopoyéticas que expresan CD34 y el receptor 1 del factor de crecimiento fibroblástico, o que coexpresan CD34, CD133 y VEGF-2, presentan un comportamiento característico de EPCs **(94,95)**.

Actualmente, la mayoría de estudios que estiman el número de EPCs en la circulación sanguínea cuantifican el número de células CD34⁺/VEGFR-2⁺ o CD133⁺/VEGFR-2⁺ **(96,97)**. Sin embargo, la expresión de CD34 no parece ser un requerimiento imprescindible para la identificación de EPCs. Poblaciones de HSCs CD34⁻ y células madre mesenquimáticas CD34⁻/CD133⁺/VEGFR-2⁺ han demostrado poseer la capacidad de comportarse como EPCs, generando células endoteliales maduras **(98,99)**. En conclusión, la caracterización fenotípica exacta de las EPCs no es totalmente conocida.

1.2.2. FUNCIONES Y PROPIEDADES DE LAS EPCs

El endotelio vascular desempeña un papel crucial en la regulación de la tonicidad y el mantenimiento de la homeostasis vascular **(100)**. La disfunción endotelial predispone a la vasoconstricción, trombosis y aterosclerosis **(101)**. Las EPCs desempeñan una importante función en el mantenimiento del endotelio, siendo implicadas en procesos de reendotelización y neovascularización.

1.2.2.1. EPCs y Reendotelización

La significación fisiológica de la movilización de las EPCs *in vivo* fue identificada en estudios experimentales, en donde la aorta torácica de perros adultos, con médula ósea transplantada, fue implantada con injertos Dracon **(102)**. Pasados 3 meses, se observó una colonización de los injertos por células endoteliales CD34⁺ del donante. Este hecho demuestra que la endotelización observada fue llevada a cabo exclusivamente por EPCs movilizadas de la médula ósea. En seres humanos, las superficies de los dispositivos de asistencia ventricular presentan células CD133⁺/VEGFR-2⁺ **(93)**. Conjuntamente, estos estudios sugieren la existencia de una población de EPCs en la circulación periférica que contribuyen a una rápida endotelización, previniendo la aparición de aterosclerosis.

Tomás Sobrino Moreiras

La movilización e incorporación de EPCs derivadas de la médula ósea a áreas de daño celular endotelial median y modulan procesos de reendotelización **(103,104) (Figura 12)**. Por todo ello, las EPCs pueden participar en el mantenimiento de la homeostasis vascular mediante mecanismos de restauración del endotelio.

1.2.2.2. EPCs y Neovascularización

La neovascularización en adultos no sólo es producida por angiogénesis, proceso mediado por la proliferación y migración de células endoteliales de los vasos sanguíneos adyacentes preexistentes **(105,106)**; sino también por vasculogénesis en la que las EPCs son movilizadas, a través de la circulación sanguínea periférica, desde la médula espinal hasta los lugares de neovascularización, en donde finalmente se diferencian a células endoteliales maduras **(87,107,108) (Figura 12)**. Las EPCs pueden ser el sustrato para la formación de nuevos vasos sanguíneos, y a su vez, pueden ejercer una acción paracrina simultánea promoviendo angiogénesis.

La participación de las EPCs en la formación de nuevos vasos sanguíneos fue demostrada mediante estudios experimentales en los que se observó la formación de estructuras similares a capilares, a partir de HSCs aisladas o EPCs **(88, 109)**. Recientes estudios, realizados en modelos animales de isquemia miocárdica, sugieren que

Neurorreparación mediada por Células Progenitoras Endoteliales en el Ictus Isquémico: influencia de Factores de Proliferación y Migración Celular Endógenos

Tomás Sobrino Moreiras

la administración local o sistémica de EPCs aumentan la neovascularización y median la recuperación de la funcionalidad de aquellos tejidos isquémicamente comprometidos **(90,110,111)**.

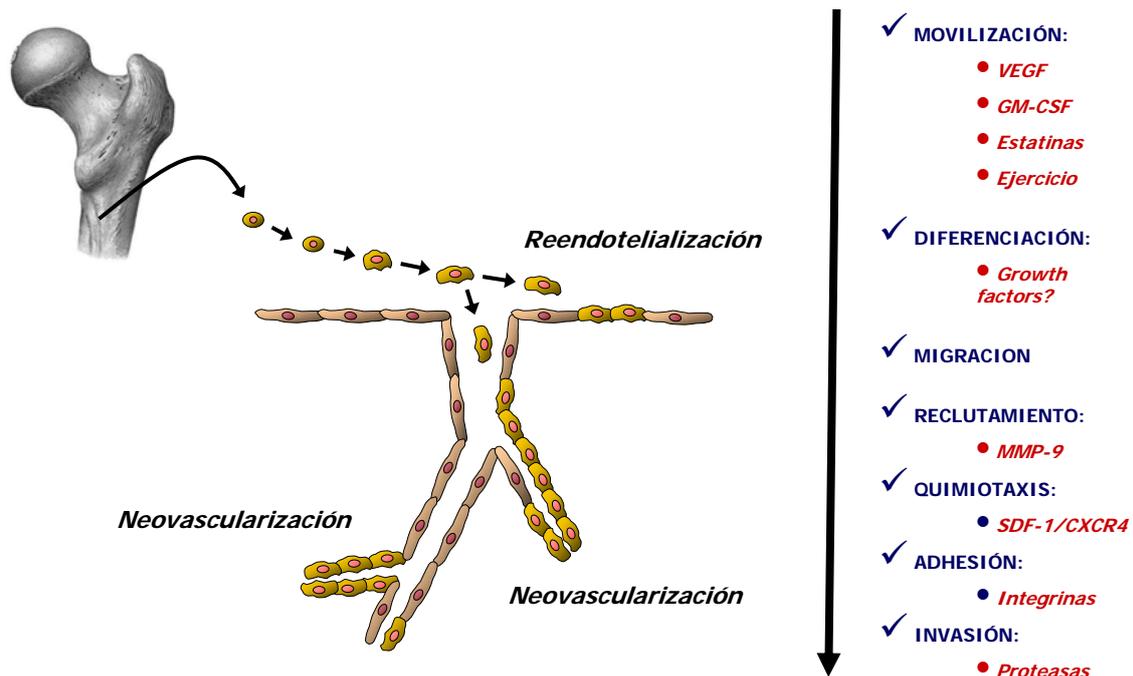


Figura 12. Reendotelización y neovascularización mediada por EPCs.

Empleando un modelo de retinopatía en ratón, Grant y colaboradores demostraron que el reclutamiento de EPCs hacia las áreas de daño isquémico desempeña una función importante e imprescindible en los procesos de neovascularización **(112)**. Sin embargo, la angiogénesis patológica que induce la formación de tumores también depende del reclutamiento de las células precursoras hematopoyéticas y EPCs **(113)**. Por lo tanto, el bloqueo selectivo de la

Tomás Sobrino Moreiras

migración de EPCs puede constituir una nueva estrategia terapéutica antiangiogénica **(114)**.

1.2.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN EL NÚMERO DE EPCs

La mayoría de las EPCs residen en la médula ósea en estrecha asociación con las HSCs y las células estromáticas que suministran el microambiente necesario para la hematopoyesis **(86)**. En la médula ósea, las células progenitoras están presentes en diferentes estadios de diferenciación. En condiciones fisiológicas, las EPCs representan únicamente el 0.01% de las células mononucleadas sanguíneas **(115)**. La movilización de las EPCs requiere la disociación del contacto entre las células estromáticas de la médula ósea y las células progenitoras **(91)**. Este proceso se denomina reclutamiento.

1.2.3.1. Reclutamiento y movilización de las EPCs

Estímulos endógenos, tales como una isquemia tisular o la terapia exógena con ciertas citocinas, han demostrado promover la movilización de EPCs. Una isquemia focal en modelos experimentales induce un incremento en el número de EPCs circulantes **(116)**. De igual modo, las EPCs fueron movilizadas en pacientes con trauma vascular o infarto agudo de miocardio **(96,117)**. Estudios con citometría de flujo revelan que las concentraciones de EPCs se incrementan significativamente en pacientes con infarto agudo de miocardio, un

incremento que ha sido positivamente correlacionado con niveles plasmáticos elevados de VEGF **(117)**. La capacidad regenerativa endógena de las EPCs es mediada principalmente por quimocinas y citocinas.

Numerosos estudios han demostrado que el factor angiogénico VEGF promueve la movilización e incorporación de EPCs a las áreas de neovascularización **(118-122)**. VEGF promueve angiogénesis por inducción, diferenciación y quimiotaxis de las células endoteliales **(123)**. Asimismo, este factor de crecimiento es esencial para los procesos de hematopoyesis y angiogénesis **(124)**. Múltiples isoformas de VEGF son secretadas, siendo el VEGF₁₆₅ la más abundante. El VEGF₁₆₅ ejerce su actividad biológica a través de su interacción con 2 receptores tirosín quinasa, VEGFR-1 y VEGFR-2 **(115)**. Ambos receptores son expresados por las HSCs y EPCs. La liberación de VEGF por las HSCs y otras células en la médula ósea puede inducir la proliferación de EPCs, el remodelado vascular de la médula ósea y la regulación de la expresión de las moléculas de adhesión vascular. En conjunto, estos mecanismos promueven la migración de las EPCs desde la médula ósea **(125)**. En modelos experimentales, la administración de VEGF induce una elevación de las concentraciones de EPCs en la circulación sanguínea, generando a su vez un aumento de su actividad proliferativa y migratoria **(119)**. En los seres humanos, la administración exógena de VEGF aumenta el número de EPCs circulantes **(121)**, lo que sugiere que

Tomás Sobrino Moreiras

su sobreexpresión puede inducir la movilización de EPCs. Además del VEGF, otros factores de crecimiento angiogénicos, incluyendo la angiopoyetina 1, el factor de crecimiento fibroblástico y el factor de crecimiento derivado de las células estromáticas 1 (SDF-1), estimulan la movilización y el reclutamiento de las EPCs **(118,122,126)**. El factor de crecimiento placentar, un miembro de la familia de los VEGF, ha sido implicado en la formación de vasos sanguíneos colaterales en el corazón isquémico vía VEGFR-1, induciendo el reclutamiento de EPCs derivadas de la médula ósea **(127,128)**. Además de los efectos directos del VEGF en la movilización de EPCs, VEGF puede inducir la liberación de otros factores de crecimiento hematopoyéticos, tales como el factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF) por las células endoteliales de la médula ósea **(129)**. En modelos experimentales de isquemia focal, la administración exógena de GM-CSF induce específicamente la movilización de EPCs contribuyendo a un aumento de vascularización en el área isquémica **(116)**. La administración de GM-CSF en pacientes con excesivo daño de la arteria coronaria (CAD) induce un aumento del flujo colateral del miocardio **(130)**. El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), al igual que el GM-CSF, induce un aumento en el número de células CD34+ que podría estimular la neovascularización en regiones de miocardio isquémico **(89)**.

El reclutamiento de las células progenitoras desde la médula ósea parece requerir la actividad de la metaloproteasa de matriz - 9 (MMP-9) **(131)**. Ratones MMP-9^{-/-} presentan una deficiencia en la movilización de células madre, de tal modo, que la administración de inhibidores de MMPs bloquean la movilización de EPCs. La actividad de la MMP-9 provoca la liberación masiva de la quimocina del factor de células madre (SCF), lo que favorece el reclutamiento de células progenitoras positivas c-kit, entre las que se encuentran las EPCs, desde la médula ósea. La MMP-9 activa induce la liberación de citocinas activadoras de células madre que provocan la movilidad de EPCs quiescentes **(115)**. El mecanismo por el cual el factor de crecimiento placentar recluta células progenitoras derivadas de la médula ósea requiere la actividad de la MMP-9, que induce la liberación de SCF **(128)**. Una vez reclutadas y movilizadas, las EPCs deben dirigirse y diferenciarse a las zonas de endotelización.

1.2.3.2. Autodirección y diferenciación de las EPCs

Los mismos factores responsables de la movilización de las EPCs también pueden desempeñar una función importante en su migración e incorporación a las áreas de endotelización y neovascularización. La expresión aumentada de VEGF, después de una lesión vascular, recluta EPCs. Asimismo, paralelamente a la migración de las EPCs al área de

Tomás Sobrino Moreiras

lesión, se produce un aumento de los niveles plasmáticos de VEGF **(96)**. En modelos experimentales, se ha comprobado que la implantación de VEGF induce neovascularización *in vivo*, mediada en gran medida por EPCs **(132)**. Estos datos nos indican que las EPCs fueron dirigidas al área de implantación de VEGF. El SDF-1 también puede contribuir al autoguiado de las EPCs hacia las zonas de neovascularización. El SDF-1, que se encuentra en concentraciones elevadas tras un infarto de miocardio, se une al receptor de quimocinas CXCR-4, que se expresa abundantemente en las EPCs **(126,133,134)**. Actualmente se ha comprobado que: las EPCs expresan CXCR4, receptor de SDF-1 **(134,135)**; VEGF induce la expresión de CXCR4 en EPCs **(136)**; SDF-1 actúa como quimiotáctico de EPCs *in vitro* **(137,138,139)**; SDF-1 induce la expresión de VEGF y angiogenesis *in vivo* **(136)**. Por ello, debido a que las EPCs expresan receptores funcionales de CXCR4 y VEGF, se postula que una interacción conjunta entre SDF-1/CXCR4 y VEGF generaría un proceso de feed-back positivo que aumentaría los efectos terapéuticos de las EPCs en la Neovascularización *in vivo* **(126,136-139)**.

1.2.3.3. Influencia de los factores de riesgo vascular en las EPCs

La caracterización de las EPCs en pacientes con CAD fue realizada por Vasa y colaboradores **(97)**. El estudio demuestra que existe una correlación negativa entre el número de factores de riesgo vascular y el número y actividad migratoria de las EPCs. El factor de riesgo más asociado a la reducción de los niveles de EPCs fue el tabaco, mientras que la hipertensión es el factor que más influye en la reducción de la actividad migratoria. Los mecanismos por lo que los factores de riesgo vascular reducen el número y la funcionalidad de las EPCs son desconocidos. Sin embargo, Vasa y colaboradores **(97)** especulan con la posibilidad de que estos mecanismos implican un aumento de la apoptosis de EPCs. Recientemente, se ha sugerido que los niveles de EPCs circulantes en sangre periférica podrían ser un marcador de la función endotelial y de riesgo cardiovascular **(140)**.

Tomás Sobrino Moreiras

1.2.3.4. Fármacos que aumentan la movilización y diferenciación de las EPCs

Además del uso de la administración exógena de factores de crecimiento, citocinas o quimocinas, los inhibidores de la reductasa de HMG-CoA o estatinas aumentan la movilización y funcionalidad de las EPCs. Las estatinas poseen efectos beneficiosos como el aumento de la función endotelial, independientemente de la reducción del colesterol **(141)**. Dimmeler y colaboradores **(142)** así como Llevadot y colaboradores **(143)** han demostrado que las estatinas incrementan la diferenciación de EPCs in vitro, y su movilización in vivo. Estos efectos fueron mediados a través de la vía fosfatidil inositol – 3 – kinasa/Akt, que también es utilizada por los factores de crecimiento angiogénicos que inducen la diferenciación de HSC **(144)**. La influencia de las estatinas en la movilización de las EPCs se reflejó en un aumento 3x en el número de EPCs circulantes en pacientes con CAD estable después de 4 semanas de tratamiento con atorvastatina **(145)**. Asimismo, el tratamiento con estatinas aumentan el flujo sanguíneo coronario en pacientes con CAD estable **(146)**.

1.2.4. EPCs Y ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

La disfunción endotelial propicia procesos de aterosclerosis y trombosis **(101)**, responsables de enfermedades cerebrovasculares **(147)**. Se ha sugerido que la concentración de EPCs circulantes en sangre periférica pueda ser un marcador de la función endotelial y de riesgo cardiovascular **(140,148)**. El número de EPCs es significativamente inferior y su actividad migratoria menor en sujetos con elevado colesterol en suero, hipertensión y diabetes, así como en fumadores **(97)**, todos ellos factores de riesgo cerebrovascular. También se han observado reducciones en el número de EPCs en pacientes con enfermedad coronaria **(149)**, diabetes **(150)** e ictus **(151)**. En modelos experimentales de isquemia cerebral, se ha demostrado que las EPCs median procesos de neovascularización cerebral **(152)**. Recientemente, los beneficios de la terapia con EPCs fueron demostrados en pacientes con isquemia cerebral grave y con infarto agudo de miocardio **(153-155)**.

En la actualidad apenas existen estudios acerca de la relación existente entre EPCs y enfermedad cerebrovascular. Este estudio pretende evaluar los efectos de las EPCs en la recuperación del Infarto cerebral, así como el papel de los factores moleculares que median su proliferación y migración.

2. HIPÓTESIS

Tomás Sobrino Moreiras

El aumento de la concentración de EPCs circulantes en sangre periférica durante la fase aguda de la isquemia cerebral se asocia a un buen pronóstico funcional en el Ictus Isquémico.

3. OBJETIVOS

Tomás Sobrino Moreiras

El objetivo principal de este estudio es demostrar la asociación entre la concentración de EPCs circulantes en sangre periférica y el pronóstico funcional en pacientes con ictus isquémico agudo.

Como objetivos secundarios nos planteamos confirmar que los niveles séricos de VEGF, SDF-1 α y MMP-9 activa se asocian con el incremento de las concentraciones de EPCs y con el pronóstico funcional.

4. PACIENTES Y MÉTODOS

Tomás Sobrino Moreiras

Se ha realizado un análisis prospectivo en el que se han estudiado 48 pacientes con diagnóstico de ictus isquémico hemisférico no lacunar de menos de 12 horas de evolución.

Las variables clínicas, neurorradiológicas y moleculares de los pacientes incluidos en el estudio se recogieron en un banco de datos prospectivo, diseñado con el propósito de estudiar la función de las EPCs en el ictus isquémico, su influencia en el pronóstico funcional y la influencia de los factores de crecimiento en la concentraciones de EPCs en sangre periférica.

La base de datos cumplía las siguientes características:

1. Se recogieron un gran número de variables comunes, incluyendo escalas neurológicas y funcionales.
2. Los datos clínicos y moleculares fueron recogidos por los mismos investigadores.
3. Las muestras de sangre congelada y fresca, para la determinación de los factores de crecimiento y el cultivo de EPCs respectivamente, se recogieron usando un protocolo común.

4.1. CRITERIOS DE SELECCIÓN

Se seleccionaron los pacientes que cumplían los criterios de inclusión y no presentaban ninguno de los criterios de exclusión.

4.1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

1. Pacientes ingresados con primer episodio de ictus isquémico hemisférico de menos de 12 horas de evolución, en los que persista la sintomatología neurológica durante al menos 2 horas.
2. Edad mayor de 18 años.
3. Ausencia de discapacidad previa (puntuación en la escala de Rankin modificada ≤ 1).

4.1.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

1. Infarto cerebral no confirmado por tomografía computerizada.
2. Inclusión en ensayos clínicos con tratamiento versus placebo en la fase aguda del ictus.
3. Pacientes con infarto lacunar o con infartos cerebrales previos que dificulten la evaluación de los resultados.
4. Enfermedades sistémicas graves.
5. Pacientes con alta probabilidad de exitus.

4.1.3. CONSENTIMIENTO INFORMADO

A todos los pacientes se les proporcionó la información del proyecto por escrito y firmaron un formato de consentimiento informado.⁷⁰

4.2. DESCRIPCIÓN DE PARÁMETROS ANALIZADOS Y TÉCNICAS

En el momento de la llegada al hospital se realizó extracción de sangre para la determinación de glucosa, fibrinógeno y recuento de leucocitos; radiografía de tórax; electrocardiograma y tomografía computerizada. También se extrajeron muestras de sangre para la determinación de los factores de crecimiento y el cultivo de EPCs.

Los datos iniciales que se recogieron fueron:

1. Edad.
2. Sexo.
3. Tiempo de latencia, definido como el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas hasta la llegada al hospital.
4. Antecedentes de hipertensión arterial, diabetes mellitus, dislipemia, fibrilación auricular, cardiopatía isquémica, tabaquismo, alcoholismo u otro factor de riesgo vascular.
5. Tratamiento previo con estatinas.
6. Temperatura corporal medida en el hueco axilar.
7. Situación neurológica del paciente.
8. Tensión arterial no invasiva.

Para evaluar la situación funcional previa de los pacientes se empleó la Escala de Rankin modificada (mRS). Dicha escala valora la

Neurorreparación mediada por Células Progenitoras Endoteliales en el Ictus Isquémico: influencia de Factores de Proliferación y Migración Celular Endógenos

Tomás Sobrino Moreiras

discapacidad en diferentes grados, con una puntuación comprendida entre 0 y 6 puntos (**tabla 2**) (**156**).

Escala de Rankin modificada (mRS)	
0	Asintomático
1	Incapacidad no significativa pese a la existencia de síntomas: capaz de realizar su trabajo y actividad habituales.
2	Incapacidad ligera: incapaz de realizar todas sus actividades habituales previas, capaz de realizar sus necesidades personales sin ayuda
3	Incapacidad moderada: requiera alguna ayuda, capaz de caminar sin ayuda.
4	Incapacidad moderadamente severa: incapaz de caminar sin ayuda, incapaz de atender sus necesidades sin ayuda.
5	Incapacidad severa: limitado a cama, incontinencia, requiere cuidados de enfermería y atención constante
6	Muerte

Tabla 2. Escala de Rankin modificada.

4.2.1. EVALUACIÓN CLÍNICA DEL ICTUS

Todos los pacientes fueron atendidos en una Unidad de Ictus por el mismo equipo neurológico, aplicándoseles el protocolo diagnóstico terapéutico de ictus del hospital, adaptado a las guías del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología. (**157**)

Sólo los pacientes con presión arterial sistólica (PAS) ≥ 220 mm Hg o diastólica (PAD) ≥ 120 mm Hg recibieron medicación antihipertensiva durante las primeras 48 horas desde el ingreso. La hiperglucemia se trató con insulina cuando los niveles de glucosa fueron ≥ 160 mg/dL.

Tomás Sobrino Moreiras

Para el tratamiento de la hipertermia (temperatura axilar >37.5 °C) se inició tratamiento con metamizol o paracetamol intravenoso. Como profilaxis del tromboembolismo pulmonar se emplearon heparinas de bajo peso molecular. También se administró medicación antiagregante. Sólo se administraron anticoagulantes cuando existía una fuente cardioembólica mayor, pero no como tratamiento del deterioro neurológico precoz. Quince pacientes recibieron tratamiento fibrinolítico con tPA según criterios SITS-MOST. En los pacientes con tratamiento previo de estatinas se les mantuvo la medicación; en los que no recibían esta medicación, 20 mg de atorvastatina fue administrada entre el tercer y quinto día después de la hospitalización. Asimismo, un grupo randomizado de pacientes fue tratado con citicolina (2.000 mg Somazina/día) desde las primeras 24 horas y durante 3 meses.

4.2.1.1. Clasificación etiológica

Los ictus se clasificaron etiológicamente según los criterios TOAST **(6)** en 4 grupos:

1. Aterotrombóticos.
2. Cardioembólicos.
3. Lacunares
4. Indeterminados.

4.2.1.2. Evaluación clínica

Para cuantificar el grado de afectación neurológica se empleó la Escala de Ictus del National Institute of Health (NIHSS) (**158**) al ingreso, 24 horas, 72 horas, día 7±1 y a los 3 meses. Se realizó un estudio ultrasonográfico de los arcos supraaórticos y Doppler Transcraneal al ingreso y a las 24 horas de evolución.

4.2.1.3. Valoración del tamaño del infarto

El volumen del infarto se midió en centímetros cúbicos. Para su determinación se realizó una segunda tomografía computerizada entre el 4º y el 7º día. Se empleó la fórmula $0.5 \times a \times b \times c$, donde “a” y “b” corresponden a los diámetros mayores en sentido perpendicular, y “c” al número de cortes de 10 mm en los que aparecía el infarto cerebral.

4.2.1.4. Evaluación pronóstica

Para evaluar el pronóstico de los pacientes, se emplearon las siguientes variables:

- El volumen del infarto medido entre el 4º y el 7º día.
- El deterioro neurológico precoz.
- La puntuación en la mRS a los 3 meses.
- La mejoría en la puntuación en la NIHSS.

Tomás Sobrino Moreiras

Se consideró deterioro neurológico precoz a un aumento igual o superior a los 4 puntos en la NIHSS en las primeras 24 horas de evolución.

Se consideró mal pronóstico cuando los pacientes presentaban una puntuación mayor de 2 puntos en la mRS o se producía el fallecimiento del paciente (asignando una puntuación de 6 en dicha escala).

La mejoría en la puntuación de la NIHSS fue determinada como la diferencia de puntuación entre el día 7 y la determinación basal, y entre el día 90 y la determinación basal.

4.2.2. EVALUACIÓN MOLECULAR

Después de la inclusión, se extrajo una primera muestra de sangre para hemograma, coagulación, bioquímica y VSG. A continuación se realizó una extracción sanguínea basal al ingreso del paciente, que se repitió a las 24 y 72 horas, así como a los 7 ± 1 días y a los 3 meses de la determinación basal para la posterior determinación de los marcadores moleculares. Cada extracción constó de 1 tubo de 4.5 mL de bioquímica con separador (para la obtención de suero):

Dejamos reposar los tubos durante 10 minutos a temperatura ambiente para la formación del botón celular, y luego centrifugamos los tubos a 3.000 rpm. durante otros 10 minutos. El suero se repartió en 2

alícuotas de 1 mL. Congelamos las 2 alícuotas a - 80 °C hasta la realización de los test moleculares oportunos.

Los niveles séricos de VEGF y SDF-1 α se midieron mediante kits comercializados de análisis cuantitativo de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA), obtenidos de Instant Elisa, MedSystems Diagnostics GmbH, Vienna, Austria; y Quantinea, R&D System. Minneapolis, MN, USA, respectivamente. Los niveles séricos de MMP-9 activa se determinaron mediante un ensayo de actividad, obtenida de Biotrack, Amersham Pharmacia, UK.

El análisis de estos marcadores moleculares se llevó a cabo sin conocer los datos clínicos ni de neuroimagen.

4.2.3. EVALUACIÓN CELULAR

Para la cuantificación de las EPCs en sangre periférica se realizó una extracción sanguínea (14 mL) basal al ingreso, así como a los días 7 \pm 1 y a los 3 meses \pm 15 días desde el momento de la inclusión en el estudio.

4.2.3.1. Extracción, conservación y procesamiento de las muestras

Se extrajeron 2 tubos de 7 mL con EDTA K3. Las muestras de sangre se conservaron a temperatura ambiente si fueron procesadas inmediatamente después de su extracción o en nevera a 4°C si la

Tomás Sobrino Moreiras

evaluación celular se realizó en las siguientes 2 horas. Las células mononucleadas de las muestras sanguíneas fueron aisladas usando un gradiente de densidad de Ficoll®, y 5×10^6 de estas células fueron cultivadas en placas de 6 pocillos bañados con fibronectina en Endocult TM Medium (StemCell Technologies, Vancouver, Canada). Pasadas 48h, las células no adheridas fueron recolectadas y 1×10^6 cultivadas en duplicado en placas de 24 pocillos bañados con fibronectina con el mismo medio de cultivo. Las colonias son cuantificadas y evaluadas 3 días más tarde por el método descrito por Hill y colaboradores (140) (figura 13).

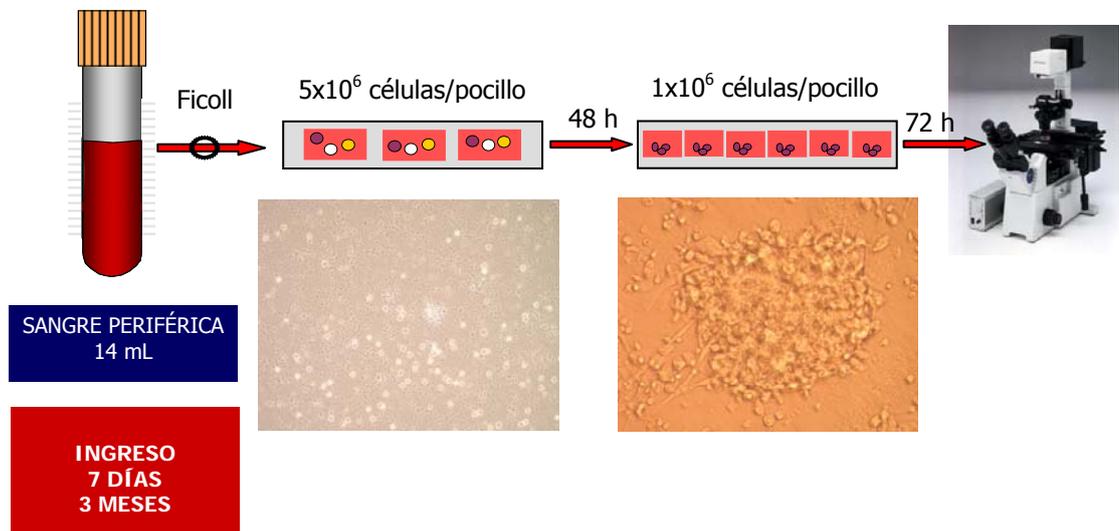


Figura 13. Método de cultivo de EPCs.

Una Unidad Formadora de Colonias (CFU) se define como un núcleo central de células redondeadas con células más alargadas en la

periferia. En el presente estudio hablaremos de CFU-EC (Unidades Formadoras de Colonias de Células Endoteliales) (**figura 14**).

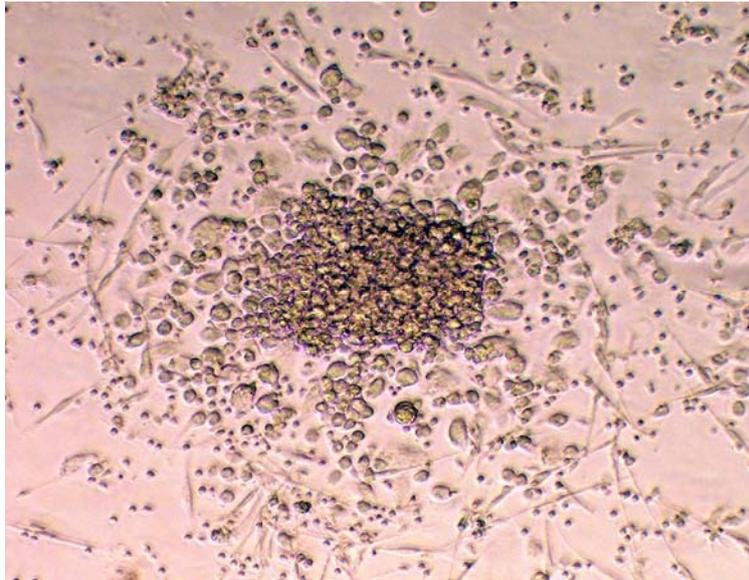


Figura 14. Microfotografía de CFU-EC en microscopio de contraste de fases (x100).

Las diferentes fases de diferenciación de las CFU-EC durante los 5 días de cultivo celular se reflejan en la **figura 15**.

El incremento del número de CFU-EC fue cuantificado durante la primera semana y definido como la diferencia absoluta entre el número de CFU-EC al 7º día y al ingreso.

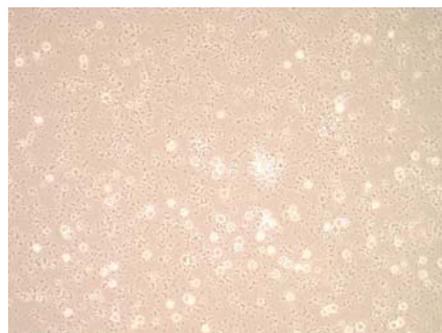
Se confirmó la línea endotelial de las células de cultivo por técnicas de Inmunohistoquímica siguiendo un método descrito previamente. (**87,140,151**)

Tomás Sobrino Moreiras

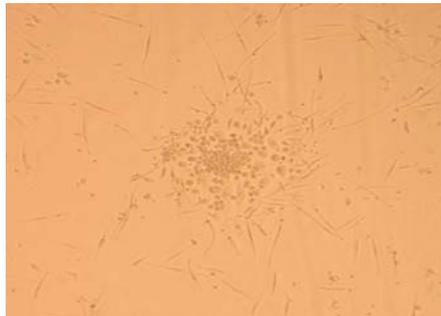
El coeficiente de variación intraensayo, obtenido por el único investigador que realizó el estudio celular, calculado por el análisis de 2 muestras sanguíneas de un mismo paciente fue de 0.96.



Células Mononucleadas sanguíneas
día 1 (x100)



Células Mononucleadas sanguíneas
día 2 (x100)



CFU-EC día 3 (x100)



CFU-EC día 4 (x100)



CFU-EC día 5 (x100)

Figura 15. Fases de diferenciación de las CFU-EC durante los 5 días de cultivo celular.

4.2.4. MÉTODO ESTADÍSTICO.

La descripción de las variables continuas se realizó mediante la media y desviación estándar si la distribución fue normal o con la mediana y rango de percentiles en caso contrario. Las variables categóricas se describieron mediante porcentajes. La comparación bivariada de grupos se realizó con los contrastes de t-Student (variables continuas normales), U-Mann-Whitney (variables continuas no normales) y chi-cuadrado (variables categóricas). Dado que las concentraciones de los marcadores moleculares no siguen una distribución normal fueron expresadas como mediana [percentiles], y las comparaciones entre grupos fueron realizadas usando el U-Mann-Whitney test o el Kruskal-Wallis test según fuese apropiado.

El análisis de Curva COR fue utilizado para determinar el punto de corte más apropiado para determinar buen pronóstico a partir de los siguientes resultados del estudio (Incremento de EPCs durante la primera semana). La influencia de las EPCs en el pronóstico funcional fue analizado mediante análisis de regresión logística, ajustando por las variables relacionadas con el buen pronóstico en los modelos divariados. La influencia del incremento del número de EPCs en el volumen y en la mejoría en la puntuación de la NIHSS se determinó mediante modelos de regresión lineal múltiple, también ajustados por la variables relacionadas con el volumen y con la modificación de la NIHSS en sendos modelos bivariados.

Tomás Sobrino Moreiras

El coeficiente de correlación r de Pearson fue utilizado para analizar la correlación existente entre las concentraciones de los marcadores moleculares (ingreso, 24 y 72 horas, 7 días y 3 meses) con el número de CFU-EC al ingreso, 7 días y 3 meses, así como con el incremento de EPCs durante los primeros 7 días.

Los modelos fueron ajustados por aquellos factores relacionados con el pronóstico en el análisis bivariado ($p < 0.05$). Una $p < 0.05$ fue considerada como estadísticamente significativa en todos los test.

El programa estadístico SPSS 14.0 para Windows XP fue utilizado para el análisis de datos.

5. RESULTADOS

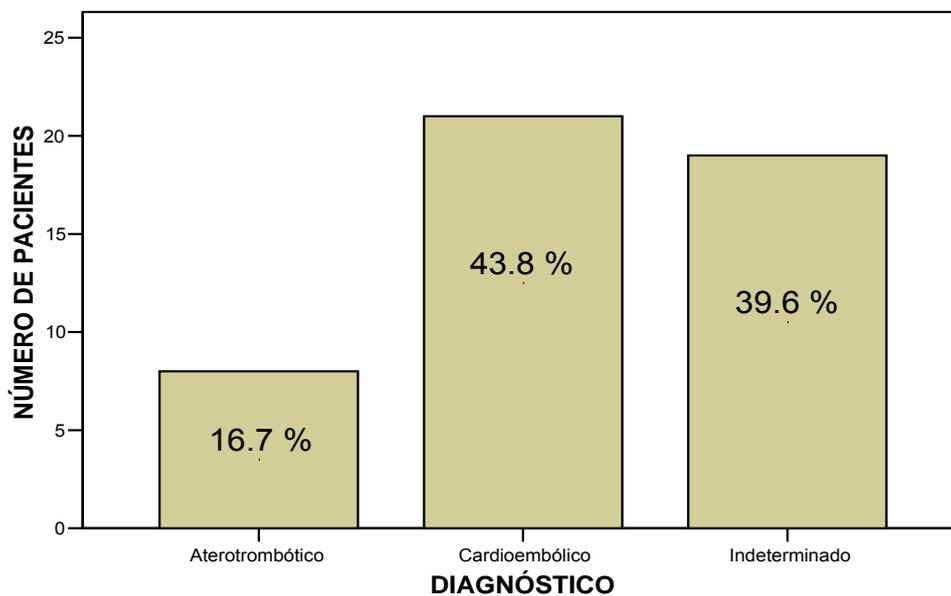
Tomás Sobrino Moreiras

En este estudio se han incluido 48 pacientes con el diagnóstico de ictus isquémico hemisférico no lacunar, de menos de 12 horas de evolución.

5.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

En nuestra muestra, la edad fue de 70.9 ± 10.1 años. La distribución por sexos fue de 24 hombres (50 %) y 24 mujeres (50 %).

En cuanto al diagnóstico etiopatogénico, 8 pacientes presentaron un ictus de origen aterotrombótico (16.7 %). Veintiún pacientes (43.8 %) presentó un infarto de origen cardioembólico, y 19 pacientes (39.6 %) un infarto de origen indeterminado (**Gráfica 4**).



Gráfica 4. Clasificación etiopatogénica (criterios TOAST)

En nuestra muestra, 23 pacientes presentaron más de 2 factores de riesgo vascular (47.9%). Asimismo, 16 pacientes (33.3%) estaban a

Neurorreparación mediada por Células Progenitoras Endoteliales en el Ictus Isquémico: influencia de Factores de Proliferación y Migración Celular Endógenos

Tomás Sobrino Moreiras

tratamiento con estatinas previo al ictus; quince pacientes (31.3%) recibieron tratamiento trombolítico con rtPA siguiendo los criterios SITS-MOST; y por último, 26 pacientes (54.2 %) recibieron tratamiento con citicolina. El tiempo de latencia desde el inicio de los síntomas al ingreso fue de 5.6 [2.4, 8.5] horas. Las cifras de PAS y PAD al ingreso fueron de 151.2 (23.2) y 82.6 (12.5) mm Hg, respectivamente; la temperatura axilar al ingreso fue de 36.5 (0.45) °C; y los niveles de glucosa y fibrinógeno en suero al ingreso fueron de 133.1 (40.1) y 422.1 (128.6) mg/dL, respectivamente. El grado de afectación neurológica al ingreso, evaluada por la NIHSS fue de 13 [6-18], **(tabla 3)**.

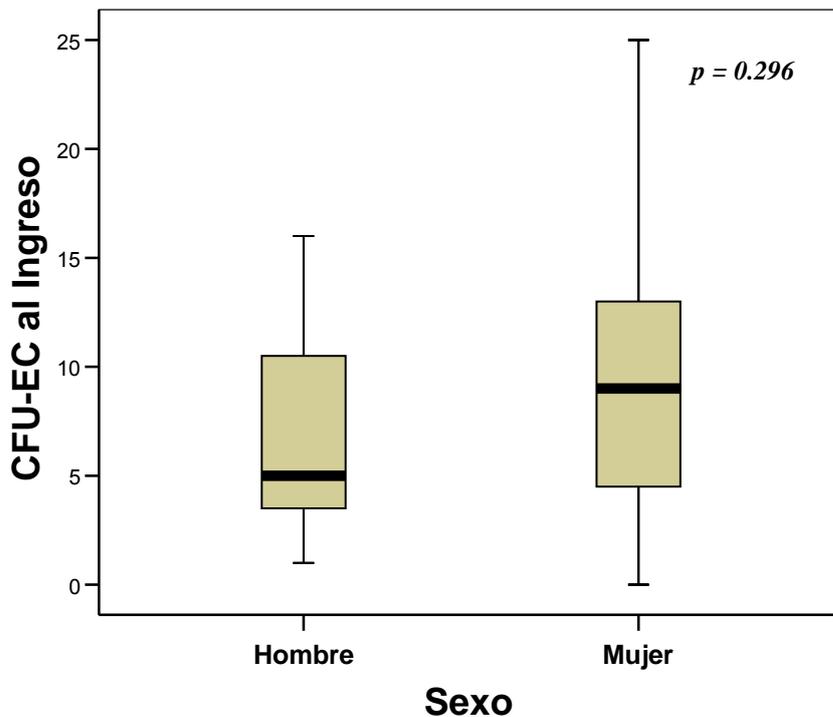
Hombres, %	50
Edad, años	70.9 (10.1)
Pacientes con >2 FRV, %	47.9
Pacientes a tratamiento previo con estatinas, %	33.3
Pacientes que recibieron tratamiento con rtPA, %	31.3
Pacientes a tratamiento con citicolina, %	54.2
PAS al ingreso, mm Hg	151.2 (23.2)
PAD al ingreso, mm Hg	82.6 (12.5)
Temperatura al ingreso, °C	36.5 (0.45)
Glucemia, mg/dL	133.1 (40.1)
Fibrinógeno, mg/dL	422.1 (128.6)
NIHSS al ingreso, mediana [percentiles]	13 [6-18]
Tiempo de Latencia, h	5.6 [2.4, 8.5]
Subtipos de Ictus, %:	
Cardioembólicos	43.8
Aterotrombóticos	16.7
Indeterminados	39.6

Tabla 3. Características basales de la muestra

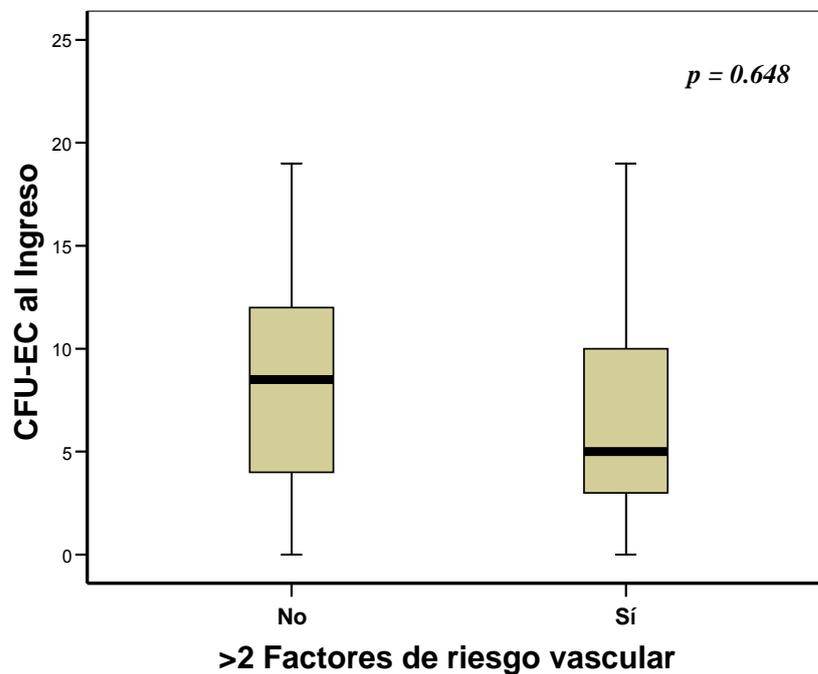
5.2. ANÁLISIS COMPARATIVOS

5.2.1. INFLUENCIA DEL SEXO Y DE LOS FRV EN EL NÚMERO DE CFU-EC AL INGRESO

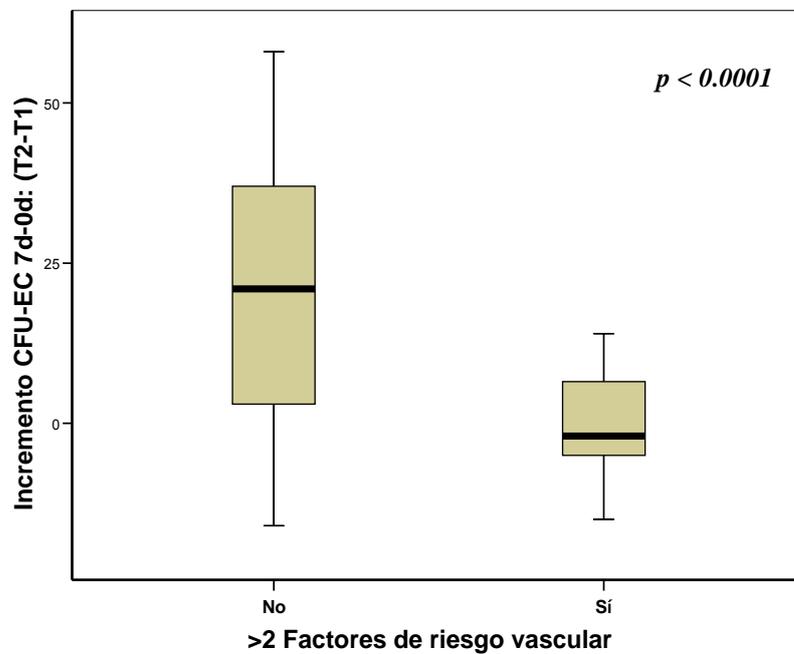
No se encontraron diferencias significativas en el número de CFU-EC al ingreso entre pacientes de distinto sexo (**gráfica 5**), así como entre pacientes que presentaban, o no, más de 2 factores de riesgo vascular al ingreso (**gráfica 6**). Sin embargo, sí que se observaron diferencias significativas en el curso evolutivo del crecimiento de las EPCs, de tal modo que el incremento de CFU-EC durante la primera semana fue significativamente menor en el grupo de pacientes que presentaban más de 2 factores de riesgo vascular al ingreso (**gráfica 7**).



Gráfica 5. Influencia del sexo en el número de CFU-EC al ingreso.



Gráfica 6. Influencia de los FRV en el número de CFU-EC al ingreso.



Gráfica 7. Influencia de los FRV en el Incremento de CFU-EC durante la primera semana.

Tomás Sobrino Moreiras

5.2.2. RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE CFU-EC Y EL PRONÓSTICO FUNCIONAL A LOS 3 MESES.

Para observar qué factores influyen en el pronóstico de los pacientes con ictus isquémico agudo, fue utilizada la puntuación en la mRS a los 3 meses, comparando a los pacientes con buen pronóstico (mRS < 3 puntos) con los pacientes con mal pronóstico (mRS ≥ 3 puntos) (**tabla 4**).

	Buen Pronóstico (n = 25)	Mal Pronóstico (n = 23)	P
Edad (años)	68.2 (12.6)	73.3 (4.1)	0.391
Hombres (%)	56.0	43.5	0.282
Tiempo de latencia (h)	5.3 (2.1)	5.3 (2.3)	0.274
Factores de Riesgo Vascular			
Ant. de Hipertensión (%)	36.0	69.7	0.020
Ant. de Diabetes (%)	24.0	34.8	0.307
Ant. de Dislipemia (%)	24.0	30.4	0.430
Ant. de Tabaquismo (%)	12.0	8.7	0.541
Ant. de Enolismo (%)	16.0	13.0	0.352
Ant. de Cardiopatía isquémica (%)	20.0	17.4	0.556
Ant. de Fibrilación Auricular (%)	24.0	40.0	0.182
Ictus previo (%)	0	8	0.203
Bioquímica y signos vitales al ingreso			
Temperatura (°C)	36.4 (0.3)	36.7 (0.4)	0.006
Presión Arterial Sistólica (mm Hg)	144.7 (21.1)	160.0 (24.6)	0.039
Presión Arterial Diastólica (mm Hg)	81.2 (12.4)	84.7 (13.2)	0.268
Glucemia (mg/dL)	119.1 (31.2)	148.9 (44.1)	0.015
Fibrinógeno (mg/dL)	380.8 (103.6)	434.6 (125.9)	0.026
Tratamiento con tPA, (%)	44.0	17.4	0.046
Tratamiento con estatinas, (%)	40.0	26.1	0.238
Variables de Neuroimagen			
Volumen del infarto (cc)	13.2 (10.1)	64.8 (29.6)	<0.0001

Neurorreparación mediada por Células Progenitoras Endoteliales en el Ictus Isquémico: influencia de Factores de Proliferación y Migración Celular Endógenos

Tomás Sobrino Moreiras

	Buen Pronóstico (n = 25)	Mal Pronóstico (n = 23)	p
Características Clínicas			
NIHSS al ingreso	6 [5, 9]	18 [14, 20]	<0.0001
Signos ultrasonográficos, (%)	40.0	39.1	0.377
Mejoría de la NIHSS 1ª semana	-6 [-8, -3]	-4 [-6, -1]	0.001
Mejoría de la NIHSS a los 3 meses	0 [0, 0]	12 [11, 16]	<0.0001
Diagnóstico Etiológico			
Aterotrombótico (%)	16.0	17.4	0.435
Cardioembólico (%)	36.0	52.2	
Indeterminado (%)	48.0	30.4	
Células Progenitoras Endoteliales (EPCs)			
Número de CFU-EC al ingreso	8 [4, 12]	9 [3, 14]	0.407
Número de CFU-EC al 7º día	36 [14, 47]	3 [2, 10]	<0.0001
Número de CFU-EC a los 3 meses	37 [22, 63]	9 [4, 17]	<0.0001
Incremento CFU-EC en 1ª semana	23 [11, 36]	-3 [-7, 1]	<0.0001
Incremento CFU-EC a los 3 meses	80 [68, 86]	27 [-102, 51]	<0.0001

Tabla 4. Factores que influyen en el pronóstico de los pacientes con ictus.

Se ha evaluado la **edad; sexo; tiempo de latencia; antecedentes de factores de riesgo vascular** (hipertensión, diabetes mellitus, dislipemia, antecedentes de tabaquismo y enolismo, antecedentes de cardiopatía isquémica, antecedentes de fibrilación auricular e ictus previo); **bioquímica y signos vitales al ingreso** (temperatura, PAS y PAD, glucemia y fibrinógeno, así como tratamiento previo con estatinas y tratamiento trombolítico con tPA); **variables de neuroimagen** (volumen del infarto); **características clínicas** (NIHSS al ingreso, signos ultrasonográficos y la Mejoría en la puntuación de la NIHSS en la primera semana y a los 3 meses); **diagnóstico etiológico del ictus**; y **variables de las EPCs** (Número de CFU-EC al ingreso, a los 7 días y a

Tomás Sobrino Moreiras

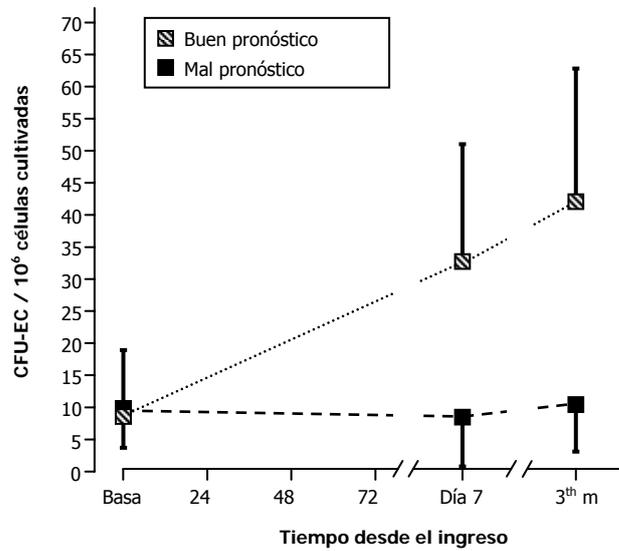
los 3 meses, así como el incremento del número de CFU-EC durante la primera semana y los 3 primeros meses) . Los resultados se expresan como porcentaje, media (desviación estándar) o como la mediana y los percentiles 25 y 75.

Los factores que se relacionan con un peor pronóstico son los antecedentes de hipertensión arterial (69.7 % vs. 36.0 %, $p=0.020$); una mayor cifra de PAS al ingreso (160 (24.6) mm Hg vs. 144.7 (21.1), $p=0.039$); mayor temperatura (36.7 °C vs 36.4, $p=0.006$), mayor glucemia (148.9 mg/dL vs. 119.1, $p=0.015$) y los niveles más elevados de fibrinógeno (434.6 mg/dL vs. 380.8, $p=0.026$); mayor puntuación en la NIHSS al ingreso (18 [14, 20] vs. 6 [5, 9], $p < 0.0001$); y mayor volumen del infarto (64.8 cc vs. 13.2, $p < 0.0001$).

No se encontraron diferencias en el número de CFU-EC al ingreso entre los pacientes con buen y mal pronóstico (8 [4, 12] vs. 9 [3, 14], $p=0.407$). Sin embargo, al 7º día de evolución, el número de CFU-EC fue significativamente más elevado en los pacientes que presentaron buen pronóstico funcional a los 3 meses (36 [14, 47] vs. 3 [2, 10], $p < 0.0001$) y esta diferencia se evidenció nuevamente a los 3 meses (37 [22, 63] vs. 9 [4, 17], $p < 0.0001$) (**Gráfica 8**). Asimismo, los pacientes con buen pronóstico presentaron un mayor incremento en el número de CFU-EC durante la primera semana de evolución (23 [11, 36] vs. -3 [-7, 1], $p < 0.0001$) así como a los 3 meses (80 [68, 86] vs. 27 [-102, 51], $p < 0.0001$).

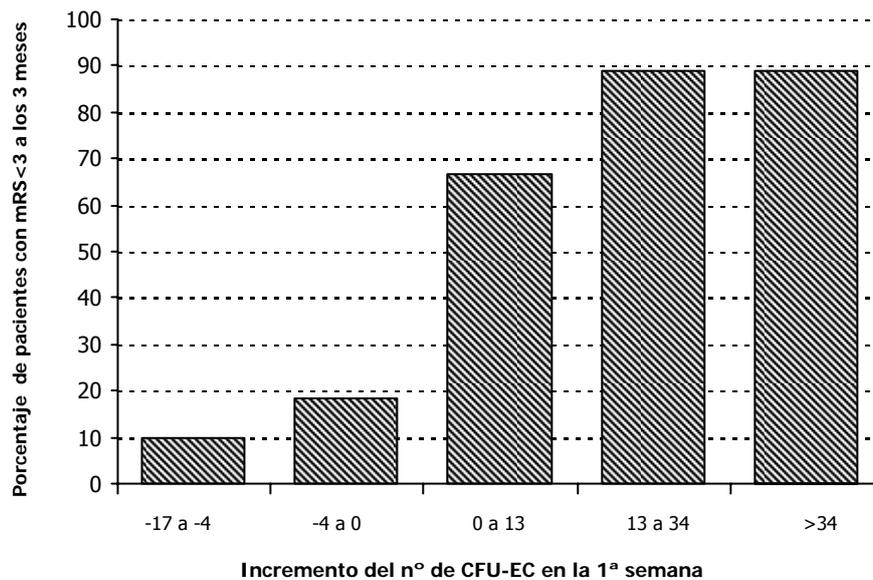
Neurorreparación mediada por Células Progenitoras Endoteliales en el Ictus Isquémico: influencia de Factores de Proliferación y Migración Celular Endógenos

Tomás Sobrino Moreiras



Gráfica 8. Perfil temporal del número de CFU-EC en pacientes con buen y mal pronóstico durante un periodo de 3 meses.

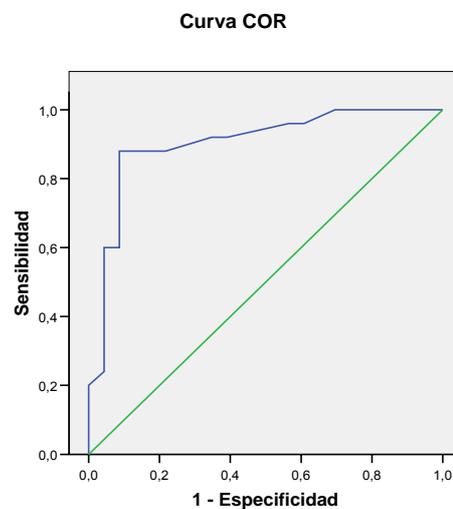
Además, durante la primera semana, el mayor incremento del número de CFU-EC fue observado en el grupo de pacientes con buen pronóstico (mRS < 3) a los 3 meses. **(Gráfica 9)**



Gráfica 9. Probabilidad de buen pronóstico a los 3 meses en relación al Incremento del número de CFU-EC en la primera semana (en quintiles).

Tomás Sobrino Moreiras

El análisis ROC (receiver operating characteristics) nos muestra que un Incremento de EPCs ≥ 4 CFU-EC, durante la primera semana, predice con la más alta sensibilidad (88%) y especificidad (92%) la probabilidad de buen pronóstico (mRS < 3) a los 3 meses (**gráfica 10**).



Los segmentos diagonales son producidos por los empates.

Área bajo la curva

Variables resultado de contraste: Incremento EPCs 7d-0:
(T2-T1)x100/T1

Área	Error típ. ^a	Sig. asintótica ^b	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
			Límite inferior	Límite superior
,903	,047	,000	,811	,995

La variable (o variables) de resultado de contraste: Incremento EPCs 7d-0: (T2-T1)x100/T1 tiene al menos un empate entre el grupo de estado real positivo y el grupo de estado real negativo. Los estadísticos pueden estar sesgados .

a. Bajo el supuesto no paramétrico

b. Hipótesis nula: área verdadera = 0,5

Gráfica 10. Análisis ROC: un Incremento ≥ 4 CFU-EC durante la 1^a semana predice con una sensibilidad del 88% y una especificidad del 92% la probabilidad de buen pronóstico a los 3 meses.

Neurorreparación mediada por Células Progenitoras Endoteliales en el Ictus Isquémico: influencia de Factores de Proliferación y Migración Celular Endógenos

Tomás Sobrino Moreiras

Utilizando un modelo de regresión logística, se obtiene que el Incremento ≥ 4 CFU-EC durante la primera semana está independientemente asociado con el buen pronóstico (mRS < 3) a los 3 meses de evolución (OR: 22.6, IC 95 %: 1.1-372.5, $p=0.018$), después de ajustar por los antecedentes de hipertensión, PAS, temperatura, glucemia y fibrinógeno, NIHSS al ingreso, tratamiento con tPA y volumen del infarto (**tabla 5**).

Variable Independiente	OR	OR ajustado
Incremento ≥ 4 CFU-EC 1ª semana	77.0 [11.7, 507.9], $p < 0.0001$	22.6 [1.1, 372.5], $p=0.018$

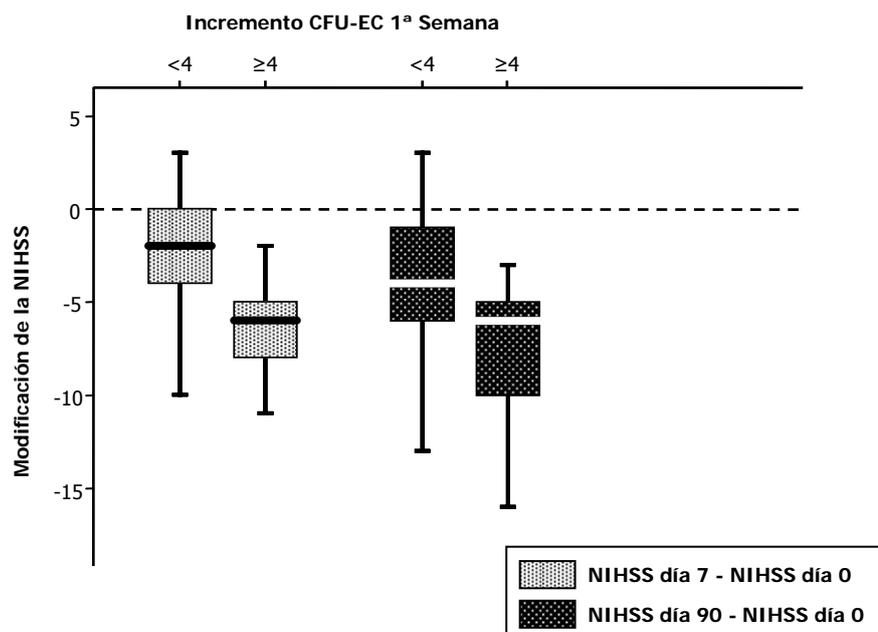
Tabla 5. Modelo de Regresión Logística: OR cruda y ajustada para el buen pronóstico a los 3 meses en pacientes con un Incremento ≥ 4 CFU-EC durante la 1ª semana. Variable dependiente: Buen pronóstico a los 3 meses (mRS < 3).

5.2.3. ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE CONDICIONAN UN INCREMENTO DEL NÚMERO DE CFU-EC ≥ 4 EN LA PRIMERA SEMANA.

En la **tabla 6** se muestran las características basales y evolutivas de los pacientes en relación con el incremento del número de CFU-EC durante la primera semana. El antecedente de hipertensión arterial (69.2 % vs. 31.8, $p = 0.010$); una temperatura más elevada (36.6 °C vs 36.3, $p = 0.005$); y niveles superiores de glucemia (147.9 mg/dL vs.

Tomás Sobrino Moreiras

115.9, $p = 0.015$) y de fibrinógeno (428.8 mg/dL vs. 378.7, $p = 0.036$) se asocian con un menor incremento del número de CFU-EC, así como un mayor déficit neurológico al ingreso (16 [13, 19] vs. 6 [5, 10], $p < 0.0001$) y un mayor volumen de infarto (64.8 cc vs. 13.2, $p < 0.0001$). Por el contrario, el tratamiento con tPA (50.0 % vs. 15.4, $p = 0.011$) se asocia con un incremento significativo del número de CFU-EC en la primera semana. Los pacientes con un incremento ≥ 4 CFU-EC durante la primera semana presentan una mejoría significativa en la puntuación de la NIHSS durante la primera semana (-6 [-9, -5] vs. -2 [-4, 0], $p < 0.0001$) y durante los 3 primeros meses (-6 [-10, -5] vs. -4 [-6, -1], $p = 0.002$) (**Gráfica 11**), así como un mejor pronóstico funcional a los 3 meses (0 [0, 1] vs. 4 [3, 4], $p < 0.0001$).



Gráfica 11. Mejoría de la puntuación en la NIHSS durante la primera semana y los primeros 3 meses en relación al Incremento de CFU-EC en la primera semana.

Neurorreparación mediada por Células Progenitoras Endoteliales en el Ictus Isquémico: influencia de Factores de Proliferación y Migración Celular Endógenos

Tomás Sobrino Moreiras

	Incremento ≥ 4 CFU-EC (n = 22)	Incremento < 4 CFU-EC (n = 26)	p
Edad (años)	69.1 (12.9)	72.6 (6.6)	0.488
Hombres (%)	45.5	53.8	0.386
Tiempo de latencia (h)	5.1 (3.4)	4.3 (2.2)	0.123
Factores de Riesgo Vascular			
Ant. de Hipertensión (%)	31.8	69.2	0.010
Ant. de Diabetes (%)	22.7	34.6	0.281
Ant. de Dislipemia (%)	22.7	30.8	0.385
Ant. de Tabaquismo (%)	4.5	15.5	0.230
Ant. de Enolismo (%)	18.2	11.5	0.358
Ant. de Cardiopatía isquémica (%)	15.4	22.7	0.389
Bioquímica y signos vitales al ingreso			
Temperatura (°C)	36.3 (0.3)	36.6 (0.4)	0.005
PAS (mm Hg)	145.3 (22.1)	157.3 (22.4)	0.109
PAD (mm Hg)	81.2 (12.8)	84.1 (12.7)	0.304
Glucemia (mg/dL)	115.9 (25.1)	147.9 (45.9)	0.015
Fibrinógeno (mg/dL)	378.7 (102.2)	428.8 (124.7)	0.036
Tratamiento con tPA, (%)	50.0	15.4	0.011
Tratamiento con estatinas, (%)	40.9	26.9	0.237
Variables de Neuroimagen			
Volumen del infarto (cc)	19.1 (21.4)	51.2 (35.1)	<0.0001
Diagnóstico Etiológico			
Aterotrombótico (%)	9.1	23.1	0.411
Cardioembólico (%)	50.0	38.5	
Indeterminado (%)	40.9	38.5	
Características clínicas			
NIHSS al ingreso	6 [5, 10]	16 [13,19]	<0.0001
Signos ultrasonográficos, (%)	36.6	50.0	0.172
Mejoría de la NIHSS 1ª semana	-6 [-9, -5]	-2 [-4, 0]	<0.0001
Mejoría de la NIHSS a los 3 meses	-6 [-10, -5]	-4 [-6, -1]	0.002
mRS a los 3 meses	0 [0, 1]	4 [3, 4]	<0.0001

Tabla 6. Factores que influyen en el Incremento \geq ó $<$ 4 CFU-EC en la primera semana.

Tomás Sobrino Moreiras

En modelos de regresión lineal, la mejoría en la puntuación de la NIHSS durante la primera semana (B: 4.7, IC 95%: 2.5 - 6.8; $p < 0.0001$) y en los tres primeros meses (B: 3.8, IC 95%, 2.2 - 7.4; $p = 0.001$) se asocian independientemente con un incremento no categorizado de CFU-EC durante la primera semana de evolución, después de ajustar por la NIHSS al ingreso, tratamiento con tPA y estatinas, volumen del infarto y subtipo de ictus (ictus cardioembólico vs. ictus no cardioembólico) (**tabla 7**).

Variable	B (IC 95%),p	B (IC 95%),p ajustado
Mejoría de la NIHSS 1ª semana	4.6 [2.3, 5.9], $p < 0.0001$	4.7 [2.5, 6.8], $p < 0.0001$
Mejoría de la NIHSS a los 3 meses	3.5 [1.4, 5.7], $p = 0.002$	3.8 [2.2, 7.4], $p = 0.001$

Tabla 7. Modelo de Regresión Lineal: B cruda y ajustada para la mejoría de la puntuación en la NIHSS en la 1ª semana y a los 3 meses en pacientes con un Incremento de CFU-EC durante la 1ª semana.

5.2.4. RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE CFU-EC Y LOS MARCADORES MOLECULARES ENDÓGENOS DE PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN CELULAR.

Para observar la correlación existente entre las EPCs y los marcadores moleculares endógenos de proliferación y migración celular (VEGF, SDF-1 α , MMP9 activa) se utilizó el coeficiente de correlación r de Pearson. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 8**.

GRUPO	MARCADOR		
		Coef. Pearson	p
CFU-EC basales	VEGF basal	- 0.020	0.891
Incremento CFU-EC 1ª Semana	VEGF basal	0.054	0.718
	VEGF 24h	0.782	< 0.0001
	VEGF 72h	0.839	< 0.0001
	VEGF 7º día	0.602	< 0.0001
CFU-EC 3er mes	VEGF basal	0.056	0.721
	VEGF 24h	0.717	< 0.0001
	VEGF 72h	0.727	< 0.0001
	VEGF 7º día	0.669	< 0.0001
	VEGF 3er mes	- 0.106	0.499
CFU-EC basales	SDF-1α basal	- 0.087	0.549
Incremento CFU-EC 1ª Semana	SDF-1α basal	- 0.175	0.235
	SDF-1α 24h	0.828	< 0.0001
	SDF-1α 72h	- 0.026	0.859
	SDF-1α 7º día	- 0.142	0.335
CFU-EC 3er mes	SDF-1α basal	- 0.129	0.409
	SDF-1α 24h	0.587	< 0.0001
	SDF-1α 72h	0.015	0.923
	SDF-1α 7º día	- 0.275	0.075
	SDF-1α 3er mes	- 0.311	0.043

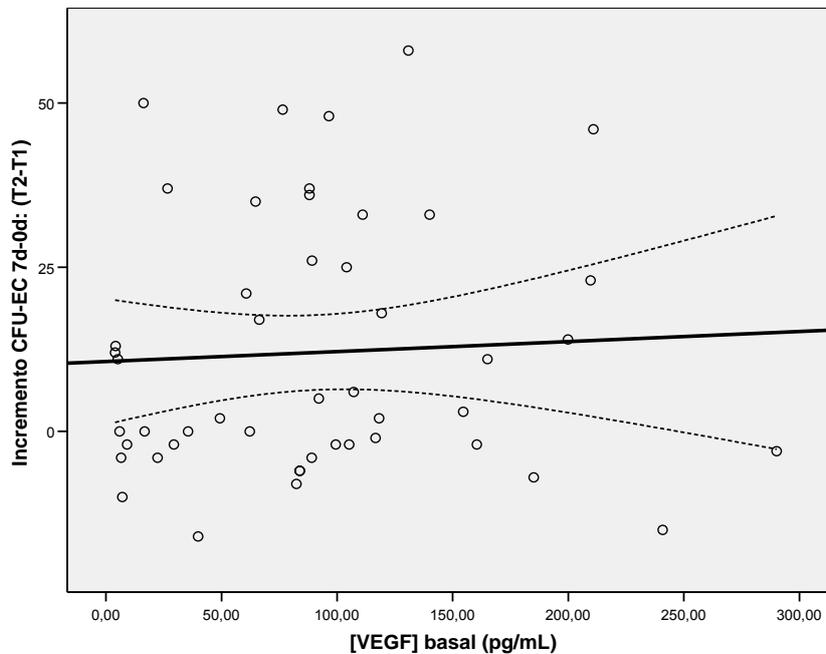
GRUPO	MARCADOR	Coef. Pearson	
			p
CFU-EC basales	MMP9 activa basal	0.078	0.590
Incremento CFU-EC 1ª Semana	MMP9 activa basal	0.343	0.017
	MMP9 activa 24h	0.740	< 0.0001
	MMP9 activa 72h	0.442	0.002
	MMP9 activa 7º día	0.474	0.001
CFU-EC 3er mes	MMP9 activa basal	0.287	0.062
	MMP9 activa 24h	0.561	< 0.0001
	MMP9 activa 72h	0.343	0.024
	MMP9 activa 7º día	0.403	0.007
	MMP9 activa 3er mes	0.201	0.196

Tabla 8. Resumen de correlaciones entre las EPCs y los marcadores moleculares endógenos de proliferación y migración celular.

Puesto que el análisis ROC nos muestra que el Incremento de EPCs ≥ 4 CFU-EC, durante la primera semana, predice con la más alta sensibilidad (88%) y especificidad (92%) la probabilidad de buen pronóstico (mRS <3) a los 3 meses (**ver página 86**) el análisis se centra en aquellos marcadores que se correlacionan positivamente con el Incremento del número de CFU-EC en la primera semana.

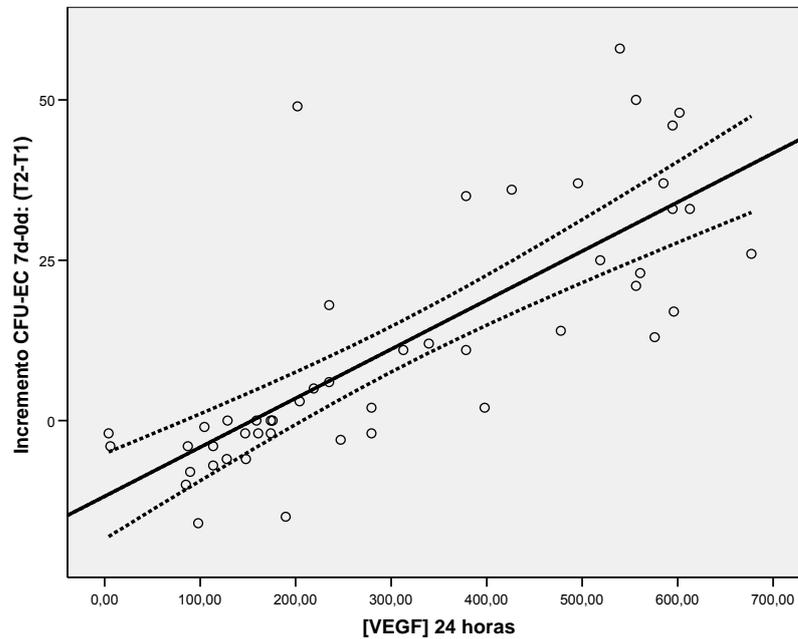
La relación del Incremento del número de CFU-EC en la primera semana con los niveles de VEGF se expresa en las **gráficas 12, 13, 14 y 15**; con los niveles de SDF-1 α en las **gráficas 16, 17, 18 y 19**; y con los niveles de MMP-9 activa en las **gráficas 20, 21, 22, y 23**.

Encontramos que existe correlación positiva entre el Incremento de CFU-EC durante la 1^a semana y los niveles de VEGF a las 24 horas ($r=0.782$), 72 horas ($r=0.839$) y al 7^o día ($r=0.602$); con los niveles de SDF-1 α a las 24 horas ($r=0.828$); así como con los niveles de MMP-9 activa basales ($r=0.343$), 24 horas ($r=0.740$), 72 horas ($r=0.442$) y al 7^o día ($r=0.474$).

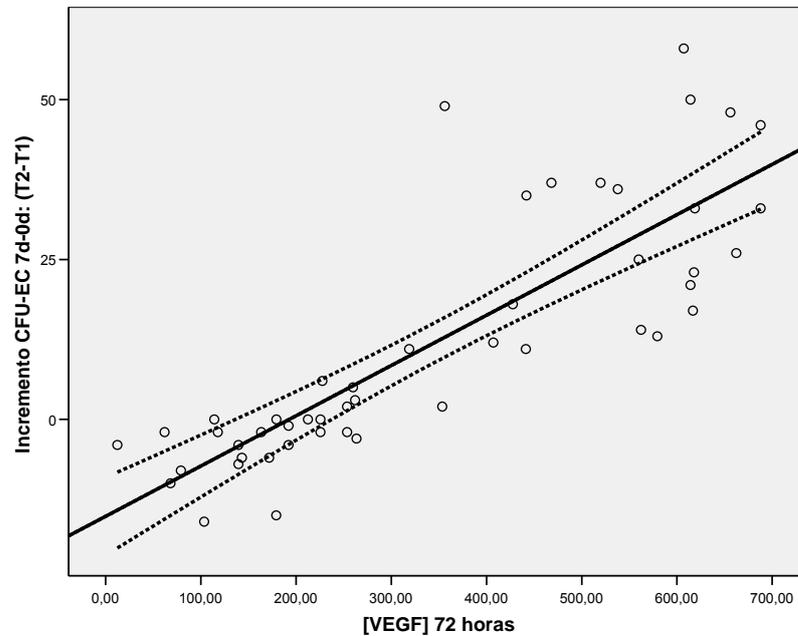


Gráfica 12. Relación entre los niveles de VEGF basal y el Incremento del número de CFU-EC en la primera semana. Coef. Pearson = 0.054, $p = 0.718$.

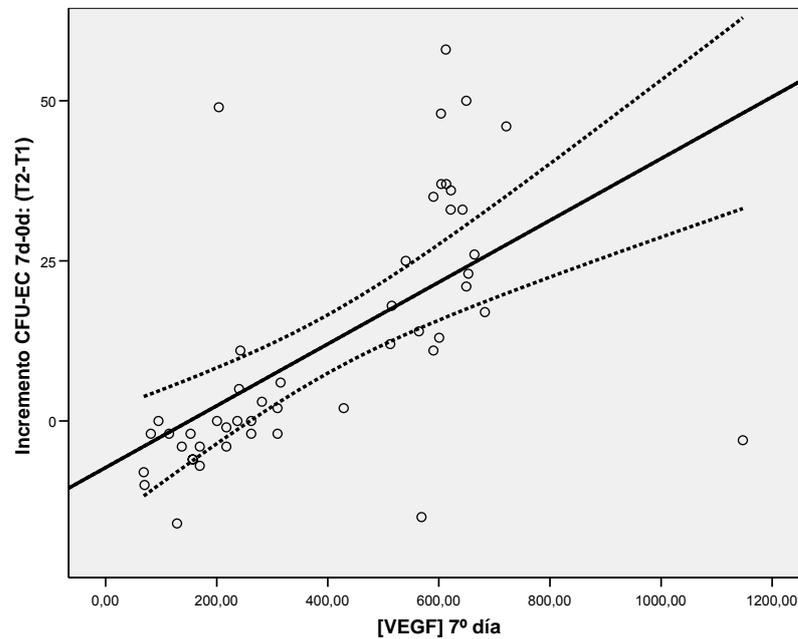
Tomás Sobrino Moreiras



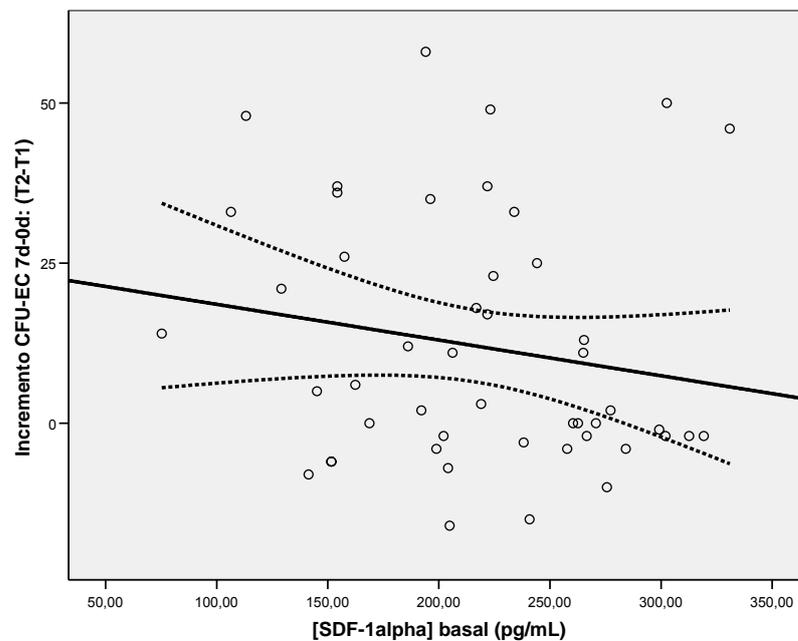
Gráfica 13. Relación entre los niveles de VEGF a las 24 h y el Incremento del número de CFU-EC en la primera semana. Coef. Pearson = 0.782, $p < 0.0001$.



Gráfica 14. Relación entre los niveles de VEGF a las 72 h y el Incremento del número de CFU-EC en la primera semana. Coef. Pearson = 0.839, $p < 0.0001$.

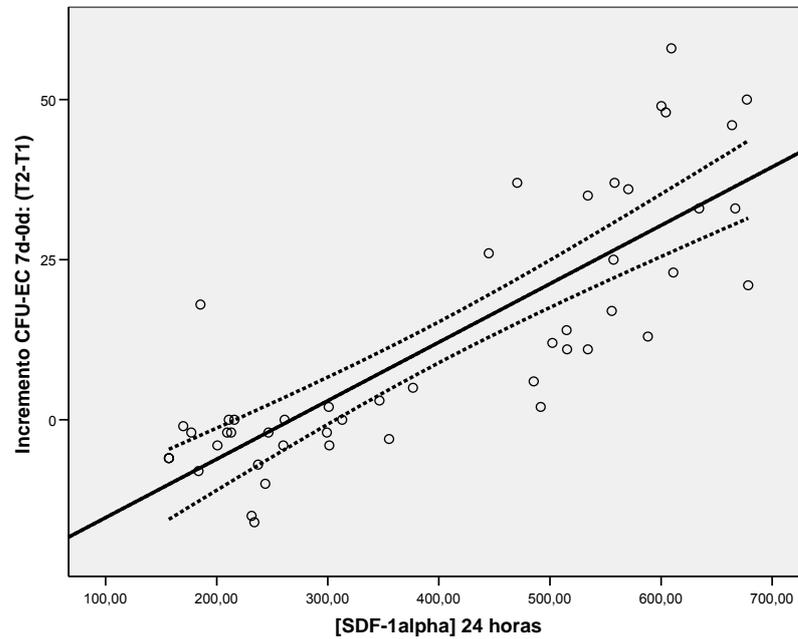


Gráfica 15. Relación entre los niveles de VEGF al 7º día y el Incremento del número de CFU-EC en la primera semana. Coef. Pearson = 0.602, $p < 0.0001$.

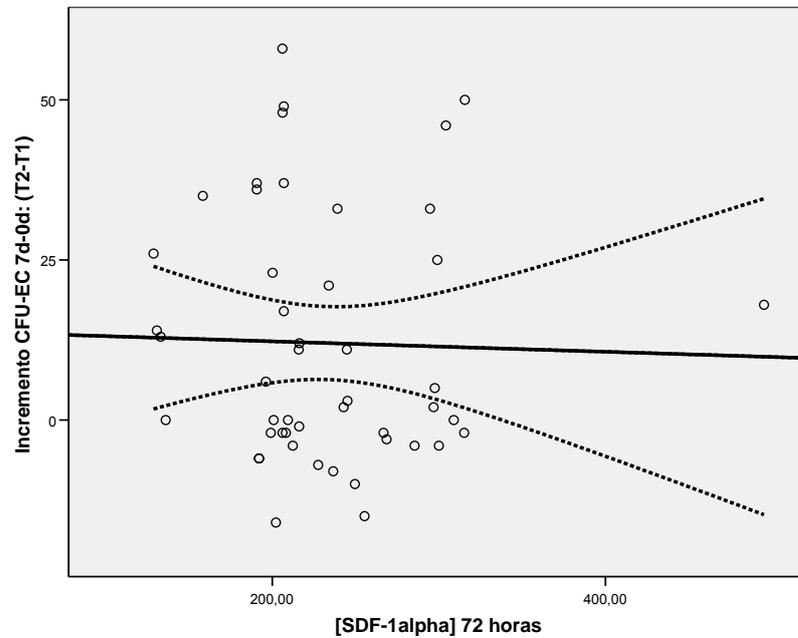


Gráfica 16. Relación entre los niveles de SDF-1 α basal y el Incremento del número de CFU-EC en la primera semana. Coef. Pearson = - 0.175, $p = 0.235$.

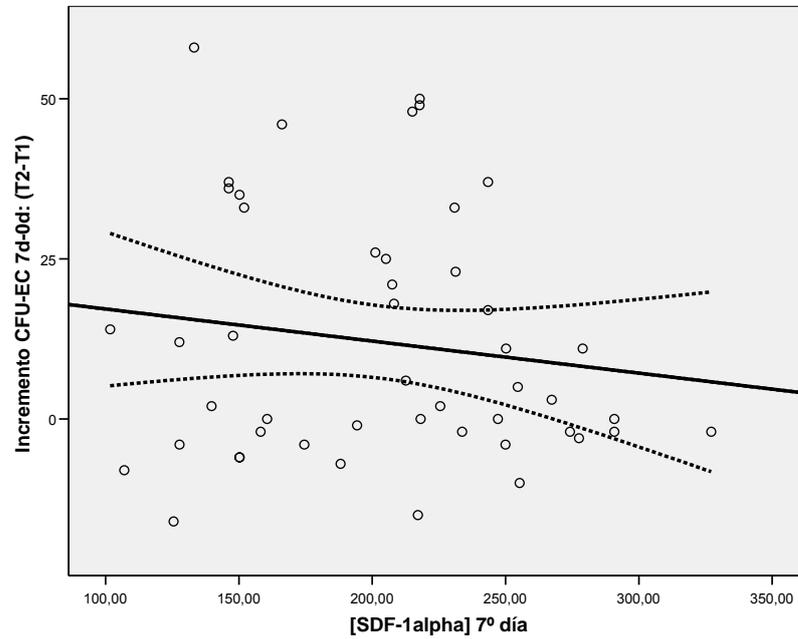
Tomás Sobrino Moreiras



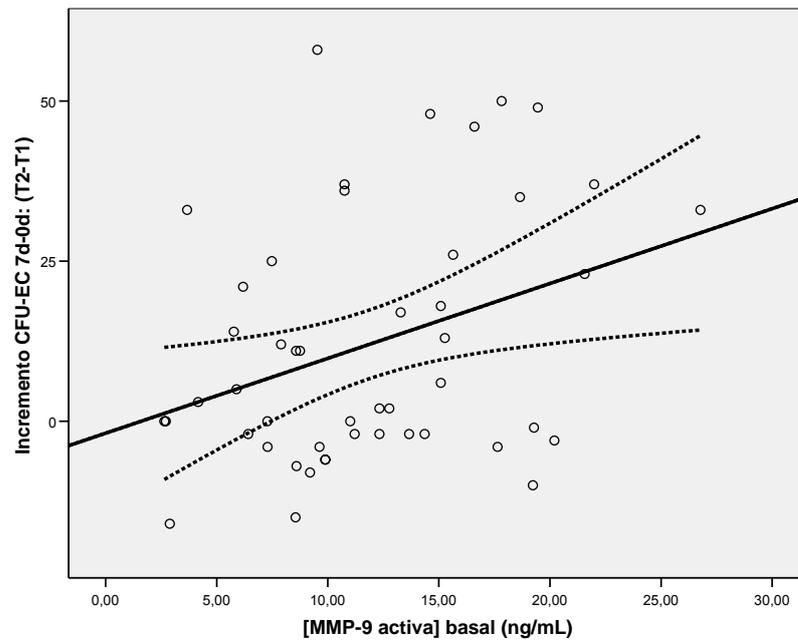
Gráfica 17. Relación entre los niveles de SDF-1 α a las 24 h y el Incremento del número de CFU-EC en la primera semana. Coef. Pearson = 0.828, $p < 0.0001$.



Gráfica 18. Relación entre los niveles de SDF-1 α a las 72 h y el Incremento del número de CFU-EC en la primera semana. Coef. Pearson = - 0.026, $p = 0.859$.

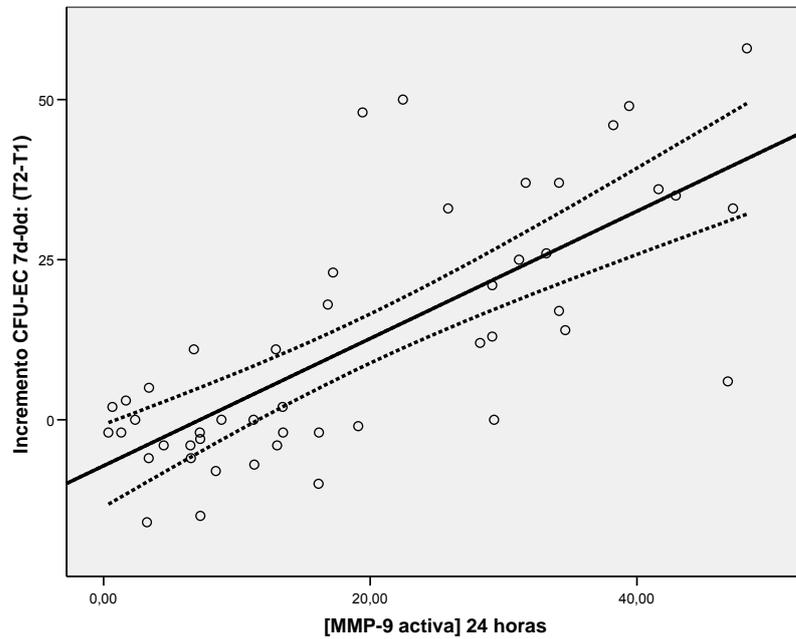


Gráfica 19. Relación entre los niveles de SDF-1 α al 7º día y el Incremento del número de CFU-EC en la primera semana. Coef. Pearson = - 0.142, p = 0.335.

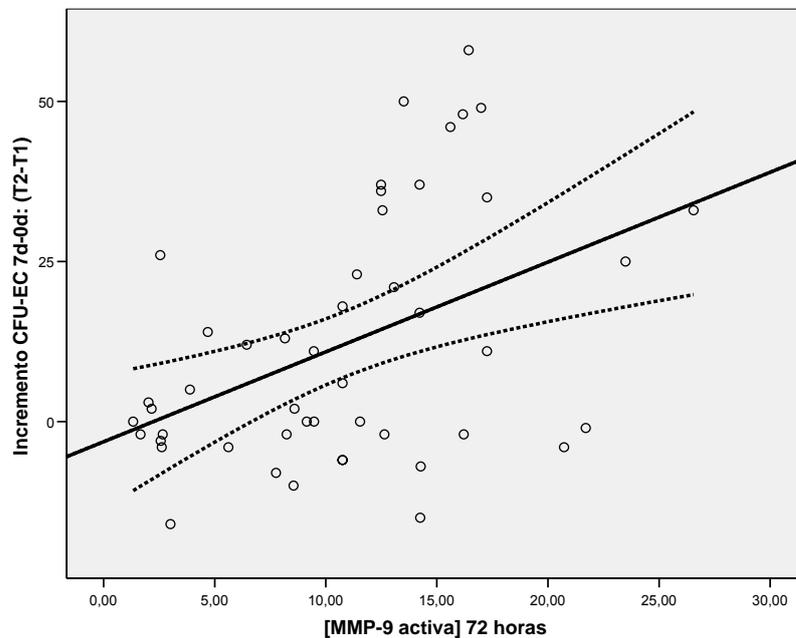


Gráfica 20. Relación entre los niveles de MMP-9 activa basal y el Incremento del número de CFU-EC en la primera semana. Coef. Pearson = 0.343, p = 0.017.

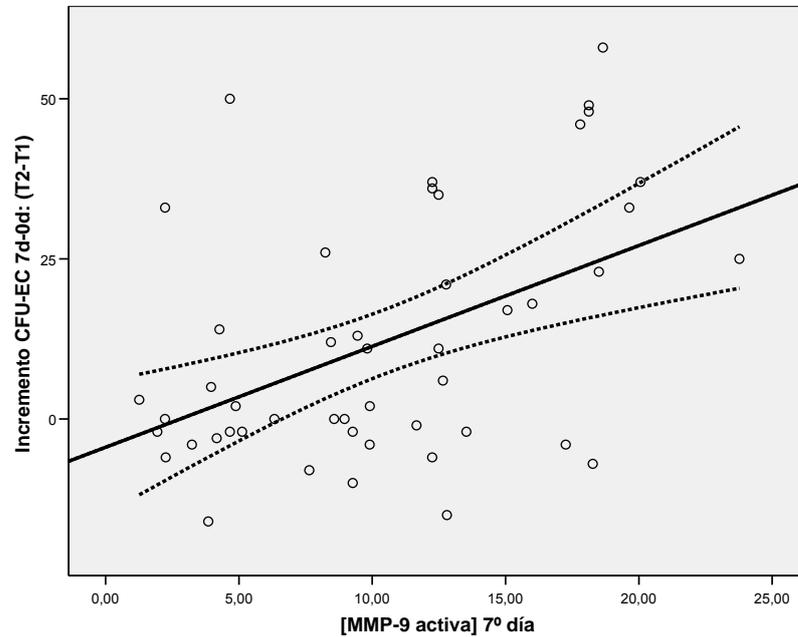
Tomás Sobrino Moreiras



Gráfica 21. Relación entre los niveles de MMP-9 activa a 24 h y el Incremento del número de CFU-EC en la primera semana. Coef. Pearson = 0.740, $p < 0.0001$.



Gráfica 22. Relación entre los niveles de MMP-9 activa a 72 h y el Incremento del número de CFU-EC en la primera semana. Coef. Pearson = 0.442, $p = 0.002$.



Gráfica 23. Relación entre los niveles de MMP-9 activa 7º día y el Incremento del número de CFU-EC en la primera semana. Coef. Pearson = 0.474, $p = 0.001$.

Para analizar qué marcadores moleculares endógenos de proliferación y migración celular influyen independientemente en el Incremento del número de CFU-EC en la primera semana, hemos empleado un modelo de regresión lineal múltiple, utilizando como variable dependiente el Incremento del número de CFU-EC en la primera semana (**tabla 9**).

Las variables que han demostrado una correlación significativa con el Incremento del número de CFU-EC son los niveles de VEGF a las 72 horas, así como los niveles de SDF-1 α a las 24 horas.

Tomás Sobrino Moreiras

Variables independientes	Coeficientes ^a		Intervalo de confianza para B al 95 %	
	B	Sig.	Límite inferior	Límite superior
VEGF 24 h	- 0.043	0.124	- 0.098	0.012
VEGF 72 h	0.091	0.003	0.033	0.149
VEGF 7^a día	- 0.016	0.127	-0.036	0.005
SDF-1α 24 h	0.037	0.036	0.002	0.071
MMP-9 activa basal	0.360	0.220	-0.225	0.945
MMP-9 activa 24 h	0.248	0.114	-0.062	0.558
MMP-9 activa 72 h	0.041	0.910	-0.695	0.777
MMP-9 activa 7^o día	0.033	0.933	-0.757	0.823

Tabla 9. Correlación entre el Incremento de CFU-EC en la 1^a semana y los marcadores moleculares endógenos de proliferación y migración celular.
a. variable dependiente: Incremento del n^o de CFU-EC en la 1^a semana.

5.2.5. INFLUENCIA DE FÁRMACOS EN FASE AGUDA SOBRE EL INCREMENTO DEL NÚMERO DE CFU-EC EN LA PRIMERA SEMANA.

Para observar qué factores, incluidos fármacos en fase aguda, influyen en el Incremento del número de CFU-EC en la primera semana de evolución, fue realizado un estudio bivariado, comparando a los pacientes que presentaron, o no, Incremento del número de CFU-EC entre el día 7 y el ingreso con los pacientes **(tabla 10)**.

	Incremento (n = 24)	No Incremento (n = 24)	p
Edad (años)	69.7 (12.6)	72.2 (6.7)	0.391
Hombres (%)	50.0	50.0	0.613
Tiempo de latencia (h)	5.0 (3.1)	4.4 (2.3)	0.134
Factores de Riesgo Vascular			
Ant. de Hipertensión (%)	29.4	75.0	0.002
Ant. de Diabetes (%)	20.8	37.5	0.171
Ant. de Dislipemia (%)	20.8	33.3	0.259
Ant. de Tabaquismo (%)	8.3	12.5	0.500
Ant. de Enolismo (%)	4.2	4.2	0.919
Ant. de Cardiopatía isquémica (%)	20.8	16.7	0.500
Ant. de Fibrilación Auricular (%)	33.3	33.3	0.620
Ictus previo (%)	8.3	4.2	0.221
Bioquímica y signos vitales al ingreso			
Temperatura (°C)	36.3 (0.3)	36.7 (0.5)	0.003
Presión Arterial Sistólica (mm Hg)	144.5 (21.5)	157.9 (23.4)	0.045
Presión Arterial Diastólica (mm Hg)	81.3 (12.3)	83.8 (12.9)	0.336
Glucemia (mg/dL)	117.5 (27.8)	148.7 (44.8)	0.016
Fibrinógeno (mg/dL)	376.8 (101.6)	467.4 (138.6)	0.018
Diagnóstico Etiológico			
Aterotrombótico (%)	16.7	16.7	0.951
Cardioembólico (%)	45.8	41.7	
Indeterminado (%)	37.5	41.7	

Tomás Sobrino Moreiras

	Incremento (n = 24)	No Incremento (n = 24)	p
Características Clínicas			
NIHSS al ingreso	6 [5, 10]	17 [14, 20]	<0.0001
Fármacos en fase aguda			
Tratamiento con tPA, (%)	54.2	8.3	0.001
Tratamiento con citicolina, (%)	87.5	20.5	<0.0001
Tratamiento con estatinas, (%)	45.8	20.8	0.062

Tabla 10. Factores que influyen en el Incremento del número de CFU-EC en la 1ª semana, incluyendo fármacos en fase aguda.

Se ha evaluado la **edad; sexo; tiempo de latencia; antecedentes de factores de riesgo vascular** (hipertensión, diabetes mellitus, dislipemia, antecedentes de tabaquismo y enolismo, antecedentes de cardiopatía isquémica, antecedentes de fibrilación auricular e ictus previo); **bioquímica y signos vitales al ingreso** (temperatura, PAS y PAD, glucemia y fibrinógeno); **características clínicas** (NIHSS al ingreso); **diagnóstico etiológico del ictus;** y **fármacos en fase aguda** (tratamiento trombolítico con tPA, citicolina y estatinas) . Los resultados se expresan como porcentaje, media (desviación estándar) o como la mediana y los percentiles 25 y 75.

Los factores que se relacionan con un decremento o no incremento del número de CFU-EC durante la primera semana de evolución son los antecedentes de hipertensión (75.0 % vs. 29.4 %, p=0.002); una mayor cifra de PAS al ingreso (157.9 (23.4) mm Hg vs. 144.5 (21.5), p=0.045); mayor temperatura (36.7 °C vs 36.3, p=0.003); mayor glucemia (148.7 mg/dL vs. 117.5, p=0.016); niveles más elevados

de fibrinógeno (467.5 mg/dL vs. 376.8, $p = 0.018$); y mayor puntuación en la NIHSS al ingreso (17 [14, 20] vs. 6 [5, 10], $p < 0.0001$).

Asimismo, los factores que se relacionaron con un Incremento del número de CFU-EC durante la primera semana de evolución fueron los tratamientos, en fase aguda, con tPA (54.2 % vs. 8.3 %, $p=0.001$) y citicolina (87.5 % vs. 20.5 %, $p < 0.0001$).

En la **tabla 11** se muestran los Incrementos del número de CFU-EC (en valor absoluto) para los tratamientos con tPA, estatinas y citicolina. El tratamiento con tPA (33.1 (17.9) vs. 2.4 (10.6), $p < 0.0001$) y con citicolina (22.9 (18.7) vs. - 0.9 (10.3), $p < 0.0001$) pero no así con estatinas (18.6 (19.7) vs. 8.7 (18.7), $p=0.117$) se asocian con un mayor incremento del número de CFU-EC durante la primera semana de evolución (**gráficas 24, 25 y 26**).

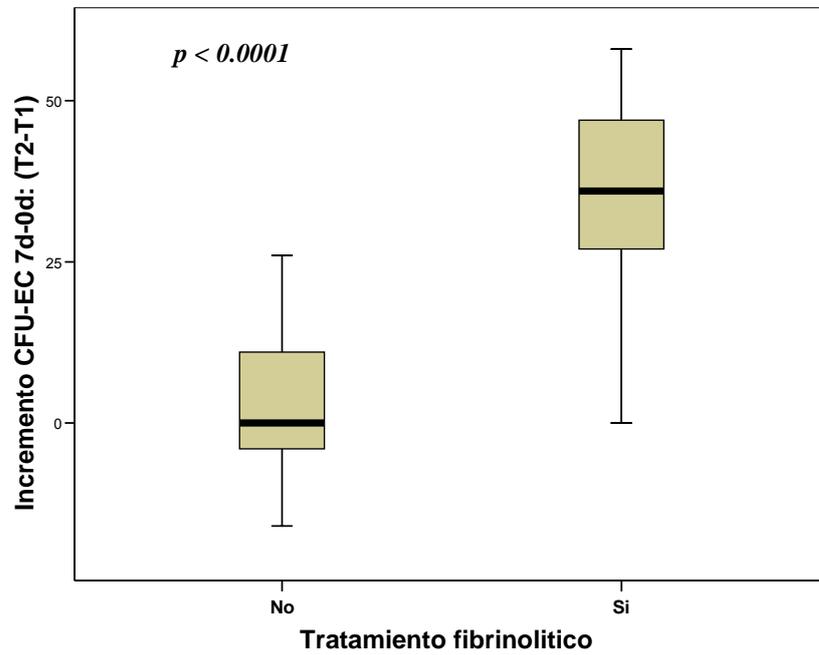
	Sí t-PA (n=15)	No t-PA (n=33)	P
Incremento CFU-EC en la 1ª semana	33.1 (17.9)	2.4 (10.6)	<0.0001

	Sí Citicolina (n = 16)	No Citicolina (n = 32)	P
Incremento CFU-EC en la 1ª semana	22.9 (18.7)	- 0.9 (10.3)	<0.0001

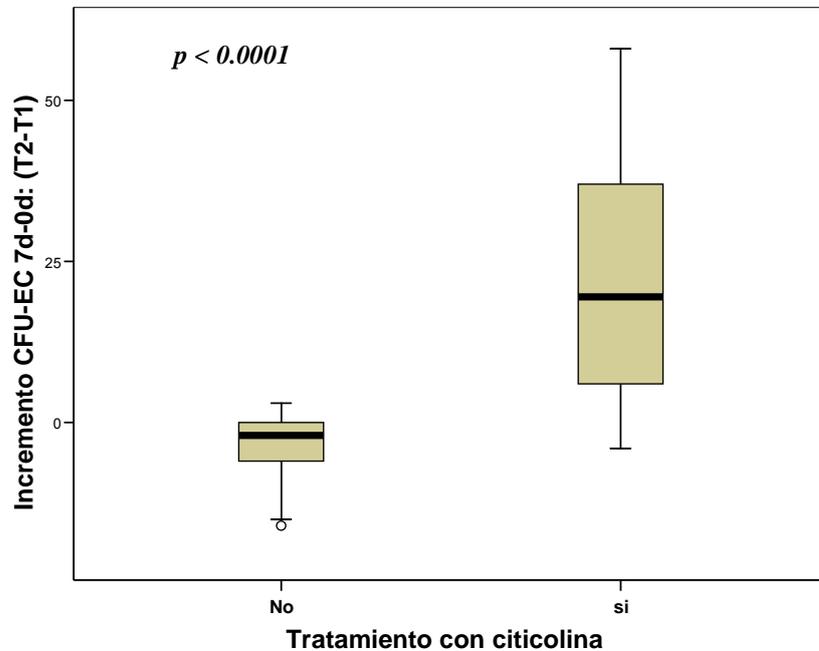
	Sí Estatinas (n = 16)	No Estatinas (n = 32)	P
Incremento CFU-EC en la 1ª semana	18.6 (19.7)	8.7 (18.7)	0.117

Tabla 11. Incremento del número de CFU-EC en la 1ª semana (en valor absoluto) para los tratamientos con tPA, citicolina y estatinas en fase aguda.

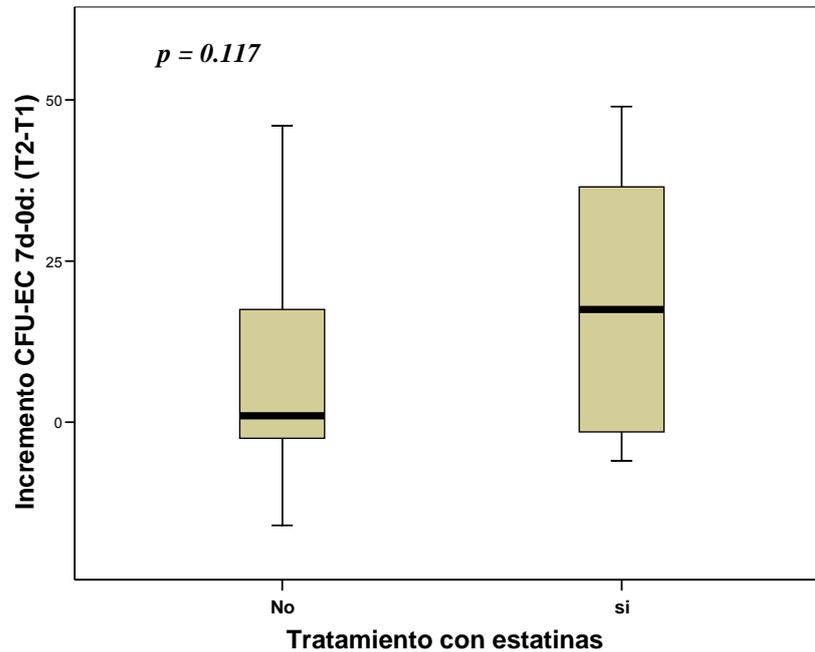
Tomás Sobrino Moreiras



Gráfica 24. Influencia del tratamiento trombolítico con tPA en el Incremento del número de CFU-EC durante la primera semana.



Gráfica 25. Influencia del tratamiento con citicolina en el Incremento del número de CFU-EC durante la primera semana.



Gráfica 26. Influencia del tratamiento con estatinas en el Incremento del número de CFU-EC durante la primera semana.

Utilizando un modelo de regresión logística, se obtiene que el tratamiento con tPA y citicolina durante la primera semana está independientemente asociado con el Incremento del número de CFU-EC durante la primera semana de evolución (OR: 7.2, IC 95 %: 1.6-30.9, $p=0.003$) y (OR: 18.9, IC 95 %: 2.1-744.6, $p=0.032$), después de ajustar por los antecedentes de hipertensión, PAS, temperatura, glucemia, fibrinógeno y NIHSS al ingreso (**tabla 12**).

Tomás Sobrino Moreiras

Variable Independiente	OR	OR ajustado
Tratamiento con tPA	13.0 [2.5, 68.1], p = 0.002	7.2 [1.6, 30.9], p=0.003
Tratamiento con citicolina	26.6 [5.6, 126.6], p <0.0001	18.9 [2.1, 744.6], p=0.032
Tratamiento con estatinas	3.2 [0.9, 11.5], p = 0.072	1.6 [0.7, 24.6], p=0.128

Tabla 12. Modelo de Regresión Logística: OR cruda y ajustada para el Incremento del número de CFU-EC en la 1ª semana en pacientes tratados con tPA, citicolina y estatinas en fase aguda. Variable dependiente: Incremento del número de CFU-EC durante la primera semana de evolución.

6. DISCUSIÓN

Tomás Sobrino Moreiras

A pesar de la existencia de gran cantidad de estudios, la función de las Células Progenitoras Endoteliales como un marcador pronóstico en el ictus isquémico es incierta. Este es el primer estudio prospectivo que valora la influencia de las EPCs circulantes en sangre periférica sobre el pronóstico funcional de pacientes con ictus isquémico. Los pacientes que presentaron buen pronóstico a los 3 meses, definido como una puntuación mRS <3, muestran un número más elevado de CFU-EC al 7º día y un mayor incremento de CFU-EC durante la primera semana de evolución, en comparación con los pacientes con mal pronóstico (mRS ≥3).

Numerosos factores han sido identificados como marcadores de mal pronóstico en el ictus isquémico: la edad, la intensidad del déficit neurológico al ingreso del paciente, la fiebre, la hipertensión, los niveles elevados de glucosa y fibrinógeno, la enfermedad cardiaca y la elevación de la proteína C reactiva. Asimismo, se ha demostrado que las EPCs circulantes se ven influenciadas en gran medida por muchos de estos factores pronósticos **(97,150,159-162)**.

Los datos de este estudio, después de ser ajustados por los antecedentes de hipertensión, PAS, temperatura corporal, niveles de glucosa y fibrinógeno, así como por la puntuación en la NIHSS al ingreso, muestran que el Incremento del número de CFU-EC ≥4 durante la primera semana de evolución se asocia independientemente con el buen pronóstico a los 3 meses. Estos datos confirman que las EPCs

circulantes en sangre periférica son un marcador pronóstico en el ictus isquémico.

La mayoría de los factores de riesgo cardio y cerebrovascular han sido correlacionados con las EPCs. La hipercolesterolemia está asociada con reducciones del número de EPCs **(163)** y las estatinas son capaces de incrementar los niveles de EPCs circulantes **(142)**. El tabaquismo ha sido identificado como uno de los factores de riesgo que más potencia la reducción del número de EPCs **(97)**. Además, en patología cardiovascular se ha observado una disminución del número y la funcionalidad de las EPCs **(164)**. Asimismo, se ha demostrado la existencia de una fuerte correlación entre el número de EPCs circulantes en sangre periférica y la puntuación en la Escala de Framingham **(140)**. Finalmente, nuestros resultados están en consonancia con los descritos por Ghani y colaboradores **(151)**. Estos investigadores demostraron que los niveles de EPCs en los pacientes con ictus son significativamente más reducidos en comparación con sujetos control, y que estos niveles de EPCs se correlacionan negativamente con la Escala de Framingham.

Los pacientes con más factores de riesgo e infartos más graves tienen una menor capacidad de incrementar el número de EPCs, lo que se asocia a un peor pronóstico. Algunos tratamientos, como los fibrinolíticos, podrían condicionar no sólo una respuesta beneficiosa inmediata, sino a más largo plazo. Nuestro estudio plantea la hipótesis

Tomás Sobrino Moreiras

del probable papel de la reperfusión en el incremento del número de EPCs. Los pacientes que recibieron tratamiento fibrinolítico mostraron un aumento significativo de las EPCs, y en los pacientes en los que se demostró una recanalización ultrasonográfica a las 24 horas (8 de 13, datos no mostrados) también presentaron un significativo aumento de las EPCs (40.8 (13.7) vs 10.6 (8.1), $p < 0.0001$). De todas formas, el tratamiento fibrinolítico se asocia a un aumento del nivel de la MMP-9 **(165)**, y ésta es un potente estimulador de la liberación de las EPCs **(131)**; el incremento de marcadores moleculares asociados a la reperfusión, más que esta misma, podría ser el responsable de la respuesta de las EPCs. Esta hipótesis podría coincidir con los resultados de nuestro estudio, en los que el incremento de las EPCs fue independiente del tratamiento fibrinolítico.

Diversos estudios sugieren que las EPCs desempeñan una importante función no sólo en la regeneración celular sino también en la neovascularización **(87,164,166,167)**. En este contexto, estudios en clínica humana e isquemia experimental indican que la neovascularización está presente en el cerebro adulto **(168,169)**, y que las EPCs participan en procesos de neovascularización cerebral en modelos animales de isquemia cerebral **(152)**. El hecho de que los pacientes con buen pronóstico muestren un mayor número de CFU-EC al 7° día y a los 3 meses, pero no así al ingreso, sustenta la hipótesis de que las EPCs pueden mediar procesos crónicos de neurorreparación.

Neurorreparación mediada por Células Progenitoras Endoteliales en el Ictus Isquémico: influencia de Factores de Proliferación y Migración Celular Endógenos

Tomás Sobrino Moreiras

Además, el incremento de las EPCs durante la primera semana se asocia a una mejoría en la puntuación de la NIHSS en el mismo espacio de tiempo. Aunque el volumen del infarto es menor en los pacientes con mayor incremento de las EPCs, esta relación no es independiente; probablemente, esta asociación podría haberse demostrado si hubiésemos considerado el volumen residual a los 3 meses.

En este sentido, los tratamientos dirigidos a potenciar la neuroprotección, ampliamente eficaz en modelos experimentales de isquemia cerebral, en las fases aguda e hiperaguda del ictus isquémico no han mostrado beneficio **(170)**, por lo que son necesarias nuevas estrategias terapéuticas. La neurorreparación por neovascularización mediada por EPCs podría ser una nueva e interesante alternativa en futuros tratamientos en el ictus isquémico **(Figura 16)**.

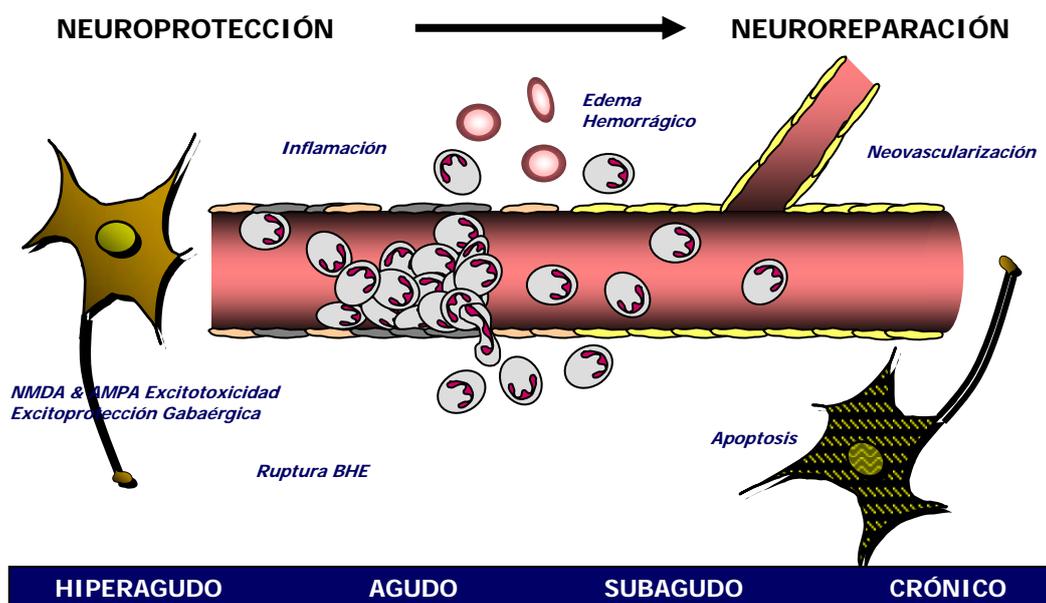


Figura 16. Neuroprotección vs. Neurorreparación en el ictus isquémico.

Tomás Sobrino Moreiras

Por otra parte, numerosos estudios han demostrado que el factor angiogénico VEGF promueve la movilización e incorporación de EPCs a las áreas de neovascularización **(118-122)**. Asimismo, las concentraciones de EPCs aumentan significativamente tras un infarto agudo de miocardio, un incremento que ha sido correlacionado positivamente con los niveles plasmáticos elevados de VEGF **(117)**. Los resultados de este estudio muestran igualmente una correlación positiva entre el incremento del número de CFU-EC y las concentraciones séricas de VEGF, por lo que se puede concluir que tras un ictus isquémico la movilización de EPCs puede ser inducida por los niveles de VEGF.

Del mismo modo, el Incremento del número de CFU-EC durante la primera semana fue correlacionado positivamente con los niveles séricos de MMP-9 activa. Estos datos sugieren que la actividad de la MMP-9 participa en el reclutamiento de las EPCs desde la médula ósea, tal como habían descrito Heissig y colaboradores **(131)**. La correlación, para las concentraciones séricas al ingreso de MMP-9 activa, fue mayor con el incremento del número de CFU-EC durante la primera semana que con el número de CFU-EC al ingreso. Este dato podría hacer referencia a que la actividad de la MPP-9 podría inducir la liberación de citocinas activadoras de células madre, que provocarían la movilidad de EPCs quiescentes **(115)**.

Finalmente, los resultados del presente estudio vendrían a refrendar los estudios que sugieren que el SDF-1 α podría contribuir al autoguiado de las EPCs hacia las zonas de neovascularización y reendotelización **(126,137-139)**. Asimismo, la proteína SDF-1 α induce la expresión de VEGF y media procesos de angiogenesis *in vivo* **(136)**. Por ello, debido a que nuestros resultados muestran una correlación positiva entre el Incremento del número de CFU-EC y los niveles séricos de VEGF y SDF-1 α , y a que las EPCs expresan receptores funcionales de CXCR4 (receptor de SDF-1) y VEGF, se podría postular que una interacción conjunta entre SDF-1 α /CXCR4 y VEGF generaría un proceso de feed-back positivo que aumentaría los efectos terapéuticos de las EPCs en la Neovascularización *in vivo* **(126,136-139)**.

Como se ha comentado anteriormente, el tratamiento fibrinolítico fue asociado a un aumento significativo de las EPCs, y los pacientes en los que se demostró una recanalización ultrasonográfica a las 24 horas también presentaron un incremento significativo del número de CFU-EC.

Otro tratamiento farmacológico en fase aguda que evidenció un comportamiento similar al tPA fue la citicolina. La citicolina es un intermediario en la síntesis de fosfolípidos de membrana que, administrada exógenamente, incrementa el contenido de membrana en fosfatidilcolina y esfingomiélinas desde el primer día de reperfusión en

Tomás Sobrino Moreiras

modelos experimentales de isquemia **(171)**. A pesar de que generalmente se asume que la función neuroprotectora de la citicolina se debe a su propiedad estabilizadora de membranas, un reciente estudio demuestra que el tratamiento crónico con citicolina mejora la recuperación funcional e incrementa la plasticidad neuronal en modelos experimentales de isquemia **(172)**. Los resultados de este estudio vendrían a refrendar la hipótesis de que la citicolina podría mediar procesos de neurorreparación crónica en el ictus isquémico, no sólo mediante el incremento de la plasticidad neuronal sino también por un incremento del número de EPCs.

Por último, numerosos estudios han demostrado que las estatinas incrementan la diferenciación de EPCs *in vitro* y su movilización *in vivo* **(142-145)**. En este estudio, el tratamiento con estatinas induce un incremento del número de CFU-EC, aunque estadísticamente no es significativo.

En conclusión, el presente estudio demuestra que las EPCs circulantes en sangre periférica son un excelente marcador de buen pronóstico en pacientes con ictus isquémico agudo. Los pacientes que presentan niveles más altos de EPCs muestran una mejoría del déficit neurológico y tienen un mejor pronóstico funcional a los 3 meses. Asimismo, un Incremento del número de CFU-EC ≥ 4 durante la primera semana de evolución incrementa en 22 veces la frecuencia de buen pronóstico a los 3 meses. La función de las EPCs como una nueva

Neurorreparación mediada por Células Progenitoras Endoteliales en el Ictus Isquémico: influencia de Factores de Proliferación y Migración Celular Endógenos*Tomás Sobrino Moreiras*

herramienta farmacológica que mediaría procesos de neurorreparación crónica necesita ser explorada en el futuro, pero es posible que se pueda conseguir, bien sea por estimulación endógena de las EPCs mediante factores moleculares endógenos (VEGF, SDF-1 α y MMP-9 activa) o tratamientos farmacológicos (tPA, citicolina y estatinas) que potencien su proliferación, migración y activación, o a través de su administración exógena.

7. CONCLUSIONES

1. Las EPCs circulantes en sangre periférica son un excelente marcador de buen pronóstico en pacientes con ictus isquémico agudo.
2. El incremento del número de CFU-EC ≥ 4 en la primera semana de evolución se asocia a un mejor pronóstico funcional a los 3 meses en los pacientes con ictus isquémico.
3. Los niveles séricos elevados de VEGF, SDF-1 α y MMP-9 activa a las 24 horas de evolución y de VEGF a las 72 horas se asocian con un mayor incremento del número de CFU-EC durante la primera semana.
4. La administración de tPA, citicolina y estatinas durante la fase aguda del ictus isquémico se asocia con un mayor incremento del número de CFU-EC durante la primera semana de evolución. Este incremento sólo es significativo para el tPA y la citicolina.
5. Estos hallazgos abren la posibilidad a una nueva estrategia terapéutica, mediada por EPCs, para los pacientes que sufren un ictus isquémico.

8. BIBLIOGRAFÍA

Tomás Sobrino Moreiras

1. WHO MONICA Project, Principal Investigators. The World Health Organisation MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. *J Clin Epidemiol* 1988; 41:105-114.
2. Instituto Nacional de Estadística. Defunciones según la causa de muerte 2000. www.ine.es 30 Dic 2002.
3. López-Pousa S, Vilalta J, Llinás J. Incidencia de la enfermedad vascular en España: estudio en un área rural de Girona. *Rev Neurol* 1995; 23:1074-1080.
4. Olalla MT, Medrano MJ, Sierra MJ, Almazán J. Time trends, cohort effect and spatial distribution of cerebrovascular disease mortality in Spain. *Eur J Epidemiol* 1999; 15:331-339.
5. Arboix A, Díaz J, Pérez-Sempere A, Álvarez-Sabín J, en nombre del Comité de Redacción *ad hoc* del Grupo de Estudio de las Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología. Ictus: tipos etiológicos y criterios diagnósticos. *Neurologia* 2002; 17 Supl 3:3-12.
6. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. 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: 35-41.
7. Bamford J, Sandercock P, Dennis M, Burn J, Warlow C. Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. *Lancet* 1991; 22:1521-1526.

8. Arboix A, Díaz J, Pérez-Sempere A, Álvarez-Sabín J, en nombre del Comité de Redacción *ad hoc* del Grupo de Estudio de las Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología. *Neurología* 2002; 17 Supl 3:3-12.
9. Arboix A, García-Eroles L, Oliveres M, Massons JB, Targa C. Clinical predictors of early embolia recurrence in presumed cardioembolic stroke. *Cerebrovasc Dis* 1998; 8:345-353.
10. Wolf PA, D'Agostino RB, Belanger AJ, Kannel WB. Possibility of stroke: A risk profile from the Framingham Study. *Stroke* 1991; 22: 312-318.
11. Siesjö BK. Cerebral circulation and metabolism. *J Neurosurg* 1984; 60:883-908.
12. Pulsinelli W. Pathophysiology of acute ischemic stroke. *Lancet* 1992; 339:533-536.
13. Heiss WD, Graf R. The ischemic penumbra. *Curr Opin Neurol* 1994; 7:11-19.
14. Castillo J. Fisiopatología de la circulación cerebral. En: Castillo J, Noya M (eds). *Patología cerebrovascular isquémica*. Barcelona: Repro Disseny, 1993; 59-66.
15. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia: the ischemic penumbra. *Stroke* 1981; 12:723-725.
16. Powers WJ. The ischemic penumbra: usefulness of PETT. En: Del Zoppo GJ, Mori E, Hacke W (eds). *Thrombolytic therapy in acute ischemic stroke II*. Berlin: Springer – Verlag 1993; 17-21.
17. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 1994; 36:557-565.

Tomás Sobrino Moreiras

18. Ginsberg MD, Pulsinelli WA. The ischemic penumbra, injury thresholds, and the therapeutic window for acute stroke. *Ann Neurol* 1994; 36:553-554.
19. Castillo J. Intervenciones diagnósticas y terapéuticas en las primeras seis horas de la isquemia cerebral. Tiempos de latencia. Intervención prehospitalaria. *Neurología* 1995; 10 (Supl. 2):1-7.
20. Castillo J, Rodríguez JR, Corredera E, Álvarez JM, Pumar JM, Noya M. White matter high-signal areas on MRI associated with chronic hypoxia. *Eur J Neurol* 1996; 3:533-538.
21. Pulsinelli WA. Selective neuronal vulnerability: Morphological and molecular characteristics. *Prog Brain Res* 1985; 63:29-37.
22. Shiraishi K, Sharp FR, Simon RP. Sequential metabolic changes in rat brain following middle cerebral artery occlusion: A 2-deoxyglucose study. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989; 9:765-773.
23. Bousser MG. Cerebral venous thrombosis. In Fisher M, Bogousslavsky J, eds. *Current review of cerebrovascular diseases*. Boston: Butterworth-Heinemann; 1999:129-135.
24. Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. Cerebral autorregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 1990; 2:162-192.
25. Powers WJ. Hemodynamics and metabolism in ischemic cerebrovascular diseases. In Barnett HJM, Hachinski VC, eds. *Cerebral ischemia: Treatment and prevention*. Philadelphia; WW Saunders; 1992:31-48.

26. Iadecola C. Cerebral circulatory dysregulation in ischemia. In Ginsberg MD, Bofousslavsky, eds. Cerebrovascular diseases: Pathophysiology, diagnosis and management. Blackwell Science; 1999:319-332.
27. Murayama S, Bouldin TW, Suzuki K. Selective sparing of Betz cells in primary motor area in hypoxic-ischemic encephalopathy. *Acta Neuropathol* 1990; 80:560-562.
28. Mohr JP, Martí-Vilalta JL. Lacunes. In Barnett HJM, Mohr JP, Stein BM, Yatsu FM, eds. Stroke. Pathophysiology, diagnosis and management. New York: Churchill Livingstone; 1998:599-622.
29. Waxman SG, Davis PK, Black JA, Ranson BR. Anoxic injury of mammalian central white matter: Decreased susceptibility in myelin-deficient optic nerve. *Ann Neurol* 1990; 28:335-340.
30. Bruno V, Battaglia G, Copani A, D'Onofrio M, Di Iorio P, De Blasi A, Melchiorri D, Flor PJ, Nicoletti F. Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001; 21:1013-1033.
31. Ginsberg MD. Injury mechanisms in the ischaemic penumbra. Approaches to neuroprotection in acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 1997; 7 (supl 2):7-12.
32. Rossi DJ, Oshima T, Atwell D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature.* 2000; 403:316-321.
33. Castillo J. Bioquímica de la isquemia cerebral. *Neurología* 1999; 14 (supl 4):17-23.

Tomás Sobrino Moreiras

34. Dawson VL, Dawson TM. Free radicals and neuronal cell death. *Cell Death and Differentiation* 1996; 3:71-78.
35. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Eng J Med* 1993; 329:2002-2012.
36. Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL. Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 1997; 28:1283-1288.
37. Garthwaite J, Charles SL, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptor suggests a role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 1988; 336: 385-388.
38. Castillo J, Rama R, Dávalos A. Nitric oxide-related brain damage in acute ischemic stroke. *Stroke* 2000; 31:852-857.
39. Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 1994; 263:687-689.
40. Castillo J, Dávalos A, Naveiro J, Noya M. Neuroexcitatory amino acids and their relation to infarct size and neurological deficit in ischemic stroke. *Stroke* 1996; 27:1060-1065.
41. MacManus JP, Linnik MD. Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997; 17:815-852.
42. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; 281:1309-1312.
43. Mattson MP, Culmsee C, Yu ZF. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res* 2000; 301:173-187.

44. An G, Lin TN, Liu JS, Xue JJ, He YY, Hsu CY. Expression of c-fos and c-jun family genes after focal cerebral ischemia. *Ann Neurol* 1993; 33:457-464.
45. Nichols D, Attwell D. The release and uptake of excitatory amino acids. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11:462-468.
46. Scheneider G-H, Baethmann A, Kempfski O. Mechanisms of glial swelling induced by glutamate. *Can J Physiol Pharmacol* 1992; 70:S334-S343.
47. Lees GJ. The possible contribution of microglia and macrophages to delayed neuronal death after ischemia. *J Neurol Sci* 1993; 114:119-122.
48. Ijichi A, Sakuma S, Tofilon PJ. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression in normal rat astrocyte cultures. *Glia* 1995; 14:87-93.
49. Dávalos A, Toni D, Iweins F, Lesaffre E, Bastianello S, Castillo J, for the ECASS Group. Neurological deterioration in acute ischemic stroke. Potential predictors and associated factors in the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS) I. *Stroke* 1999; 30:2631-2636.
50. Hacke W, Schwab S, Horn M, Spranger M, De Georgia M, von Kummer R. Malignant middle cerebral artery infarction: clinical course and prognostic signs. *Arch Neurol* 1996; 53:309-315.
51. Sherman DG, Easton JD. Cerebral edema in a stroke: a common, often fatal complication. *Postgrad Med* 1980; 68:107-120.

Tomás Sobrino Moreiras

52. MacGregor DG, Avshalumov MV, Rice ME. Brain edema induced by in vitro ischemia: causal factors and neuroprotection. *J Neurochem* 2003; 85:1402–1411.
53. Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 1987; 7:369–379.
54. Werth JL, Park TS, Silbergeld DL, Rothman SM. Excitotoxic swelling occurs in oxygen and glucose deprived human cortical slices. *Brain Res* 1998; 782:248–254.
55. Friberg H, Wieloch T. Mitochondrial permeability transition in acute neurodegeneration. *Biochimie* 2002; 84:241–250.
56. Frantseva MV, Carlen PL, Perez Velazquez JL. Dynamics of intracellular calcium and free radical production during ischemia in pyramidal neurons. *Free Rad Biol Med* 2001; 31:1216–1227.
57. Vergun O, Sobolevsky AI, Yelshansky MV, Keelan J, Khodorov BI, Duchon MR. Exploration of the role of reactive oxygen species in glutamate toxicity in rat hippocampal neurons in culture. *J Physiol (Lond)* 2001; 531:147–163.
58. Castillo J. Fisiopatología de la isquemia cerebral. *Rev Neurol* 2000; 30:459-464.
59. Del Zoppo GJ, von Kummer R, Hamann GF. Ischemic damage of brain microvessels: Inherent risk for thrombolytic treatment in stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998; 65:19.
60. Pessin MS, Teal PA, Caplan LR. Hemorrhagic infarction: Guilt by association. *Am J Neuroradiol* 1991; 12:11236.
61. Castillo J, Dávalos A, Noya M. Progression of ischaemic stroke and excitotoxic amino acids. *Lancet* 1997; 349:79-83.

62. Serena J, Leira R, Castillo J, Pumar JM, Castellanos M, Dávalos A. Neurological deterioration in acute lacunar infarctions. The role of excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Stroke* 2001; 32:1154-1161.
63. Dávalos A, Castillo J, Marrugat J, Fernández-Real JM, Armengou A, Cacabelos P, Rama R. Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral infarcts. *Neurology* 2000; 54:1568-1574.
64. Vila N, Castillo J, Dávalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* 2000; 31:2325-2329.
65. Castillo J, Dávalos A, Noya M. Aggravation of acute ischemic stroke by hyperthermia is related to an excitotoxic mechanism. *Cerebrovasc Dis* 1999; 9:22-27.
66. Leira R, Dávalos A, Aneiros A, Serena J, Pumar JM, Castillo J. Headache as a surrogate marker of the molecular mechanisms implicated in progressing stroke. *Cephalalgia* 2002; 22:303-308.
67. Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takashashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GTL-1. *Science* 1997; 276:1699-1702.
68. 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.

Tomás Sobrino Moreiras

69. DeGraba TJ. The role of inflammation after acute stroke. Utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology* 1998; 51 (supl 3):S62-S68.
70. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Eng J Med* 1997; 336:973-979.
71. Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoproteins cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Eng J Med* 2002; 347:1557-1565.
72. Castellanos M, Castillo J, García MM, Leira R, Serena J, Chamorro A, Dávalos A. Inflammation-mediated damage in progressing lacunar infarctions. *Stroke* 2002; 33:982-987.
73. Hallenbeck JM. Inflammatory reactions at the blood-endothelial interface in acute stroke. *Adv Neurol* 1996; 71:281-297.
74. Montaner J, Álvarez-Sabín J, Molina C, Angles A, Abilleira S, Arenillas J, Gonzalez MA, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* 2001; 32:1759-1766.
75. Rothwell NJ, Bersbridge NJ, Lefeuvre RA, Hardwick AJ, Gauldie J, Hopkins SJ. Interleukin-6 is a centrally acting endogenous pyrogen in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 1991; 69:1465-1469.
76. Adams DH, Shaw S. Leukocyte endothelial interactions and regulation of leukocyte migration. *Lancet* 1994; 343:831-836.
77. Smith CW. Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. *Can J Physiol Pharmacol* 1993; 71:76-87.

78. Marín J, Abella J, Leira R, Aneiros A, Serena J, Dávalos A, Castillo J. Marcadores bioquímicos de los signos tomográficos precoces de isquemia cerebral. *Neurología* 2001; 16:448.
79. Castillo J, Rodríguez I. Biochemical changes and inflammatory response as markers for brain ischemia: molecular markers of diagnostic utility and prognosis in human clinical practice. *Cerebrovas Dis* 2004; 17(suppl 1):7-18.
80. Toni D, Fiorelli M, Bastianello S, Sachetti ML, Sette G, Argentino C, et al. Hemorrhagic transformation of brain infarct: Predictability in the first 5 hours from stroke onset and influence on clinical outcome. *Neurology* 1996; 43:341-345.
81. Laure V, Von Kummer R, Del Zoppo G. Hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke: Potential contributing factors in the European Cooperative Acute Stroke Study. *Stroke* 1997; 28:957-960.
82. Hamman GF, Okada Y, del Zoppo GJ. Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16:1373-1378.
83. Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G. Proteolytic cascade enzymes increased in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16:360-366.
84. Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain I, Castillo J, Dávalos A. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke* 2003; 34:40-46.

Tomás Sobrino Moreiras

85. Castellanos M, Leira R, Serena J, Blanco M, Pedraza S, Castillo J, Dávalos A. Plasma cellular-fibronectin concentration predicts hemorrhagic transformation after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. *Stroke* 2004; 35:1671-1676.
86. Lutun A, Carmeliet G, Carmeliet P. Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med.* 2002; 12:88-96.
87. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275:964-967.
88. Bhattacharya V, McSweeney PA, Shi Q, Bruno B, Ishida A, Nash R, Storb RF, Sauvage LR, Hammond WP, Wu MH. Enhanced endothelialization and microvessel formation in polyester grafts seeded with CD34⁺ bone marrow cells. *Blood.* 2000; 95:581-585.
89. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, Takuma S, Burkhoff D, Wang J, Homma S, Edwards NM, Itescu S. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med.* 2001; 7:430-436.
90. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K, Eguchi H, Onitsuka I, Matsui K, Imaizumi T. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest.* 2000; 105:1527-1536.
91. Walter DH, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: regulation and contribution to adult neovascularization. *Herz* 2002; 27:579-588.

92. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90:5002–5012.
93. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34₊ cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95:952–958.
94. Burger PE, Coetzee S, McKeegan WL, Kan M, Cook P, Fan Y, Suda T, Hebbel RP, Novitzky N, Muller WA, Wilson EL. Fibroblast growth factor receptor-1 is expressed by endothelial progenitor cells. *Blood* 2002; 100:3527–3535.
95. Salven P, Mustjoki S, Alitalo R, Alitalo K, Rafii S. VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34₊ lymphatic/vascular endothelial precursor cells. *Blood*. 2003; 101:168–172.
96. Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, Rafii S. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2₊AC133₊ endothelial precursor cells. *Circ Res*. 2001; 88:167–174.
97. Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res*. 2001; 89:e1–e7.
98. Hirschi KK, Goodell MA. Hematopoietic, vascular and cardiac fates of bone marrow-derived stem cells. *Gene Ther*. 2002; 9:648–652.

Tomás Sobrino Moreiras

99. Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, Verfaillie CM. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest.* 2002; 109:337–346.
100. Libby P. Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis and stabilization. *Am J Cardiol.* 2000; 86:3J–9J.
101. Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation.* 2002; 105:546–549.
102. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow derived endothelial cells. *Blood* 1998; 92:362–367.
103. Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, Isner JM. Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 2002; 105:3017–3024.
104. Werner N, Priller J, Laufs U, Endres M, Bohm M, Dirnagl U, Nickenig G. Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:1567–1572.
105. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1995; 1:27–31.
106. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med.* 2000; 6:389–395.

107. Kerbel Q, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:727-739.
108. Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23:1143-1151.
109. Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, Shapira OM, Perry T, Sutherland FW, Rabkin E, Moran AM, Schoen FJ, Atala A, Soker S, Bischoff J, Mayer JE Jr. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med*. 2001; 7:1035-1040.
110. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*. 1999; 85:221-228).
111. Kamihata H, Matsubara H, Nishiue T, Fujiyama S, Amano K, Iba O, Imada T, Iwasaka T. Improvement of collateral perfusion and regional function by implantation of peripheral blood mononuclear cells into ischemic hibernating myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22:1804-1810.
112. Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB, Scott EW. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med*. 2002; 8:607-612.

Tomás Sobrino Moreiras

113. Lyden D, Hattori K, Dias S, Costa C, Blaikie P, Butros L, Chadburn A, Heissig B, Marks W, Witte L, Wu Y, Hicklin D, Zhu Z, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Hajjar KA, Manova K, Benezra R, Rafii S. Impaired recruitment of bone marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat Med.* 2001; 7:1194–1201.
114. Rafii S, Lyden D, Benezra R, Hattori K, Heissig B. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer.* 2002; 2:826–835.
115. Rafii S, Heissig B, Hattori K. Efficient mobilization and recruitment of marrow-derived endothelial and hematopoietic stem cells by adenoviral vectors expressing angiogenic factors. *Gene Ther.* 2002; 9:631–641.
116. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med.* 1999; 5:434–438.
117. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, Imaizumi T. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2001; 103:2776–2779.
118. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999; 85:221–228.

119. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner JM. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J.* 1999; 18:3964–3972.
120. Kalka C, Tehrani H, Laudenberg B, Vale PR, Isner JM, Asahara T, Symes JF. VEGF gene transfer mobilizes endothelial progenitor cells in patients with inoperable coronary disease. *Ann Thorac Surg.* 2000; 70:829–834.
121. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Gordon R, Tepper O, Gravereaux E, Pieczek A, Iwaguro H, Hayashi SI, Isner JM, Asahara T. Vascular endothelial growth factor (165) gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circ Res.* 2000; 86:1198–1202.
122. Hattori K, Dias S, Heissig B, Hackett NR, Lyden D, Tateno M, Hicklin DJ, Zhu Z, Witte L, Crystal RG, Moore MA, Rafii S. Vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 stimulate postnatal hematopoiesis by recruitment of vasculogenic and hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2001; 193:1005–1014.
123. Flamme I, Breier G, Risau W. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo. *Dev Biol.* 1995; 169: 699–712.
124. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380:435–439.

Tomás Sobrino Moreiras

125. Rafii S, Meeus S, Dias S, Hattori K, Heissig B, Shmelkov S, Rafii D, Lyden D. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 2002; 13:61–67.
126. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T. Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation* 2003; 107:1322–1328.
127. Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, Nagy JA, Hooper A, Priller J, De Klerck B, Compernelle V, Daci E, Bohlen P, Dewerchin M, Herbert JM, Fava R, Matthys P, Carmeliet G, Collen D, Dvorak HF, Hicklin DJ, Carmeliet P. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med.* 2002; 8:831–840.
128. Hattori K, Heissig B, Wu Y, Dias S, Tejada R, Ferris B, Hicklin DJ, Zhu Z, Bohlen P, Witte L, Hendrikx J, Hackett NR, Crystal RG, Moore MA, Werb Z, Lyden D, Rafii S. Placental growth factor reconstitutes hematopoiesis by recruiting VEGFR1⁺ stem cells from bone-marrow microenvironment. *Nat Med.* 2002; 8:841–849.
129. Bautz F, Rafii S, Kanz L, Mohle R. Expression and secretion of vascular endothelial growth factor-A by cytokine-stimulated hematopoietic progenitor cells: possible role in the hematopoietic microenvironment. *Exp Hematol.* 2000; 28:700–706.

130. Seiler C, Pohl T, Wustmann K, Hutter D, Nicolet PA, Windecker S, Eberli FR, Meier B. Promotion of collateral growth by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with coronary artery disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Circulation*. 2001;104:2012–2017.
131. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 2002; 109:625–637.
132. Murayama T, Tepper OM, Silver M, Ma H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T, Kalka C. Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo. *Exp Hematol*. 2002; 30:967–972.
133. Pillarisetti K, Gupta SK. Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1): SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. *Inflammation* 2001; 25: 293–300.
134. Mohle R, Bautz F, Rafii S, Moore MA, Brugger W, Kanz L. The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood* 1998; 91:4523–4530.
135. Jo DY, Rafii S, Hamada T, Moore MA. Chemotaxis of primitive hematopoietic cells in response to stromal cell-derived factor-1. *J Clin Invest*. 2000; 105:101–111.

Tomás Sobrino Moreiras

136. Salcedo R, Wasserman K, Young HA, Grimm MC, Howard OM, Anver MR, Kleinman HK, Murphy WJ, Oppenheim JJ. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor induce expression of CXCR4 on human endothelial cells: in vivo neovascularization induced by stromal-derived factor-1 alpha. *Am J Pathol.* 1999; 154:1125-1135.
137. Aiuti A, Webb IJ, Bleul C, Springer T, Gutierrez-Ramos JC. The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ haematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain to mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood. *J Exp Med.* 1997; 185:111-120.
138. Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, Nagler A, Ben-Hur H, Many A, Shultz L, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T. Dependence of human stem cells engraftment and repopulation of NDO/SCID mice on CXCR4. *Science* 1999; 283:845-848.
139. Hattori K, Heissig B, Tashiro K, Honjo T, Tateno M, Shieh JH, Hackett NR, Quitariano MS, Crystal RG, Rafii S, Moore MA. Plasma elevation of stromal cell-derived factor-1 induces mobilization of mature and immature hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood* 2001; 97:3354-3360.
140. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med.* 2003; 348:593-600.
141. Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation* 2000; 101:207-213.

142. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*. 2001; 108:391–397.
143. Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y, Uchida S, Masuda H, Kawamoto A, Walsh K, Isner JM, Asahara T. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*. 2001; 108:399–405.
144. Dimmeler S, Zeiher AM. Akt takes center stage in angiogenesis signaling. *Circ Res*. 2000; 86:4–5.
145. Vasa M, Fichtlscherer S, Adler K, Aicher A, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S. Increase in circulating endothelial progenitor cells by statin therapy in patients with stable coronary artery disease. *Circulation* 2001; 103:2885–2890.
146. Baller D, Notohamiprodjo G, Gleichmann U, Holzinger J, Weise R, Lehmann J. Improvement in coronary flow reserve determined by positron emission tomography after 6 months of cholesterol-lowering therapy in patients with early stages of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99:2871–2875.
147. Blanco M, Rodríguez-Yáñez M, Sobrino T, Leira R, Castillo J. Platelets, inflammation, and atherothrombotic neurovascular disease: the role of endothelial dysfunction. *Cerebrovasc Dis* 2005; 20(suppl 2):32-39.
148. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G. Circulating Endothelial Progenitor Cells and Cardiovascular Outcomes. *N Eng J Med* 2005; 353:999-1007.

Tomás Sobrino Moreiras

149. George J, Goldstein E, Abashidze S, Deutsch V, Schmilovich H, Finkelstein A, Herz I, Miller H, Keren G. Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation. *Eur Heart J.* 2004; 25: 1003-1008.
150. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC. Human endothelial progenitor cells form Type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion incorporation into vascular structures. *Circulation* 2002; 106: 2781-2786.
151. Ghani U, Shuaib A, Salam A, Nasir A, Shuaib U, Jeerakathil T, Sher F, O'Rourke F, Nasser AM, Schwindt B, Todd K. Endothelial progenitor cells during cerebrovascular disease. *Stroke* 2005; 36: 151-153.
152. 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; 90:284-288.
153. Assmus B, Schachinger V, Teupe C, et al. Transplantation of Progenitor cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106:3009-3017.
154. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360:427-435.

155. Inaba S, Egashira K, Komori K. Peripheral-blood or bone-marrow mononuclear cells for therapeutic angiogenesis? *Lancet* 2002; 360:2083; autor reply 2084.
156. Bonita R, Beaglehole R. Recovery of motor function after stroke. *Stroke*. 1988; 19:1497-1500.
157. Comité ad hoc del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la SEN. Guía para el diagnóstico y tratamiento del ictus. Prous Science. Barcelona 2004.
158. Cote R, Battista RN, Wolfson C, Boucher J, Adam J, Hachinski V. The Canadian Neurological Scale: validation and reliability assessment. *Neurology* 1989; 39:638-643.
159. Thijssen DH, Vos JB, Verseyden C, van Zonneveld AJ, Smits P, Sweep FC, Hopman MT, de Boer HC. Haematopoietic stem cells and endothelial progenitor cells in healthy men: effect of aging and training. *Aging Cell* 2006; 5:495-503.
160. Tyner SD, Venkatachalam S, Choi J, Jones S, Ghebranious N, Igelmann H, Lu X, Soron G, Cooper B, Brayton C, Hee Park S, Thompson T, Karsenty G, Bradley A, Donehower LA. p53 mutant mice that display early ageing-associated phenotypes. *Nature* 2002; 415:45-53.
161. Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, Verhaar MC, Braam B, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes* 2004; 53:195-199.

Tomás Sobrino Moreiras

162. Krankel N, Adams V, Linke A, Gielen S, Erbs S, Lenk K, Schuler G, Hambrecht R. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:698-703.
163. Chen JZ, Zhang FR, Tao QM, Wang XX, Zhu JH, Zhu JH. Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia. *Clin Sci (Lond)* 2004; 107:273-280.
164. Werner N, Nickenig G. Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: limitations for therapy? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26:257-266.
165. Ning M, Furie KL, Koroshetz WJ, Lee H, Barron M, Lederer M, Wang X, Zhu M, Sorensen AG, Lo EH, Kelly PJ. Association between tPA therapy and raised early matrix metalloproteinase-9 in acute stroke. *Neurology* 2006; 66:1550-1555.
166. Kong D, Melo LG, Gneocchi M, Zhang L, Mostoslavsky G, Liew CC, Pratt RE, Dzau VJ. Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries. *Circulation* 2004; 110:2039-2046.
167. Werner N, Junk S, Laufs U, Link A, Walenta K, Bohm M, Nickenig G. Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circ Res.* 2003; 93:e17-e24.
168. Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S, Wang JM. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* 1994; 25:1794-1798.

169. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C, Bruggen N, Chopp M. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* 2000; 106:829-838.
170. Castillo J, Alvarez-Sabin J, Davalos A, Diez-Tejedor E, Lizasoain I, Martinez-Vila E, Vivancos J, Zarranz JJ. Revisión de consenso. Neuroprotección farmacológica en la isquemia cerebral: ¿es todavía una opción terapéutica? *Neurología*. 2003; 18:368-384.
171. Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ. Effects of citicoline on phospholipid and glutathione levels in transient cerebral ischemia. *Stroke* 2001; 32:2376-2381.
172. Hurtado O, Cárdenas A, Pradillo JM, Morales JR, Ortego F, Sobrino T, Castillo J, Moro MA, Lizasoain I. A chronic treatment with CDP-choline improves functional recovery and increases neuronal plasticity after experimental stroke. *Neurobiol Dis* 2007; DOI:10.1016/j.nbd.2006.12.005 [en prensa].