

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA**



TESIS DOCTORAL

**Dianas terapéuticas del ciclo circadiano de los neutrófilos
en las enfermedades neurovasculares**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Fernando Ostos Moliz

DIRIGIDA POR

**Ignacio Lizasoain Hernández
María Ángeles Moro Sánchez
Alicia García Culebras**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



TESIS DOCTORAL

DIANAS TERAPÉUTICAS DEL CICLO CIRCADIANO DE LOS NEUTRÓFILOS
EN LAS ENFERMEDADES NEUROVASCULARES

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Fernando Ostos Moliz

DIRECTORES

Ignacio Lizasoain Hernández

María Ángeles Moro Sánchez

Alicia García Culebras

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Programa de Doctorado en Investigación Biomédica



TESIS DOCTORAL

**DIANAS TERAPÉUTICAS DEL CICLO CIRCADIANO DE LOS
NEUTRÓFILOS EN LAS ENFERMEDADES NEUROVASCULARES**

PRESENTADA POR

Fernando Ostos Moliz

DIRECTORES

**Ignacio Lizasoain Hernández
María Ángeles Moro Sánchez
Alicia García Culebras**

Madrid, 2024

Memoria presentada por D. Fernando Ostos Moliz para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

La presente tesis doctoral ha sido financiada por los proyectos HR17-0025 (Obra Social Fundación la Caixa), PID2019-106471RB-100 (Ministerio de Ciencia de Innovación (MCIN)), PI20/00535 (Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional “Una manera de hacer Europa”), RICORS-ICTUSRD21/0006/0001 (Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)) y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional “Una manera de hacer Europa”) y TNE-21CVD04 (Leducq Foundation for Cardiovascular Research).

AGRADECIMIENTOS

Es una sensación extraña redactar estas palabras tras finalizar todas las aventuras y desventuras propias de toda tesis doctoral, pero este momento supone una reflexión acerca de las experiencias vividas durante estos años. No es fácil encontrar las palabras y menos transmitir el agradecimiento a todas las personas que me han acompañado en este viaje.

Me gustaría empezar dedicando estas palabras a mi familia, en particular a mis padres y a mi hermana. Es para mi todo un orgullo haber crecido junto a vosotros. Me habéis enseñado desde pequeño una forma de vivir y de trabajar principalmente encaminada a actuar para ayudar a los demás y me habéis inculcado el deseo de aprender e investigar el mundo que me rodea. Gracias a vosotros he podido desarrollarme como persona y posteriormente como médico. Sin vuestro apoyo y ayuda nunca hubiera llegado a donde estoy hoy, y no puedo estar más agradecido.

A Laura, mi compañera de vida, sin ti no hubiera sido capaz de continuar este camino. Gracias por ayudarme en cada momento, por la paciencia y por el apoyo continuo. No puedo expresarte la suerte que tengo de tenerte a mi lado, y espero poder corresponder en el futuro todo lo que has hecho por mi durante este tiempo.

A mis amigos, esa familia que se escoge. Pese a no poder estar tan presente como me gustaría, habéis sido ese soporte imprescindible para continuar en los momentos buenos y malos.

A mis directores de tesis, es un privilegio poder trabajar con vosotros. A Nacho, por el entusiasmo y por transmitirnos siempre las ganas de encontrar nuevas metas y objetivos. A María Ángeles, por enseñarnos una forma de trabajar rigurosa, buscando siempre la explicación y el mecanismo de cada resultado. A Ali, por ser ese apoyo

cercano con consejos siempre acertados y por todo lo que me has ayudado desde que llegué al i+12. Gracias a los tres por confiar en mí y por haberme permitido participar en un proyecto tan bonito como este. No puedo expresar lo mucho que he aprendido con vosotros, para mí habéis sido y seréis un referente.

Este agradecimiento se extiende a todos los compañeros de la UIN, en especial al equipo del i+12, es un gusto formar parte de un grupo de investigación de este nivel, tanto científico como personal. Está siendo apasionante participar en los distintos proyectos a vuestro lado y espero poder seguir aportando mi granito de arena en el futuro. También quería dedicar unas palabras al Dr. Hidalgo y a su grupo en el CNIC, ha sido muy enriquecedor trabajar y llevar adelante este proyecto con investigadores de tanta valía. Y qué decir de mis compañeros del 12 de Octubre, destacando a Patricia y a los miembros de la Unidad de Ictus. Tengo la inmensa suerte de poder trabajar cada día con vosotros y formar parte de un equipo que destaca tanto en la parte humana como profesional. Gracias por hacer que pueda ser uno más y haberme apoyado en todos los pasos desde que entré como residente al hospital. Y a todo el Servicio de Neurología, gracias por ayudarme en este tiempo, todo empezó con una idea para recoger trombos y ha acabado culminando en mi tesis doctoral. Sin vosotros hubiera sido imposible llevarlo a cabo.

Por último, no puedo olvidarme de los pacientes que han colaborado en este proyecto y de sus familias. El propósito de este trabajo es encontrar nuevos tratamientos para mejorar el pronóstico de esta dura enfermedad en el futuro, no hubiera sido posible sin este gesto altruista de cada uno de vosotros.

GRACIAS

ÍNDICE

ABREVIATURAS	9
RESUMEN.....	15
ABSTRACT	23
1. INTRODUCCIÓN	29
<i>1.1. El ictus isquémico.....</i>	<i>29</i>
1.1.1 Definición.....	29
1.1.2. Epidemiología	30
1.1.3. Factores de riesgo.....	32
1.1.3.1. Factores de riesgo no modificables.....	32
1.1.3.2. Factores de riesgo modificables	33
1.1.3.3. Factores de riesgo genéticos	37
1.1.3.4. Prevención primaria	38
1.1.4. Etiología	38
1.1.4.1. Causas arteriales.....	38
1.1.4.2. Causas cardiacas	40
1.1.4.3. Otras etiologías.....	41
1.1.4.4. Causa desconocida	42
1.1.4.5. Clasificaciones.....	44
1.1.5. Fisiopatología.....	44
1.1.5.1. Circulación colateral	44
1.1.5.2. Cascada isquémica.....	46

1.1.5.3 Transformación hemorrágica	48
1.1.6. Tratamiento	49
1.1.6.1. Estabilización clínica	49
1.1.6.2. Cuidados en Unidad de Ictus	50
1.1.6.3. Fibrinólisis intravenosa	50
1.1.6.4. Trombectomía mecánica	53
1.1.6.5. Cerebroprotección.....	56
1.1.6.6. Tratamientos de prevención secundaria.....	59
<i>1.2. La respuesta inmune en el ictus.....</i>	<i>61</i>
1.2.1. Inflamación intravascular	63
1.2.2. Activación de la microglía	63
1.2.3. Infiltración de monocitos	64
1.2.4. Infiltración de neutrófilos	65
1.2.5. Infiltración de linfocitos.....	67
<i>1.3. El neutrófilo.....</i>	<i>69</i>
1.3.1. Fisiología	69
1.3.2. Activación de los neutrófilos	72
1.3.2.1 Fagocitosis	72
1.3.2.2. Degranulación.....	73
1.3.2.3. Neutrophil Extracellular Traps (NETs)	74
<i>1.4. Ritmos circadianos.....</i>	<i>80</i>
1.4.1. Definición.....	80
1.4.2. Fisiología	81

1.4.3. Influencia en procesos fisiopatológicos	83
1.4.4. Cambios circadianos del fenotipo de los neutrófilos circulantes.....	84
1.4.4.1. Diferencias fisiológicas y fisiopatológicas de los neutrófilos jóvenes y envejecidos	86
1.5. CXCL12	89
1.5.1. Definición.....	89
1.5.2. CXCL12 en el sistema nervioso central.....	91
1.5.3. CXCL12 e ictus isquémico	92
1.5.3.1 Estudios preclínicos	92
1.5.3.2 Estudios en humanos	95
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	99
2.1 <i>Hipótesis</i>	99
2.2 <i>Objetivos</i>	99
3. MATERIAL Y MÉTODOS	103
3.1. <i>Diseño y periodo de estudio</i>	103
3.2. <i>Selección de la población</i>	103
3.2.1. <i>Ámbito de realización</i>	103
3.2.2. <i>Criterios de Inclusión y exclusión</i>	103
3.2.2.1. <i>Criterios de inclusión</i>	103
3.2.2.2. <i>Criterios de exclusión</i>	104
3.2.3. <i>Procedimiento para el reclutamiento de los pacientes</i>	104
3.2.4. <i>Tamaño de la muestra</i>	105

<i>3.3. Diseño experimental y recogida de datos</i>	105
3.3.1. Descripción de las variables recogidas	106
3.3.1.1 Variables clínicas.....	106
3.3.1.2 Variables radiológicas.....	108
3.3.1.3. Variables de laboratorio	113
3.2.2 Fuentes de datos	118
3.2.3. Existencia de ciego.....	118
<i>3.4. Análisis estadístico</i>	119
3.4.1. Estudio descriptivo	119
3.4.2 Análisis estadístico univariante	119
3.4.3. Análisis predictivo.....	120
<i>3.5. Aspectos éticos</i>	121
4. RESULTADOS	125
<i>4.1. Análisis descriptivo de los pacientes incluidos en el estudio</i>	125
4.1.1. Pacientes incluidos	125
4.1.2. Variables demográficas	126
4.1.3. Características clínicas y radiológicas al ingreso	128
4.1.4. Tratamiento en fase aguda y tiempos de atención.....	129
4.1.5. Estudio descriptivo de las variables analíticas	130
4.1.6. Evolución clínica y radiológica durante el ingreso	132
4.1.7. Etiología del ictus isquémico y evolución clínica a los tres meses	134
<i>4.2. Análisis de los principales factores de confusión</i>	135
4.2.1. Sexo	135

4.2.2. Edad	137
4.2.3. NIHSS al ingreso.....	137
4.2.4. Ictus diurno/nocturno	138
<i>4.3. Estudio de la relación de la concentración de CXCL12 plasmática con la evolución de pacientes con ictus isquémico agudo</i>	<i>138</i>
4.3.1. Correlación de la concentración de CXCL12 plasmática con las principales variables demográficas, antecedentes personales y tratamiento previo.....	138
4.3.2. Correlación entre la concentración plasmática de CXCL12 y la gravedad neurológica y radiológica al ingreso.....	140
4.3.3. Correlación entre la concentración de CXCL12 con el momento de inicio del ictus (diurno/nocturno).....	143
4.3.4. Correlación entre la concentración de CXCL12 y el tipo de tratamiento realizado en fase aguda.....	144
4.3.5. Correlación entre la concentración de CXCL12 en plasma y las principales variables analíticas.....	144
4.3.6. Análisis de la evolución de la concentración plasmática de CXCL12	146
4.3.7. Correlación de la concentración plasmática de CXCL12 con las principales variables clínicas y radiológicas durante el ingreso	147
4.3.7.1. Evolución clínica durante el ingreso.....	147
4.3.7.2. Evolución radiológica.....	148
4.3.8. Correlación entre la concentración plasmática de CXCL12 y el pronóstico a los tres meses	154

4.4. Estudio de la relación de la concentración de CXCL12 plasmática con el fenotipo de los neutrófilos y la concentración plasmática de NETs.....	156
4.4.1. Correlación entre la concentración plasmática de CXCL12 y el fenotipo de los neutrófilos.....	157
4.4.2. Correlación entre la concentración plasmática de CXCL12 y la concentración plasmática de NETs.....	160
5. DISCUSIÓN	165
5.1. Descripción de la cohorte analizada.....	166
5.2. Correlación entre CXCL12 y las principales variables demográficas, antecedentes personales y tratamiento previo.....	167
5.3. Variabilidad de la concentración de CXCL12 en relación con la hora de inicio de síntomas	169
5.4. Correlación entre CXCL12 y la gravedad neurológica y radiológica al ingreso.	171
5.5. Correlación de la concentración de CXCL12 con las principales variables analíticas.....	173
5.6. Evolución de la concentración de CXCL12	175
5.7. Asociación entre la concentración de CXCL12 y la evolución radiológica	175
5.7.1 Selección de modalidad de neuroimagen para medir el volumen de infarto (RM o TC craneal)	175
5.7.2 Correlación entre la concentración de CXCL12 y el volumen de infarto a las 24-72 horas.....	176
5.7.3. Asociación entre CXCL12 y transformación hemorrágica	180
5.8. Correlación entre CXCL12 y la evolución clínica	181

5.8.1. Discrepancia entre volumen de infarto y la evolución clínica.....	182
5.8.2. Limitaciones de la ERm para determinar el pronóstico de los pacientes ..	183
5.8.3. Implicación directa de CXCL12 en el pronóstico neurológico	184
5.9. <i>Correlación de CXCL12 con el fenotipo del neutrófilo</i>	185
5.9.1. Frotis sanguíneo	185
5.9.2 Correlación entre la concentración de CXCL12 y NETs plasmáticos	187
5.10. <i>Limitaciones</i>	188
6. CONCLUSIONES	193
7. BIBLIOGRAFÍA.....	197
8. ANEXOS.....	223

ABREVIATURAS

AAS: ácido acetilsalicílico

ACI: arteria carótida interna

ACM: arteria cerebral media

ACOD: anticoagulantes de acción directa.

ADN: ácido desoxirribonucleico

AIT: accidente isquémico transitorio.

ASPECTS: *Alberta Stroke Programme Early CT Score*

ATP: adenosín trifosfato

AVK: antagonistas de la vitamina K

BMAL1: *brain and muscle Arnt-like protein 1*

CADASIL: *cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*

CCR2: receptor de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1)

CD (número): cluster de diferenciación

cfDNA: ADN circulante libre (*cell free DNA*)

CLOCK: *circadian locomotor output cycles kaput*

CXCL (número): quimiocina C-X-C ligando

CXCR (número): receptor C-X-C

DAMPs: patrones moleculares asociados a daño celular (*damage associated molecular patterns*).

DWI: técnica de difusión por RM (*diffusion-weighted imaging*)

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ERm: escala de Rankin modificada

ERC: enfermedad renal crónica

ERK: *extracellular regulated kinase*

ESUS: ictus embólico de origen indeterminado (*embolic stroke of undetermined source*)

FA: fibrilación auricular.

FLAIR: recuperación de la inversión atenuada de fluido (*Fluid-Attenuated Inversion Recovery*)

FOP: foramen oval permeable.

GABA: ácido gamma-aminobutírico

HbA1c: hemoglobina glucosilada

HI: infarto hemorrágico

(hemorrhagic infarction)

HIF-1: *hypoxia-inducible factor 1*

HMBG1: *high-mobility box group 1*

HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A

IC95%: intervalo de confianza del 95%

ICAM-1: molécula de adhesión

intercelular-1 (*intercellular adhesion molecule 1*)

IFN: interferón

IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1 (*insulin-like growth factor 1*)

IL: interleucina

INR: relación internacional normalizada

IV: intravenoso.

MMP: metaloproteasas de matriz

NADPH: nicotina adenina dinucleótido

NETs: trampas extracelulares de neutrófilos (*neutrophil extracellular traps*)

NIHSS: *National Institute of Health*

Stroke Scale

NK: células asesinas naturales (*natural killer*)

nNIF: *neonatal NETs-inhibitory factor*

NMDA: N-metil-D-aspartato

NPAS2: *Neuronal PAS domain-containing protein 2*

NSQ: núcleo supraquiasmático

MAP: *mitogen-activated protein*

MPO: mieloperoxidasa

OR: *odds ratio*

PBS: tampón fosfato salino

PFA: paraformaldehído

PAD4: peptidilarginina deaminasa 4

PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*)

PH: hemorragia parenquimatosa (*parenchymal hematoma*)

PPAR: receptores activados por proliferadores de peroxisomas (*peroxisome proliferator-activated receptor*)

PSGL-1: ligando de P-selectina (*P-selectin glycoprotein ligand-1*)

RM: resonancia magnética

ROS: especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species*)

Rpm: revoluciones por minuto

RRR: razón de riesgo relativo

SARS-CoV-2: *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

SDF-1 α : *stromal-derived factor-1 α*

SNC: sistema nervioso central

SOD: superóxido dismutasa

STAIR: *Stroke Treatment Academic Industry Roundtable*

TC: tomografía computarizada

TICI: *Thrombolysis in Cerebral Infarction Scale*

TNF- α : factor de necrosis tumoral α (*tumor necrosis factor- α*)

TNK: tenecteplasa

TLR4: receptor Toll-like 4 (Toll-like Receptor 4)

TOAST: *Trial Org-10172 Acute Stroke Treatment*

t-PA: activador tisular del plasminógeno (alteplasa)

UTP: uridín trifosfato

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

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana

ZT: Zeitgeber time

RESUMEN



RESUMEN

El ictus es una de las principales causas de mortalidad en España (la primera en mujeres), la segunda causa de demencia y la primera de discapacidad adquirida en el adulto. El pronóstico de los pacientes con un ictus isquémico ha mejorado sustancialmente en las últimas décadas, especialmente con la introducción de tratamientos en fase aguda como la fibrinólisis intravenosa (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995; Hacke et al., 2008) o la trombectomía mecánica (Goyal et al., 2016). Sin embargo, dichos tratamientos tienen importantes limitaciones que restringen su uso a casos seleccionados y algunos pacientes, pese a recibirlos, no presentan ninguna mejoría clínica. Por ello, es fundamental encontrar nuevas dianas terapéuticas relacionadas con la cerebroprotección que mejoren el pronóstico de los pacientes.

El ictus isquémico es una enfermedad compleja con importante variabilidad interindividual por la diversidad en la sintomatología y en las etiologías. Se produce por una obstrucción a nivel arterial que disminuye el flujo sanguíneo cerebral, lo cual provoca un conjunto de eventos asociados a un fallo energético celular (cascada isquémica), que finalmente dan lugar a un daño en el parénquima cerebral (Campbell et al., 2019a). La respuesta inmune asociada a un ictus isquémico es un factor crucial en la fisiopatología y en la resolución del mismo (Shichita et al., 2023). Dentro de los distintos tipos celulares implicados, el neutrófilo está involucrado en la respuesta inflamatoria los primeros días tras el ictus. Aunque inicialmente se le atribuyeron únicamente efectos deletéreos, también se ha observado que hay neutrófilos con funciones

cerebroprotectoras asociados a una resolución de la inflamación cerebral (Cuartero et al., 2013; García-Culebras et al., 2019).

En los últimos años, se ha descrito que los neutrófilos circulantes presentan una variación en su fenotipo en un proceso denominado envejecimiento o “*aging*”. El *aging* del neutrófilo tiene un patrón circadiano y puede condicionar cambios en la respuesta ante lesiones inflamatorias, infecciosas o vasculares. Los neutrófilos que salen a la circulación se denominan jóvenes (*fresh*) y presentan marcadores en membrana que los identifican, principalmente niveles altos de CXCR2 (CXCR2^{HI}) y CD62L (CD62L^{HI}) y bajos de CXCR4 (CXCR4^{LO}), en contraposición con los neutrófilos envejecidos que tienen un núcleo hipersegmentado y presentan niveles altos de CXCR4 (CXCR4^{HI}) y bajos de CD62L (CD62L^{LO}) (Adrover et al., 2016). Entre los mecanismos implicados en el “*aging*” del neutrófilo, se ha descrito un proceso regulado por el gen *Bmal1*, que a su vez controla la expresión del gen *Cxcl2*. La proteína resultante, CXCL2, actúa como agonista del receptor CXCR2 de forma autocrina promoviendo el envejecimiento del neutrófilo. Por el contrario, la citocina CXCL12, la cual es un agonista de CXCR4, inhibe este proceso (Adrover et al., 2019). En estudios preclínicos de infarto de miocardio, se ha observado que los ratones con neutrófilos jóvenes presentan un menor daño miocárdico (Adrover et al., 2019), por lo que se plantea que el fenotipo de los neutrófilos pudiera influir en la gravedad de las enfermedades vasculares en humanos.

Con estos antecedentes, en la presente Tesis Doctoral propusimos como hipótesis que la concentración de CXCL12 plasmática estaría relacionada con el fenotipo de los neutrófilos circulantes, inhibiendo el proceso de envejecimiento y, por ello, confiriendo un mejor pronóstico en pacientes con ictus isquémico agudo. En este sentido, los objetivos principales planteados han sido correlacionar la concentración plasmática de

CXCL12 con el volumen de infarto cerebral, gravedad del ictus y pronóstico de los pacientes a los 3 meses, así como con el fenotipo de los neutrófilos. De forma adicional, se ha planteado un análisis para determinar si la concentración de CXCL12 está influida por variables demográficas o por las principales patologías del paciente. Asimismo, se ha realizado un estudio exploratorio para valorar la relación entre la concentración de CXCL12 y los principales marcadores plasmáticos de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, por sus siglas en inglés).

Para contrastar esta hipótesis, se ha realizado un estudio prospectivo en el que se han reclutado en un Centro de Ictus un total de 134 pacientes con diagnóstico de ictus isquémico de menos de 6 horas de evolución o “del despertar”, excluyendo aquellos pacientes con ictus lacunares o con patologías o tratamientos previos que pudieran modificar la respuesta inmune (infección reciente, enfermedades oncológicas o reumatológicas activas). Para ello, en cada paciente se ha realizado una extracción sanguínea al ingreso, a las 24 horas y, en caso de ser posible, a los tres meses, así como un estudio de neuroimagen al ingreso y a las 24-72h para determinar el volumen de infarto y las principales complicaciones. Con respecto a las muestras sanguíneas, se han procesado para disponer de frotis sanguíneos que permitan valorar el fenotipo de los neutrófilos y obtener plasma pobre en plaquetas para determinar los niveles plasmáticos de CXCL12 mediante ELISA.

Para el análisis de los datos, se ha realizado un estudio descriptivo de la cohorte, un análisis univariante para establecer la correlación de CXCL12 con las distintas variables relacionadas con la gravedad clínica y radiológica, así como un estudio predictivo mediante el método de regresión paso a paso con exclusión secuencial (*backwards stepwise*) de las variables más relevantes.

Como principales resultados, cabe destacar:

1) Se observa una correlación positiva entre los niveles de CXCL12 y la edad, así como una menor concentración de CXCL12 en los pacientes que presentan diabetes mellitus ($p < 0,01$ al ingreso y $p = 0,03$ a las 24 horas en ambos casos). No se han objetivado otras asociaciones relevantes con otras patologías.

2) En relación con la afectación neurológica, en primer lugar, una concentración de CXCL12 más elevada al ingreso se ha asociado a una menor gravedad clínica medida por la escala NIHSS ($p = 0,08$) y radiológica medida por la escala ASPECTS ($p = 0,06$), sin encontrar diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, sí se ha observado una correlación negativa estadísticamente significativa entre los niveles plasmáticos de CXCL12 a las 24 horas del ictus y el volumen de infarto, tanto al analizar directamente el área isquémica ($p = 0,03$) como si se categoriza en terciles ($p = 0,01$). En este último caso, la concentración de CXCL12 a las 24 horas es una de las variables incluidas en el modelo predictivo. En la misma línea, se ha objetivado una correlación significativa entre la posibilidad de presentar una transformación hemorrágica y una menor concentración de CXCL12 a las 24 horas ($p = 0,04$). Pese a lo descrito anteriormente, no se ha confirmado una asociación entre los niveles de CXCL12 y el pronóstico funcional a los tres meses medido por la escala de Rankin modificada (ERm).

3) No se han demostrado variaciones en los niveles de CXCL12 en relación con el momento de inicio de los síntomas. Con respecto a la evolución de la concentración a lo largo del tiempo, se ha observado una menor concentración de CXCL12 a las 24 horas con respecto a las determinaciones al ingreso y a los tres meses. No se han objetivado diferencias del número de leucocitos o neutrófilos circulantes en función de los niveles de CXCL12.

4) En el estudio para valorar el fenotipo del *aging* de los neutrófilos mediante el grado de segmentación del núcleo, no se han observado diferencias significativas del fenotipo en función de la hora en la que se ha producido el ictus isquémico ni de la concentración plasmática de CXCL12.

5) Por último, se ha observado una correlación positiva débil entre los niveles plasmáticos de CXCL12 y los marcadores plasmáticos de NETs, por lo que deberán realizarse estudios adicionales para establecer los mecanismos subyacentes.

En conclusión, los resultados presentados en esta tesis doctoral sugieren un efecto protector de CXCL12 en pacientes con ictus isquémico agudo, especialmente relacionado con un menor volumen del infarto cerebral, lo cual podría ser una futura diana terapéutica. Sin embargo, no se ha confirmado una asociación con el fenotipo de los neutrófilos, por lo que deberán realizarse estudios futuros para corroborar esta hipótesis.

ABSTRACT



ABSTRACT

Stroke is one of the leading causes of mortality in Spain (first among women), the second cause of dementia and the main cause of acquired disability in adults. The prognosis of patients with ischemic stroke has improved significantly in recent decades, especially after the introduction of acute-phase treatments such as intravenous thrombolysis (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995; Hacke et al., 2008) or mechanical thrombectomy (Goyal et al., 2016). However, these treatments have important limitations that restrict their use to selected cases, and some patients do not show clinical improvement despite receiving them. Therefore, it is essential to identify new therapeutic targets in the field of neuroprotection to improve the prognosis of stroke patients.

Ischemic stroke is a complex disease with significant inter-individual variability due to the diversity of symptoms and etiologies. It is caused by an arterial occlusion that reduces cerebral blood flow, leading to a series of events associated with cellular energy failure (ischemic cascade), which ultimately results in damage to the brain parenchyma (Campbell et al., 2019a). The immune response associated with ischemic stroke is a critical factor in the pathophysiology and resolution of stroke (Shichita et al., 2023). Among the different cell types involved, the neutrophil is a key player in the inflammatory response in the first days after stroke. Although initially only deleterious effects were attributed to neutrophils, it has been shown that there are also neutrophils with neuroprotective functions associated with the resolution of brain inflammation (Cuartero et al., 2013; García-Culebras et al., 2019).

Recently, it has been described that circulating neutrophils change their phenotype in a process called aging. Neutrophil aging has a circadian pattern and may influence the response to inflammatory, infectious, or vascular injury. Neutrophils released into the circulation are known as "fresh" neutrophils and have characteristic membrane markers, mainly high levels of CXCR2 (CXCR2^{Hi}) and CD62L (CD62L^{Hi}) and low levels of CXCR4 (CXCR4^{Lo}). In contrast, aged neutrophils have a hypersegmented nucleus and high levels of CXCR4 (CXCR4^{Hi}) and low levels of CD62L (CD62L^{Lo}) (Adrover et al., 2016). Among the mechanisms involved in neutrophil aging, a pathway regulated by the *Bmal1* gene, which controls the expression of *Cxcl2*, has been identified. The resulting protein, CXCL2, acts as an agonist of the CXCR2 receptor in an autocrine manner to promote neutrophil aging. In contrast, the cytokine CXCL12, which is a CXCR4 agonist, inhibits this process (Adrover et al., 2019). In preclinical studies of myocardial infarction, mice with young neutrophils have less myocardial damage (Adrover et al., 2019), suggesting that the neutrophil phenotype may influence the severity of vascular diseases in humans.

With this background, in this Doctoral Thesis we hypothesized that plasma CXCL12 concentration would be related to the phenotype of circulating neutrophils, inhibiting the aging process and, therefore, conferring a better prognosis in patients with acute ischemic stroke. The main objectives were to correlate the plasma concentration of CXCL12 with cerebral infarct volume, stroke severity and patient prognosis at 3 months, and also with the phenotype of neutrophils. In addition, an analysis was performed to determine whether CXCL12 concentration was influenced by demographic variables or by the patients' main pathologies. An exploratory study was also performed to assess the relationship between CXCL12 levels and the main plasma markers of neutrophil extracellular traps (NETs).

To prove this hypothesis, a prospective study was conducted. 134 patients with a diagnosis of ischemic stroke up to 6 hours' duration or "wake-up" stroke were recruited at a single stroke center. Patients with lacunar stroke or with previous pathologies or treatments that could modify the immune response (recent infection, oncologic or active rheumatologic diseases) were excluded. Blood samples were obtained at admission, after 24 hours and, if possible, after three months. Neuroimaging was also performed on arrival and at 24-72 hours to determine infarct volume and major complications. Blood samples were processed to obtain blood smears to assess neutrophil phenotype and platelet-poor plasma to determine plasma CXCL12 levels by ELISA.

We performed a descriptive study of the cohort, a univariate analysis to determine the correlation between CXCL12 and different variables related to clinical and radiologic severity, and a predictive study using backward stepwise regression for the most relevant variables.

The main results of our study were the following:

- 1) A positive correlation between CXCL12 levels and age was observed, and diabetic patients had lower CXCL12 levels ($p < 0.01$ at admission and $p = 0.03$ at 24 hours in both cases). No other relevant associations with other pathologies were observed.
- 2) Regarding neurological involvement, a higher CXCL12 concentration on admission was associated with less clinical severity as measured by the NIHSS scale ($p = 0.08$) and less radiological severity as measured by the ASPECTS scale ($p = 0.06$), but no statistically significant differences were found. A statistically significant negative correlation was observed between plasma CXCL12 levels 24 hours after stroke and infarct volume, both when we analyzed the ischemic area directly ($p = 0.03$) and when it was categorized into

tertiles ($p = 0.01$). In the latter case, the concentration of CXCL12 at 24 hours is one of the variables included in the predictive model. Furthermore, a significant correlation was found between the likelihood of hemorrhagic transformation and a lower CXCL12 concentration at 24 hours ($p = 0.04$). However, an association between CXCL12 levels and functional prognosis at 3 months measured by the modified Rankin Scale (mRS) was not confirmed.

3) CXCL12 levels were not shown to vary according to the time of symptom onset. Regarding the evolution of the concentration across time, a lower CXCL12 concentration was observed at 24 hours compared to the levels measured at admission and at three months. Circulating leukocyte and neutrophil counts did not differ based on CXCL12 levels.

4) No significant differences in neutrophil phenotype were observed according to the time of ischemic stroke onset or the plasma concentration of CXCL12 when assessing the aging phenotype of neutrophils by their nuclear segmentation.

5) Finally, a weak positive correlation was observed between plasma CXCL12 levels and plasma NETs markers. Further studies should be performed to establish the underlying mechanisms.

In conclusion, the results of this Doctoral Thesis suggest a protective effect of CXCL12 in patients with acute ischemic stroke, particularly in relation to smaller cerebral infarct volume, which may be a future therapeutic target. However, an association with the neutrophil phenotype was not confirmed, so further studies should be performed to confirm this hypothesis.

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

1.1. El ictus isquémico

1.1.1 Definición

El ictus se define como un déficit neurológico atribuible a una lesión aguda y focal en el sistema nervioso central (SNC) de causa vascular (Sacco et al., 2013). Puede clasificarse en dos grupos principales: el ictus isquémico y el ictus hemorrágico; este último incluye la hemorragia intracerebral y la hemorragia subaracnoidea.

Un ictus isquémico se define como un episodio de disfunción neurológica originado por un infarto focal cerebral, espinal o retiniano. A su vez, un infarto del SNC se define como un daño celular ocasionado por isquemia, basado en hallazgos patológicos o de neuroimagen, o por síntomas neurológicos focales persistentes (>24h de duración o hasta el fallecimiento) compatibles con dicho diagnóstico y del que se han excluido otras posibles etiologías (Sacco et al., 2013).

Por otra parte, los accidentes isquémicos transitorios (AIT) son episodios de afectación neurológica focal del SNC de duración breve (típicamente menos de una hora) sin evidencia de una lesión isquémica aguda en las pruebas de neuroimagen (Albers et al., 2002). Se producen por una interrupción transitoria del flujo sanguíneo que se resuelve antes de producir una lesión permanente. Su patogenia y estudio etiológico es igual a la del ictus isquémico. Es de especial importancia la adecuada valoración de estos pacientes ya que presentan un riesgo aumentado de tener un ictus isquémico posterior, que puede disminuir con un estudio y tratamiento dirigido adecuado (Amarenco et al., 2016).

Esta revisión tratará principalmente del ictus isquémico, aunque algunos aspectos pueden ser aplicables a la hemorragia cerebral y a los AIT.

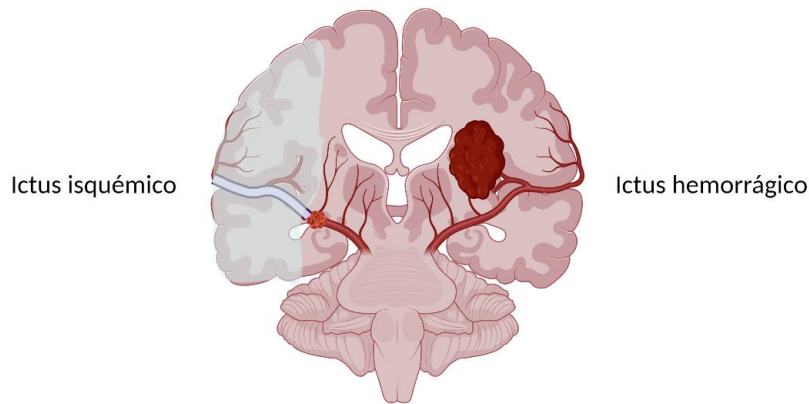


Figura 1: Representación esquemática de un ictus isquémico y hemorrágico. En el ictus isquémico, un trombo bloquea el flujo sanguíneo a un área cerebral, provocando una lesión isquémica secundaria. Por el contrario, un ictus hemorrágico se produce por una colección de sangre en el parénquima cerebral o en el sistema ventricular.

1.1.2. Epidemiología

A nivel mundial, se estima que una de cada cuatro personas sufrirá un ictus a lo largo de su vida, siendo un 71% de ellos ictus isquémicos (The GBD 2016 Lifetime Risk of Stroke Collaborators, 2018). En conjunto, afecta anualmente a 13,7 millones de personas en el mundo, siendo la segunda causa de fallecimiento, con 5,5 millones de muertes al año (Johnson et al., 2019). La incidencia y mortalidad ajustada por edad ha descendido progresivamente en los países con mayores recursos económicos gracias a una mejor prevención primaria, pero no en países con un nivel económico intermedio o bajo (Krishnamurthi et al., 2013), de modo que, a nivel global, la probabilidad de tener un ictus a lo largo de la vida ha aumentado de un 22,8% en 1990 a un 24,9% en 2016 (The GBD 2016 Lifetime Risk of Stroke Collaborators, 2018). Además, la frecuencia de patología cerebrovascular en la población probablemente sea mayor, ya que en un estudio poblacional realizado en Países Bajos en personas asintomáticas mayores de 55

años se identificaron lesiones isquémicas silentes en resonancia magnética (RM) craneal en el 7,2% de los sujetos estudiados (Vernooij, 2007). Asimismo, la incidencia de ictus entre personas jóvenes ha aumentado en los últimos años (Ekker et al., 2019), lo que puede atribuirse, al menos en parte, al aumento de los factores de riesgo vascular en este grupo de población (Bhatt et al., 2018).

En España, se estima que la incidencia anual de ictus es de 187 casos por cada 100000 habitantes al año (Díaz-Guzmán et al., 2012), por lo que se calcula que aproximadamente 71000 personas sufren un ictus anualmente. Aproximadamente 27000 personas fallecieron por este motivo durante 2017, siendo esta la segunda causa de muerte en España y la primera en mujeres (datos del Instituto Nacional de Estadística, 2017). El aumento de prevalencia de las enfermedades cerebrovasculares se relaciona con un envejecimiento de la población, pero desde los años 80 se ha observado un descenso progresivo de la mortalidad ajustada por edad gracias al mejor control de factores de riesgo vascular y a los avances en el tratamiento de los pacientes con ictus (Cayuela et al., 2016). Esta tendencia se está frenando, en parte porque hay un mayor reconocimiento en la población general de los síntomas y por la mejora en el estudio diagnóstico que, en conjunto, condicionan un aumento del número de pacientes diagnosticados (Cayuela et al., 2022).

El ictus no solo es relevante en términos de incidencia y mortalidad, ya que en los países occidentales las enfermedades cerebrovasculares suponen la segunda causa de demencia después de la enfermedad de Alzheimer y la primera causa de discapacidad adquirida (Johnson et al., 2019). De los pacientes que sobreviven a un ictus, dos tercios presentarán algún tipo de secuela, un 30% requerirá ayuda en sus actividades diarias, un 20% precisarán asistencia para poder desplazarse y un 16% necesitarán ingresar en

una residencia o en un centro de continuidad de cuidados, siendo la edad uno de los principales factores para presentar secuelas graves a largo plazo (Kelly-Hayes et al., 2003). Por otra parte, los pacientes en edad laboral que sufren un ictus tienen una mayor probabilidad de estar en situación de desempleo que la población general (Maaijwee et al., 2014).

Considerando todo lo anterior, las enfermedades cerebrovasculares suponen un importante impacto socioeconómico a nivel mundial. En España, el coste medio de un paciente ingresado con un ictus es de aproximadamente 6000€ y se estima un gasto medio durante el primer año de aproximadamente 27000€ (datos de 2013) (Alvarez-Sabín et al., 2017).

1.1.3. Factores de riesgo

Existen múltiples factores de riesgo asociados al ictus isquémico, que se dividen en aquellos que son modificables, no modificables y genéticos.

1.1.3.1. Factores de riesgo no modificables

La **edad** es el principal factor de riesgo. A partir de los 55 años se dobla la posibilidad de presentar un ictus isquémico y la mitad de casos ocurren en pacientes con más de 75 años (Chen et al., 2010). Además, los pacientes de mayor edad presentan mayor mortalidad, déficits neurológicos y tienen una recuperación más lenta.

Con respecto al **sexo**, las diferencias en la incidencia dependen de la edad. Los hombres tienen una mayor incidencia de ictus entre los 45 y los 75 años y a nivel global presentan una incidencia más alta: 133 casos por 100000/personas-año vs. 99 casos por 100000/personas-año en las mujeres (Krishnamurthi et al., 2013). Sin embargo, a partir de los 75 años las mujeres tienen una mayor probabilidad de padecer un ictus por lo

que, en países con mayor esperanza de vida, las mujeres tienen en conjunto una mayor posibilidad de tener un ictus a lo largo de su vida (Benjamin et al., 2019).

Por otra parte, se ha observado una mayor incidencia y mortalidad en pacientes de raza negra, que se relaciona en parte con un mayor riesgo de presentar factores predisponentes como la hipertensión arterial y por un peor acceso a la sanidad en determinadas regiones (Cruz-Flores et al., 2011).

1.1.3.2. Factores de riesgo modificables

La identificación de factores de riesgo modificables en la población es uno de los principales objetivos para iniciar terapias de prevención primaria que permitan disminuir la probabilidad de padecer un ictus en el futuro (Boehme et al., 2017; Tsao et al., 2023). En el estudio internacional INTERSTROKE, se identificaron 10 factores de riesgo modificables que predicen el 90% de posibilidad de tener un ictus, que se identifican en la Figura 2 (O'Donnell et al., 2010):



Figura 2: Factores de riesgo relacionados con el ictus en el estudio INTERSTROKE: hipertensión arterial, tabaquismo, cociente entre cintura y cadera, dieta, sedentarismo, consumo importante de alcohol, factores psicosociales (estrés y depresión), causas cardíacas y relación entre apolipoproteína B y A1.

La **hipertensión arterial** es el factor de riesgo modificable más importante, especialmente si la presión arterial es superior a 160/90mmHg (O'Donnell et al., 2010). De forma general, se recomienda que debe tratarse con medidas farmacológicas y cambios en el estilo de vida para conseguir una tensión arterial inferior a 140/90mmHg (Meschia et al., 2014). En los últimos años se propone un objetivo más estricto (<130/80mmHg), especialmente en pacientes con enfermedad isquémica de pequeño vaso o diabetes mellitus (Furie, 2020).

La **diabetes mellitus** es otro factor de riesgo independiente, que aumenta el riesgo de sufrir un ictus especialmente en pacientes menores de 65 años y en mujeres (Furie, 2020). Se recomienda conseguir un control glucémico con un valor de hemoglobina glucosilada menor del 7% para prevenir complicaciones microvasculares, sin haberse demostrado que un control más intensivo de la glucemia disminuya la posibilidad de tener un ictus isquémico (Fang et al., 2016).

El papel del **colesterol** y sus subfracciones como factor de riesgo para sufrir un primer ictus isquémico ha presentado resultados contradictorios en los distintos estudios realizados. En general, valores aumentados de colesterol total entre los 40 y 59 años de edad se relacionan con un aumento de riesgo de padecer un ictus isquémico; por el contrario, algunos estudios asocian valores más elevados de colesterol total con tener una menor posibilidad de desarrollar un ictus hemorrágico (Tsao et al., 2023). En cualquier caso, se deben indicar cambios en el estilo de vida en pacientes con hipercolesterolemia y alto riesgo vascular y considerar el inicio de estatinas para prevenir la posibilidad de desarrollar enfermedades vasculares.

La **fibrilación auricular (FA)** es otro de los principales factores de riesgo para presentar un ictus isquémico, especialmente en personas de edad avanzada y en mujeres. Para

prevenir embolias cerebrales o sistémicas asociadas a la FA, se indica iniciar tratamiento anticoagulante con antagonistas de la vitamina K (AVK) o anticoagulantes de acción directa (ACOD) en pacientes con una puntuación de la escala CHA₂DS₂-VASc ≥ 1 (January et al., 2019).

ESCALA CHA ₂ DS ₂ -VASc	
Disfunción ventricular/ Insuficiencia cardiaca congestiva	1 punto
Hipertensión arterial	1 punto
Edad mayor o igual de 75 años	2 puntos
Diabetes mellitus	1 punto
Ictus/ AIT/ Tromboembolismo	2 puntos
Enfermedad vascular: infarto previo, enfermedad aórtica periférica, afectación aórtica...	1 punto
Edad 65-74	1 punto
Sexo femenino	1 punto

Tabla 1: Escala CHA₂DS₂-VASc. Valora el riesgo de tener un ictus en pacientes con fibrilación auricular. Puntuación máxima: 9 puntos. Riesgo bajo: 0 puntos. Riesgo moderado: 1 punto. Riesgo alto ≥ 2 puntos.

El **consumo de tóxicos** se relaciona con un aumento de la probabilidad de presentar enfermedades cerebrovasculares. El tabaquismo incrementa el riesgo de sufrir un ictus, siendo este más alto a mayor número de cigarrillos consumidos al día (Bhat et al., 2008). Se estima que el tabaquismo está relacionado con un 15% de la mortalidad (Thun et al., 2000) y el abandono del hábito tabáquico se asocia con una disminución del riesgo de padecer un ictus (Song and Cho, 2008). El consumo de alcohol a dosis altas se asocia con una mayor posibilidad de presentar un ictus isquémico y, de forma más directa, con desarrollar una hemorragia intracraneal. Su consumo conlleva un peor control de la tensión arterial y una mayor posibilidad de presentar cardiopatías embolígenas como la fibrilación auricular o la miocardiopatía dilatada por alcohol (Hillbom et al., 2011). El uso de otros tóxicos ilegales como la cocaína, la heroína, anfetaminas y MDMA están

relacionados con un aumento importante del riesgo de presentar un ictus isquémico o hemorrágico (Boehme et al., 2017).

En relación con los **hábitos de vida**, las personas físicamente activas tienen un riesgo inferior de sufrir un ictus isquémico (Tsao et al., 2023). Con respecto a la nutrición, la dieta mediterránea y un bajo consumo de sal se relacionan con una menor probabilidad de desarrollar enfermedades cerebrovasculares (Strazzullo et al., 2009; Estruch et al., 2018). Entre los distintos mecanismos propuestos, la actividad física y la dieta están relacionadas una disminución de la presión arterial, del peso corporal y de la posibilidad de padecer diabetes mellitus.

Otros factores reconocidos son la apnea obstructiva del sueño, la enfermedad renal crónica o trastornos psiquiátricos como el estrés o la depresión (Bang et al., 2015). Asimismo, se ha relacionado un incremento de la incidencia de ictus con una mayor exposición a contaminantes atmosféricos (Shah et al., 2015).

Algunos **procesos inflamatorios crónicos** también se han relacionado con una mayor probabilidad de tener un ictus. Se ha observado que niveles de proteína C reactiva más elevados en plasma, que es un marcador inespecífico de inflamación, se relacionan de forma modesta con una mayor incidencia de ictus (Emerging Risk Factors Collaboration et al., 2010). Asimismo, la exposición previa a infecciones bacterianas y virales se ha asociado a un mayor riesgo de presentar un ictus (Elkind et al., 2010), así como la enfermedad periodontal crónica (Lafon et al., 2014). Las **infecciones agudas** también suponen un desencadenante para presentar un ictus agudo; de hecho, se ha observado una menor incidencia de ictus en personas que han sido vacunadas de la gripe (Holodinsky et al., 2022) y del SARS-CoV-2 (Kim et al., 2022).

1.1.3.3. Factores de riesgo genéticos

La identificación de variantes genéticas que puedan relacionarse con un aumento de la probabilidad de tener ictus es compleja ya que se trata de una enfermedad muy heterogénea, en la que existe una importante variabilidad entre poblaciones, de etiologías y de factores de riesgo. Las variantes genéticas pueden contribuir a presentar un ictus de distintas formas (Boehme et al., 2017; Dichgans et al., 2019):

1. Trastornos genéticos monogénicos en los que el ictus es su manifestación única o principal. Entre ellos destacan el CADASIL (de las siglas en inglés "*cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy*"), secundario a una mutación del gen NOTCH3, la angiopatía amiloide familiar (siendo el principal gen implicado el precursor de la proteína APP/ β -amiloide) o las variantes patogénicas del gen Colágeno 4 (COL4A1).
2. Trastornos genéticos que pueden presentarse con ictus como una de sus manifestaciones. En esta categoría, las patologías más relevantes son la enfermedad de Fabry (mutación de la galactosidasa A), el MELAS (de las siglas en inglés "*mitochondrial encephalopathy with lactic acid and stroke-like episodes*"), por mutación en el ADN mitocondrial, y la anemia falciforme.
3. Variantes genéticas relacionadas con tener una mayor probabilidad de tener un ictus o factores de riesgo vascular clásicos (estos a su vez incrementan la posibilidad de presentar enfermedades neurovasculares). Existen distintos genes conocidos, como variantes de los genes HDAC9 o TSPAN2, que se asocian a ictus aterotrombóticos, o variantes de PITX2 o ZFH3, con los ictus cardioembólicos (Dichgans et al., 2019).

1.1.3.4. Prevención primaria

Considerando los factores de riesgo previamente mencionados, se han diseñado distintas estrategias para prevenir el desarrollo de ictus. Como se ha reflejado previamente, es preciso conseguir un adecuado control de la tensión arterial, glucémico y lipídico. A nivel poblacional, no se ha observado un beneficio del tratamiento con ácido acetilsalicílico (AAS) en la prevención de enfermedades cerebrovasculares en pacientes sin patología vascular conocida y sí un leve incremento de la posibilidad de presentar complicaciones hemorrágicas (McNeil et al., 2018), por lo que actualmente no se recomienda su toma como prevención primaria en la población general.

La identificación de fibrilación auricular y su adecuado tratamiento con fármacos anticoagulantes disminuye la probabilidad de presentar un ictus, aunque de momento no está establecido un *screening* poblacional (Hindricks et al., 2021). El aumento de impuestos al tabaco y bebidas azucaradas se ha identificado como una medida útil para disminuir el consumo de dichos productos (Colchero et al., 2017), así como medidas de salud pública orientadas al desarrollo de actividad física o a promover una dieta saludable.

1.1.4. Etiología

1.1.4.1. Causas arteriales

Ateroesclerosis

La ateroesclerosis es una de las principales etiologías del ictus. Los trombos arteriales se originan cuando el núcleo lipídico de la placa de ateroma se expone a la luz arterial, principalmente por fenómenos inflamatorios locales o por ulceración. Las placas de ateroma se localizan en población occidental principalmente a nivel carotídeo o aórtico

y, por el contrario, las placas de ateroma en arterias intracraneales son más frecuentes en población asiática o en pacientes con diabetes mellitus o tabaquismo importante (Kim et al., 2018).

Existen varios mecanismos por los cuales a partir una placa de ateroma complicada se puede dar lugar a un ictus. El mecanismo principal es un embolismo arterio-arterial, que se produce por una migración del trombo a arterias distales, pero también puede ser secundario a una trombosis arterial *in situ* o por un mecanismo hemodinámico (hipoperfusión distal) en estenosis de alto grado u oclusiones arteriales.

Enfermedad de pequeño vaso

La afectación de arterias de pequeño tamaño o de las arteriolas cerebrales da lugar a distintas manifestaciones, tanto isquémicas (infartos lacunares, leucoaraiosis) como hemorrágicas (microhemorragias o hemorragia intracerebral). La afectación de las arterias de pequeño calibre se presenta preferentemente a nivel subcortical de los hemisferios cerebrales o a nivel troncoencefálico, ya que en estas localizaciones se originan directamente desde arterias de mayor calibre y por ello se exponen a una presión arterial más elevada, que a su vez predispone a un daño vascular por lipohialinosis. También pueden verse afectadas estas arterias por arterioesclerosis o en casos más infrecuentes pueden asociarse a enfermedades genéticas como el CADASIL (Campbell et al., 2019a).

Otras causas vasculares

Existen otras patologías arteriales que pueden provocar un ictus isquémico. Dentro de ellas, las disecciones arteriales son las más frecuentes; se producen por una separación entre la capa íntima y la capa media arterial, que puede ocasionar una lesión isquémica

por un mecanismo hemodinámico o por embolismos arterio-arteriales. Pueden presentarse de forma espontánea, ser secundarias a traumatismos o relacionarse con enfermedades del tejido conectivo.

Otras causas más raras son las vasculitis autoinmunes del SNC (primaria o secundaria a otras enfermedades reumatológicas), vasculitis infecciosas (entre ellas por virus Varicela-Zoster, sífilis...) u otras arteriopatías como la displasia fibromuscular, la enfermedad de moya-moya, el síndrome de vasoconstricción cerebral reversible, etc.

1.1.4.2. Causas cardiacas

Fibrilación auricular y flutter auricular

La fibrilación auricular es una de las arritmias más frecuentes en la población general. Se origina cuando se generan estímulos eléctricos en distintos puntos de la aurícula condicionando una alteración del ritmo cardiaco y contracciones auriculares irregulares (Brundel et al., 2022). Por distintos mecanismos aumenta la probabilidad de que se originen trombos auriculares, que pueden provocar embolismos arteriales a nivel del sistema nervioso central o a nivel sistémico. En conjunto, las personas que presentan una fibrilación auricular tienen un riesgo cinco veces mayor de presentar un ictus isquémico, si bien el riesgo individual se ve modificado por la edad y los factores de riesgo específicos (Pisters et al., 2012).

Otras causas cardiacas

Otras fuentes cardioembólicas relacionadas con los ictus isquémicos son:

- Las válvulas metálicas.

- La hipocinesia o dilatación del ventrículo izquierdo por cardiopatía isquémica aguda o crónica o en miocardiopatías dilatadas, que favorecen el desarrollo de trombos murales.
- Las endocarditis infecciosas o las endocarditis trombóticas no bacterianas.
- Tumores cardiacos como los mixomas o fibroelastomas, entre otros.
- En los últimos años han cobrado especial interés los ictus asociados a foramen oval permeable (FOP) a partir de ensayos clínicos que han demostrado una reducción del riesgo de ictus isquémico recurrente tras el cierre endovascular del FOP (Mas et al., 2017; Saver et al., 2017).

1.1.4.3. Otras etiologías

Trombofilias y estados de hipercoagulabilidad

Algunos trastornos hematológicos aumentan la posibilidad de presentar eventos tromboembólicos que, si bien son más frecuentes en la circulación venosa, pueden provocar eventos isquémicos arteriales como los ictus isquémicos. Entre los más comunes encontramos la mutación del factor V de Leyden (resistencia a la proteína C activada), la mutación del gen de la protrombina 20210A, el déficit de proteína C y S y el déficit de antitrombina.

Las enfermedades oncológicas también pueden suponer un aumento de la probabilidad de presentar eventos isquémicos por diversos mecanismos, siendo el principal una coagulopatía intravascular por aumento de factores procoagulantes sintetizados por las células tumorales o como parte de la respuesta inmune, por producción de NETs (*neutrophil extracellular traps*; trampas extracelulares de neutrófilos), por aumento de la actividad plaquetaria o por disfunción endotelial (Bang et al., 2020; Navi et al., 2021).

Algunas enfermedades autoinmunes se asocian a un riesgo aumentado de ictus isquémico, siendo de especial interés el síndrome antifosfolípido primario o secundario (asociado a otras enfermedades autoinmunes) (Naranjo et al., 2021).

Otras enfermedades sistémicas también pueden provocar un estado de hipercoagulabilidad, como pueden ser la enfermedad renal crónica, especialmente si se asocia a un síndrome nefrótico, o las hepatopatías graves. Algunos fármacos también se han asociado a un estado procoagulante, como pueden ser los anticonceptivos orales o el tratamiento hormonal sustitutivo.

Enfermedades genéticas

Como se ha recogido previamente, algunas enfermedades genéticas pueden aumentar el riesgo de presentar ictus isquémico, destacando el CADASIL, la enfermedad de Fabry o la anemia falciforme.

Otras causas

Múltiples enfermedades pueden asociarse a ictus isquémicos, como el síndrome de vasoconstricción cerebral reversible, el uso de drogas recreativas como la cocaína, embolismos grasos en contexto de fracturas óseas, etc.

1.1.4.4. Causa desconocida

En torno al 20% de los pacientes no presentan una causa determinada. Esto puede deberse a la coexistencia de dos o más causas conocidas (por ejemplo, que presenten una estenosis carotídea mayor del 70% y una fibrilación auricular) o a que no se haya podido completar el estudio etiológico.

Un infarto cerebral se considera criptogénico cuando no se llega al diagnóstico etiológico pese a haber realizado un estudio completo. Dentro de ellos, se ha desarrollado el

término ESUS (de las siglas en inglés “*embolic stroke of undetermined source*”), que engloba a los ictus de mecanismo embólico criptogénicos. Los ESUS pueden deberse a fibrilación auricular paroxística no detectada, otras cardiopatías (enfermedad valvular, cardiopatía atrial), placas ateroscleróticas o a cáncer oculto, entre otros. En este grupo, se han desarrollado varios ensayos clínicos valorando la eficacia de la anticoagulación frente a la antiagregación, sin evidenciarse una disminución de riesgo de padecer un ictus en pacientes con tratamiento anticoagulante (Kotadia et al., 2021).

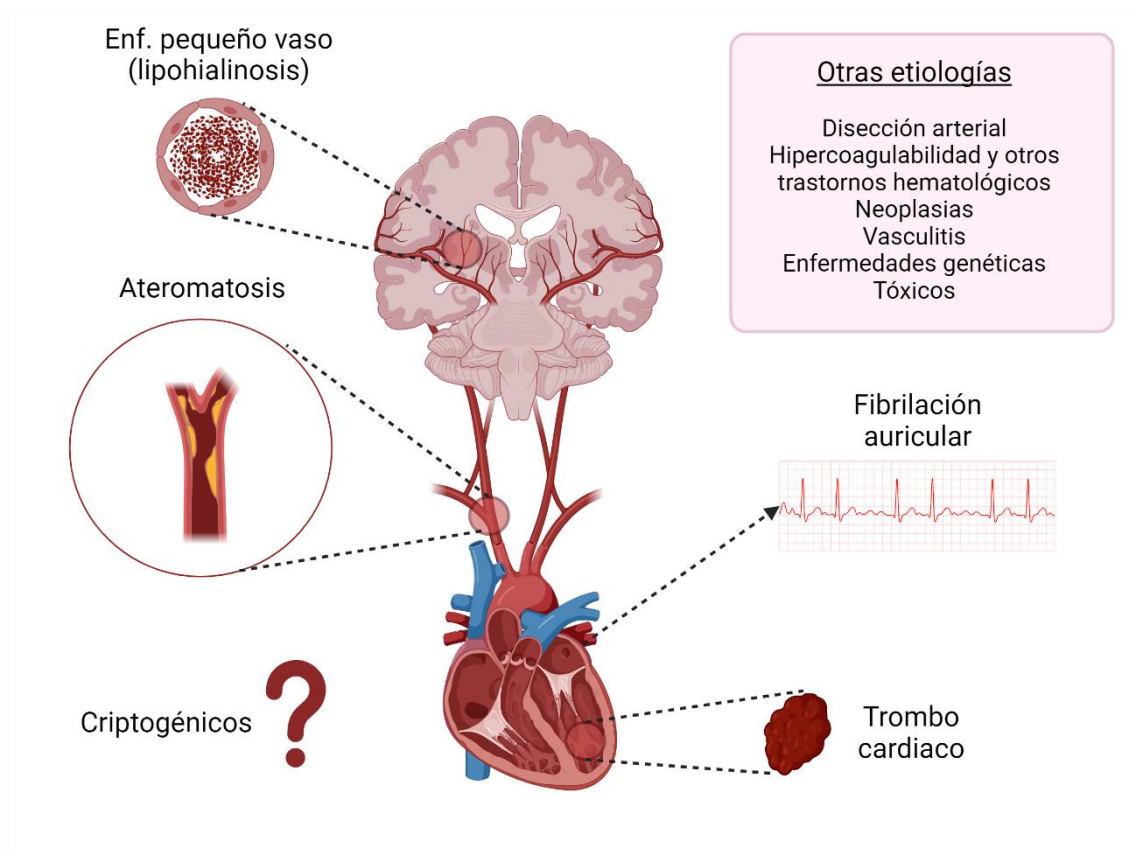


Figura 3: Principales etiologías de los ictus isquémicos. Se destacan causas arteriales (ateromatosis, disección, vasculitis), cardíacas (fibrilación auricular, trombo cardiaco), enfermedad de pequeño vaso, causas inhabituales (hipercoagulabilidad, neoplasias, enfermedades genéticas, tóxicos) y los ictus criptogénicos.

1.1.4.5. Clasificaciones

Se han propuesto distintas clasificaciones para englobar las etiologías de los ictus isquémicos recogidas previamente. Dentro de ellas, la más utilizada es la **clasificación TOAST**, que divide los ictus en 5 tipos principales (Adams et al., 1993):

- Infarto aterotrombótico. Arterioesclerosis de arteria grande.
- Infarto cardioembólico.
- Enfermedad isquémica de pequeño vaso. Infarto lacunar.
- Infarto cerebral de causa rara o inhabitual.
- Infarto cerebral de origen indeterminado.

Otras clasificaciones destacadas son la de **Laussane** y la **escala ASCO** (A: aterotrombótico; S: *small vessel* (pequeño vaso); C: cardioembólico; O: otras causas), en la que se aporta una valoración en función de la probabilidad de cada etiología, que aumenta la complejidad de la valoración pero disminuye el número de ictus clasificados como indeterminados por coexistencia de causas (Sobrino García et al., 2013).

1.1.5. Fisiopatología

1.1.5.1. Circulación colateral

El cerebro humano es muy susceptible a la isquemia. Tiene un alto consumo energético y, a diferencia de otros órganos, utiliza de forma casi exclusiva la glucosa para obtener energía y tiene escasas reservas (Markus, 2004). Recibe en torno al 20% del gasto cardiaco, aunque supone únicamente un 2% del peso total del cuerpo. Para mantener un flujo de sangre constante, las arterias cerebrales mantienen una autorregulación del flujo cerebral para mantener una presión arterial con valores entre 60 y 150mmHg,

aunque existen variaciones interpersonales. Valores inferiores pueden conllevar el desarrollo de isquemia y, cifras superiores, de edema cerebral.

Cuando una arteria cerebral se ocluye, otras arterias pueden aportar flujo sanguíneo a la región cerebral afectada que, en su conjunto, se denominan **circulación colateral**. La circulación colateral puede depender tanto de otras arterias del polígono de Willis (primarias) o de anastomosis por vía leptomenígea (secundarias). Varía entre individuos en función de distintos determinantes genéticos y ambientales (Zhang et al., 2010), así como en un mismo paciente a lo largo del tiempo (Agarwal et al., 2018).

Tras producirse la oclusión arterial, el área isquémica puede tener dos zonas en función del aporte sanguíneo que reciban (Figura 4). Una es el **core o núcleo isquémico**, que es donde hay una disminución más importante del flujo sanguíneo y en la que se produce una lesión isquémica en un tiempo reducido de tiempo (incluso minutos). A su alrededor hay una zona denominada **penumbra isquémica**, cuyo aporte sanguíneo es insuficiente para conservar una función normal pero sí para mantener la viabilidad celular durante un tiempo variable, que puede recuperarse si vuelve a recibir un flujo sanguíneo normal. Por ello, uno de los principales objetivos del tratamiento de los pacientes con un ictus isquémico será conseguir una reperusión en el menor tiempo posible para intentar recuperar el territorio de penumbra y evitar la progresión del *core* (Ermine et al., 2021), que se resume en la frase “tiempo es cerebro”. Los pacientes con mejor circulación colateral presentan un crecimiento más lento del área de infarto, lo que condiciona un mejor pronóstico con el tratamiento de reperusión incluso en ventana temporal extendida (Rocha and Jovin, 2017).

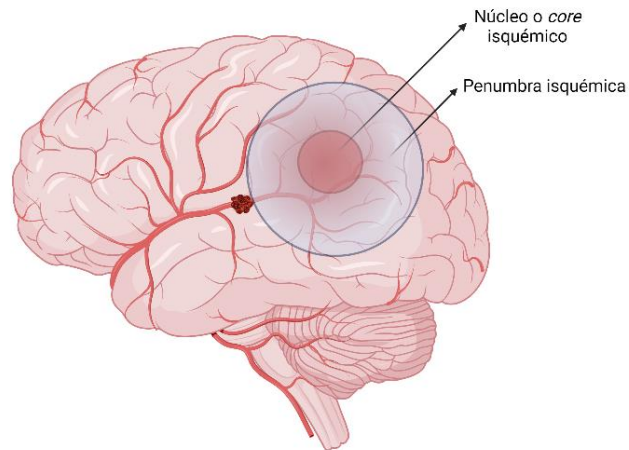


Figura 4: Imagen representativa del área de isquemia, incluyendo el núcleo o *core* isquémico que recibe un menor aporte sanguíneo y en el que se puede desarrollar una lesión isquémica en poco tiempo, y un área circundante de penumbra isquémica.

1.1.5.2. Cascada isquémica

La disminución del flujo sanguíneo conlleva una disminución de nutrientes y glucosa al parénquima cerebral irrigado por la arteria afectada. Esto inicia un conjunto de eventos asociados a un fallo energético celular, con afectación de la función neuronal y vascular, que en conjunto se denominan **cascada isquémica** (Figura 5).

La actividad neuronal depende de tener una disponibilidad energética continua para producir ATP principalmente a través de la glucólisis aeróbica. Gracias a ello se mantiene la homeostasis iónica de la membrana a través de distintos mecanismos, destacando las bombas dependientes de ATP como la Na^+/K^+ ATPasa. La pérdida de este gradiente transmembrana por una disminución del ATP conlleva una despolarización que provoca la activación de canales dependientes de calcio (Ca^{2+}), ocasionando una entrada masiva de Ca^{2+} al citoplasma neuronal. Este hecho incrementa aún más la despolarización de la membrana y produce una liberación excesiva de neurotransmisores excitatorios como

el glutamato que se acumula en el espacio extracelular y están implicados en un nivel excesivo de activación denominado **excitotoxicidad** (Obrenovitch et al., 1993; Martin et al., 1994).

La alteración del gradiente transmembrana y la excesiva activación mencionada conllevan un aumento de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático por liberación de depósitos intracelulares y por la activación de receptores de glutamato, y esto a su vez inicia una serie de procesos que conducen a un daño neuronal irreversible. Entre ellos, cabe destacar la activación de la sintasa del óxido nítrico neuronal (nNOS) que aumenta la producción de radicales libres (Love, 2006) lo que, junto al aumento excesivo de la concentración de Ca^{2+} , favorece un daño mitocondrial. Esto provoca en última instancia la activación de la cascada apoptótica (liberación de citocromo C, activación de caspasas, fragmentación de ADN) o, si la disminución del ATP es muy importante, se produce una necrosis neuronal (Campbell et al., 2019a).

Estos procesos no solo generan una afectación neuronal, sino que afectan a otras estirpes celulares del SNC incluyendo astrocitos, oligodendrocitos y pericitos. Los **astrocitos** presentan igualmente un incremento de las concentraciones de calcio citoplasmático y una reducción de la expresión de transportadores de glutamato, que favorece un aumento de la concentración extracelular de éste (Rao et al., 2001). Los **oligodendrocitos** también se ven afectados por la isquemia y la excitotoxicidad, lo cual puede derivar en una desmielinización de los axones neuronales, que se asocia a una mayor afectación de la sustancia blanca cerebral y a un aumento de la degeneración Walleriana (George and Steinberg, 2015). Por último, la lesión de los **pericitos** puede afectar la circulación a nivel capilar y contribuir a un daño de la barrera hematoencefálica (Hall et al., 2014).

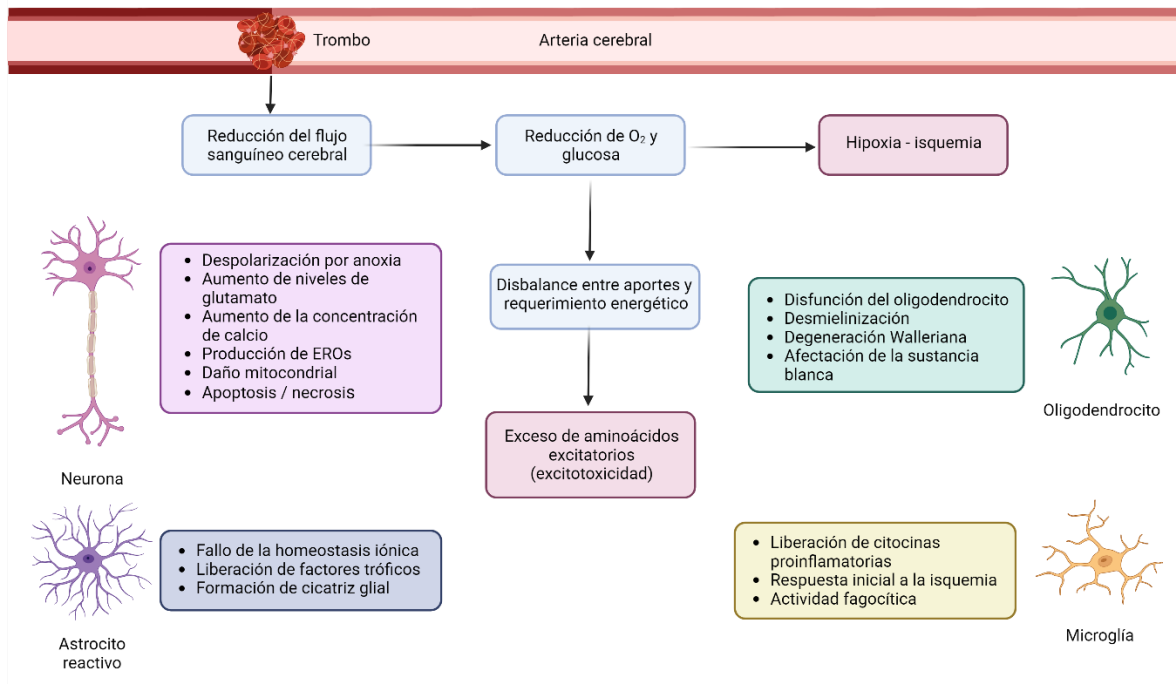


Figura 5: Representación esquemática de la cascada isquémica. La disminución de oxígeno y glucosa provoca una cascada de eventos que en último lugar provoca la muerte celular y una respuesta del sistema inmune. Adaptado de (George and Steinberg, 2015).

Todo este proceso se acompaña de una respuesta del sistema inmune que se tratará en un apartado específico (sección 1.2)

1.1.5.3 Transformación hemorrágica

Tras producirse el ictus isquémico, no se produce únicamente un daño del parénquima cerebral, sino que pueden afectarse distintos elementos de la unión neurovascular. La afectación de la barrera hematoencefálica puede favorecer el edema cerebral y, si es de suficiente gravedad, producir una extravasación de sangre en el tejido cerebral en un proceso denominado transformación hemorrágica (Spronk et al., 2021). La frecuencia de este evento es variable en las distintas series publicadas, oscilando entre el 3-40% en función de la definición y de las características de la población estudiada (Spronk et al., 2021).

Dentro de los distintos tipos de transformación hemorrágica, cabe diferenciar aquellas que son asintomáticas, es decir, que no ocasionan un deterioro neurológico significativo, y aquellas que son sintomáticas. Estas últimas suelen ser secundarias a un hematoma de gran tamaño con efecto de masa (hemorragias parenquimatosas tipo 2) o a una hemorragia subaracnoidea difusa, y en conjunto se asocian a un deterioro neurológico precoz y a un aumento de la mortalidad a los tres meses (Fiorelli et al., 1999).

Existen distintos factores de riesgo que pueden favorecer el desarrollo de una transformación hemorrágica, entre los que se incluyen la edad avanzada, la gravedad inicial del ictus, la hipertensión, la diabetes, tener una mala circulación colateral y el tratamiento con fibrinólisis intravenosa o trombectomía mecánica (Whiteley et al., 2012). Además de estos factores mencionados, la respuesta inflamatoria local generada por el sistema inmune puede contribuir a la lesión de la barrera hematoencefálica, ya que la activación de los leucocitos produce la liberación al espacio extracelular de distintas enzimas como las metaloproteasas de matriz (MMP por sus siglas en inglés, destacando en el ictus isquémico la MMP-9), y de ROS, que en conjunto aumentan el daño de la unión neurovascular.

1.1.6. Tratamiento

1.1.6.1. Estabilización clínica

En la atención a los pacientes con un ictus isquémico agudo, es preciso asegurar en primer lugar una estabilización clínica tanto de la vía aérea como de la situación hemodinámica.

1.1.6.2. Cuidados en Unidad de Ictus

Los pacientes con un ictus isquémico agudo presentan un mejor pronóstico cuando son evaluados y tratados en Unidades de Ictus, por lo que se recomienda su ingreso en unidades con telemetría con neurólogos y enfermería especializados en patología neurovascular (Candelise et al., 2007; Langhorne et al., 2020).

Es recomendable un control de la presión arterial, que depende del tratamiento realizado en fase aguda. En aquellos pacientes candidatos a recibir fibrinólisis intravenosa o trombectomía mecánica se recomienda disminuir la presión a cifras inferiores a 180/105mmHg, y en aquellos que no reciban tratamiento recanalizador, la tensión no debe ser superior a 220/110mmHg en las primeras horas. Asimismo, se debe realizar un control de la temperatura, de la glucemia y de la saturación de oxígeno (Powers et al., 2019).

También es especialmente relevante el abordaje integral de los pacientes en las Unidades de Ictus para prevenir la aparición de complicaciones asociadas a esta enfermedad. Entre ellas destaca la prevención de neumonías o infecciones respiratorias asociadas a broncoaspiración mediante la evaluación de la deglución, o la prevención de enfermedades tromboembólicas venosas (trombosis venosa profunda y tromboembolismo pulmonar) mediante profilaxis con heparina de bajo peso molecular o con medias de compresión neumática (Sherman et al., 2007; CLOTS (Clots in Legs Or sTockings after Stroke) Trials Collaboration et al., 2013).

1.1.6.3. Fibrinólisis intravenosa

La fibrinólisis intravenosa es un tratamiento de primera línea en pacientes seleccionados con ictus isquémico en fase aguda. Existen dos principales fármacos fibrinolíticos disponibles para el tratamiento: la alteplasa y la tenecteplasa.

Alteplasa (t-PA)

La alteplasa (activador tisular del plasminógeno o t-PA) promueve el paso del plasminógeno a plasmina, la cual está implicada en la degradación de la fibrina, provocando en última instancia la lisis de un trombo. Dado que la plasmina se inactiva rápidamente, es preciso que el tratamiento con t-PA se administre con un bolo inicial (10% de la dosis) y el 90% restante en una perfusión continua durante una hora. La dosis total habitual es de 0,9mg/kg (máximo 90mg) aunque se ha demostrado que una dosis menor (0,6mg/kg) es “no inferior” en población asiática (Anderson et al., 2016).

El t-PA supuso una revolución en el tratamiento del ictus isquémico tras los resultados favorables de los ensayos clínicos iniciales (NINDS 1 y 2) que demostraron un mejor pronóstico de los pacientes tratados en las primeras 3 horas (National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). Posteriormente, en el ensayo ECASS III se mostró igualmente beneficio en una ventana de tratamiento de hasta 4,5 horas después del inicio del ictus, aunque su eficacia es mayor cuanto antes se administre (Hacke et al., 2008; Lees and Bluhmki, 2010; Emberson et al., 2014).

El tratamiento en pacientes con un ictus de más de 4,5 horas de evolución o con inicio desconocido solo está indicado en la práctica clínica habitual con estudios de neuroimagen avanzada favorables. Por una parte, el estudio WAKE-UP objetivó un mejor pronóstico de los pacientes con ictus de inicio desconocido que presentan en la RM craneal un “*mismatch*” (diferencia o desproporción) entre la lesión isquémica objetivada en la secuencia de difusión (DWI) y la secuencia FLAIR (recuperación de la inversión atenuada de fluido) (Thomalla et al., 2018). Por otra parte, el estudio EXTEND y un metaanálisis posterior mostraron beneficio del tratamiento con t-PA hasta 9 horas

desde el inicio de los síntomas si presentaban un TC perfusión favorable (Campbell et al., 2019b; Ma et al., 2019).

La alteplasa, por lo tanto, supone un tratamiento accesible para mejorar el pronóstico de los pacientes con ictus isquémico, y actualmente está incluida en la lista de medicamentos esenciales de la Organización Mundial de la Salud (<https://www.who.int/publications/i/item/WHO-MHP-HPS-EML-2021.02>). Sin embargo, presenta importantes limitaciones que condicionan su administración, incluyendo la estrecha ventana terapéutica previamente mencionada y que no puede administrarse en situaciones en las que pueda haber un alto riesgo hemorrágico. Además, hay pacientes en los que no se consigue una recanalización arterial pese al tratamiento t-PA, especialmente si el trombo es de predominio plaquetario (Peña-Martínez et al., 2019). Las contraindicaciones más relevantes son las que pueden aumentar el riesgo de sangrado intracraneal o sistémico, por ejemplo, el diagnóstico previo de hemorragia intracraneal, la presencia de coagulopatía (por enfermedades sistémicas o por uso de fármacos anticoagulantes), hipertensión arterial no controlada, tener antecedente de sangrado digestivo o urinario en las semanas previas, así como haber sido sometido a una cirugía reciente (Demaerschalk et al., 2016).

Tenecteplasa (TNK)

La tenecteplasa (TNK) es un fármaco fibrinolítico derivado del t-PA que tiene una mayor especificidad sobre la fibrina, mayor resistencia a inhibidores y una semivida más larga, lo que permite su administración en un único bolo (Logallo et al., 2015). Es el fármaco fibrinolítico de elección en pacientes con infarto de miocardio en los que no existe disponibilidad de realizar un cateterismo coronario, por asociarse a un riesgo de

hemorragia sistémica inferior que la alteplasa (Van de Werf, 1999; Neumann et al., 2019).

En estudios realizados en pacientes con ictus isquémico, se ha observado una mayor tasa de recanalización arterial con tenecteplasa que con alteplasa (Coutts et al., 2018). Además, su facilidad de administración puede disminuir el tiempo puerta-aguja y facilitar el traslado intra e interhospitalario en pacientes candidatos a trombectomía mecánica (Warach et al., 2022). Este aspecto puede ser de especial relevancia en situaciones en las que se encuentren saturados los sistemas sanitarios, como sucedió con el inicio de la pandemia por SARS-CoV-2 (Ostos et al., 2023).

En los últimos años se han publicado varios ensayos clínicos comparando la eficacia de la tenecteplasa, entre los que destacan los estudios EXTEND-IA TNK, AcT y TASTE-A, con resultados positivos en pacientes con ictus isquémico de menos de 4,5 horas de duración (Campbell et al., 2018; Bivard et al., 2022; Menon et al., 2022), por lo que actualmente la *European Stroke Organisation* (ESO) recomienda su uso en pacientes en los que está indicado un tratamiento combinado con trombectomía mecánica y la considera una alternativa segura a la alteplasa en el resto de pacientes (Alamowitch et al., 2023). Se han valorado varias dosis, principalmente entre 0,1mg/kg y 0,4mg/kg, siendo la dosis recomendada actualmente 0,25mg/kg (Campbell et al., 2020; Kvistad et al., 2022). Sus contraindicaciones son iguales a las mencionadas con la alteplasa.

1.1.6.4. Trombectomía mecánica

En 2015 se publicaron 5 ensayos clínicos que demostraron el beneficio de la trombectomía mecánica en pacientes con ictus isquémico con oclusión de gran vaso (MR-CLEAN, ESCAPE, REVASCAT, SWIFT PRIME y EXTEND-IA; resultados recogidos en el metaanálisis publicado por Goyal y colaboradores), lo que ha supuesto un cambio en el

manejo y pronóstico de estos pacientes, que representan el grupo con mayor morbimortalidad (Goyal et al., 2016). Este tratamiento se basa en la extracción del trombo por vía intraarterial, utilizando dispositivos *stent retriever*, dispositivos de aspiración o una combinación de ambos (Figura 6). A diferencia del infarto de miocardio, es menos frecuente la colocación de un *stent* en las arterias intracraneales para conseguir una apertura arterial, si bien está aumentando su uso en pacientes en los que no se consigue una recanalización efectiva o si se evidencia una reoclusión inmediata por patología arterial local (Chang et al., 2018).

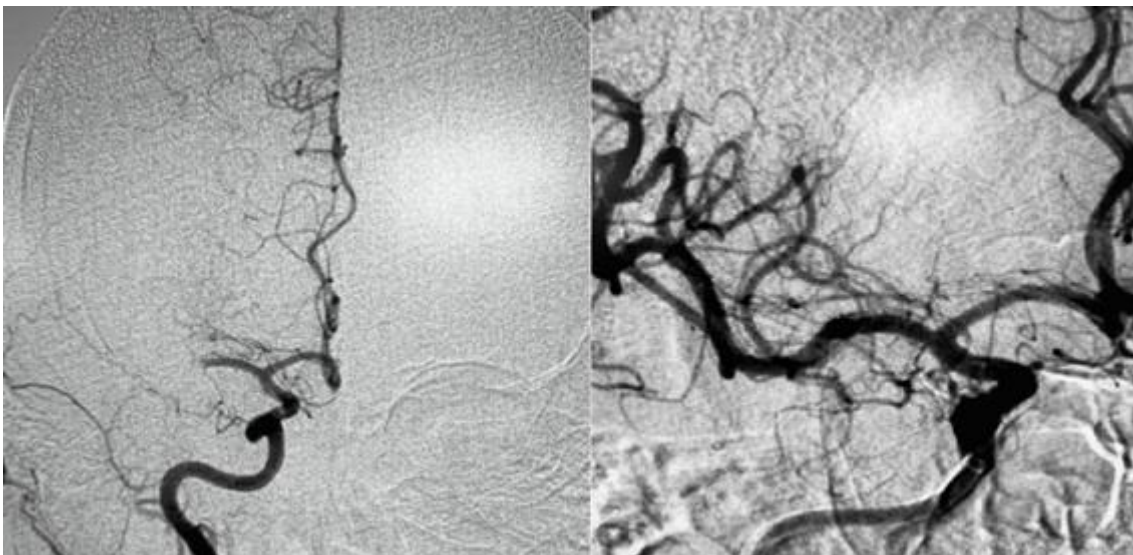


Figura 6: Trombectomía mecánica. Se muestra a la izquierda una arteriografía cerebral en la que se visualiza una oclusión de la arteria cerebral media derecha; a la izquierda se observa una circulación cerebral normal tras conseguir una recanalización arterial.

Con este procedimiento se consigue una recanalización arterial mayor del 50% del área afectada en más del 70% de los casos (Goyal et al., 2016), aunque este porcentaje se ha incrementado en estudios y series más recientes. El grado de recanalización arterial se relaciona con el pronóstico funcional, siendo más favorable en aquellos pacientes en los que se consigue una mejor recanalización arterial (Ghozy et al., 2022).

Basándose en la información de los ensayos clínicos recogidos, la trombectomía mecánica es el tratamiento de elección para pacientes con ictus isquémico de menos de 6 horas de evolución desde el inicio de los síntomas en ictus con oclusión de gran vaso de circulación anterior (Turc et al., 2019). Ensayos más recientes (DAWN, DEFUSE-3) probaron un beneficio de la trombectomía mecánica con pacientes tratados en ventana temporal extendida (hasta 24 horas después del inicio de los síntomas) si presentaban un estudio de neuroimagen que confirmase la existencia de tejido en penumbra (Figura 7) (Albers et al., 2018; Nogueira et al., 2018). Igualmente, se están ampliando las indicaciones de tratamiento tras los resultados de ensayos clínicos posteriores, que han mostrado el beneficio de este tratamiento en pacientes con ictus con una lesión isquémica de gran tamaño (ASPECTS 3-5) (Yoshimura et al., 2022; Sarraj et al., 2023), y también en pacientes con oclusión de la arteria basilar (Tao et al., 2022).

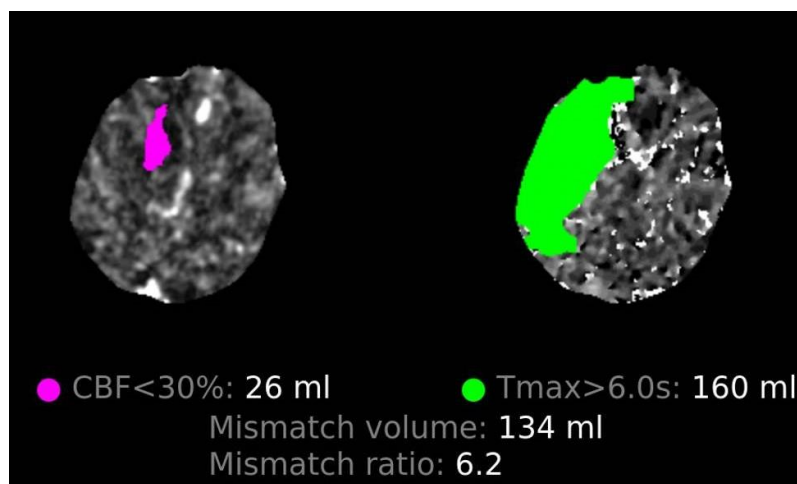


Figura 7: Imagen que representa el área de *core* isquémico y de penumbra isquémica obtenida con el software RAPID. En la imagen se observa un área de penumbra extensa (160 ml) comparada con el volumen de *core* isquémico (26 ml), que permitiría tratar al paciente en ventana temporal extendida.

En general, la trombectomía mecánica presenta escasas contraindicaciones, entre las que destacan padecer una plaquetopenia grave (<40000) o una coagulopatía grave, y en el caso de que el paciente tenga alergia a contrastes yodados puede utilizarse contraste con gadolinio. Una de sus principales ventajas es que puede emplearse en pacientes con riesgo hemorrágico elevado, como en pacientes con anticoagulación activa o con riesgo de sangrado sistémico (hemorragia digestiva, urinaria, cirugía reciente...). En el caso de que un paciente sea candidato a tratamiento fibrinolítico intravenoso y trombectomía mecánica, se recomienda el tratamiento combinado, preferiblemente con tenecteplasa, en lugar de la trombectomía mecánica de forma aislada (Alamowitch et al., 2023). Incluso se ha valorado la posibilidad de administrar alteplasa por vía intraarterial tras conseguir una recanalización adecuada, con resultados favorables de eficacia y seguridad en un estudio preliminar (Renú et al., 2022).

1.1.6.5. Cerebroprotección

Como se ha reflejado previamente, los tratamientos orientados a conseguir una recanalización arterial suponen la principal terapia en fase aguda para mejorar el pronóstico funcional. Sin embargo, muchos de los pacientes no pueden recibirlos por presentar alguna contraindicación: en el caso de la fibrinólisis IV destaca la estrecha ventana temporal y en la trombectomía mecánica que está restringida a pacientes con oclusión de gran o mediano vaso y que tiene importantes limitaciones técnicas. Además, hay pacientes que no experimentan ninguna mejoría pese a administrarse los tratamientos mencionados.

En este sentido, no es de extrañar que desde hace décadas se investiguen fármacos o intervenciones que puedan disminuir los efectos nocivos de la cascada isquémica o de la respuesta inmune, que en su conjunto se denominan cerebroprotectores (Chamorro

et al., 2021). Se ha propuesto también el término citoprotectores, ya que pueden ir dirigidos a cualquier célula de la unidad neurovascular (neuronas, astrocitos, microglía, pericitos y células endoteliales), si bien las neuronas son el tipo celular más vulnerable a la isquemia (Fisher and Savitz, 2022).

Durante años se han desarrollado numerosos estudios de investigación preclínicos que han determinado la eficacia de distintos agentes cerebroprotectores en modelos animales, pero hasta el momento la inmensa mayoría han presentado resultados negativos en humanos y ninguno forma parte de la práctica clínica habitual (Haupt et al., 2023). Se han planteado distintas hipótesis que hayan podido contribuir a este fallo sistemático, que se resumen en la Tabla 2.

Modelos animales (preclínico)	Estudios humanos (ensayos clínicos)
Ausencia de aleatorización	Uso de fármacos en pacientes con escaso potencial de mejoría
Ausencia de ciego	Estudios realizados en un número escaso de pacientes (baja potencia)
No monitorizar variables fisiológicas	Efectos secundarios inducidos por los fármacos
Estimación incorrecta del volumen muestral	Inclusión de pacientes con infartos lacunares en fármacos sin efecto en esta etiología
Estudios en animales jóvenes sin comorbilidad	Administración tardía del fármaco
Ausencia de estudios de dosis-respuesta y falta de reproducibilidad entre laboratorios	No realizar estudios de neuroimagen avanzada
Conocimiento incompleto de la vía	Excesiva heterogeneidad de los pacientes
Sesgo de publicación	

Tabla 2: Motivos que pueden asociarse a un fallo en la traslación de fármacos cerebroprotectores del modelo animal al humano. Modificado de (Fisher and Savitz, 2022) y (Chamorro et al., 2021).

Con el fin de mejorar los estudios traslacionales de los agentes cerebroprotectores se establecieron las recomendaciones STAIR (del inglés “*Stroke Therapy Academic Industry Roundtable*”) de cara a optimar la metodología (Albers et al., 2011). Entre los tratamientos cerebroprotectores con mayor relevancia en los últimos años cabe destacar la nerinetida y el ácido úrico, que no demostraron eficacia en el objetivo primario pero se observó un efecto favorable en algunos subgrupos: en pacientes sin tratamiento con t-PA en el caso de la nerinetida (Hill et al., 2020) y en mujeres, pacientes con hiperglucemia o en aquellos tratados con trombectomía mecánica en el ensayo URICO-ICTUS (Chamorro et al., 2014, 2021). Por ello, se están realizando nuevos ensayos clínicos para valorar la eficacia estas circunstancias.

En relación con los fármacos asociados a la modulación de la respuesta del sistema inmune en el ictus isquémico hay que destacar el ApTOLL, un aptámero que actúa como antagonista del receptor TLR4. En estudios preclínicos, los ratones que no expresan TLR4 presentan una menor volumen de isquemia tras un ictus (Caso et al., 2007), y el bloqueo de TLR4 tras la infusión de ApTOLL ha mostrado igualmente disminuir el volumen de infarto y mejorar la evolución neurológica (Fernández et al., 2018). La administración de este aptámero en humanos es segura (Hernández-Jiménez et al., 2022), y un primer ensayo clínico fase Ib/IIa en pacientes con ictus de <6h de evolución y tratados con trombectomía mecánica sugiere que puede disminuir la mortalidad (Hernández-Jiménez et al., 2023). Se están desarrollando nuevos ensayos (fase IIb/III) para confirmar estos hallazgos.

En este sentido, y tras años de pesimismo por los repetidos ensayos clínicos negativos, actualmente la cerebroprotección es un tema en auge. Además, el avance en el tratamiento del ictus isquémico ofrece nuevas oportunidades, ya que en algunos casos

estos fármacos pueden ser útiles tras conseguir una adecuada reperusión arterial tras una trombectomía mecánica. También se está explorando su aplicación en el entorno prehospitalario (ambulancias o en unidades de ictus móviles) para disminuir el tiempo hasta su administración. Por ello, es de especial importancia encontrar nuevas dianas terapéuticas encaminadas a mejorar el tratamiento de los pacientes con ictus isquémico.

1.1.6.6. Tratamientos de prevención secundaria

Tras completar el estudio etiológico dirigido, se debe recomendar un tratamiento para prevenir nuevos eventos isquémicos. Es preciso hacer cambios en el estilo de vida como cesar el consumo de tabaco, realizar una actividad aeróbica habitual, adoptar la dieta mediterránea y evitar el consumo excesivo de sal, que son estrategias comunes para prevenir enfermedades vasculares. Es recomendable disminuir la tensión arterial, siendo una presión inferior a 130/80mmHg el objetivo recomendado en las guías europeas aunque este valor debe individualizarse en función de las características y comorbilidad de los pacientes (Dawson et al., 2022). Por norma general debe hacerse un control lipídico estricto, siendo los fármacos de primera línea los inhibidores de la HMGCoA reductasa (estatinas) (Amarencu et al., 2006) con objetivo de LDL <70mg/dl aunque puede ser más estricto en pacientes con ateromatosis (<55mg/dl). En caso de que no se alcance este objetivo o si existe intolerancia, se puede administrar ezetimiba o inhibidores de PCSK9 (*proprotein convertase subtilisin-kexin type 9*) (Sabatine et al., 2017). Asimismo, se recomienda un control glucémico en pacientes diabéticos, con un objetivo de hemoglobina glucosilada (HbA1c) < 7% (Dawson et al., 2022)

El fármaco de prevención secundaria con un uso más extendido por su escaso coste y su fácil acceso a nivel mundial es el AAS, con una dosis entre 81 y 325mg al día a largo plazo, pero en caso de que exista alguna contraindicación puede utilizarse clopidogrel 75mg al día (CAPRIE Steering Committee, 1996). Actualmente se recomienda el uso de doble antiagregación con AAS y clopidogrel durante 21 días o AAS y ticagrelor durante 30 días en pacientes con AIT de alto riesgo o ictus isquémico “*minor*” de etiología no cardioembólica (Dawson et al., 2021). En el caso de que el ictus sea secundario a una ateromatosis intracraneal con una estenosis significativa y sintomática, se recomienda ampliar el tratamiento con doble antiagregación a 3 meses (Psychogios et al., 2022).

El uso de tratamientos anticoagulantes se reserva a pacientes seleccionados, como pueden ser aquellos con cardiopatías embolígenas (fibrilación auricular, válvula metálica, trombo ventricular...) o con trastornos de hipercoagulabilidad. En el caso de la fibrilación auricular “no valvular” (sin estenosis mitral relevante) y sin otras contraindicaciones, se recomienda el uso de anticoagulantes de acción directa frente a antagonistas de la vitamina K por presentar menor riesgo de sangrado intracraneal (Klijn et al., 2019).

El tratamiento de prevención secundaria en situaciones concretas como pueden ser la estenosis carotídea o los ictus asociados a un foramen oval permeable excede el objetivo de esta revisión.

1.2. La respuesta inmune en el ictus

La respuesta del sistema inmune puede dividirse en dos grandes bloques: el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo:

- El sistema inmune innato es el encargado de la respuesta inicial ante procesos infecciosos a través de una respuesta inflamatoria celular y humoral indiscriminada. Se desencadena por la activación de receptores con baja afinidad, como los receptores TLR (*Toll-like receptors*), ante una amplia variedad de moléculas de origen microbiano denominadas en conjunto PAMPs (del inglés "*pathogen-associated molecular patterns*") o por moléculas liberadas tras un daño tisular que son interpretadas como potencialmente dañinas (DAMPs, del inglés "*damage-associated molecular patterns*") (Chen et al., 2010). La respuesta celular depende principalmente de neutrófilos, monocitos, macrófagos y algunos tipos de linfocitos como los linfocitos NK y $T\gamma\delta$ y la humoral de proteínas circulantes como el sistema del complemento.

- El sistema inmune adaptativo, por el contrario, presenta una actividad dirigida al estímulo causante pero su respuesta necesita varios días hasta ser efectiva. Se basa en receptores de alta afinidad, como el receptor T de los linfocitos T, y en la síntesis de inmunoglobulinas específicas por parte de los linfocitos B / células plasmáticas. Además, el sistema inmune adaptativo es capaz de generar una "memoria inmunológica" para responder ante un estímulo similar de forma rápida y eficaz (Jain and Pasare, 2017). Ambos sistemas interactúan entre ellos, siendo el ejemplo más representativo la presentación de antígenos entre las células dendríticas y los linfocitos.

El sistema inmune, tanto innato como adaptativo, presenta un papel fundamental en la fisiopatología del ictus isquémico desde su fase aguda hasta la crónica (Shichita et al., 2023). Comienza rápidamente después de producirse la oclusión arterial, bien a través

de la infiltración de células del sistema inmune presentes en la sangre o por activación de células residentes en el SNC como la microglía (Planas, 2018; Iadecola et al., 2020). Asimismo, en los últimos años ha sido objeto de estudio la participación de las meninges (Brioschi et al., 2021) y de la médula ósea del cráneo como nicho hematopoyético específico en distintas patologías cerebrales (Cugurra et al., 2021). Dicha respuesta inmune puede provocar un daño adicional o, por el contrario, estar relacionada con una resolución de la inflamación y con la reparación tisular (Shichita et al., 2023). Entre los tipos celulares implicados, destacan la microglía, los monocitos, los neutrófilos y los linfocitos (Figura 8).

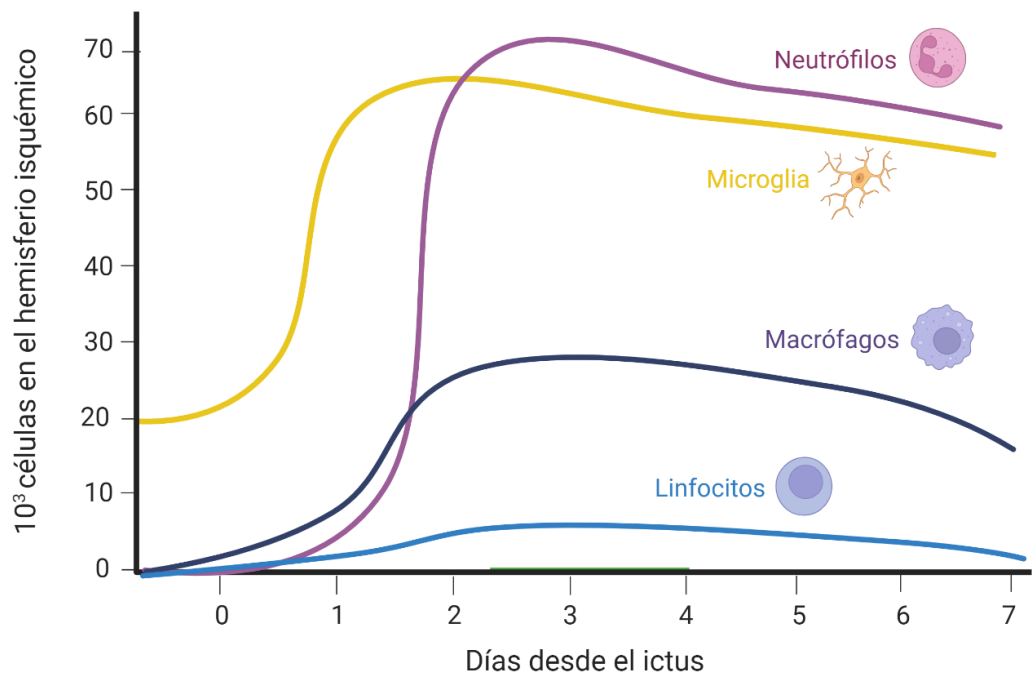


Figura 8: Dinámica de reclutamiento de células inflamatorias al cerebro de ratón tras un ictus isquémico. La gráfica muestra la infiltración de las principales células inflamatorias tras la isquemia. Modificado de (Gelderblom et al., 2009).

1.2.1. Inflamación intravascular

La respuesta inflamatoria intravascular se inicia inmediatamente después de la oclusión arterial (Iadecola and Anrather, 2011). La hipoxia resultante produce una activación del endotelio y de las plaquetas, que aumentan la expresión de moléculas de adhesión como la P-selectina. Esto favorece la interacción entre los leucocitos y el endotelio, promoviendo a su vez una respuesta inflamatoria intravascular. Los fenómenos inflamatorios locales, así como la producción de proteasas por los leucocitos y las células endoteliales, provocan un daño de la barrera hemato-encefálica y un aumento de la permeabilidad vascular, que a su vez se relaciona con un aumento del edema cerebral y de la infiltración de leucocitos al parénquima cerebral (Konsman et al., 2007; Shichita et al., 2023)

1.2.2. Activación de la microglía

Tras el inicio de la isquemia y la inflamación intravascular, en el área circundante las células del sistema inmune residentes en el SNC, es decir, la microglía, se activan incluso antes de producirse un daño neuronal (Rupalla et al., 1998).

La microglía activada modifica su morfología (Morrison and Filosa, 2013) e inicialmente favorece la amplificación de la respuesta inflamatoria a través de la secreción de ATP y UTP, que moviliza la microglía de regiones próximas (Verma et al., 2017). Está implicada en los procesos de fagocitosis en los primeros días tras el ictus isquémico, antes de la infiltración de monocitos y macrófagos procedentes de la circulación sanguínea (Schilling et al., 2003). Fagocitan las neuronas que se han visto lesionadas, e incluso neuronas todavía viables, en un proceso denominado fagoptosis, que aumenta la inflamación estéril y produce daño neuronal adicional (Brown and Neher, 2014).

Pese a que la microglía se asocia a una actividad proinflamatoria inicial, se considera que es el primer tipo celular que promueve la reparación tisular. Algunos de los mecanismos propuestos son la liberación del factor neurotrófico IGF-1 (del inglés *insulin-like growth factor 1*), la fagocitosis de células muertas y neutrófilos y la supresión de la actividad inflamatoria de los astrocitos (Ballesteros et al., 2014; Iadecola et al., 2020). De hecho, y a diferencia de otros tipos celulares, la depleción de la microglía en modelos animales antes de generar la lesión isquémica empeora el pronóstico neurológico (Lalancette-Hébert et al., 2007; Jin et al., 2017).

1.2.3. Infiltración de monocitos

Como se ha indicado previamente, tras el inicio de la cascada isquémica la microglía cambia su morfología, lo que dificulta diferenciarla de los monocitos/macrófagos que provienen de la circulación sanguínea mediante métodos de estudio inmunohistoquímicos clásicos (Planas, 2018). Sin embargo, el desarrollo de mejores técnicas y el reconocimiento de marcadores de membrana específicos de cada tipo celular han mejorado la identificación de los macrófagos derivados de los monocitos circulantes.

Los monocitos son, junto a los neutrófilos, las primeras células en infiltrar el parénquima cerebral en las enfermedades cerebrovasculares. Este proceso está estrechamente vinculado al receptor CCR2 (Gliem et al., 2012), que es un receptor presente en aproximadamente el 10% de los monocitos circulantes. El papel de monocitos y su posterior diferenciación a macrófagos en el pronóstico neurológico tras un ictus isquémico presenta resultados contrapuestos en los estudios realizados, lo cual puede explicarse por la heterogeneidad de fenotipos de esta población celular. Por una parte, ratones sin expresión de CCR2 o en los que se inhibe su actividad presentan un menor

volumen de lesión isquémica (Dimitrijevic et al., 2007) y, en humanos, se ha observado que un mayor número de monocitos circulantes clásicos CD14^{hi}CD16⁻ se relaciona con un peor pronóstico a los tres meses (Urra et al., 2009). Por el contrario, otros estudios muestran que el bloqueo del receptor CCR2 con anticuerpos específicos se relaciona con un peor pronóstico neurológico (Wattananit et al., 2016) y puede favorecer la transformación hemorrágica (Gliem et al., 2012).

Para poder explicar esta distinta función de los macrófagos se ha propuesto su división en dos fenotipos principales de microglía/macrófagos: M1 y M2. Por una parte, los macrófagos con un fenotipo clásico o M1 se considera que son beneficiosos en la respuesta inmune frente a patógenos, pero pueden aumentar el daño tisular en la isquemia cerebral. Posteriormente, los macrófagos cambiarían este fenotipo proinflamatorio M1 a un fenotipo alternativo o M2 implicado en la reparación tisular que contribuiría a la recuperación funcional (Chu et al., 2015; Wattananit et al., 2016). Sin embargo, esta visión dicotómica limitada a únicamente dos fenotipos ha sido rebatida en los últimos años, ya que en análisis con transcriptómica de *single-cell* se ha descrito un número mayor de subpoblaciones de microglía/macrófagos, siendo preciso realizar estudios adicionales para poder determinar su función proinflamatoria o de cerebroprotección (Li et al., 2022).

1.2.4. Infiltración de neutrófilos

Los neutrófilos son las primeras células del sistema inmune que infiltran el SNC tras un ictus isquémico y son uno de los principales responsables de la respuesta inflamatoria asociada a la isquemia. Los neutrófilos activados expresan moléculas de adhesión como PSGL1 (*P-selectin glycoprotein ligand-1*), ICAM-1 (*intracellular cell adhesion molecule-1*) e integrinas, que favorecen la adhesión a las células endoteliales lesionadas y su posterior

paso al tejido cerebral. Su infiltración es máxima en los tres primeros días tras el ictus (Gelderblom et al., 2009).

En general, se considera que la actividad de los neutrófilos es neurotóxica y aumenta el daño isquémico. Se realizará una revisión pormenorizada en un apartado específico (ver sección 1.3), pero este proceso puede estar mediado por la producción de ROS, la liberación de gránulos con proteínas como la elastasa, la mieloperoxidasa o la metaloproteasa 9 y por la liberación de NETs. Además, amplifican la actividad inflamatoria y el reclutamiento de leucocitos a través de la liberación de TNF α (*tumour necrosis factor- α*), interleucina 1 β (IL1 β) y la interleucina 6 (IL6) (Gelderblom et al., 2009). El papel deletéreo de los neutrófilos está apoyado por estudios experimentales en los que se objetiva una disminución del volumen de infarto tras la depleción de neutrófilos o la inhibición de su paso al parénquima cerebral (Cuartero et al., 2013; Sreeramkumar et al., 2014). Además, niveles circulantes más elevados de neutrófilos se asocian a un peor pronóstico en pacientes con un ictus isquémico tratados con trombectomía mecánica (Boisseau et al., 2019; Jickling and Dziedzic, 2019), y un mayor cociente neutrófilo-linfocito en sangre se asocia con un peor pronóstico y mayor posibilidad de presentar complicaciones infecciosas (Nam et al., 2018).

Sin embargo, estudios recientes muestran que los neutrófilos no son un tipo celular homogéneo y su actividad no es únicamente proinflamatoria, sino que pueden tener también incluso un rol protector. Estos neutrófilos con propiedades antiinflamatorias fueron descritos inicialmente en la respuesta inmune asociada a tumores y se denominaron N2 a semejanza de los macrófagos M2 (Fridlender et al., 2009), y expresan marcadores de membrana como YM1 (también denominado proteína Chil3). En estudios en modelo murino de ictus isquémico se objetiva que la polarización de los

neutrófilos hacia un fenotipo N2 puede producirse tras la administración de rosiglitazona (agonista de PPAR γ) o inhibiendo el receptor TLR4, y se relaciona con un menor volumen de infarto (Cuartero et al., 2013; García-Culebras et al., 2019). Entre los posibles mecanismos implicados, se ha demostrado que neutrófilos N2 del tejido isquémico facilitan su propia fagocitosis por los macrófagos/microglia, hecho que puede promover la resolución de la inflamación (Cuartero et al., 2013).

Esta dicotomía entre fenotipos de neutrófilos como los N1/N2 no es la única que ha sido propuesta en la literatura científica. Otro abordaje ha consistido en la diferenciación entre neutrófilos jóvenes y envejecidos (*non-aged* o *fresh* vs. *aged*), que ha sido desarrollada de forma distinta por Frenette y colaboradores (Zhang et al., 2015) y por Hidalgo y colaboradores (Adrover et al., 2019), y que se expondrá de forma detallada en el apartado 1.4.4. Pese a que estas clasificaciones difieren entre sí, los neutrófilos N2 se asemejan al fenotipo "*non-aged*" descrito por Frenette et al. (García-Culebras et al., 2019).

1.2.5. Infiltración de linfocitos

La infiltración de linfocitos es más tardía, se produce a partir del tercer día después de la lesión isquémica (Gelderblom et al., 2009). A semejanza de los otros tipos celulares, la infiltración de linfocitos se considera principalmente nociva, ya que en estudios preclínicos se ha observado que la inhibición del paso de linfocitos al tejido cerebral disminuye el volumen de infarto y mejora el pronóstico neurológico (Becker et al., 2001). El efecto nocivo inicial de los linfocitos T no parece estar relacionado por el reconocimiento de antígenos a través del receptor T (Kleinschnitz et al., 2010), y su papel patogénico se asocia a una amplificación de la respuesta del sistema inmune a través de la liberación de citocinas como el interferón γ (IFN γ) y las interleucinas 17 y 21 (IL17 e

IL21) (Shichita et al., 2009; Clarkson et al., 2014). La producción de IL17 se ha relacionado con un aumento del daño de la barrera hematoencefálica (Kebir et al., 2007) y favorece la infiltración de leucocitos; de hecho, la inhibición de esta vía en modelo animal disminuye el volumen de isquemia (Gelderblom et al., 2018). En la fase subaguda-crónica sí que se produce una respuesta inmune específica mediada por antígenos que se ha relacionado con un peor pronóstico neurológico (Mracsko et al., 2014; Jin et al., 2018)

Al igual que sucede con los neutrófilos y monocitos, también se han descrito subpoblaciones de linfocitos que pueden tener una función cerebroprotectora. Los linfocitos T reguladores (Treg) se asocian con una modulación de la actividad autoinmune, y su depleción se ha asociado en algunos estudios a un peor pronóstico (Liesz et al., 2009), pero en otros trabajos les atribuyen un efecto deletéreo al provocar una disfunción de la microcirculación cerebral (Kleinschnitz et al., 2013).

Con respecto a los linfocitos B, su papel todavía no está claramente definido. Un estudio ha relacionado la infiltración de linfocitos B con una mayor posibilidad de presentar demencia tras el ictus isquémico (Doyle et al., 2015), mientras que otra investigación asocia la presencia de linfocitos B en las áreas de infarto con un incremento de la neurogénesis y una recuperación cognitiva (Ortega et al., 2020).

1.3. El neutrófilo

1.3.1. Fisiología

Los neutrófilos o leucocitos polimorfonucleares son el tipo de leucocito más frecuente en la sangre, representando un 50-70% de los leucocitos en el humano y un 10-25% en ratón (Mestas and Hughes, 2004). Son la primera línea de defensa gracias a su gran capacidad citotóxica. Poseen una gran cantidad de gránulos citoplasmáticos que almacenan compuestos de alta toxicidad y, por ello, su ciclo de vida está estrechamente regulado ya que la activación de estas células en el lugar o el momento inadecuado puede ocasionar daño en los tejidos y en los vasos sanguíneos.

Tradicionalmente se ha considerado que es una célula que participa en la fase inicial de la respuesta inmune, únicamente con actividad proinflamatoria. Sin embargo, en los últimos años se ha profundizado en el conocimiento del papel del neutrófilo como uno de los principales partícipes de la respuesta del sistema inmune innato en enfermedades infecciosas, inflamatorias y vasculares, con funciones de modulación de la respuesta del sistema inmune e incluso estando implicados en la resolución del proceso inflamatorio. Los neutrófilos se caracterizan por tener un núcleo segmentado, con un citoplasma con gránulos y vesículas que pueden ser liberados como parte de su actividad antimicrobiana. Los gránulos pueden diferenciarse en los siguientes tipos (Kolaczkowska and Kubes, 2013):

- Gránulos azurófilos o primarios: contienen principalmente mieloperoxidasa (MPO) y elastasa, entre otras enzimas.
- Gránulos específicos o secundarios: contienen, entre otras proteínas, lactoferrina, fosfatasa alcalina, lisozima y NADPH.

- Gránulos terciarios: contienen fosfatasa y metaloproteinasa 9 (MMP9).

Los neutrófilos se producen en la médula ósea en un proceso denominado granulopoyesis, en el que estas células maduran y adquieren los gránulos precisos para su función (Borregaard, 2010). Tras su maduración, los neutrófilos pasan al torrente sanguíneo, manteniéndose un *pool* de neutrófilos listos para ser liberados ante distintos estímulos inflamatorios. Por ello, debe existir una regulación muy estrecha de este proceso, estando implicados los receptores CXCR4 (receptor de quimiocina C-X-C tipo 4) y CXCR2 (receptor de quimiocina C-X-C tipo 2) (Figura 9) (Nicolás-Ávila et al., 2017).

CXCR4 y su ligando CXCL12 tienen un papel fundamental manteniendo los neutrófilos en la médula ósea. Una delección de CXCR4 está relacionada con un mayor liberación de neutrófilos al torrente sanguíneo y, por el contrario, variantes de CXCR4 que se asocian a una hiperfunción de este receptor se relaciona con el síndrome WHIM (*warts* o verrugas, hipogammaglobulinemia, infecciones, mielocatexis) caracterizado por una deficiencia de neutrófilos circulantes y una acumulación de neutrófilos maduros en la médula ósea (Hernandez et al., 2003). La expresión de CXCL12 en médula ósea presenta una variación circadiana, mediada en parte por el sistema nervioso autónomo: las fibras del sistema nervioso simpático modulan la expresión de esta quimiocina por parte de las células estromales, inhibiendo la expresión diurna de CXCL12 mediante receptores β_3 adrenérgicos y, por el contrario, fibras colinérgicas del sistema nervioso parasimpático inhiben esta actividad adrenérgica por la noche. En conjunto, esto implica una mayor liberación de neutrófilos por el día (Aroca-Crevillén et al., 2020). Otros mecanismos implicados en la liberación circadiana de neutrófilos pueden ser las variaciones en la síntesis de corticoides o la melatonina (Ella et al., 2016).

Por el contrario, CXCR2 y sus ligandos CXCL1 y CXCL2 favorecen su liberación a la circulación sanguínea. Al contrario de lo descrito con CXCR4, las mutaciones en CXCR2 que disminuyen su actividad también pueden generar mielocatexis (hipersegmentación de los neutrófilos en la médula ósea). De momento, no se conoce si la síntesis de CXCL1 y CXCL2 presenta variaciones circadianas en médula ósea.

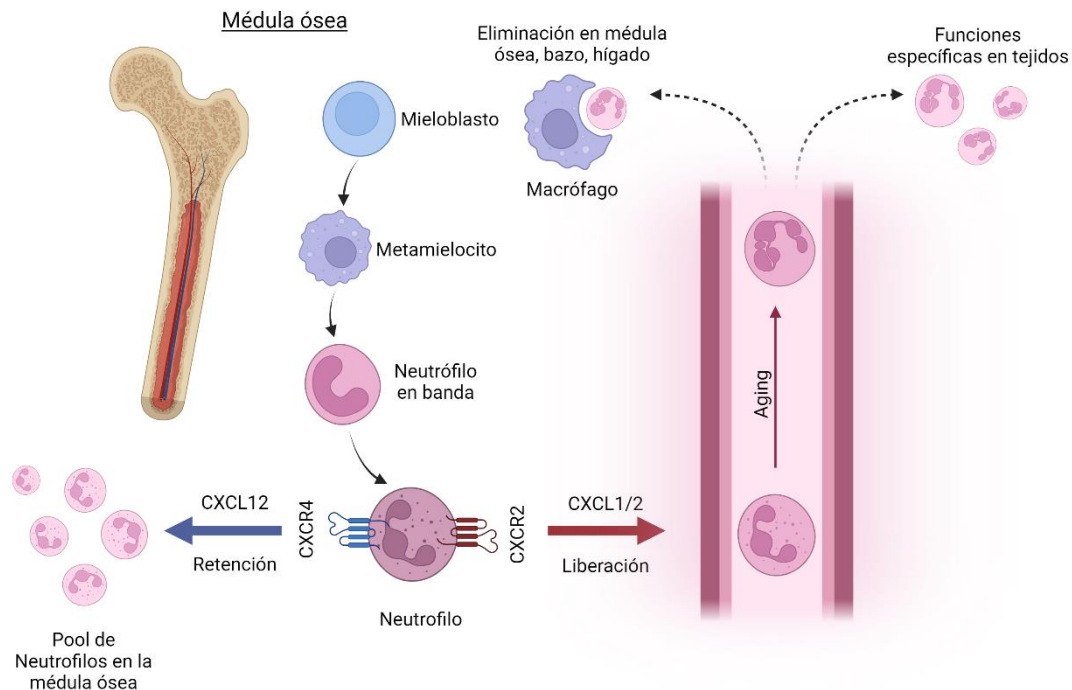


Figura 9: Esquema representativo del ciclo de vida de los neutrófilos. Los neutrófilos se producen en la médula ósea desde las células madre y progenitores de granulocitos. La liberación de los neutrófilos depende de las señales antagonistas de CXCL12/CXCR4 (retención) y CXCL1 y CXCL2/CXCR2 (liberación). Tras 8-12 horas en sangre, los neutrófilos pasan a los tejidos o son eliminados en la médula ósea, bazo o hígado. Adaptado de (Nicolás-Ávila et al., 2017).

Cada día se generan entre $1-2 \times 10^{11}$ neutrófilos, que tienen una vida media en torno a 8-12h, aunque existen reservorios de neutrófilos maduros de forma fisiológica en hígado, bazo y pulmón, en los que su vida media puede ser mayor (Wang et al., 2017; Ballesteros et al., 2020). En homeostasis, se liberan neutrófilos maduros de la médula ósea; sin embargo, durante una infección o en otras enfermedades, aumenta la granulopoyesis y

pueden liberarse formas inmaduras de los neutrófilos caracterizados por presentar núcleos no completamente lobulados o “en banda” (Burn et al., 2021).

1.3.2. Activación de los neutrófilos

Existen tres vías principales por las que los neutrófilos pueden eliminar patógenos: la fagocitosis, la degranulación y la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs, por sus siglas en inglés) (Kolaczkowska and Kubes, 2013; Burn et al., 2021).

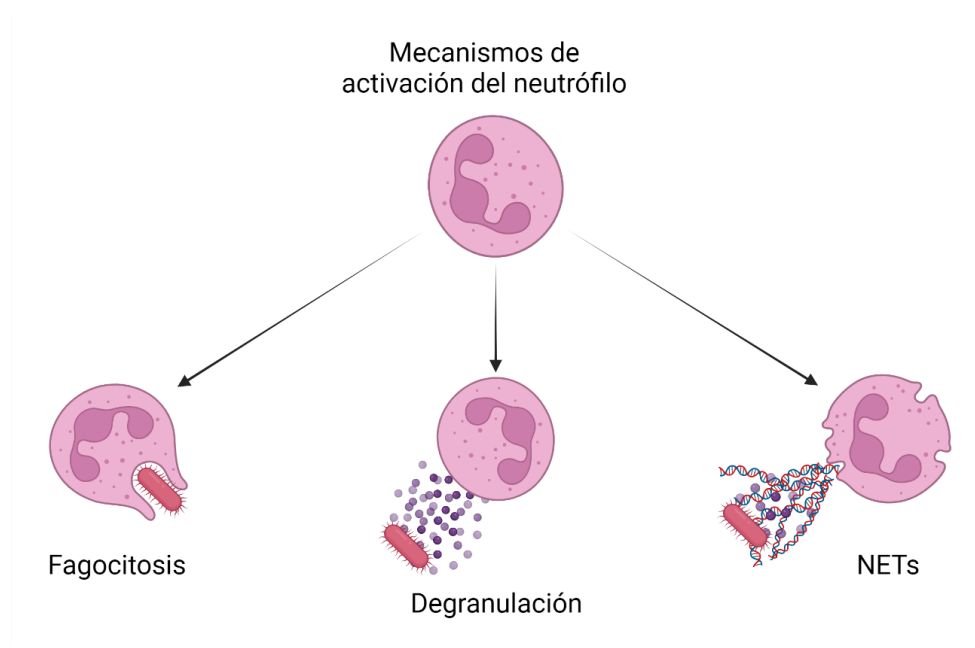


Figura 10: Vías de activación de los neutrófilos para eliminar patógenos: fagocitosis, degranulación y liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs). Adaptado de (Kolaczkowska and Kubes, 2013).

1.3.2.1 Fagocitosis

La **fagocitosis** es un proceso por el que los neutrófilos y otras células del sistema inmune rodean con su membrana una partícula (microbios, restos celulares...), formando finalmente una vacuola denominada fagosoma. Este proceso es activo, mediado por receptores de membrana, bien sea de forma directa o a través del reconocimiento de PAMPs/DAMPs o de la fracción Fc de los anticuerpos. De esta manera, el neutrófilo

puede ejercer su actividad antimicrobiana en el interior celular limitando los efectos nocivos asociados. Estos fagosomas se fusionan con los gránulos azurófilos que contienen sustancias microbicidas como la mieloperoxidasa (MPO) y la elastasa.

Además, en este proceso se producen especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) que tienen una importante labor bactericida en un proceso llamado **estallido respiratorio u oxidativo** (oxidative burst). En este proceso, el complejo de la oxidasa de NADPH transfiere una carga negativa a una molécula de oxígeno generando un anión superóxido (O_2^-), que produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante la enzima superóxido dismutasa (SOD). Tanto el O_2^- como el H_2O_2 pueden generar otros compuestos con alta capacidad tóxica como el peroxinitrito o el ácido hipocloroso (HClO) (Amulic et al., 2012).

1.3.2.2. Degranulación

Cuando el neutrófilo se encuentra en un ambiente inflamatorio, puede liberar al espacio extracelular los gránulos previamente mencionados. Este proceso tiene varias funciones (Amulic et al., 2012):

- La degranulación inicial de gránulos terciarios libera metaloproteasas al espacio extracelular, que puede favorecer el avance de los neutrófilos a través de la matriz extracelular.
- Posteriormente se produce la degranulación de los gránulos primarios y secundarios que contienen proteínas bactericidas (lactoferrina, catepsinas, lisozimas, etc.) y también tienen la capacidad de generar ROS por procesos similares a los descritos en el apartado anterior (Burn et al., 2021). Además, puede favorecer el reclutamiento de otras células del sistema inmune como los monocitos. Este proceso es muy útil para combatir

infecciones de la mayoría de microorganismos, pero también puede producir un daño tisular del propio individuo.

1.3.2.3. *Neutrophil Extracellular Traps (NETs)*

Una tercera forma de actuación antimicrobiana que tienen los neutrófilos es la liberación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) al espacio extracelular. Los NETs son estructuras en forma de red que están formadas por cromatina descondensada (es decir, por ADN) y por proteínas granulares de los neutrófilos con propiedades antimicrobianas como la elastasa y la mieloperoxidasa (Papayannopoulos, 2018). Los NETs se describieron por primera vez como una barrera para contener la diseminación de patógenos, especialmente bacterias (Brinkmann et al., 2004), pero cada vez se conoce más su implicación en otros procesos como la inflamación y en la inmunotrombosis.

Formación de NETs

El proceso por el que se produce la formación de NETs todavía no se conoce en detalle, aunque se han descrito varias vías implicadas. Se inicia como respuesta ante un estímulo inicial por microorganismos, plaquetas activadas y DAMPs a través de la activación de receptores específicos de la membrana del neutrófilo recogidos en la Figura 11. También es importante la interacción neutrófilo-plaqueta, ya que las plaquetas activadas mediante el receptor TLR4 son una parte fundamental en este proceso, bien sea a través de una activación directa o por la liberación de la proteína HMBG1 (del inglés, *high-mobility box group 1*) (Clark et al., 2007; Denorme et al., 2022; Peña-Martínez et al., 2022) que puede inducir la liberación de NETs vía CXCR4 y TLR4 (Kim et al., 2019).

Estos estímulos provocan la generación de ROS por la NADPH oxidasa a través de la vía Raf-MEK-ERK. Las ROS estimulan la traslocación de MPO y elastasa al citoplasma y posteriormente al núcleo celular, donde favorecen la descondensación del ADN (Papayannopoulos et al., 2010). Este proceso también activa la enzima peptidilarginina deaminasa 4 (PAD4), que está implicada en la citrulinación de las histonas H3 y H4 (Martinod et al., 2013); PAD4 tiene un papel fundamental en la producción de NETs, ya que su inhibición tras la administración de Cl-amidina se relaciona con una disminución de su síntesis (Knight et al., 2014).

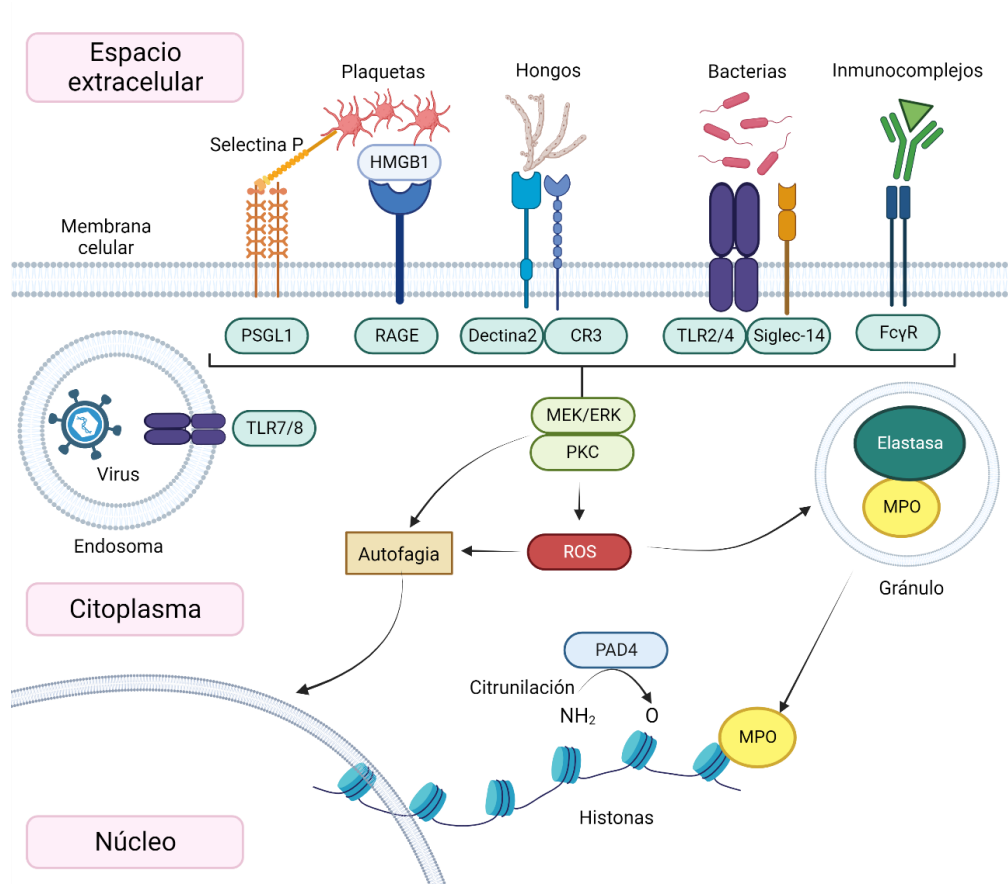


Figura 11: Mecanismos moleculares que regulan la NETosis. La formación de NETs puede desencadenarse por microorganismos y estímulos endógenos como los inmunocomplejos. Las plaquetas también pueden inducir la NETosis a través de la unión de HMGB1 (del inglés *high mobility group B1*) y el receptor RAGE (del inglés *receptor for advanced glycation end products*) y por la interacción P-selectina – PSGL1. Estas señales convergen en la vía MEK/ERK, que induce la formación de especies reactivas de oxígeno, fenómenos de autofagia y la liberación de elastasa y MPO. Por último, la enzima PAD4 está implicada en la citrulinación de las histonas. Adaptado de (Papayannopoulos, 2018).

La cromatina descondensada se une a distintos gránulos del neutrófilo y finalmente se libera al espacio extracelular. La principal vía por la que se produce este proceso se denomina NETosis, que se debe a una ruptura de la membrana celular que conlleva la muerte celular del neutrófilo, con la consecuente expulsión de los NETs y del contenido citoplasmático. Otra vía es la liberación de NETs mediante degranulación y expulsión de la cromatina nuclear sin provocar una lisis del neutrófilo, lo que favorece en infecciones bacterianas la fagocitosis de microorganismos atrapados (Papayannopoulos, 2018).

NETs y trombosis

Como se ha reflejado previamente, los NETs se describieron inicialmente en infecciones bacterianas y en sepsis, pero también están presentes en concentraciones bajas en individuos sanos (Jiménez-Alcázar et al., 2017). En los últimos años se ha descrito su implicación en enfermedades inflamatorias crónicas como el lupus eritematoso sistémico o en cáncer (Nicolás-Ávila et al., 2017), y actualmente se conoce que los NETs también están relacionados con un proceso denominado inmunotrombosis, que se produce por la interacción entre los factores de coagulación, las plaquetas y las células del sistema inmune innato en distintas patologías trombóticas (Martinod and Deppermann, 2021).

Ante un daño endotelial, los neutrófilos pueden activarse incluso antes que las plaquetas (Darbousset et al., 2012). La liberación de NETs asociada a este proceso genera una red que favorece la actividad de las plaquetas a través de sus receptores TLR, lo que promueve a su vez la generación y el crecimiento del trombo. Además, existe una interacción electrostática entre las plaquetas y las histonas de los NETs que favorece su depósito. Por otra parte, los NETs favorecen la activación de la vía intrínseca de la coagulación a través de la activación del factor XII de la coagulación así como el depósito

de factores procoagulantes como el fibrinógeno, el factor de von Willebrand y la fibronectina (Fuchs et al., 2010). Por último, recientemente se ha descrito la capacidad de los neutrófilos y de las NETs para ocluir vasos de pequeño tamaño en un proceso independiente de las plaquetas (Jiménez-Alcázar et al., 2017). Estos procesos se resumen en la Figura 12 (Gómez-Moreno et al., 2018).

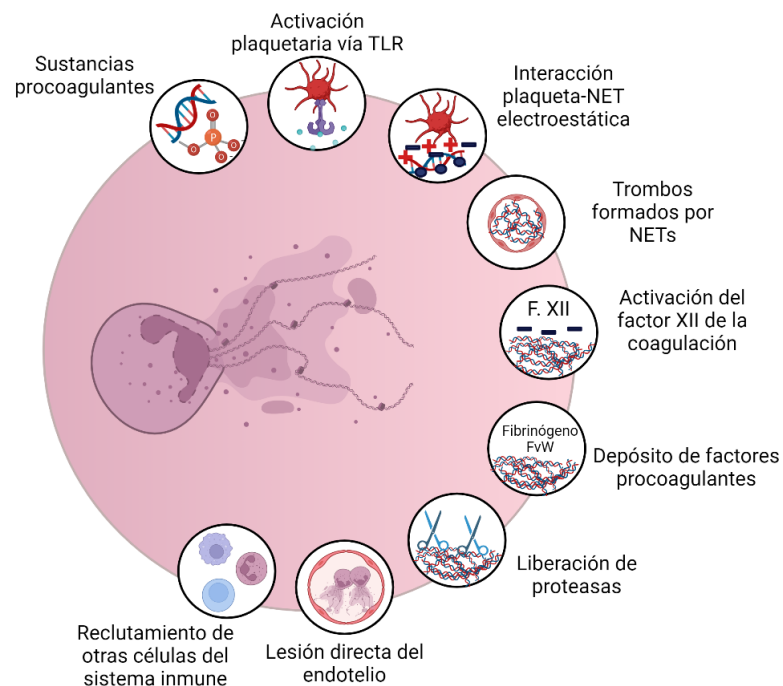


Figura 12: Mecanismos de los NETs en las enfermedades vasculares. Los NETs intravasculares presentan una variedad de acciones que median el reclutamiento de células inmunes, la adhesión y activación plaquetaria, el daño endotelial y la trombosis. Modificado de (Gómez-Moreno et al., 2018).

A su vez, los trombos también pueden favorecer la generación de NETs. Los neutrófilos pueden interactuar con plaquetas activadas, hecho que promueve la generación de NETs y a su vez favorecer los fenómenos trombóticos explicados previamente, conduciendo todo ello a un aumento del volumen del trombo (Maugeri et al., 2014; Ghasemzadeh and Hosseini, 2015).

NETs e ictus isquémico

Los niveles de NETs se encuentran elevados tras un ictus isquémico, tanto en modelos animales (Kim et al., 2019; Peña-Martínez et al., 2019) como en humanos (Vallés et al., 2017). Una mayor concentración plasmática de NETs se relaciona con un peor pronóstico al año del ictus (Vallés et al., 2017; Ducroux et al., 2018).

Los trombos en los ictus isquémicos están formados fundamentalmente por fibrina, plaquetas, eritrocitos, leucocitos y NETs, pero su composición no es homogénea (Laridan et al., 2017; Jolugbo and Ariëns, 2021). Dentro del mismo trombo, pueden distinguirse áreas con alto contenido en eritrocitos que tienen escasa fibrina, áreas con alto contenido en plaquetas y fibrina y áreas mixtas (Jolugbo and Ariëns, 2021; Pir et al., 2022).

En investigaciones recientes se ha relacionado la diferente composición del trombo con la eficacia de los tratamientos en fase aguda. Se ha observado que trombos ricos en plaquetas presentan una menor tasa de recanalización tras la administración de fibrinolisis IV tanto en infarto de miocardio (Jang et al., 1989) como en ictus isquémico (Choi et al., 2018). En estudios *ex vivo* con trombos de pacientes con ictus isquémico, se ha observado que los trombos ricos en plaquetas son eficazmente degradados tras la administración de DNAsa-1 (enzima implicada en la degradación de NETs), lo que sugiere que los NETs pueden contribuir a la resistencia a t-PA (Ducroux et al., 2018; Peña-Martínez et al., 2019). Por otra parte, los pacientes con ictus isquémico agudo tratados con trombectomía mecánica que tienen trombos con mayor proporción de NETs presentan menor tasa de recanalización arterial, procedimientos más largos y peor pronóstico (Novotny et al., 2020; Lapostolle et al., 2023). Además, pueden estar implicados en los fenómenos de *no-reflow* y en recanalizaciones fútiles (pacientes que

no presentan una mejoría neurológica pese a conseguirse una adecuada recanalización arterial).

Los NETs no sólo influyen en la generación del trombo y en la recanalización arterial, sino que están implicados en otros procesos patológicos. Se ha demostrado que la presencia de NETs en el área cerebral isquémica tiene su pico a los 2-3 días después del ictus, y el propio daño neuronal puede favorecer la polarización de neutrófilos a un fenotipo proinflamatorio que aumenta a su vez la liberación de NETs (Cai et al., 2020). Además, pueden aumentar la actividad inflamatoria en las placas ateroscleróticas (Warnatsch et al., 2015), favorecer el daño endotelial (Franck et al., 2018), aumentar el daño de la barrera hemato-encefálica e interferir en la neovascularización tras el ictus (Kang et al., 2020).

Considerando todo lo previo, los NETs suponen una diana terapéutica prometedora. En modelo animal se ha demostrado que la administración de DNAsa1 aumenta la tasa de recanalización arterial en trombos ricos en plaquetas y disminuye el volumen de infarto, (Peña-Martínez et al., 2019, 2022) y también se ha demostrado una disminución del área de isquemia tras la administración de nNIF (*neonatal NETs-inhibitory factor*) (Denorme et al., 2022). En humanos, el tratamiento con DNAsa solo está indicado para la fibrosis quística por vía inhalatoria (Suri, 2005), dos ensayos clínicos con DNAsa-I diseñados para mejorar los índices de perfusión temprana (EXTEND-IA DNase; <https://www.clinicaltrials.gov>, identificador: NCT05203224) o para disminuir la inflamación sistémica asociada al ictus (ReSCInD; <https://www.clinicaltrials.gov>, identificador: NCT05880524).

1.4. Ritmos circadianos

1.4.1. Definición

El término circadiano proviene del latín *circa diem* (alrededor de un día) y se emplea para describir oscilaciones endógenas de los organismos que tienen una duración aproximada igual al tiempo de rotación de la tierra (24 horas). Los procesos circadianos se han desarrollado como respuesta a los ciclos solares y cambios ambientales de oxigenación por los organismos fotosintéticos y se estima que el 10% del genoma está influido por variaciones circadianas (Scheiermann et al., 2013).

En los seres humanos, la luz supone el principal factor para ajustar los ritmos circadianos con los ciclos rotatorios de la tierra. La luz influye en los periodos de actividad y de reposo e, indirectamente, con la ingesta de alimentos. Teniendo en cuenta la importancia de la luz en los ritmos circadianos, se ha establecido el término alemán *zeitgeber* (dador de tiempo) y se ha definido el concepto *zeitgeber time* (ZT) como el tiempo medido en horas desde que comienza el periodo de luz (por ejemplo, ZT5 significa que han transcurrido 5 horas desde el inicio de periodo de luz). Otros reguladores de los ritmos circadianos son la alimentación, el ejercicio físico, la temperatura o incluso costumbres sociales (Neves et al., 2022).

Los ritmos circadianos difieren entre las distintas especies, lo que dificulta su estudio en modelos animales. Los humanos tienen un periodo de actividad predominantemente diurno, en contraposición con otros animales como los ratones cuya actividad es principalmente nocturna. Además, los estudios de investigación usando roedores se suelen hacer en su fase inactiva (diurna), por lo que en ocasiones los resultados obtenidos pueden no extrapolarse a los humanos (Esposito et al., 2020).

1.4.2. Fisiología

En organismos opacos como los mamíferos, los estímulos lumínicos se detectan principalmente en la retina. Esta información se transmite hasta el núcleo supraquiasmático del hipotálamo, que es el “marcapasos” central del organismo (Golombek and Rosenstein, 2010). A nivel molecular, la regulación de estos procesos depende de cambios cíclicos de la transcripción génica, siendo los genes cruciales *BMAL1* (*brain and muscle Arnt-like protein 1*) y *CLOCK* (*circadian locomotor output cycles kaput*) o *NPAS2* en función del tipo celular. Las proteínas resultantes forman un heterodímero BMAL-CLOCK/NPAS2 que controla la transcripción de genes circadianos a través de secuencias E-box. Entre los genes implicados destacan *PER* y *CRY* que regulan de forma negativa de este proceso, ya que las proteínas transcritas forman un heterodímero PER-CRY que interacciona con BMAL-CLOCK, inhibiendo su función (Scheiermann et al., 2013; Peñaloza-Martínez et al., 2022). Este proceso se resume en la Figura 13.

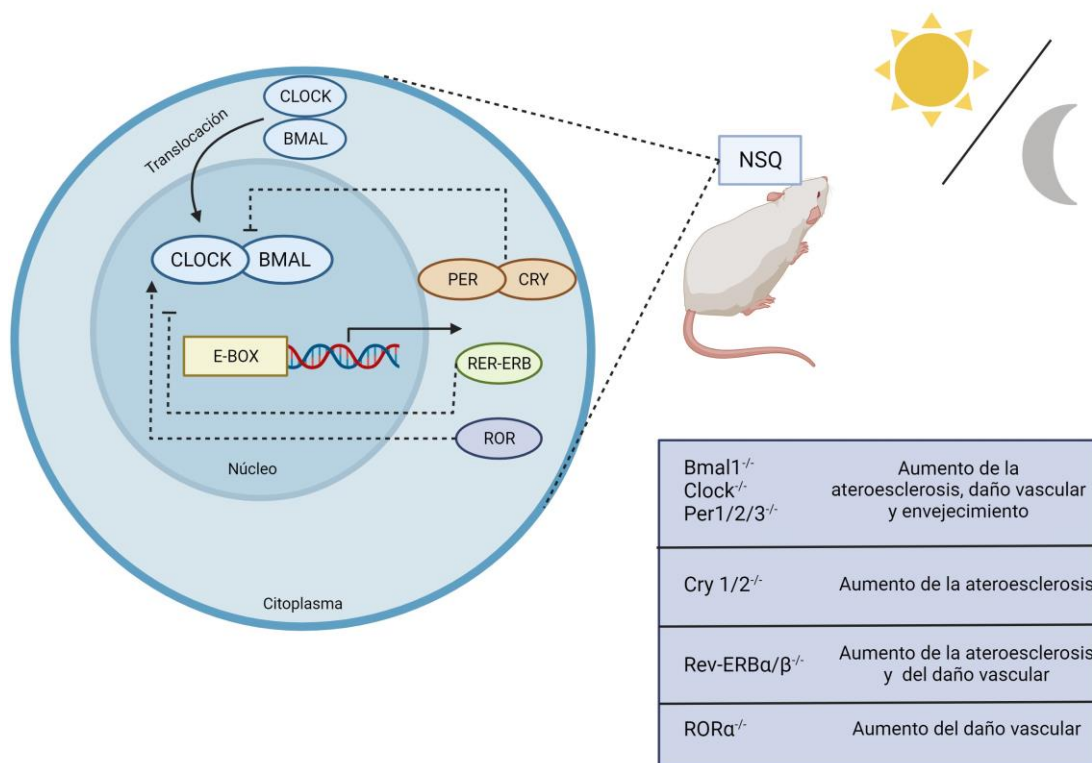


Figura 13: Resumen del ciclo circadiano en el núcleo supraquiasmático (NSQ) y su implicación en las enfermedades vasculares. El heterodímero CLOCK/BMAL1 se une a una E-Box y promueve la transcripción de varios genes: PER 1/2/3, CRY 1/2, Rev-ERBα/β y RORα, entre otros. PER y CRY forman un dímero que inhibe la transcripción mediada por CLOCK/BMAL1, al igual que Rev-ERBα/β, formando un *feedback* negativo. Por el contrario, ROR promueve la transcripción de CLOCK-BMAL1. La deficiencia de estos componentes clave del ritmo circadiano se asocia con un aumento de la aterosclerosis, aumento del daño vascular y del envejecimiento. Adaptado de (Peñaloza-Martínez et al., 2022).

La mayoría de los órganos presentan variaciones circadianas en su función, que se regulan en su mayoría por la misma vía BMAL-CLOCK. El núcleo supraquiasmático coordina el resto de ritmos circadianos “periféricos” por vía endocrina a través del eje hipotálamo-hipofisario (siendo las hormonas más destacadas los glucocorticoides y catecolaminas) (Scheiermann et al., 2013) y por el sistema nervioso autónomo. De hecho, la ablación del núcleo supraquiasmático conlleva la pérdida de sincronía de los ritmos circadianos entre los tejidos (Musiek and Holtzman, 2016).

El propio cerebro presenta ritmos circadianos, siendo el más fácilmente reconocible el ciclo de sueño-vigilia. Otros procesos con variación circadiana son el metabolismo neuronal, el mantenimiento de la barrera hematoencefálica, la homeostasis sináptica y el flujo glinfático (Musiek and Holtzman, 2016; Noya et al., 2019).

1.4.3. Influencia en procesos fisiopatológicos

La implicación de los ritmos circadianos en el desarrollo de enfermedades y la variabilidad circadiana de sus manifestaciones clínicas ha sido descrita en múltiples enfermedades (para una revisión, véase Scheiermann et al., 2013 y Neves et al., 2022). Entre otras, se ha relacionado la alteración de ritmos circadianos con un aumento de la resistencia a la insulina y de la posibilidad de presentar diabetes mellitus (Leproult and Van Cauter, 2010), con un aumento de posibilidad de presentar cáncer de mama, (Wegrzyn et al., 2017; Pham et al., 2019) o de desarrollar enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (Wu et al., 2019) o de Parkinson (Leng et al., 2020).

El sistema inmune, tanto innato como adaptativo, presenta variaciones circadianas (Scheiermann et al., 2018). Esto se evidencia en las enfermedades autoinmunes, que presentan distinta afectación en función de la hora del día, como es el caso de la artritis reumatoide (aumento de dolor y rigidez articular a primera hora de la mañana) (Cutolo, 2011) o el asma (empeoramiento de síntomas durante la noche) (Durrington et al., 2014).

En las enfermedades cardiovasculares también existen importantes diferencias circadianas en su gravedad y presentación. Además de las modificaciones fisiológicas conocidas como la variación en la temperatura corporal, de la presión arterial o de la frecuencia cardíaca, que son más altas por la mañana (Thosar et al., 2018), cada vez

cobra más interés la influencia del sistema inmune y su variabilidad circadiana en la incidencia y pronóstico de los pacientes con enfermedades vasculares (Lecour et al., 2022). Entre las distintas patologías, cabe destacar su impacto en el infarto de miocardio y en el ictus isquémico:

- Infarto de miocardio: Los infartos de miocardio y los episodios de muerte súbita son más frecuentes a primera hora de la mañana (Aziz et al., 2021). Esto puede explicarse por una combinación de factores, como pueden ser hemodinámicos (aumento de presión arterial y de frecuencia cardiaca), aumento de agregación plaquetaria y variaciones circadianas de la actividad del sistema inmune (Lecour et al., 2022).

- Ictus isquémico: Al igual que con los infartos de miocardio, el pico de incidencia de ictus isquémico se da entre las 6:00 am y las 12:00 de la mañana y la frecuencia de eventos es menor entre las 00:00h y las 6:00h de la madrugada (Elliott, 1998; Ryu et al., 2022), algo que se observa independientemente de la etiología del ictus (Chaturvedi et al., 1999; Ripamonti et al., 2017). Sin embargo, en estudios poblacionales se observa que los ictus con inicio nocturno parecen tener una mayor gravedad de los síntomas, mayor probabilidad de deterioro neurológico y peor pronóstico a los tres meses (Ryu et al., 2022). Además de las variaciones circadianas descritas en la ateromatosis y en el infarto de miocardio, que se aplican igualmente en el ictus isquémico, en modelo murino se han observado variaciones de la perfusión cerebral y el área en penumbra en función de la fase en la que se produce el infarto (activa/inactiva) (Esposito et al., 2020).

1.4.4. Cambios circadianos del fenotipo de los neutrófilos circulantes

La regulación del número y función de los neutrófilos es fundamental para mantener la homeostasis, ya que si hay un número bajo puede favorecer el desarrollo de infecciones, pero un número muy elevado puede estar implicado en un aumento del daño tisular o

vascular mediado por neutrófilos. Este equilibrio puede regularse a distintos niveles: con la regulación de la granulopoyesis, de la liberación de neutrófilos, modificando la actividad de los neutrófilos circulantes y su eliminación en los distintos tejidos (Adrover et al., 2016).

En el pasado se consideraba que el neutrófilo era una célula madura que no presentaba modificaciones una vez egresaba de la médula ósea. Sin embargo, en los últimos años se ha descrito que los neutrófilos presentan variaciones fenotípicas durante su circulación en la sangre en un proceso denominado envejecimiento o *aging*, que sigue un patrón circadiano (Casanova-Acebes et al., 2013; Zhang et al., 2015). Los neutrófilos que salen a la circulación sanguínea, que se denominan jóvenes (*fresh*), presentan marcadores en membrana que los identifican, principalmente niveles altos de CXCR2 (CXCR2^{Hl}) y CD62L (CD62L^{Hl}) y bajos de CXCR4 (CXCR4^{L0}), en contraposición con los neutrófilos envejecidos que tienen un núcleo hipersegmentado y presentan niveles altos de CXCR4 (CXCR4^{Hl}) y bajos de CD62L (CD62L^{L0}) (Adrover et al., 2016).

El envejecimiento de estos neutrófilos está mediado por estímulos externos, como puede ser la activación del receptor TLR4 por productos de la microbiota (Zhang et al., 2015), pero recientemente se ha descrito un reloj intrínseco que regula este proceso. Este reloj intrínseco del envejecimiento de los neutrófilos está mediado, entre otros, por el gen *Arntl* (que codifica la proteína Bmal1). La proteína Bmal1 aumenta la producción de CXCL2, que actúa de forma autocrina promoviendo cambios fenotípicos y transcripcionales asociados envejecimiento de los neutrófilos a través del receptor CXCR2; por el contrario, la activación de CXCR4 por su ligando CXCL12 inhibe este proceso (Adrover et al., 2019).

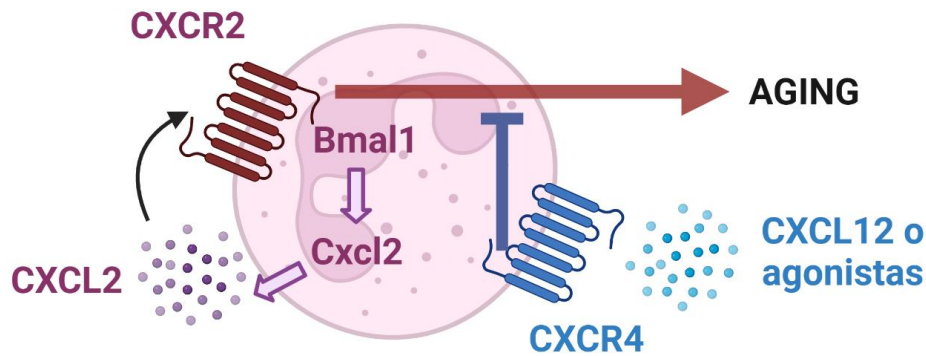


Figura 14: Modelo del envejecimiento o *aging* del neutrófilo. *Bmal1* regula la expresión de *Cxcl2*. CXCL2 actúa como agonista del receptor CXCR2 de forma autocrina promoviendo el envejecimiento. Por el contrario, CXCL12 es un agonista de CXCR4, que inhibe este proceso. Adaptado de (Adrover et al., 2019).

En ratones, los neutrófilos salen a circulación durante la noche, y a lo largo del tiempo sufren un proceso de envejecimiento que modifica sus propiedades respecto a los que se movilizan normalmente de la médula ósea. Así, los neutrófilos envejecidos predominan en circulación durante el día, especialmente en torno al mediodía, mientras que los neutrófilos “frescos” predominan durante la noche (Casanova-Acebes et al., 2013). En humanos hay resultados contrapuestos: algunos estudios muestran un predominio de neutrófilos envejecidos matutino (similar al ratón) (Adrover et al., 2020) mientras que otros autores observan que hay mayor predominio de neutrófilos hipersegmentados (fenotipo *aged*) por la tarde (Ella et al., 2016).

1.4.4.1. Diferencias fisiológicas y fisiopatológicas de los neutrófilos jóvenes y envejecidos

El papel e influencia de los neutrófilos jóvenes y envejecidos en los procesos fisiológicos y fisiopatológicos ha sido objeto de estudio en los últimos años. Mediante un modelo murino con delección del gen *Arntl* de los neutrófilos (*Arntl^{ΔN}*) se observaba una menor producción de CXCL2, y un fenotipo constitutivamente joven. Por el contrario, los

neutrófilos con delección de CXCR4 ($CXCR4^{\Delta N}$) mostraban un fenotipo envejecido (Adrover et al., 2019). Entre las diferencias propuestas entre los dos fenotipos cabe destacar (Adrover et al., 2019):

- Los neutrófilos envejecidos son los que presentan una mayor infiltración a los tejidos en ausencia de estímulos inflamatorios. Además, se eliminan preferencialmente en hígado, médula ósea y bazo en un proceso mediado por macrófagos. Por el contrario, los neutrófilos jóvenes presentan una mayor capacidad de infiltración en los tejidos cuando hay procesos inflamatorios locales. Esto puede explicarse en parte por la pérdida progresiva de microvellosidades de la membrana de los neutrófilos en el proceso de envejecimiento que implica una menor capacidad de adhesión al endotelio vascular y una disminución del "rolling", que en conjunto dificulta el paso de estos neutrófilos a los tejidos afectados.

- La presencia de neutrófilos envejecidos en los tejidos mejora la defensa contra infecciones locales, pero, en caso de sobreactivación inmune, empeoran la tormenta de citoquinas en modelos de sepsis. En modelos murinos con neutrófilos constitutivamente jóvenes ($Arnt^{\Delta N}$) se observa un menor número de neutrófilos en los tejidos y una peor respuesta inmune ante infecciones por *Candida albicans*. También se objetivan variaciones circadianas, con mejor respuesta cuando se inducía la infección fúngica durante la noche (ZT13) que durante el día (ZT5).

- Con respecto a las variaciones circadianas de la respuesta inmune de los neutrófilos, existen resultados contrapuestos. Por una parte, se ha observado una menor proporción de gránulos y una reducción de la capacidad de formar NETs en los neutrófilos envejecidos, que puede considerarse un "desarme" programado de los neutrófilos para disminuir la magnitud de la inflamación (Adrover et al., 2020). Sin embargo, otros

estudios han mostrado una mayor capacidad fagocítica y de producir ROS de los neutrófilos envejecidos (Ella et al., 2016).

- En modelo animal de infarto de miocardio, se objetiva un mayor daño miocárdico en ratones en modelos de isquemia-reperfusión neutrófilos envejecidos (ZT5, $CXCR4^{ΔN}$) (Adrover et al., 2019), mientras que en otros modelos en los que se produce una oclusión permanente (sin perfusión) se objetiva un infarto de mayor tamaño y mayor infiltración leucocitaria en infartos nocturnos (ZT13) (Schloss et al., 2016).

- Con respecto al ictus isquémico, en modelo murino no se ha observado un aumento de tamaño con neutrófilos constitutivamente envejecidos ($CXCR4^{ΔN}$) y sí con neutrófilos jóvenes ($Arntl^{ΔN}$) (Adrover et al., 2019).

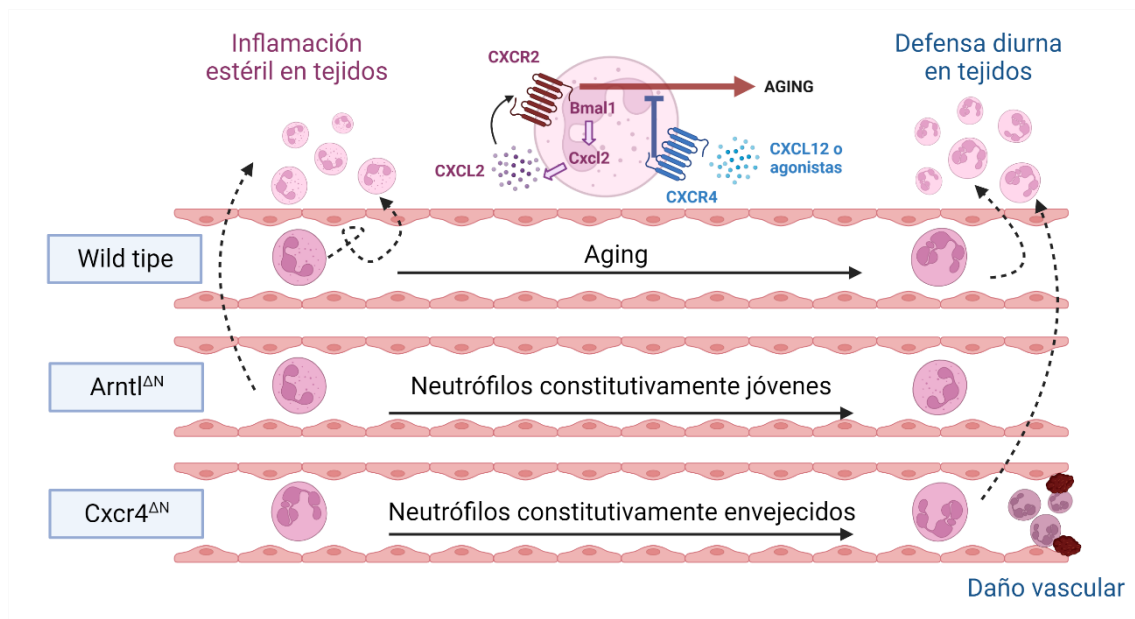


Figura 15: Modelo del envejecimiento o *aging* de los neutrófilos y sus implicaciones en la defensa del huésped y el daño vascular. Los neutrófilos jóvenes tienen una mayor capacidad de infiltración en los tejidos en los que se produce una inflamación estéril, pero una menor actividad antimicrobiana en tejidos (defensa diurna). Por el contrario, los neutrófilos envejecidos (*aged*) tienen una mayor respuesta ante infecciones, pero aumentan el daño vascular. En modelo murino, los ratones con delección de *Arntl* en neutrófilos ($Arntl^{ΔN}$) tienen un fenotipo constitutivamente joven, y por el contrario aquellos con una delección de *Cxcr4* ($Cxcr4^{ΔN}$) tienen un fenotipo constitutivamente envejecido. Adaptado de (Adrover et al., 2019).

1.5. CXCL12

1.5.1. Definición

CXCL12 (quimiocina C-X-C ligando 12) es una quimiocina que pertenece al grupo C-X-C, caracterizadas por presentar dos residuos de cisteína terminales (NH₂) separados por otro aminoácido (Zlotnik and Yoshie, 2000). En la literatura también ha sido denominada SDF-1 α (*stromal-derived factor-1 α*), si bien actualmente se recomienda el uso del término CXCL12. El gen *Cxcl12* se encuentra en el cromosoma 10, y se han identificado 6 variantes derivadas de distintas formas de *splicing* (CXCL12 α a ϕ), mientras que el ratón hay tres variantes (CXCL12 α a γ) (Zlotnik and Yoshie, 2000). A nivel cerebral, la isoforma α se produce preferencialmente a nivel neuronal y la isoforma β a nivel endotelial (Stumm et al., 2002). Las variantes de ratón y de los humanos son muy similares, por lo que se considera que los modelos murinos son apropiados para su estudio (Shirozu et al., 1995).

Esta citocina fue descrita inicialmente en células estromales de la médula ósea (Tashiro et al., 1993) ya que, como se ha reflejado en apartados previos, está implicada en la regulación de la regulación del paso de neutrófilos al torrente sanguíneo. Posteriormente se ha descrito su expresión en múltiples tejidos, estando implicada en procesos como la embriogénesis y la angiogénesis. De hecho, los ratones *knockout* para el gen *Cxcl12* presentan múltiples defectos en la hematopoyesis, la neurogénesis y el desarrollo del septo ventricular, que hace que no sean viables (Nagasawa et al., 1996; Ma et al., 1998).

CXCL12 ejerce sus funciones principalmente a través de dos receptores: CXCR4 y CXCR7 (también llamado ACKR3: *atypical chemokine receptor 3*). Además, presenta uniones electroestáticas con glucosaminoglicanos como la heparina y el heparán- sulfato, que

son necesarias para la adecuada función de CXCL12 (Rueda et al., 2012). Inicialmente se consideró que CXCL12 estaba únicamente implicada en procesos homeostáticos, pero actualmente se considera que tiene una acción dual, estando también relacionada con la regulación de procesos inflamatorios ya que es un potente quimioatrayente de linfocitos y monocitos con expresión de CXCR4 y regula el fenotipo y migración de los neutrófilos (Li and Ransohoff, 2008). Se ha descrito la influencia de CXCL12 en distintas patologías que se resumen en la Figura 16.

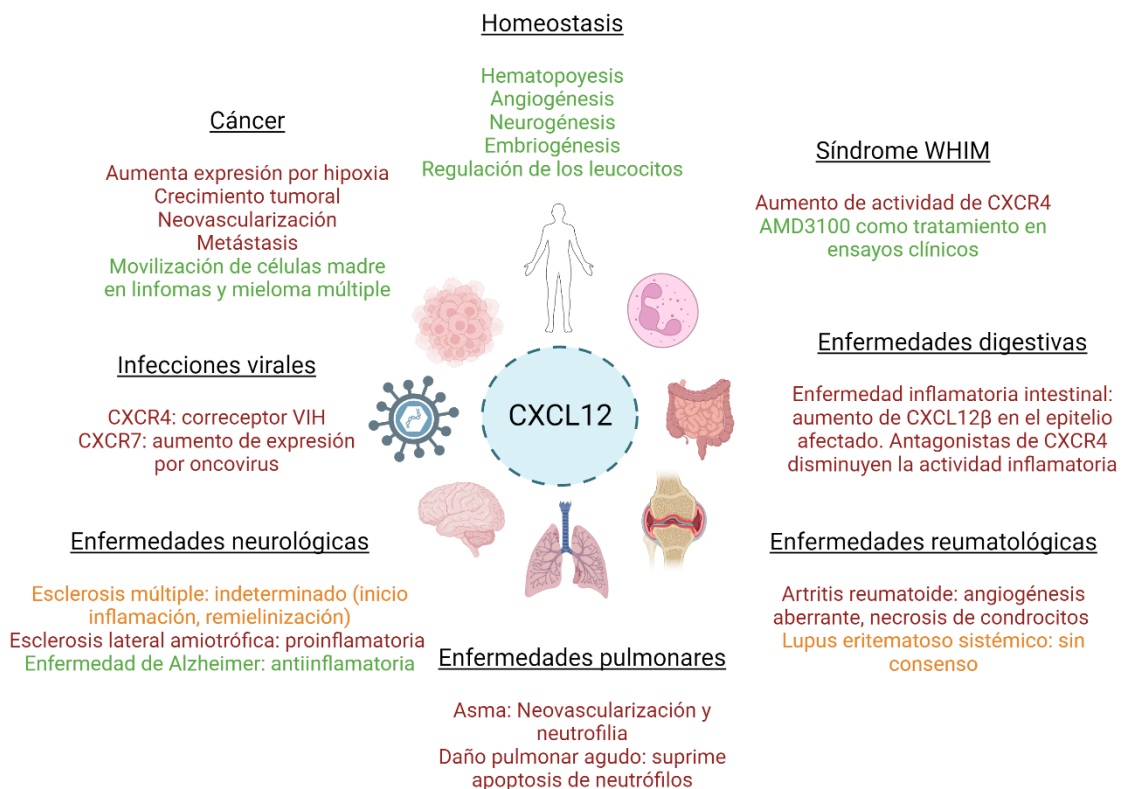


Figura 16: Resumen del papel de CXCL12 en la homeostasis y en diversas enfermedades. En rojo se indican los efectos negativos, en verde los positivos y en naranja si tiene un efecto dual o no hay consenso con respecto a su efecto. AMD3100 es un antagonista de CXCR4. Adaptado de (Janssens et al., 2018).

En humanos, la concentración de CXCL12 plasmática presenta variaciones circadianas, encontrándose más disminuida por la mañana, hecho que se ha relacionado con una

mayor liberación de neutrófilo a la circulación sanguínea y que haya una mayor proporción de neutrófilos jóvenes en la circulación por la mañana (Ella et al., 2016).

1.5.2. CXCL12 en el sistema nervioso central

CXCL12 tiene un papel importante en la neurogénesis. Está implicada en la regulación del crecimiento axonal y de las neuritas (Ma et al., 1998; Pujol et al., 2005) y en la migración de neuronas dopaminérgicas y de neuronas neuroendocrinas hipotalámicas implicadas en la secreción de gonadotropina (Guyon, 2014). Se ha descrito la presencia de receptores CXCR4 a nivel neuronal en múltiples regiones (hipocampo, cerebelo, hipotálamo, sustancia nigra, etc.), estando implicado en la modulación de la excitabilidad neuronal y de la liberación de algunos neurotransmisores (GABA, glutamato, opioide, cannabinoide) (Guyon, 2014). CXCL12 también se expresa de forma constitutiva en el endotelio cerebral, y se considera que puede estar implicada en la regulación de la migración de leucocitos del sistema inmune en situaciones fisiológicas y de estrés (Stumm et al., 2002). Aunque CXCL12 y CXCR4 se expresan en el SNC a bajas concentraciones, puede aumentar su expresión bajo determinadas circunstancias. El principal inductor a nivel sistémico es la hipoxia a través del factor de transcripción HIF-1 (del inglés, *hypoxia-inducible factor 1*), que aumenta la expresión de CXCL12 a nivel endotelial (Ceradini et al., 2004).

La implicación de CXCL12/CXCR4 es relevante en distintas enfermedades neurológicas. Se considera que tiene un papel deletéreo en la esclerosis lateral amiotrófica por un papel proinflamatorio (atracción de microglía proinflamatoria), una función beneficiosa en la enfermedad de Alzheimer (menor concentración de CXCL12 en modelos animales, promueve fagocitosis de placas beta-amiloide) y principalmente beneficiosos en esclerosis múltiple (puede estar implicada en la respuesta inmune al inicio de la

enfermedad, pero en modelo murino niveles altos de CXCL12 confieren protección y favorece la remielinización por la atracción neuronal y de precursores de oligodendrocitos) (Janssens et al., 2018). También se ha estudiado su implicación en la demencia asociada al VIH, ya que CXCR4 fue uno de los primeros correceptores identificados en la infección por VIH (Bleul et al., 1996; Oberlin et al., 1996).

1.5.3. CXCL12 e ictus isquémico

Como se ha reflejado en apartados anteriores, el sistema inmune tiene un papel muy importante en el ictus isquémico. CXCL12 no es una excepción, ya que su influencia en el paso de neutrófilos a la circulación sanguínea, la regulación del envejecimiento de los neutrófilos y su papel quimioatrayente de las células del sistema inmune puede modificar la evolución de los pacientes con un ictus isquémico. Los trabajos realizados presentan resultados contrapuestos, pudiendo tener efectos beneficiosos o perjudiciales.

1.5.3.1 Estudios preclínicos

Efectos beneficiosos:

En los primeros estudios realizados con esta citocina en modelo animal de ictus isquémico, se observó un aumento de la expresión de CXCL12 β en células endoteliales del área del área de penumbra (Stumm et al., 2002). En cultivos neuronales, la administración de CXCL12 tiene un papel neuroprotector ante la administración de neurotóxicos como el H₂O₂ (Shyu et al., 2008). En el mismo trabajo se observó que la administración de CXCL12 α en un modelo murino de ictus isquémico se reducía el daño neuronal en el área de penumbra y el volumen de infarto, presentando en conjunto una mejor evolución neurológica que el grupo control. En otro estudio en el que se inducía

la producción de CXCL12 tanto a nivel cortical como endotelial por hipoxia de repetición se observaba un menor volumen de infarto, perdiéndose el efecto protector al administrarse un antagonista del receptor CXCR4 (AMD3100) (Selvaraj et al., 2017).

Además, CXCL12 está implicado en la regulación y reclutamiento de células del sistema inmune en el área de infarto, en concreto en las que expresan CXCR4 en su superficie (Stumm et al., 2002), entre las que cabe destacar:

- Células madre / células progenitoras endoteliales: CXCR4 participa en el reclutamiento de células madre mesenquimales CD34+ en áreas de isquemia (Ceradini et al., 2004) y en la vasculogénesis mediada por células progenitoras endoteliales (Yamaguchi et al., 2003). En otro estudio en modelo murino de ictus isquémico, los ratones a los que se administraba células madre mesenquimales modificadas para que sobreexpresen CXCR4 en superficie presentaban menor volumen de infarto y una mayor angiogénesis comparado tanto con el grupo control y con otro grupo en el que se administraban células madre sin dicha modificación (Yu et al., 2012). Este aspecto cobra especial relevancia en el área de penumbra isquémica, donde hay mayor expresión de CXCR4/CXCL12, y en la que una mayor angiogénesis puede disminuir el daño tisular. Otros trabajos también relacionan CXCL12 con un incremento de la angiogénesis a través de un aumento la expresión de VEGF a nivel endotelial (Neuhaus et al., 2003) y de metaloproteasas 3 y 9 (MMP3 y MMP9) (Barkho et al., 2008).

- El paso de monocitos al área de isquemia cerebral está mediado en parte por CXCR4. En modelo animal con oclusión transitoria de la arteria cerebral media, los ratones en los que se inhibe la expresión de *Cxcr4* en monocitos presentan una menor infiltración en el parénquima afectado, presentando una peor evolución neurológica y mayor volumen de infarto (Werner et al., 2020).

- El aumento de expresión de CXCL12 endotelial está implicado en el reclutamiento de células NK de carácter protector en el área de infarto. En modelo animal con delección de CXCR4 en células NK, se inhibía su paso al tejido isquémico, condicionando un mayor déficit neurológico y un incremento en área isquémica (Wang et al., 2023).

Efectos perjudiciales:

Por el contrario, otros estudios preclínicos asocian CXCL12 con un papel deletéreo en el ictus isquémico:

- En estudios *ex vivo*, CXCL12 induce la producción de IL-6 por parte de la microglía (Lu et al., 2009). En modelo murino con oclusión transitoria de la arteria cerebral media (ACM) se observa que la administración de AMD3100 disminuye la activación de la microglía en el tejido isquémico, observándose una mejoría de la función neurológica sin modificar el volumen de infarto (Walter et al., 2015).

- Huang y colaboradores realizaron un trabajo en modelo murino con oclusión permanente de la ACM, y observaron que la administración de AMD3100 disminuía la infiltración leucocitaria, reducía la expresión de TNF- α e IL6 y disminuía el daño de la barrera hemato-encefálica (Huang et al., 2013).

- En un trabajo en modelo murino, la administración tardía de AMD3100 48 horas después de una oclusión transitoria de la ACM se relaciona con una reducción de la infiltración de células del sistema inmune (especialmente linfocitos CD3⁺ / CD4⁺) en el tejido isquémico y una mejoría de la función neurológica sin modificar el tamaño de infarto (Ruscher et al., 2013). En este estudio consideran CXCL12/CXCR4 con un papel neuroprotector en fase aguda, pero que puede perpetuar una respuesta inflamatoria tardía.

1.5.3.2 Estudios en humanos

En humanos, también existen resultados discordantes en los distintos trabajos realizados. En dos estudios realizados en población caucásica, se observa que una mayor concentración plasmática de CXCL12 se relaciona con un menor volumen de infarto, y en uno de ellos se relaciona este efecto con un aumento de células progenitoras endoteliales circulantes (Bogoslovsky et al., 2011; Sobrino et al., 2020). Por el contrario, en dos trabajos que incluían población asiática, concentraciones mayores de CXCL12 se relacionan con un mayor volumen de infarto y peor pronóstico neurológico (Duan et al., 2015; Liu et al., 2015). En otro estudio, en el análisis univariante se concluía que los niveles de CXCL12 se asocian con una peor evolución neurológica, pero en el análisis multivariante ajustado por NIHSS y volumen de infarto se muestra que niveles más elevados de CXCL12 se relacionan con una mayor probabilidad de presentar una buena evolución neurológica a largo plazo (Kim et al., 2012). También se ha descrito que los pacientes en los que aumenta la concentración de CXCL12 en los primeros días tras un ictus isquémico presentan mayor probabilidad de ser independientes. (Kim et al., 2012; Sobrino et al., 2020). Por el contrario, se han observado niveles plasmáticos de CXCL12 más elevados en pacientes con ictus isquémico que en controles (Kim et al., 2012; Duan et al., 2015), y se ha relacionado una mayor concentración de CXCL12 con una mayor probabilidad de presentar un nuevo ictus (Schutt et al., 2012; Liu et al., 2015).

De momento no se ha explorado la relación de CXCL12, los cambios fenotípicos de los neutrófilos circulantes y su asociación con la gravedad de los pacientes con ictus isquémico, lo que supondría una posible diana terapéutica en las patologías cerebrovasculares.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

Con todo lo expuesto anteriormente, se considera que la variabilidad circadiana del fenotipo de los neutrófilos puede determinar el pronóstico de los pacientes con un ictus isquémico. CXCL12 es una citocina que inhibe el proceso de envejecimiento del neutrófilo, por lo que la hipótesis principal es que su concentración plasmática puede relacionarse con diferencias en la gravedad. Asimismo, hipotetizamos que la concentración plasmática de CXCL12 puede modificar el fenotipo de los neutrófilos circulantes y su actividad.

2.2 Objetivos

Para contrastar esta hipótesis, se establecen los siguientes objetivos:

1. Determinar la existencia de variaciones en la concentración de CXCL12 en función de las principales variables demográficas y enfermedades previas.
2. Valorar la correlación entre los niveles plasmáticos de CXCL12 y el volumen de infarto cerebral, gravedad clínica del ictus y pronóstico de los pacientes a los 3 meses.
3. Analizar la variación en la concentración de CXCL12 en función del momento de inicio de los síntomas y su evolución a lo largo del tiempo, así como su asociación con otras variables analíticas.
4. Establecer la asociación entre los niveles plasmáticos de CXCL12 con el fenotipo de los neutrófilos circulantes en pacientes con ictus isquémico.
5. Explorar la relación entre los niveles plasmáticos de CXCL12 con la concentración de los marcadores de NETs en plasma en pacientes con ictus isquémico.

MATERIAL Y MÉTODOS



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Diseño y periodo de estudio.

El presente trabajo de investigación es un estudio de cohortes prospectivo realizado en un centro hospitalario terciario. El reclutamiento de pacientes comenzó en marzo de 2019 y finalizó en julio de 2022.

3.2. Selección de la población.

3.2.1. Ámbito de realización.

El reclutamiento de pacientes se ha llevado a cabo en la Unidad de Ictus del Hospital Universitario “12 de Octubre”. El procesamiento y análisis de las muestras obtenidas de los pacientes se ha realizado en el Laboratorio de Enfermedades Neurovasculares del Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (i+12) y en el grupo de Fisiopatología Neurovascular del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Los tres grupos se encuentran integrados en la Unidad de Investigación Neurovascular (UIN) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

3.2.2. Criterios de Inclusión y exclusión

3.2.2.1. *Criterios de inclusión*

- Edad igual o superior a 18 años.
- Ictus isquémico de ≤ 6 horas de evolución o ictus “del despertar”. En el caso de los ictus del despertar no deben haber transcurrido más de 6 horas a partir del punto medio del tiempo de sueño.
- Independencia funcional previa al ictus (escala modificada de Rankin ≤ 2).

- Obtención del consentimiento informado por parte del paciente o de un familiar/representante en el caso de que el paciente no pueda aportarlo por su afectación neurológica (se adjunta el documento del consentimiento informado en la sección de Anexos).

3.2.2.2. Criterios de exclusión

- Infartos lacunares por enfermedad isquémica de pequeño vaso.
- Patología infecciosa en los 15 días previos al ingreso hospitalario.
- Enfermedad sistémica grave: paciente con insuficiencia renal terminal o en tratamiento con hemodiálisis, hepatopatía grave o cirrosis hepática.
- Enfermedad inflamatoria sistémica, vasculitis del sistema nervioso central o paciente que reciba tratamiento inmunosupresor.
- Enfermedad tumoral activa o en tratamiento con quimioterapia.
- Enfermedad neurovascular secundaria a malformación arteriovenosa subyacente o de origen traumático.
- AIT sin lesión isquémica visualizable en resonancia magnética (RM) craneal.

3.2.3. Procedimiento para el reclutamiento de los pacientes

Los pacientes han sido seleccionados por un médico especialista en Neurología con experiencia en enfermedades neurovasculares para asegurar que los pacientes cumplan los criterios de inclusión y no tuvieran ningún criterio de exclusión.

Los procedimientos relacionados con este proyecto de investigación como pueden ser la exploración neurológica, la obtención de analíticas y el estudio radiológico se realizan como parte del protocolo de atención al Código Ictus, no se ha demorado la atención a los pacientes en fase aguda.

3.2.4. Tamaño de la muestra

No se ha podido calcular un tamaño muestral objetivo antes del inicio del proyecto ya que no existen datos suficientes para su estimación en los artículos publicados, por ello se trata de un estudio piloto. Se estableció que el número de pacientes debería ser mayor de 100 para intentar disminuir la variabilidad interindividual y poder plantear conclusiones preliminares. El tamaño final aumentó hasta 134 pacientes, al conseguir en los últimos meses del proyecto un mejor ritmo de reclutamiento.

3.3. Diseño experimental y recogida de datos

Las variables recogidas se describen de forma detallada en los siguientes apartados. En resumen, se ha valorado al paciente en la fase aguda, subaguda y crónica que se resume en la Figura 17:

- 1. Fase aguda (al ingreso, <6h):** Los pacientes con un ictus con inicio en las 6h previas o con un ictus del despertar son valorados en el Servicio de Urgencias, se les extrae una analítica sanguínea y se realiza un TC craneal basal. Se administra el tratamiento según lo establecido en la práctica clínica habitual.
- 2. Fase subaguda (24h):** El paciente ingresa en la Unidad de Ictus y se extrae una nueva analítica aproximadamente a las 24 horas ($\pm 12h$). Se realiza una prueba de imagen de control para valorar el volumen de infarto 24-72 horas después del inicio de la clínica.
- 3. Fase crónica (3 meses):** Por último, a los 3 meses se realiza una valoración clínica del paciente para determinar el pronóstico. Se extrae una nueva analítica en el caso de ser posible.

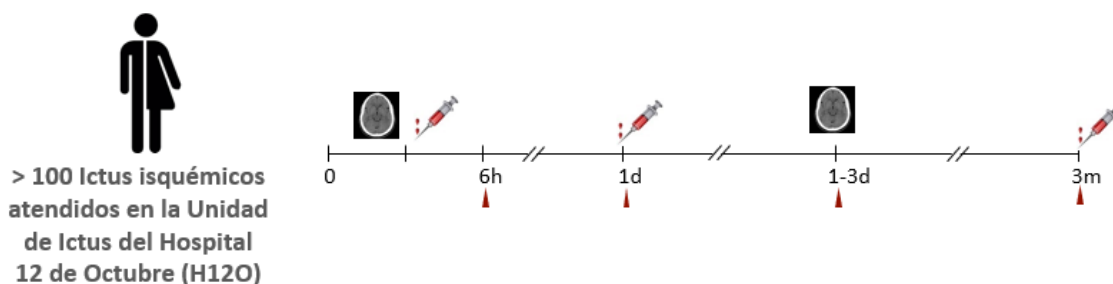


Figura 17: Esquema general del diseño experimental. Se ha reclutado una cohorte de pacientes con diagnóstico de un ictus isquémico de < de 6 horas de evolución o del despertar, de los que se realiza una valoración en fase aguda (al ingreso, < de 6 horas) clínica, radiológica y analítica, a las 24 ± 12 horas se extrae una nueva analítica y se realiza un estudio de neuroimagen de control a las 24-72 horas del ictus, y por último una valoración a los tres meses en la que se obtiene una analítica.

3.3.1. Descripción de las variables recogidas

3.3.1.1 Variables clínicas

Se han recogido la siguiente información de forma prospectiva de todos los pacientes:

- Edad y sexo.
- Factores de riesgo vascular previos al ictus: hipertensión arterial, dislipemia, diabetes mellitus, tabaquismo.
- Antecedentes médicos: ictus isquémico o hemorrágico, infarto de miocardio, fibrilación auricular, portador de válvula metálica, enfermedad arterial periférica o enfermedad renal crónica (ERC).
- Tratamiento previo: tratamiento antihipertensivo, antiagregante o anticoagulante.
- Situación funcional previa al ictus medida por la escala de Rankin modificada (ERm). Dicha escala se puntúa de 0 (independencia completa) a 6 (fallecimiento).

Se considera que el paciente tiene independencia funcional con una puntuación menor o igual de 2 puntos. Esta escala se resume en la Tabla 3.

Puntuación ERm	Grado de discapacidad
0	Asintomático.
1	Muy leve. Pueden realizar tareas y actividades habituales, sin limitaciones pese a los síntomas.
2	Leve. Incapacidad para realizar algunas actividades previas, pero pueden valerse por si mismos sin necesidad de ayuda.
3	Moderada. Requiere asistencia, pero es capaz de caminar sin ayuda
4	Moderada-grave. Dependientes para actividades básicas de la vida diaria, pero sin necesidad de supervisión continua.
5	Grave. Totalmente dependientes. Requieren asistencia continuada
6	Fallecimiento.

Tabla 3: Escala de Rankin modificada (ERm).

- Tiempos de atención al paciente: fecha y hora del inicio de los síntomas, llegada al hospital, realización del estudio de neuroimagen urgente, inicio de fibrinólisis intravenosa y de trombectomía mecánica.
- Para determinar si un paciente presenta un ictus diurno o nocturno, se ha consultado la hora de amanecer y puesta de sol de Madrid en la página web Observatorio Astronómico Nacional. La hora de amanecer en el equinoccio de otoño es a las 08:03h, por lo que se ha establecido un ictus diurno aquel que tiene como inicio entre las 08:00h y las 19:59h, y un ictus nocturno los ictus con hora de inicio entre las 20:00 y las 07:59h. En el caso de ictus con inicio

desconocido, se establece la hora de inicio según la hora de determinación de los síntomas.

- Valoración clínica al ingreso, fase aguda: constantes vitales, gravedad clínica medida con escala NIHSS (siglas en inglés de “*National Institute of Health Stroke Scale*”) (Lyden et al., 1994). La NIHSS valora la gravedad con una puntuación con un rango de de 0 a 42 puntos, siendo mayor la gravedad si la puntuación es más elevada. Se adjunta la tabla para su puntuación en la sección de anexos.
- Tratamiento administrado (antiagregación, anticoagulación, fibrinólisis intravenosa y/o trombectomía mecánica). La indicación de tratamiento en fase aguda se ha seguido según la práctica clínica habitual del centro, basada en las guías internacionales vigentes (Powers et al., 2019; Turc et al., 2019)
- Evolución clínica en fase subaguda, medida por la escala NIHSS, a las 24h (+/- 12h) del inicio del ictus y al alta.
- Situación funcional a los 3 meses medida por la ERm. Se determinará la posibilidad de independencia funcional ($ERm \leq 2$) o fallecimiento a los 3 meses ($ERm = 6$).
- Etiología del ictus según los criterios Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) (Adams et al., 1993).

3.3.1.2 Variables radiológicas

- A su llegada al Servicio de Urgencias, se ha realizado una **TC craneal** a todos los pacientes en el menor tiempo posible. Esta técnica de neuroimagen permite descartar que el paciente presente un ictus hemorrágico u otras lesiones visualizables (neoplasia, absceso...). En el caso de tratarse de un ictus isquémico que afecte al territorio de la arteria cerebral media (ACM), se ha valorado la presencia de signos precoces de

isquemia en el TC craneal mediante la **escala ASPECTS** (*Alberta Stroke Program Early CT Score*) (Barber et al., 2000).

En la escala ASPECTS se valoran 10 regiones del parénquima cerebral irrigado por la ACM, otorgando un punto a cada área, que se muestran en la Figura 18. En caso de presentar cambios isquémicos precoces se sustrae un punto por cada región afectada. Una valoración menor de 7 puntos se asocia con mayor morbimortalidad y probabilidad de que el paciente presente complicaciones como una transformación hemorrágica. Una puntuación de 0 puntos supone una afectación completa del territorio de la ACM y una puntuación de 10 significa que el TC no presenta ninguna lesión isquémica aguda visualizable mediante esta técnica.

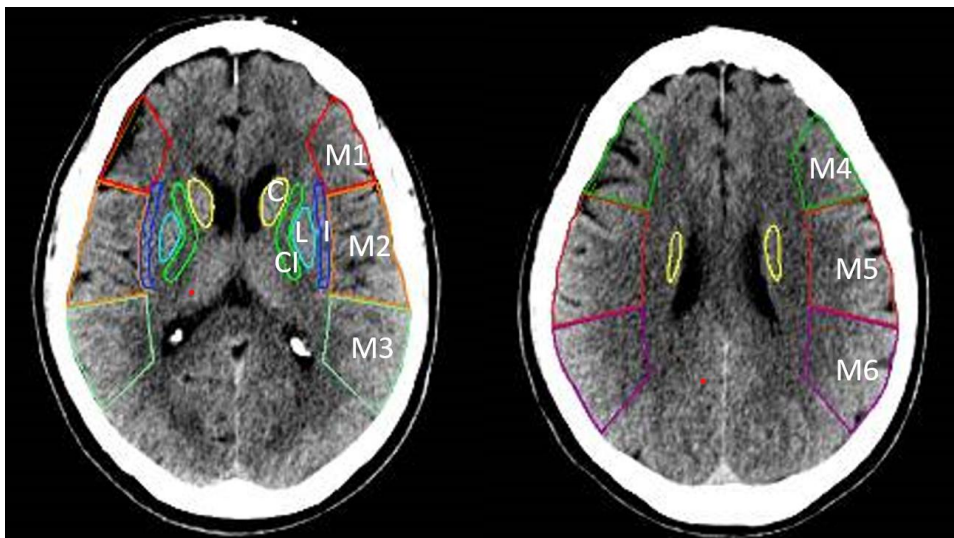


Figura 18: Esquema de las 10 áreas valoradas en la escala ASPECTS. C: caudado, CI: cápsula interna, L: lenticular, I: ínsula.

- Tras la realización del TC craneal, se completa el estudio en todos los pacientes con un **AngioTC de troncos supraaórticos**. Con esta prueba diagnóstica se valora la presencia de oclusión de gran o mediano vaso, con la siguiente clasificación:

- Ausencia de oclusión intracraneal objetivable con esta técnica
- Oclusión de la arteria carótida interna (ACI) en su segmento intracraneal o “T” carotídea.
- Oclusión del primer segmento de la ACM (M1).
- Oclusión del segundo segmento de la ACM (M2).
- Oclusión de segmentos distales de la ACM (M3 o M4)
- Oclusión de la arteria vertebral, tanto intra u extracraneal
- Oclusión de la arteria basilar
- Oclusión de la arteria cerebral posterior.
- Oclusión de otras arterias (arteria cerebral anterior, arteria cerebelosa posteroinferior, arteria cerebelosa anteroinferior, arteria cerebelosa superior...)

Además, se determina si existe una estenosis crítica o una oclusión de la arteria carótida interna extracraneal, o si presenta una oclusión simultánea de la ACI extracraneal y alguna arteria intracraneal (oclusión en tándem).

Para valorar la **circulación colateral**, se ha empleado la **escala de Tan** (Tan et al., 2009), que valora el grado de la circulación colateral en una escala de 0 a 3. Dado el número escaso de pacientes con un grado 0, se han unido en la misma categoría los pacientes con grados 0 y 1.

- Grado 0: Ausencia de circulación colateral en el territorio afectado
- Grado 1: Circulación colateral mayor al 0% y menor al 50% del territorio
- Grado 2: Circulación colateral mayor del 50% y menor del 100% del territorio
- Grado 3: Circulación colateral 100%, comparable al hemisferio contralateral.

- En los pacientes tratados con trombectomía mecánica, se ha valorado el grado de recanalización arterial con la **escala mTICI** (modified Thrombolysis in Cerebral Infarction Scale) (Higashida et al., 2003; Goyal et al., 2014), con las siguientes categorías:

- TICI 0: Obstrucción completa. Ausencia de paso de contraste.
- TICI 1: Paso filiforme de contraste sin rellenar ramas distales
- TICI 2: Existe paso de contraste que llena ramas distales del vaso tratado. A su vez se divide en
 - TICI 2A: Se reperfunden menos del 50% de las ramas distales
 - TICI 2B: Se reperfunden más del 50% de las ramas distales
 - TICI 2C: Revascularización casi completa (90-99%), salvo por émbolos distales de pequeño tamaño o enlentecimiento del flujo en 1-2 ramas distales
- TICI 3: Recanalización completa

- Se ha determinado el volumen del infarto cerebral con una prueba de neuroimagen de control (TC o RM craneal) a las 24-72 horas. Para ello se ha utilizado el visor de imágenes disponible en el Hospital U. “12 de Octubre” (VuePACS, Phillips®). El volumen se ha calculado mediante la suma del área isquémica en cada corte realizado, multiplicado por el grosor del corte (ver ejemplo en la Figura 19). En caso de que se haya empleado una RM craneal para medir el volumen de infarto, se ha utilizado la secuencia de difusión (DWI). La decisión de realizar una u otra técnica de imagen se ha establecido únicamente por criterios clínicos, en función de lo previsto en cada paciente para completar el estudio etiológico.

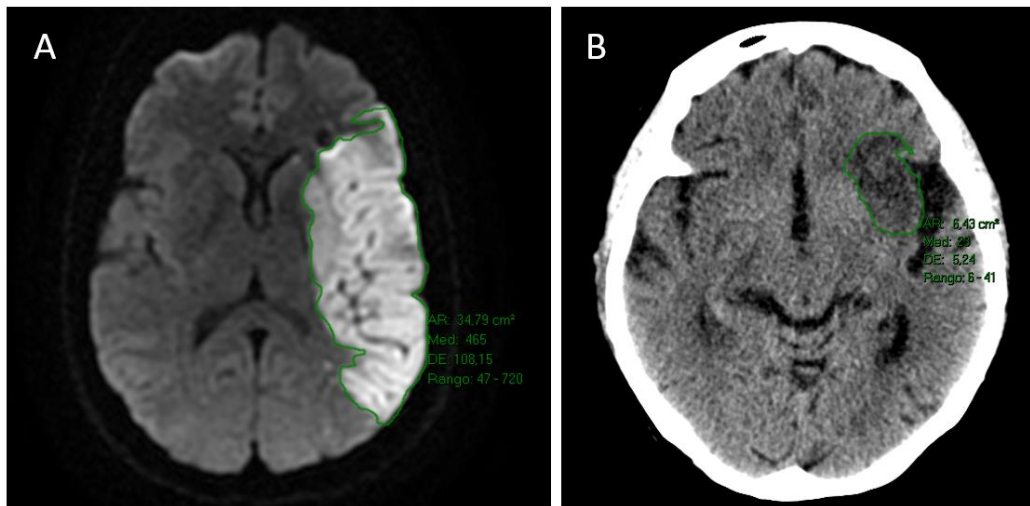


Figura 19: Ejemplo del cálculo del volumen de infarto cerebral. Se realiza una medición del área de infarto en cada corte, y posteriormente se multiplica por el grosor. En la figura A se muestra una imagen representativa de un infarto medido en una RM craneal (secuencia DWI), y en la figura B un ictus medido en un TC craneal.

- En estudio de neuroimagen de control realizado para la medición del infarto cerebral, se ha determinado si se ha producido una transformación hemorrágica. Para su clasificación se ha valorado:

- Presencia o no de cualquier tipo de transformación hemorrágica, independientemente de su gravedad o localización.
- Si el paciente ha presentado una **transformación hemorrágica sintomática** según los criterios del estudio ECASS III (Hacke et al., 2008), es decir, que haya sido la principal causa identificada para que el paciente haya sufrido un deterioro clínico significativo (empeoramiento ≥ 4 puntos en la escala NIHSS o que conlleve la muerte del paciente).
- Para la estadificación de las transformaciones hemorrágicas parenquimatosas se ha utilizado la **escala del ensayo clínico ECASS III** (Hacke et al., 2008):
 - Infarto hemorrágico tipo 1 (HI-1): Hemorragia petequiral no confluyente

- Infarto hemorrágico tipo 2 (HI-2): Hemorragia petequiral confluyente sin efecto masa significativo.
 - Hemorragia parenquimatosa tipo 1 (PH-1): hematoma intraparenquimatoso que ocupa <30% del área del infarto cerebral, que origina leve efecto masa.
 - Hemorragia parenquimatosa tipo 2 (PH-2): hematoma intraparenquimatoso que ocupa > 30% del área del infarto cerebral y que ocasiona un efecto masa significativo.
 - Además, se ha analizado si el paciente ha presentado una transformación hemorrágica en otro territorio neurovascular (también denominada hemorragia “remota” o a distancia), generalmente secundaria al tratamiento fibrinolítico administrado en fase aguda.
- En los pacientes cuya transformación hemorrágica haya sido en forma de hemorragia subaracnoidea, se ha cuantificado la misma como focal (adyacente al área de infarto cerebral) o difusa.

3.3.1.3. Variables de laboratorio

De todos los pacientes se han obtenido por venopunción tres muestras de sangre periférica en los siguientes tiempos: ingreso ($\leq 6h$ desde el inicio), 24h (+/- 12h) y 3 meses tras el ictus. Todas las muestras se recogieron a las 08:00h +/- 3h para evitar cambios relacionados con los ritmos circadianos, a excepción de la muestra al ingreso que se ha extraído lo antes posible a su llegada al Servicio de Urgencias. La obtención de dichas muestras se ha realizado siguiendo los protocolos habituales de tratamiento de los pacientes con ictus agudo, por lo que no han supuesto una demora en los tiempos de atención.

En las analíticas al ingreso y a las 24 horas se han recogido las siguientes determinaciones analizadas en el laboratorio central del Hospital U. 12 de Octubre:

- Hemograma: hemoglobina (g/dl), leucocitos (x1000/ μ l), neutrófilos (x1000/ μ l), linfocitos (x1000/ μ l), monocitos (x1000/ μ l) y plaquetas (x1000/ μ l)
- Bioquímica: creatinina (mg/dl), glucosa (mg/dl), proteína C reactiva (mg/dl).
- Coagulación: relación internacional normalizada (INR por sus siglas en inglés), determinado por el cociente entre el tiempo de protrombina del paciente entre el tiempo de protrombina de un control normal.

En cada tiempo se ha obtenido además una muestra de sangre venosa de 5ml conservada con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para la obtención de plasma pobre en plaquetas (ya que la activación plaquetaria puede liberar CXCL12 (Chatterjee and Gawaz, 2013)) y de un frotis sanguíneo.

- Obtención de plasma pobre en plaquetas

Tras separar los 500 μ l destinados a la realización de un frotis sanguíneo, se realiza una primera centrifugación a 1000G durante 10 minutos a 4°C. Se obtiene el plasma rico en plaquetas y se transfiere a un tubo Eppendorf de 2ml. Se realiza una segunda centrifugación a 2000G durante 15 minutos a 4°C, consiguiendo una precipitación de las plaquetas presentes en el plasma. Se recoge el plasma pobre en plaquetas y se obtienen alícuotas de 200 μ l que se transfieren a tubos Eppendorf de 1,5ml. Las muestras se conservaron a -80°C hasta su posterior análisis. El procesamiento se resume en la Figura 20.

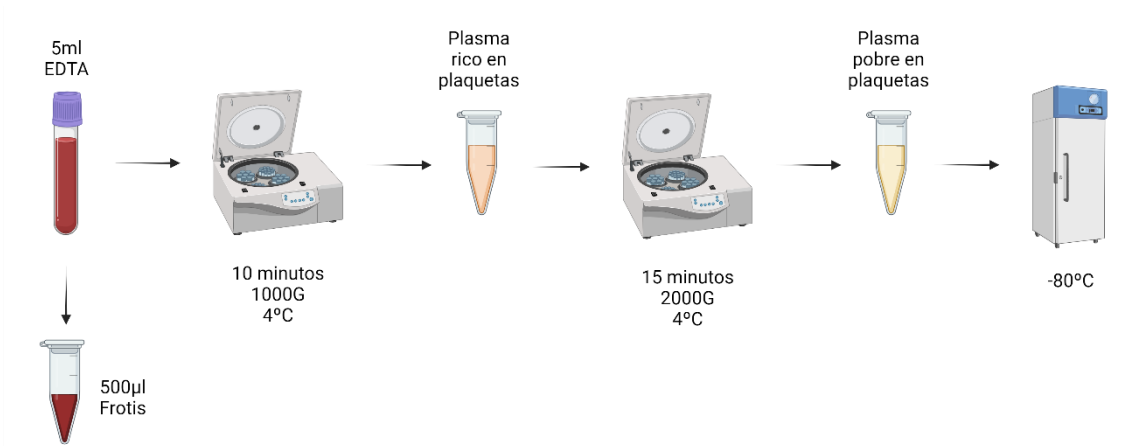


Figura 20: Esquema del procesamiento para obtener plasma pobre en plaquetas.

- Preparación de los frotis sanguíneos

Los 500µl extraídos del tubo de EDTA se transfieren a un tubo Eppendorf de 2ml. Se añade 1ml de buffer de lisis (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂, 0.02% NaN₃, 1% Triton X-100) para lisar los eritrocitos de la muestra y se mantiene 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifuga la muestra a 1800rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet con 80µl de tampón fosfato salino (PBS 1X por sus siglas en inglés, con la siguiente composición por mmol/L: NaCl 137, KCl 2.7, Na₂HPO₄ 10, KH₂PO₄, pH 7.4) y se reparte en dos portaobjetos. Tras secarse ambos portaobjetos, se fijan con paraformaldehído (PFA) 4% durante 10 minutos, y posteriormente se guardan a -20°C. Este proceso se resume en la Figura 21.

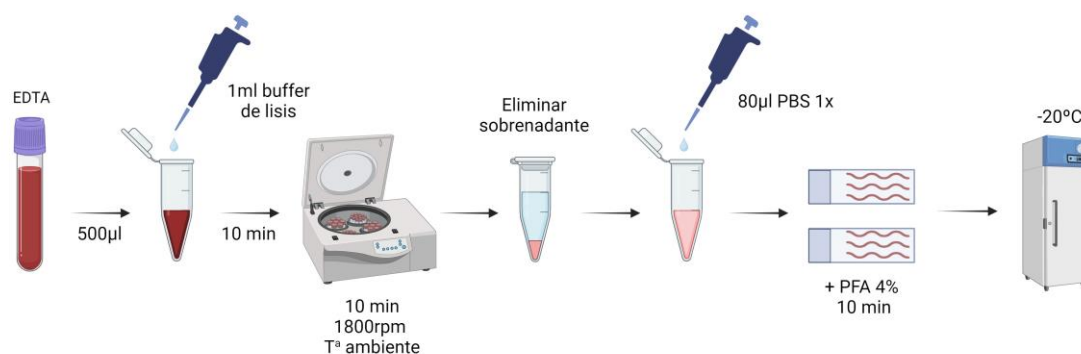


Figura 21: Esquema explicativo del proceso para preparar los frotis sanguíneos. PFA: paraformaldehído; PBS: tampón fosfato salino; EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

Posteriormente las muestras se tiñen con Giemsa y se digitalizan en el servicio de Histopatología del CNIC con el digitalizador AxioScan Z1” (Zeiss®) a 40x aumentos.

- Almacenamiento de muestras

Se han almacenado las muestras según el protocolo contemplado en la definición de “Colección de muestras biológicas de origen humano con fines de investigación biomédica”, esto es, muestras biológicas de origen humano que se conservan fuera del ámbito organizativo de un biobanco para su utilización en proyectos de investigación. El procesamiento y almacenamiento a -20°C y -80°C se ha realizado en los laboratorios de la Unidad de Investigación Neurovascular en el Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre (i+12) hasta su posterior análisis.

La colección de muestras, a la cual se han añadido las muestras si el paciente ha dado su consentimiento, está aprobada por el ISCIII con la siguiente referencia: C. 0005629, Titular: Ignacio Lizasoain Hernández, Línea de investigación: “Investigación en pacientes con ictus isquémico. Investigación en pacientes con ictus hemorrágico.”

-Cuantificación de la quimiocina CXCL12 en plasma

Se han determinado los niveles de CXCL12 en plasma extraído de los pacientes del estudio. Cada muestra se diluyó con una relación 1:2 antes de su análisis. Para el análisis se empleó el kit de ELISA comercial para CXCL12 (SSA00 de R&D Systems, Minneapolis, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. La lectura colorimétrica se realizó en un lector de placas xMark Microplate Spectrophotometer (BioRad) a 450nm. Simultáneamente se hicieron las rectas patrón en cada placa para interpolar los resultados de colorimetría.

- Cuantificación de los marcadores de NETs en plasma

Se evaluaron tres marcadores diferentes: ADN libre circulante (cfDNA, del inglés "*cell free DNA*"), elastasa del neutrófilo y mieloperoxidasa (MPO). Para el análisis se utilizaron kits de ELISA comerciales para elastasa (ab119553 de Abcam, Cambridge, UK), MPO (DMYE00B de R&D Systems, Minneapolis, EE. UU.) y cfDNA (P11496 de Invitrogen, Oregón, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante en cada uno de los casos. La lectura colorimétrica se realizó en un lector de placas xMark Microplate Spectrophotometer (BioRad).

- Análisis de los frotis sanguíneos

Los frotis se han visualizado con el software Zeiss Zen Blue (v. 3.7 lite). De cada frotis, se han identificado 100 neutrófilos, anotando el número de lóbulos del núcleo que se puede visualizar en cada uno de ellos. Se han categorizado los neutrófilos en 3 grupos en función del número de lobulaciones del núcleo: 3 o menos lóbulos, 4 lóbulos y 5 o más lóbulos. Se muestran ejemplos en la Figura 22.

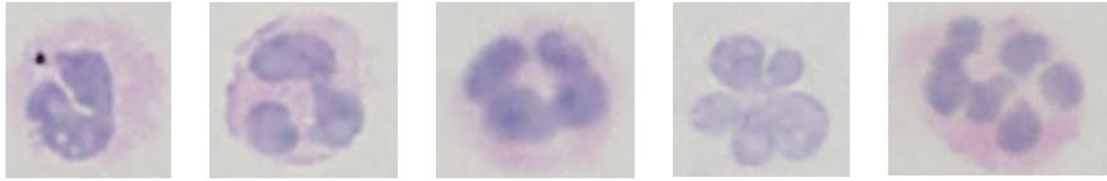


Figura 22: Ejemplo del número de lóbulos del núcleo de los neutrófilos. Se identifican de izquierda a derecha neutrófilos con 2, 3, 4, 5 y 6 lobulaciones.

3.2.2 Fuentes de datos

Se han obtenido los datos clínicos de forma prospectiva a partir de las historias clínicas de los pacientes, que se recogen de forma sistemática dentro de la práctica habitual por un neurólogo especialista en enfermedades neurovasculares. Esto incluye las variables demográficas, antecedentes personales, tratamiento previo, situación funcional, gravedad clínica, pruebas complementarias realizadas y evolución clínica durante el ingreso y a los tres meses.

Las variables radiológicas se han obtenido mediante el software VuePACS (Phillips®), en utilizando las pruebas radiológicas realizadas de forma protocolaria en el estudio habitual de los pacientes con un ictus isquémico agudo. Los estudios radiológicos han sido valorados por radiólogos con experiencia en enfermedades neurovasculares.

Se ha diseñado una base de datos específica para el presente estudio basada en el programa Access.

3.2.3. Existencia de ciego

Aunque se trata de un estudio de cohortes, se ha anonimizado la información de los pacientes con un código numérico asignado por orden cronológico de reclutamiento. Gracias a ello se ha mantenido el ciego entre las distintas secciones del estudio

(valoración clínica, estudio radiológico y análisis de las muestras en el laboratorio). No se ha podido conocer la gravedad clínica del paciente, el pronóstico o las complicaciones previo al análisis de las muestras, y solo se han unido los datos mencionados al realizar el análisis estadístico final del proyecto.

3.4. Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha llevado a cabo con el programa STATA v.15.1 (Stata Corp LP, TX, EE. UU.). Para el diseño de gráficos que muestran los resultados se han utilizado los softwares STATA v.15.1 y PRISM v.8.0 (GraphPad Software Inc., EE. UU.). El diseño de figuras del resto del texto se ha realizado a través de la plataforma Biorender.com.

3.4.1. Estudio descriptivo

Se ha realizado un estudio descriptivo de las principales variables clínicas, radiológicas y analíticas. Los valores se expresan en función del tipo de variable: número y porcentaje en el caso de variables categóricas, y la media +/- la desviación estándar o la mediana y el rango intercuartil en variables continuas o discretas.

3.4.2 Análisis estadístico univariante

Para el análisis univariante se han utilizado los siguientes métodos:

- En la mayoría de casos, se han realizado los análisis con estudios de regresión:

- En el caso de las variables continuas se ha empleado la regresión lineal, que establece una correlación positiva si el coeficiente de regresión (β) es mayor que 0 y negativa si es menor que 0.
- En las variables dicotómicas se ha empleado la regresión logística, en la que los resultados se reflejan con una *Odds Ratio* (OR), siendo una relación positiva un

resultado mayor que 1 y negativo un resultado entre 0 y 1. En el caso de variables categóricas con más de dos valores, se ha utilizado una regresión logística multinomial, y en las variables ordinales la regresión logística ordinal.

- Por último, en caso de comparar medianas, se utiliza una regresión de cuantiles.
- También se ha podido utilizar, en función del tipo de variable, los siguientes test: test ji-cuadrado, test exacto de Fisher, test t Student (incluyendo el t de Student para muestras apareadas) o test U Mann-Whitney. En el caso de variables categóricas con más de dos categorías se ha utilizado una ANOVA o en el caso de no cumplir la normalidad se ha empleado el test de Kruskal-Wallis.
- En todos los casos se ha establecido un valor $p < 0,05$ para identificar las diferencias estadísticamente significativas y se ha reflejado intervalo de confianza del 95% (IC95%) para estimar la magnitud del efecto.

3.4.3. Análisis predictivo

Para identificar las variables predictivas más relevantes en cada caso, se ha utilizado el método *backward stepwise* (regresión paso a paso con exclusión secuencial), que elimina las variables del modelo de forma consecutiva si su influencia es $p > 0,10$. El análisis se ha realizado con regresión lineal o con regresión logística en función del tipo de variable (continua o categórica, respectivamente).

Para el modelo predictivo se han utilizado las siguientes variables: edad, sexo, diabetes, NIHSS en urgencias, [CXCL12] plasmática al ingreso y a las 24 horas, ictus diurno/nocturno, tiempo inicio-puerta (tiempo desde el inicio de los síntomas hasta la llegada al hospital) medido en minutos, tratamiento con fibrinólisis IV y/o trombectomía mecánica. En el caso del análisis predictivo para determinar la gravedad al ingreso

medida por la escala NIHSS, no se han incluido las variables de tratamiento en fase aguda (fibrinolisis IV o trombectomía mecánica) ni la concentración plasmática de CXCL12 a las 24 horas.

Este análisis tiene limitaciones en la presente cohorte, porque puede haber colinealidad en algunas variables predictivas y en algunos modelos el número de resultados positivos es bajo, pero tiene la ventaja de valorar varios factores de confusión en cada caso.

3.5. Aspectos éticos

Este proyecto ha sido valorado de forma favorable por el Comité de Ética del i+12 antes de su inicio, con el número de referencia 18/520 (se adjunta en la sección de anexos). El estudio se ha llevado a cabo de acuerdo con las Normas de Buena Práctica Clínica. La información obtenida es considerada confidencial y ha sido tratada en todo momento de acuerdo con la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales. Se ha creado una base de datos específicamente diseñada para el estudio, en el que los pacientes serán identificados con un código numérico asignado por orden de reclutamiento que no contiene información personal.

Se ha solicitado el consentimiento informado al paciente o a sus representantes en caso de afectación neurológica grave previo al análisis bioquímico y a la recogida de datos clínicos o radiológicos según la ley de Investigación Biomédica 14/2007 (BOE 4-VII-2007).

RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1. Análisis descriptivo de los pacientes incluidos en el estudio

4.1.1. Pacientes incluidos

Se han reclutado un total de 180 pacientes, de los cuales se han excluido *a posteriori* 46: 16 pacientes por no identificarse una lesión isquémica en la RM o en el TC craneal de control a las 24-72h, 15 por recibir finalmente un diagnóstico alternativo (*stroke mimics*), 11 por fallos en el protocolo identificados tras su inclusión en el estudio y 4 por recibir un diagnóstico final de ictus lacunar. Por lo tanto, se han incluido 134 pacientes en el análisis final, de los que se ha realizado un seguimiento clínico y con neuroimagen en todos los casos. Se dispone de muestras sanguíneas procesadas al ingreso (<6 horas desde el inicio) de 121 pacientes, de 131 a las 24 horas y de 48 a los 3 meses. Estos datos se resumen en la Figura 23.

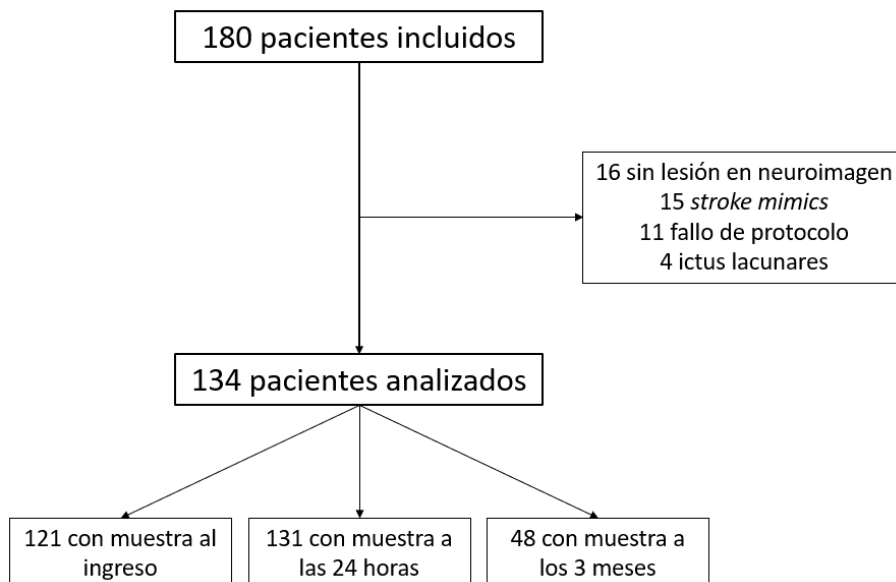


Figura 23: Cuadro explicativo en el que se describen los pacientes incluidos en el estudio, sus criterios de exclusión y las muestras obtenidas en cada tiempo.

4.1.2. Variables demográficas

La edad media fue de 74,2 años con una desviación estándar (DE) de 14,6 años. Un 53% de los pacientes reclutados eran mujeres. Con respecto a los antecedentes personales, hay una alta proporción de pacientes con factores de riesgo vascular: un 64,9% de presentaban hipertensión arterial previo al ingreso, un 55,2% dislipemia, un 19% diabetes mellitus y un 12,0% eran fumadores en activo. Dentro de las comorbilidades previas, destaca que un 42,5% de los pacientes tenía una fibrilación auricular (casi la mitad de ellas diagnosticadas “*de novo*”), un 10,5% habían tenido un ictus isquémico previamente y un 9,0% un infarto de miocardio. Todos los pacientes eran independientes antes del ingreso, pero un 31,3% tenía algún tipo de limitación funcional (ERm 1 o 2). En cuanto al tratamiento, un 24,6% tomaba algún fármaco antiagregante antes del ictus y un 18,7% algún anticoagulante. Los datos se resumen en la Tabla 4.

Antecedentes demográficos, comorbilidad y tratamiento previo (n = 134)	
Edad en años, media (\pm DE)	74,2 (\pm 14,6)
Edad en años, mediana (RIC)	78,3 (68,9 – 84,3)
Sexo femenino, n (%)	71 (53,0%)
Consumo de tabaco, n (%)	
* No fumadores	102 (76,1%)
* Fumadores	16 (12,0%)
* Exfumadores	16 (12,0%)
Hipertensión arterial, n (%)	87 (64,9%)
Dislipemia, n (%)	74 (55,2%)
Diabetes, n (%)	26 (19,4%)
Fibrilación auricular, n (%)	57 (42,5%)
* No	77 (57,5%)
* Sí	30 (22,4%)
* Diagnosticada “de novo”	27 (20,2%)
Válvula metálica, n (%)	7 (5,2%)
Infarto de miocardio previo, n (%)	12 (9,0%)
Ictus isquémico previo, n (%)	14 (10,5%)
Ictus hemorrágico previo, n (%)	2 (1,5%)
Arteriopatía periférica, n (%)	3 (2,2%)
Enfermedad renal crónica, n (%)	12 (9,0%)
Tratamiento previo	
* Antiagregación previa, n (%)	33 (24,6%)
* Anticoagulación previa, n (%)	25 (18,7%)
Escala de Rankin (ERm) previa	
* ERm 0, n (%)	92 (68,7%)
* ERm 1, n (%)	25 (18,7%)
* ERm 2, n (%)	17 (12,7%)

Tabla 4: Estudio descriptivo de las principales variables demográficas, antecedentes y tratamiento previo. Se emplea la media \pm desviación estándar (DE) o la mediana y el rango intercuartil (RIC) en el caso de variables continuas, y el número de casos y el porcentaje con respecto al total en las variables dicotómicas.

4.1.3. Características clínicas y radiológicas al ingreso

La mayoría de los pacientes (91,0%) fueron trasladado directamente al Servicio de Urgencias desde fuera del hospital (ictus extrahospitalario), 2 (1,5%) tuvieron lugar en el propio hospital (intrahospitalario) y 10 (7,5%) fueron trasladados desde otros centros. El inicio de la sintomatología era conocido en el 76,1% de los casos, en el resto el momento de instauración de los síntomas era incierto por ser ictus “del despertar” (19,4%) o de inicio desconocido pero menor de 6 horas (4,5%).

Al ingreso, la gravedad neurológica medida por la escala NIHSS media era moderada-grave, aunque el rango de gravedad es amplio (mediana 11, rango intercuartil 5 - 19). La mayoría de los ictus fueron de circulación anterior, siendo más frecuente la afectación del territorio carotídeo izquierdo (53,7%). En el estudio radiológico inicial, en el 43,3% se objetivaban datos de isquemia precoz en el TC craneal (ASPECTS < 10), aunque sólo un 5,2% tenían un ASPECTS < 7. En el AngioTC de troncos supraaórticos se detectó una oclusión arterial en el 76,9% de los pacientes siendo la localización más frecuente el primer segmento de la ACM (M1), observada en un 35,1% de los casos. Además, un 10,5% tuvieron una oclusión en tándem, es decir, una oclusión arterial simultánea a nivel intra y extracraneal. Estos datos se resumen en la Tabla 5.

Principales variables clínicas y radiológicas al ingreso	
Inicio del ictus	
Inicio presenciado / conocido, n (%)	102 (76,1%)
Ictus “del despertar”, n (%)	26 (19,4%)
Inicio desconocido (<6h), n (%)	6 (4,5%)
NIHSS en urgencias, mediana (RIC)	11 (5 – 19)
NIHSS en urgencias, media (± DE)	12,5 (±7,9)
ASPECTS, mediana (RIC)	10 (8 – 10)
* 10, n (%)	73 (55,7%)
* 9, n (%)	23 (17,6%)
* 8, n (%)	14 (10,7%)
* 7, n (%)	14 (10,7%)
* 6, n (%)	4 (3,1%)
* 5, n (%)	2 (1,5%)
* 4, n (%)	1 (0,8%)
Oclusión intracraneal	
* No identificada en AngioTC, n (%)	31 (23,1%)
* M1, n (%)	47 (35,1%)
* M2, n (%)	24 (17,9%)
* “T” carotídea o carótida intracraneal, n (%)	22 (16,4%)
* Arteria basilar, n (%)	1 (0,75%)
* Arteria vertebral, n (%)	1 (0,75%)
* Arteria cerebral posterior, n (%)	2 (1,5%)
* Otras, n (%)	6 (4,5%)
Oclusión en tándem, n (%)	14 (10,5%)

Tabla 5: Estudio descriptivo de las principales variables clínicas y radiológicas al ingreso del paciente. Se emplea la media ± desviación estándar (DE) o la mediana y el rango intercuartil (RIC) en el caso de variables continuas, y el número de casos y el porcentaje con respecto al total en las variables dicotómicas.

4.1.4. Tratamiento en fase aguda y tiempos de atención

La mayoría de los pacientes recibieron algún tratamiento recanalizador (91,0%). Un 70,2% de los pacientes fueron tratados en fase aguda con trombectomía mecánica y 46,3% con fibrinolisis IV. En la mayoría de pacientes en los que se realizó una trombectomía arterial se obtuvo una recanalización arterial; solo en 5 pacientes (5,3%) no se consiguió una recanalización TIC12b o superior.

Con respecto a los tiempos de atención, la media de tiempo desde la identificación de los síntomas hasta su llegada al hospital (inicio-puerta) fue aproximadamente 2 horas (118,5 minutos). La mediana de tiempo puerta-aguja (desde su llegada hasta la administración de la fibrinólisis IV) fue de 51 minutos y de puerta-ingle (tiempo desde la llegada hasta el inicio de la trombectomía mecánica) de 76 minutos. Los datos más relevantes se resumen en la Tabla 6.

Tratamiento en fase aguda y tiempos de atención	
Tratamiento en fase aguda	
Sin tratamiento recanalizador, n (%)	13 (9,7%)
Fibrinólisis IV (FIV), n (%)	28 (20,9%)
Trombectomía mecánica primaria (TM), n (%)	60 (44,8%)
Tratamiento combinado (FIV + TM), n (%)	34 (25,4%)
Recanalización arterial en pacientes con TM (n=94)	
TICI 0, n (%)	5 (5,3%)
TICI 2B, n (%)	15 (16,0%)
TICI 2C, n (%)	19 (20,2%)
TICI 3, n (%)	55 (58,5%)
Tiempos de atención (minutos)	
Tiempo desde el inicio-puerta, media (\pm DE)	118,5 (\pm 75,7)
Tiempo desde el inicio-puerta, mediana (RIC)	92,5 (68 – 154)
Tiempo puerta-aguja, media (\pm DE)	49,0 (\pm 33,2)
Tiempo puerta-aguja, mediana (RIC)	51,0 (36 – 69)
Tiempo puerta-ingle, media (\pm DE)	87,9 (\pm 55,0)
Tiempo puerta-ingle, mediana (RIC)	76,0 (58 – 105)

Tabla 6: Estudio descriptivo del tratamiento recibido en fase aguda y de los tiempos de atención. Se emplea la media \pm desviación estándar (DE) o la mediana y el rango intercuartil (RIC) en el caso de variables continuas, y el número de casos y el porcentaje con respecto al total en las variables dicotómicas.

4.1.5. Estudio descriptivo de las variables analíticas

El resumen de las determinaciones realizadas en el laboratorio central se expone en la Tabla 7. Dentro de ellas, cabe destacar que ningún paciente presentaba plaquetopenia (plaquetas $<$ 100000/ μ l) ni leucopenia significativa.

Principales variables analíticas	
Leucocitos al ingreso	
Leucocitos totales x 1000, media (\pm DE)	8,46 (2,55)
Neutrófilos x 1000, media (\pm DE)	5,88 (2,48)
Linfocitos x 1000, media (\pm DE)	1,8 (0,90)
Monocitos x 1000, media (\pm DE)	0,62 (0,25)
Plaquetas x 1000, media (\pm DE)	219,7 (68,2)
Leucocitos a las 24h	
Leucocitos x 1000, media (\pm DE)	7,95 (2,20)
Neutrófilos x 1000, media (\pm DE)	5,90 (2,13)
Linfocitos x 1000, media (\pm DE)	1,45 (0,99)
Monocitos x 1000, media (\pm DE)	0,66 (0,50)
Plaquetas x 1000, media (\pm DE)	198,9 (62,4)
Bioquímica	
Glucosa al ingreso (mg/dl), media (\pm DE)	126,2 (39,5)
Creatinina al ingreso (mg/dl), media (\pm DE)	0,92 (0,30)
Proteína C reactiva al ingreso (mg/dl), media (\pm DE)	0,69 (1,08)
Proteína C reactiva a las 24 horas (mg/dl), media (\pm DE)	1,66 (1,84)
Coagulación	
INR al ingreso, media (\pm DE)	1,19 (0,37)

Tabla 7: Resumen descriptivo de las principales variables analíticas. Los valores se expresan con la media \pm la desviación estándar (DE).

Por otra parte, se expone a continuación en la Tabla 8 la concentración media de CXCL12 en los distintos tiempos en los que se ha determinado.

Concentración plasmática de CXCL12	
[CXCL12] al ingreso (n = 121), media (\pm DE)	2,47 (0,98)
[CXCL12] a las 24h (n = 131), media (\pm DE)	2,04 (0,82)
[CXCL12] a los 3 meses (n = 48), media (\pm DE)	2,34 (0,73)

Tabla 8: Concentración plasmática de CXCL12 al ingreso, 24 horas y tres meses. Los valores se expresan con la media \pm la desviación estándar (DE).

4.1.6. Evolución clínica y radiológica durante el ingreso

La evolución clínica de los pacientes fue en general hacia la mejoría. A las 24 horas, la media de gravedad neurológica medida en la escala NIHSS disminuyó 6,9 puntos, lo que supone una mejoría media en la escala NIHSS de un 42,8% desde su llegada. Durante el ingreso, 23 pacientes (17,2%) presentaron algún tipo de infección, siendo la más frecuente la respiratoria. Al alta, la media de la escala NIHSS fue de 4,9, el 57,5% de los pacientes presentaban una independencia funcional ($ERm \leq 2$) y se registraron únicamente 4 fallecimientos (3,0%). Estos datos se resumen en la Tabla 9.

Evolución de los pacientes durante el ingreso y situación funcional al alta	
Evolución durante el ingreso	
NIHSS a las 24 horas, media (\pm DE)	6,9 (7,3)
NIHSS a las 24 horas, mediana (RIC)	4 (1 - 11)
NIHSS al alta, media (\pm DE)	4,9 (6,4)
NIHSS al alta, mediana (RIC)	2 (0 - 7)
Infección durante el ingreso, n (%)	23 (17,2%)
Fallecimiento durante el ingreso, n (%)	4 (3,0%)
Situación funcional al alta	
ERm 0, n (%)	27 (20,2%)
ERm 1, n (%)	36 (26,9%)
ERm 2, n (%)	18 (13,3%)
ERm 3, n (%)	14 (10,4%)
ERm 4, n (%)	24 (17,9%)
ERm 5, n (%)	18 (13,4%)
ERm 6, n (%)	4 (3,0%)
Independencia funcional ($ERm \leq 2$), n (%)	57 (57,5%)

Tabla 9: Resumen descriptivo de la evolución clínica de los pacientes durante el ingreso y situación funcional al alta. Se emplea la media \pm desviación estándar (DE) o la mediana y el rango intercuartil (RIC) en el caso de variables continuas, y el número de casos el porcentaje con respecto al total en las variables dicotómicas.

En relación con la evolución radiológica en la prueba de neuroimagen realizada de control a las 24-72h (TC o RM), los pacientes presentan un amplio rango de volumen de infarto, siendo el volumen mínimo 0,09ml y el máximo 317,33ml. La media de volumen

de infarto fue de 40,0ml y la mediana de 8,58ml. Como puede observarse en la Figura 24, la mayoría de los infartos son de volumen pequeño y en último tercil se observa un incremento de tamaño progresivo, casi exponencial. Por ello, en análisis del volumen de infarto se valorará tanto el volumen del infarto expresado en ml como su distribución categorizada en terciles. Estos datos se resumen en la Tabla 10.

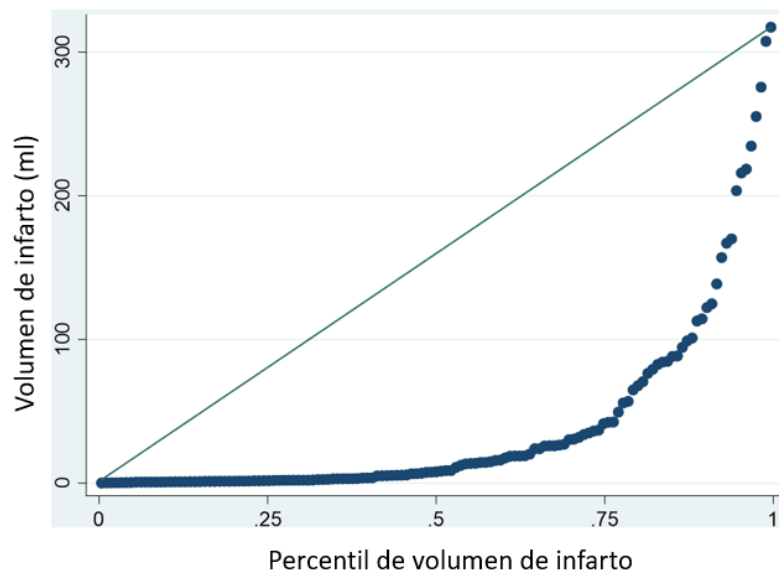


Figura 24: Distribución del volumen de infarto. En el eje X se distribuyen los pacientes en función del percentil de infarto (expresado de 0 a 1) y en el eje Y el volumen de infarto.

Con respecto a las principales complicaciones, un 23,9% de los pacientes presentaron algún tipo de transformación hemorrágica, siendo 6 (4,5%) de ellas sintomáticas, es decir, que condicionaron un empeoramiento clínico significativo del paciente o su fallecimiento. Fueron más frecuentes las hemorragias intraparenquimatosas (18,7% de los casos, aunque la mayoría de ellas fueron petequiales) y en un 12,4% presentaron algún grado de hemorragia subaracnoidea. 9 de los pacientes presentaron sincrónicamente una hemorragia intraparenquimatosa y subaracnoidea. Los datos se resumen en la Tabla 10.

Principales características en estudio de neuroimagen a las 24-72h	
Tipo de estudio de neuroimagen utilizado	
TC craneal	91 (67,9%)
RM craneal	43 (32,1%)
Volumen infarto (ml)	
Media (\pm DE)	40,0 (\pm 66,7)
Mediana (RIC)	8,58 (1,95 – 42,4)
p33 – p66	2,80 – 26,2
Transformación hemorrágica, n (%)	33 (24,6%)
Transformación hemorrágica sintomática, n (%)	6 (4,5%)
Transformación hemorrágica parenquimatosa, n (%)	25 (18,7%)
Infarto hemorrágico tipo 1 (IH-1), n (%)	5 (3,7%)
Infarto hemorrágico tipo 2 (IH-2), n (%)	11 (8,2%)
Hemorragia parenquimatosa tipo 1 (HP-1), n (%)	7 (5,2%)
Hemorragia parenquimatosa tipo 2 (HP-2), n (%)	0 (0,0%)
Hemorragia remota, n (%)	2 (1,5%)
Hemorragia subaracnoidea (HSA), n (%)	17 (12,4%)
HSA focal, n (%)	15 (11,2%)
HSA difusa, n (%)	2 (1,5%)

Tabla 10: Análisis descriptivo del volumen de infarto y del grado de transformación hemorrágica. En el caso del volumen de infarto se emplea la media \pm desviación estándar (DE) o la mediana y el rango intercuartil (RIC) y los percentiles 33 y 66 que determinan los 3 terciles en los que se ha categorizado el volumen de infarto. En el resto de variables se refleja el número de casos y el porcentaje con respecto al total en las variables dicotómicas.

4.1.7. Etiología del ictus isquémico y evolución clínica a los tres meses

La etiología más frecuente fue la cardioembólica (48,5%), seguida de la aterotrombótica (36,6%) y por causa indeterminada (13,4%). A los tres meses, el 60,5% de los pacientes consiguieron una independencia funcional ($ERm \leq 2$) y 9 pacientes fallecieron (6,7%) en este tiempo. Estos datos se resumen en la Tabla 11.

Etiología y pronóstico funcional de los pacientes a los 3 meses	
Etiología	
Aterotrombótico, n (%)	49 (36,6%)
Cardioembólico, n (%)	65 (48,5%)
Diseción arterial, n (%)	2 (1,5%)
Causa indeterminada, n (%)	18 (13,4%)
Escala de rankin (ERm) a los 3 meses,	
ERm 0, n (%)	27 (20,2%)
ERm 1, n (%)	36 (26,9%)
ERm 2, n (%)	18 (13,4%)
ERm 3, n (%)	14 (10,5%)
ERm 4, n (%)	24 (17,9%)
ERm 5, n (%)	6 (4,5%)
ERm 6 (fallecimiento), n (%)	9 (6,7%)
Independencia funcional a los 3 meses (ERm \leq 2), n (%)	81 (60,5%)

Tabla 11: Resumen de la etiología y del pronóstico funcional de los pacientes a los tres meses. Se indica el número de pacientes y su porcentaje con respecto al total.

4.2. Análisis de los principales factores de confusión

Aunque no se trate del objetivo de la presente tesis doctoral, se expondrá a continuación el análisis de las principales variables demográficas y clínicas que pudieran actuar como factores de confusión en el estudio estadístico posterior, como pueden ser el sexo, la edad, la gravedad neurológica al ingreso y la hora de inicio de los síntomas.

4.2.1. Sexo

En la muestra del estudio, existe una diferencia significativa de edad entre los hombres y las mujeres, siendo las mujeres más añosas: 77,5 años vs. 70,6 años ($p = 0,01$). Asimismo, presentan una gravedad mayor al ingreso medida por la escala NIHSS (14,0 vs. 10,8, $p = 0,02$). Es más probable que fueran tratadas con trombectomía mecánica (77% vs. 61,9%, $p = 0,049$), pero no con fibrinólisis IV (43,7% vs 49,2%, $p = 0,52$). La etiología más frecuente fue la cardioembólica en mujeres (63,4%) y la aterotrombótica

en varones (55,6%), siendo esta diferencia significativa ($p < 0,01$). No se observan diferencias significativas en el volumen de infarto, ni tampoco en el pronóstico a los 3 meses, aunque hay una tendencia a una peor evolución en el caso de las mujeres (ERm ≤ 2 a los 3 meses en un 54,9%, frente a un 66,7% en varones, $p = 0,17$). Estos datos se resumen en la Figura 25 y en la Tabla 12.

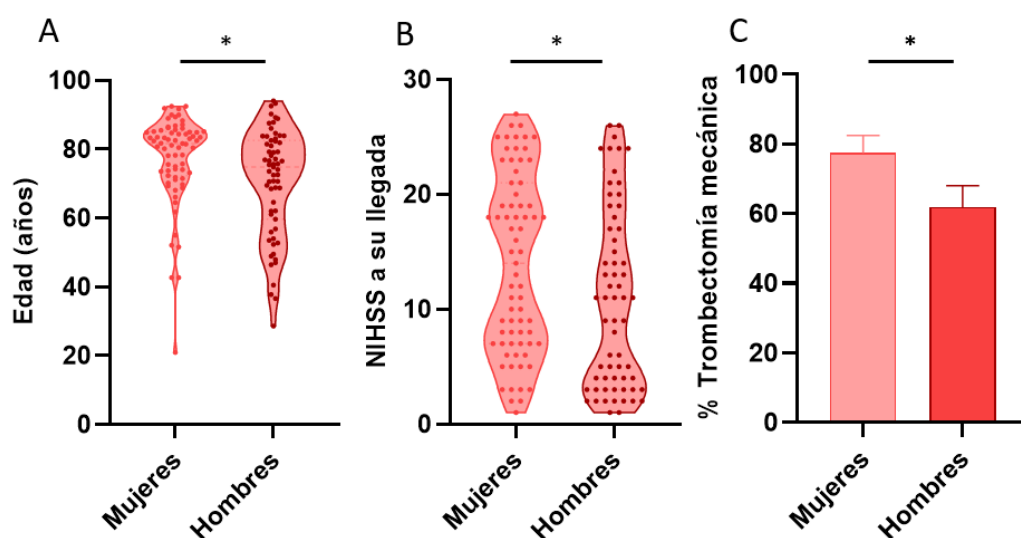


Figura 25: Gráficos que muestran la relación entre el sexo y la edad (A), la gravedad al ingreso medida por la escala NIHSS (B) y la proporción de pacientes tratados con tromboectomía mecánica (C). En los gráficos A y B se ha utilizado un diagrama de violín y en el C se expresa la proporción de pacientes tratados. En los casos A y B se ha realizado un análisis con regresión lineal, y en el C con regresión logística. (* $P < 0,05$).

Variable	Hombre	Mujer	OR o β (IC95%)	P
Edad (media, β)	70,6	77,5	-6,85 (-11,7 - -1,98)	0,01
NIHSS en urgencias, (media, β)	10,8	14,0	-3,15 (-5,81 - -0,48)	0,02
Tratamiento con FIV (% , OR)	49,2	43,7	1,25 (0,63 - 2,47)	0,52
Tratamiento con TM (% , OR)	61,9	77,5	0,47 (0,22 - 1,00)	0,049
Volumen de infarto (media, β)	40,0	40,1	0,15 (-22,7 - 23,1)	0,99
Infección durante el ingreso (% , OR)	21,1	12,7	0,54 (0,21 - 1,38)	0,20
Independencia a los 3 meses (% , OR)	66,7	54,9	1,64 (0,81 - 3,31)	0,17

Tabla 12: correlación entre sexo y NIHSS, tratamiento y pronóstico. Se utiliza como referencia el sexo femenino. Las variables continuas se han analizado con regresión lineal (expresada con el coeficiente de regresión β) y las binarias con regresión logística (se indica el *odds ratio*, OR).

4.2.2. Edad

La edad no se asoció con una mayor gravedad al ingreso medida por la escala NIHSS, ni se han observado diferencias significativas de poder recibir o no tratamiento con tromboectomía mecánica y fibrinólisis IV. En la evolución posterior, no se han identificado diferencias significativas con respecto al volumen de infarto, pero la edad se asoció con una mayor probabilidad de no conseguir una independencia funcional a los tres meses: la edad media de los pacientes independientes fue de 71,8 años y de 78,0 años en el caso de los pacientes dependientes o fallecidos ($p=0,02$). Estos datos se resumen en la

Tabla 13.

Variable	OR o β (IC95%)	P valor
NIHSS en urgencias, β	0,00 (-0,10 – 0,09)	0,96
Tratamiento con FIV, OR	0,98 (0,96 – 1,01)	0,26
Tratamiento con TM, OR	1,00 (0,97 – 1,02)	0,80
Volumen de infarto, coeficiente	-0,14 (-0,93 – 0,65)	0,72
Infección durante el ingreso, OR	0,54 (0,21 – 1,38)	0,20
Independencia a los 3 meses, OR	0,96 (0,94 – 0,99)	0,02

Tabla 13: correlación entre edad y NIHSS, tratamiento y pronóstico. Las variables continuas se han analizado con regresión lineal (se indica el coeficiente de regresión β por cada año) y las binarias con regresión logística (se indica el *odds ratio* (OR) por cada año). FIV: fibrinólisis intravenosa. TM: tromboectomía mecánica.

4.2.3. NIHSS al ingreso

La gravedad de los síntomas medida por la escala NIHSS al ingreso se relaciona con una mayor probabilidad de recibir tratamiento con tromboectomía mecánica (OR 1,27 por cada punto, IC95% 1,16 – 1,38, $p < 0,01$) pero no con la posibilidad de ser tratado con fibrinólisis IV (OR 0,98, IC95% 0,94 – 1,03, $p = 0,55$), con un mayor volumen de infarto ($\beta = 3,8$ ml por cada punto, IC95% 2,5 – 5,1), $p < 0,01$), con una mayor probabilidad de presentar una infección durante el ingreso (OR 1,10, IC95% 1,03 – 1,17, $p < 0,01$) y con

una menor probabilidad de ser independiente a los tres meses (OR 0,87, IC95% 0,83 – 0,93, $p < 0,01$).

4.2.4. Ictus diurno/nocturno

Se ha valorado la influencia en la gravedad y pronóstico de los pacientes en función del momento de atención: diurno/nocturno. No se han observado diferencias estadísticamente significativas con respecto a la gravedad al ingreso medida por la escala NIHSS ($\beta = 1,6$, IC95% -1,4 – 4,6, $p = 0,29$), con el volumen de infarto en ml ($\beta = 12,7$, IC95% -12,8 – 38,2, $p = 0,33$) o estratificado (OR 1,00, IC95% 0,45 – 2,20, $p = 0,99$). En nuestra serie, tampoco se han objetivado una probabilidad distinta de ser independiente a los 3 meses (OR 0,55, IC95% 0,25 – 1,25, $p = 0,15$).

4.3. Estudio de la relación de la concentración de CXCL12 plasmática con la evolución de pacientes con ictus isquémico agudo

El objetivo principal de la tesis doctoral es conocer la influencia de la concentración plasmática de CXCL12 en la evolución de los pacientes con un ictus isquémico agudo y su posible asociación con variaciones circadianas del fenotipo de los neutrófilos. Por ello, a continuación, se va a describir la correlación de CXCL12 con distintas variables demográficas, clínicas y radiológicas tanto al ingreso como durante su estancia hospitalaria y el pronóstico a los 3 meses.

4.3.1. Correlación de la concentración de CXCL12 plasmática con las principales variables demográficas, antecedentes personales y tratamiento previo.

La concentración de CXCL12 plasmática es más elevada en pacientes con mayor edad tanto al ingreso ($\beta = 3,89$ años por ng/ml, $p < 0,01$, Figura 26A) como a las 24h ($\beta = 3,44$ años por ng/ml, $p = 0,03$, Figura 26B), si bien hay una amplia dispersión y el valor del

coeficiente de determinación r^2 es bajo (0,07 al ingreso, 0,04 a las 24 horas). No se han identificado variaciones significativas en función del sexo.

Se ha observado una concentración de CXCL12 menor en pacientes diabéticos al ingreso (concentración media en no diabéticos 2,59ng/ml vs. 1,95ng/ml en diabético, $p < 0,01$) y a las 24h (no diabéticos 2,12ng/ml vs. 1,74ng/ml en diabéticos, $p = 0,03$) (Figura 26), sin observarse diferencias relacionadas con otros antecedentes personales relevantes.

Estos datos se resumen en la Tabla 14.

Variable	[CXCL12] al ingreso OR o β (IC95%)	P	[CXCL12] a las 24h OR o β (IC95%)	P
Edad (años), β	3,89 (1,25 – 6,54)	<0,01	3,47 (0,41 – 6,53)	0,03
Sexo (ref. mujer), OR	1,21 (0,84 – 1,75)	0,31	1,09 (0,72 – 1,66)	0,68
Hipertensión arterial, OR	1,36 (0,92 – 2,02)	0,12	1,28 (0,82 – 2,01)	0,28
Dislipemia, OR	1,02 (0,71 – 1,47)	0,91	0,99 (0,65 – 1,51)	0,96
Diabetes, OR	0,48 (0,28 – 0,81)	<0,01	0,52 (0,28 – 0,96)	0,03
Fibrilación auricular, OR	1,03 (0,71 – 1,49)	0,88	1,00 (0,65 – 1,52)	0,98
Válvula metálica, OR	1,03 (0,44 – 2,37)	0,95	0,77 (0,29 – 2,08)	0,62
Ictus previo, OR	1,30 (0,72 – 2,34)	0,38	1,91 (0,99 – 3,72)	0,05
Hematoma previo, OR	1,20 (0,29 – 4,93)	0,80	0,86 (0,15 – 5,05)	0,87
Infarto de miocardio previo, OR	0,83 (0,43 – 1,63)	0,60	1,03 (0,51 – 2,14)	0,92
Arteriopatía periférica, OR	1,60 (0,51 – 5,04)	0,42	1,29 (0,34 – 4,87)	0,71
Enfermedad renal crónica, OR	1,10 (0,55 – 2,20)	0,79	0,88 (0,42 – 1,86)	0,74
Tratamiento antiagregante, OR	0,77 (0,50 – 1,19)	0,24	0,91 (0,56 – 1,50)	0,72
Tratamiento anticoagulante, OR	0,99 (0,61 – 1,60)	0,97	1,23 (0,73 – 2,07)	0,44

Tabla 14: Correlación entre la concentración plasmática de CXCL12 al ingreso y a las 24 horas con las principales variables demográficas y antecedentes personales más relevantes. Las variables continuas se han analizado con regresión lineal (se indica el coeficiente de regresión β por ng/ml) y las binarias con regresión logística (se indica el *odds ratio* (OR) por ng/ml).

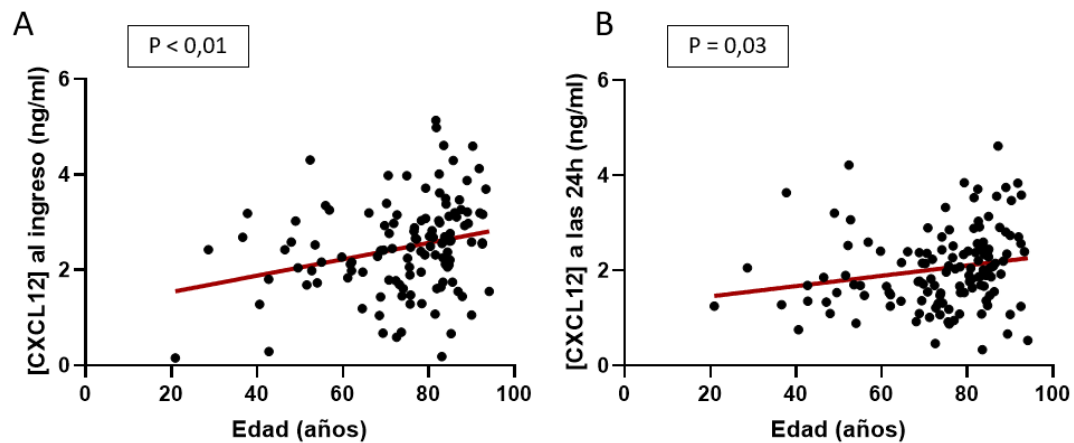


Figura 26: Correlación entre edad y concentración plasmática de CXCL12 al ingreso (A) y a las 24 horas (B). El análisis se ha realizado mediante una regresión lineal; se indica el valor P.

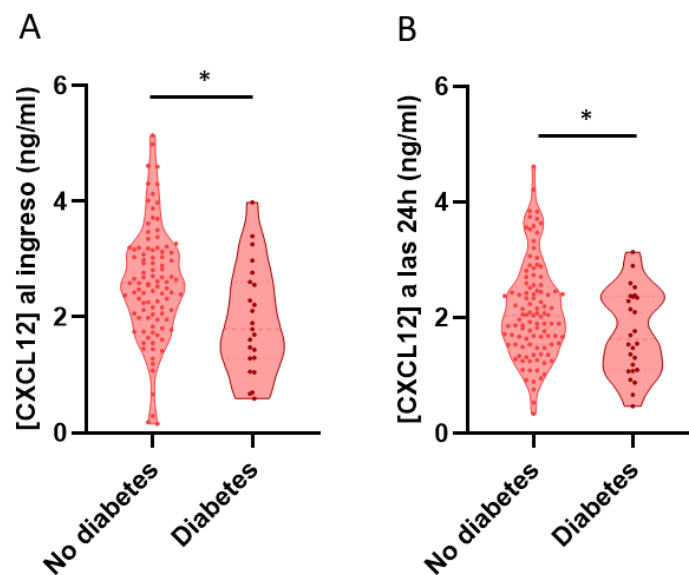


Figura 27: Relación entre la concentración plasmática de CXCL12 al ingreso (A) y a las 24 horas (B) y diabetes mellitus. Datos representados con diagramas de violín. El análisis se ha realizado mediante una regresión logística (* $P < 0,05$).

4.3.2. Correlación entre la concentración plasmática de CXCL12 y la gravedad neurológica y radiológica al ingreso.

En el análisis univariante, se observa una fuerte tendencia, pero sin diferencias estadísticamente significativas, a presentar una mayor gravedad al ingreso en pacientes

que tienen una menor concentración plasmática de CXCL12 ($\beta = -1,26$ por ng/ml, IC95% $-2,69 - 0,16$, $p = 0,08$, Figura 28). En el modelo predictivo con el método *backward stepwise* (regresión paso a paso con exclusión secuencial), en el que se eliminan las variables del análisis de forma secuencial si la $p > 0,10$, las dos variables que mejor predicen en nuestra cohorte una menor puntuación en la escala NIHSS al ingreso son el sexo (como se ha descrito previamente, las mujeres presentan una mayor gravedad al ingreso) y la concentración de CXCL12 al ingreso. Los datos se resumen en la Tabla 15.

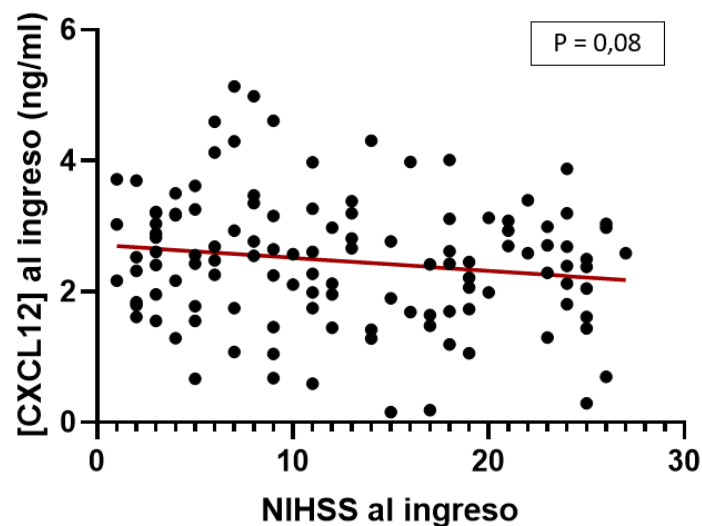


Figura 28: Correlación entre la gravedad neurológica (medida con la escala NIHSS) y la concentración plasmática de CXCL12 (ng/ml) al ingreso. Análisis realizado con regresión lineal. Se indica el valor P.

Variable	Coefficiente β (IC95%)	Valor P
Sexo masculino	-2,75 (-5,53 – 0,03)	0,05
[CXCL12] al ingreso (ng/ml)	-1,18 (-2,60 – 0,23)	0,10

Tabla 15: Variables con mayor asociación con la gravedad neurológica al ingreso (escala NIHSS) en el modelo predictivo mediante el método *backward stepwise*, excluyendo las variables con $p > 0,10$. Se excluyen del modelo de regresión lineal la edad ($p = 0,54$), diabetes ($p = 0,32$), ictus diurno ($p = 0,48$) y el tiempo inicio-puerta (min) ($p = 0,32$).

En cuanto a la afectación radiológica al ingreso, existe una tendencia a presentar una mayor área de isquemia precoz, es decir, menor puntuación en la escala de ASPECTS, con niveles más bajos de CXCL12 (análisis con regresión de cuantiles utilizando la mediana). Esto se observa tanto si se analiza el conjunto de pacientes con ictus de circulación anterior ($N = 124$, $\beta = 0,29$ por ng/ml (IC95% $-0,14 - 0,61$), $p = 0,06$), o si seleccionamos aquellos tratados con trombectomía mecánica ($N = 92$, $\beta = 0,35$ por ng/ml, IC95% $-0,15 - 0,86$, $p = 0,18$).

También se ha analizado la relación entre la concentración de CXCL12 al ingreso y el grado de circulación colateral en el AngioTC realizado en aquellos pacientes tratados con trombectomía mecánica por oclusión a nivel de la carótida intracraneal (incluyendo "T" carotídea), M1 y M2 de los que se dispone de la información del grado de colaterales ($N = 69$). En aquellos pacientes con menor circulación colateral (grados 0-1 de la escala de Tan) hay una tendencia a presentar menor concentración de CXCL12: media 1,96ng/ml, frente a una concentración de 2,60 ng/ml en los pacientes con colateralidad grado 2 y 2,33ng/ml en los pacientes con colateralidad grado 3, pero no se han identificado diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos: en la regresión logística ordinal se observa una OR de 1,24 (IC95% $0,84 - 1,85$, $p = 0,28$) y en la prueba de Kruskal-Wallis entre los tres grupos no se observan diferencias significativas ($p = 0,19$). Estos datos se resumen en la Figura 29.

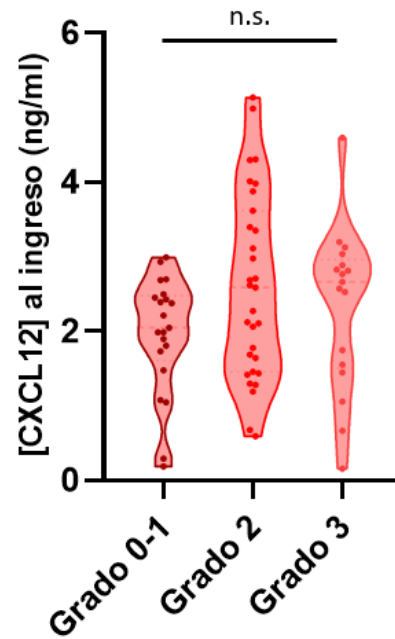


Figura 29: Correlación entre el grado de colateralidad de la escala de Tan y la concentración de CXCL12. Datos representados con diagrama de violín. El análisis se ha realizado mediante una regresión logística ordinal y un test de Kruskal-Wallis (n.s.: no significativo).

4.3.3. Correlación entre la concentración de CXCL12 con el momento de inicio del ictus (diurno/nocturno)

En la cohorte de nuestro estudio, no se han observado diferencias de la concentración plasmática de CXCL12 al ingreso en función de la hora de atención de los pacientes con ictus isquémico, ni al establecer un ictus diurno como aquel con inicio entre las 08:00h y el 19:59, ni al subdividir el día en tres secciones (8h-16h-24h). Estos datos se resumen en la Tabla 16.

Variable	OR o RRR (IC95%)	Valor P
Diurno (8:00-19:59h), OR	1,21 (0,80 – 1,86)	0,36
Hora (00h-8h,8h-16h,16h-00h)		0,60
** 16:00-23:59 vs. 08:00-15:59, RRR	1,07 (0,70 – 1,62)	0,77
** 00:00-07:59 vs. 08:00-15:59, RRR	0,80 (0,47 – 1,35)	0,40

Tabla 16: Correlación entre la concentración plasmática de CXCL12 al ingreso con la hora de inicio del ictus categorizada. Las variables categóricas binarias se han analizado con regresión logística (se indica el *odds ratio*) y las categóricas con más de dos grupos con una regresión logística multinomial (se indica la razón de riesgo relativo (RRR)).

4.3.4. Correlación entre la concentración de CXCL12 y el tipo de tratamiento realizado en fase aguda.

Con respecto al tratamiento en fase aguda, existe una tendencia a presentar una concentración de CXCL12 inferior en pacientes con tratamiento tanto con fibrinólisis IV (N = 58, media 2,42ng/ml) como con trombectomía mecánica (N = 86, media 2,39mg/ml) con respecto a los pacientes que no recibieron tratamiento recanalizador (N = 11, media 2,80ng/ml). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (tratamiento fibrinolítico: OR 0,90, IC95% 0,63 – 1,31, p = 0,59; trombectomía mecánica: OR 0,76, IC95% 0,51 – 1,15, p = 0,20).

4.3.5. Correlación entre la concentración de CXCL12 en plasma y las principales variables analíticas

El siguiente paso es conocer si la concentración de CXCL12 plasmática tiene alguna relación con el número de células sanguíneas, en especial con los neutrófilos, y con las principales determinaciones analíticas realizadas.

No se han objetivado correlaciones significativas entre la concentración de CXCL12 y el número de leucocitos totales o de las distintas subpoblaciones (incluyendo los

neutrófilos) tanto al ingreso (Tabla 17) como a las 24 horas (Tabla 18). Tampoco se ha observado una correlación entre los niveles plasmáticos de CXCL12 y los de proteína C reactiva (marcador inespecífico de inflamación). Únicamente se ha observado una correlación significativa entre el número de plaquetas y CXCL12 al ingreso, que no se mantiene a las 24 horas y que es de significado clínico dudoso ya que todos los pacientes presentan valores de plaquetas en rango normal (Figura 30).

Variable	Coefficiente β (IC95%)	Valor P
Glucemia (mg/dl)	-5,25 (-12,6 – 2,06)	0,15
Creatinina (mg/dl)	0,14 (-0,04 – 0,07)	0,62
Proteína C reactiva (mg/dl)	0,15 (-0,08 – 0,38)	0,22
Hemoglobina (mg/dl)	1,21 (-0,81 – 3,23)	0,24
Leucocitos/ μ l x 1000	-0,08 (-0,53 – 0,37)	0,72
Neutrófilos/ μ l x 1000	0,01 (-0,45 – 0,46)	0,98
Linfocitos/ μ l x 1000	0,02 (-0,14 – 0,19)	0,77
Monocitos/ μ l x 1000	0,03 (-0,01 – 0,08)	0,14
Plaquetas/ μ l x 1000	-14,95 (-26,8 - -3,1)	0,01

Tabla 17: Correlación entre la concentración de CXCL12 al ingreso y el número de leucocitos, plaquetas y las principales variables analíticas. Análisis realizado con regresión lineal.

Variable	Coefficiente β (IC95%)	Valor P
Leucocitos/ μ l x 1000	-0,11 (-0,58 – 0,36)	0,64
Neutrófilos/ μ l x 1000	- 0,16 (-0,61 – 0,29)	0,49
Linfocitos/ μ l x 1000	0,17 (-0,03 – 0,38)	0,10
Monocitos/ μ l x 1000	0,08 (-0,02 – 0,19)	0,12
Plaquetas/ μ l x 1000	-7,98 (-21,6 – 5,6)	0,25
Proteína C reactiva (mg/dl)	-0,23 (-0,75 – 0,29)	0,38

Tabla 18: Correlación entre la concentración de CXCL12 plasmática a las 24 horas y el número de leucocitos y plaquetas. Análisis realizado con regresión lineal.

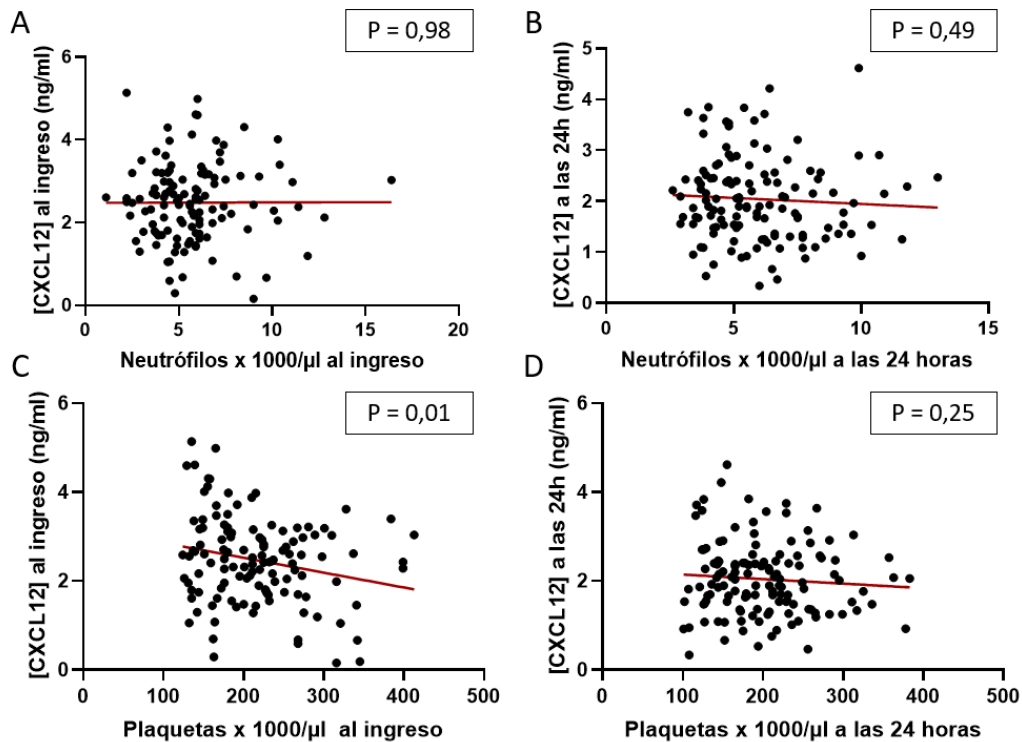


Figura 30: Correlación entre la concentración plasmática de CXCL12 al ingreso y a las 24 horas con el número de neutrófilos (A y B) y plaquetas (C y D) en sangre. En el caso de la correlación entre CXCL12 y plaquetas al ingreso se observa una asociación estadísticamente significativa ($p = 0,01$, $R^2 = 5\%$), en el resto de casos no se observa ninguna correlación. Análisis realizado con regresión lineal.

4.3.6. Análisis de la evolución de la concentración plasmática de CXCL12

Por otra parte, se ha realizado un estudio para valorar la evolución de la concentración de CXCL12 en los distintos tiempos (ingreso, 24 horas y tres meses). Para ello, se ha realizado una prueba t de Student de muestras emparejadas, en la que se observa que hay una menor concentración de CXCL12 a las 24 horas que al ingreso ($N = 119$, diferencia de medias $-0,34\text{ng/ml}$, IC95% $-0,50 - -0,18$), $p < 0,01$) y a los 3 meses ($N = 47$, diferencia de medias $-0,43\text{ng/ml}$, IC95% $-0,70 - -0,16$, $p < 0,01$), pero no se observan diferencias significativas entre los valores al ingreso y a los tres meses ($N = 37$, diferencia de medias $-0,27\text{ng/ml}$ ($-0,59 - -0,04$), $p = 0,09$). Estos datos se muestran en la Figura 31.

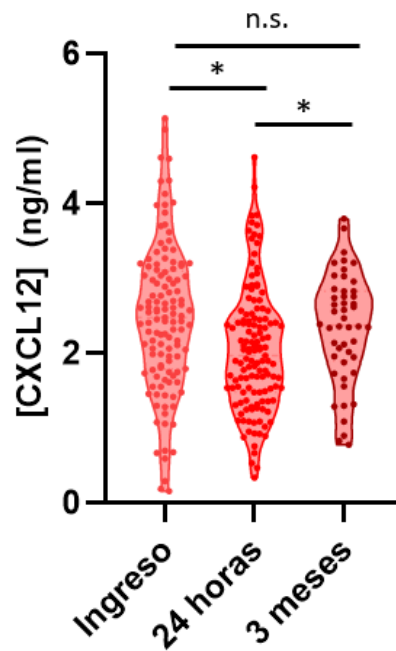


Figura 31: Gráfico que representa la evolución de la concentración de CXCL12 al ingreso, a las 24 horas y a los tres meses. La representación se ha realizado con un diagrama de violín. Análisis realizado con prueba t de Student para muestras emparejadas. (* $P < 0,05$; n.s.: no significativo).

4.3.7. Correlación de la concentración plasmática de CXCL12 con las principales variables clínicas y radiológicas durante el ingreso

4.3.7.1. Evolución clínica durante el ingreso

Desde el punto de vista clínico, no se han observado una correlación significativa entre la concentración plasmática de CXCL12 al ingreso o a las 24 horas y la gravedad neurológica medida por la escala NIHSS tanto a las 24 horas como a los 7 días/alta. De igual manera, no se han objetivado diferencias que asocien CXCL12 con la posibilidad de conseguir una independencia funcional al alta. Estos datos se resumen en la Tabla 19.

Variable	[CXCL12] al ingreso OR o β (IC95%)	P	[CXCL12] a las 24h OR o β (IC95%)	P
NIHSS a las 24h, β	-0,88 (-2,26 – 0,50)	0,21	-1,26 (-2,81 – 0,28)	0,11
NIHSS a los 7d/alta, β	-0,63 (-1,93 – 0,68)	0,34	-0,98 (-2,34 – 0,38)	0,16
Independencia 7d/alta, OR	1,14 (0,79 – 1,65)	0,49	1,25 (0,82 – 1,90)	0,31
Infección, OR	1,00 (0,63 – 1,59)	0,99	0,72 (0,39 – 1,30)	0,27

Tabla 19: Correlación entre la evolución clínica durante la estancia hospitalaria y la concentración plasmática de CXCL12 al ingreso y a las 24 horas. Análisis realizado con regresión lineal (se expresa el coeficiente β por ng/ml) o logística (se indica la *odds ratio* por ng/ml).

Tampoco se ha observado una correlación entre CXCL12 y la posibilidad de presentar una infección durante el ingreso. En el análisis predictivo, el NIHSS al ingreso es la única variable que se asocia de forma significativa con la posibilidad de tener una infección (OR 1,10, IC95% 1,04 – 1,18, $p < 0,01$). No es posible obtener conclusiones entre la relación de CXCL12 y la mortalidad durante la estancia hospitalaria por el escaso número de pacientes fallecidos en este momento (N = 4).

4.3.7.2. Evolución radiológica

En relación con el volumen de infarto, se ha analizado la asociación de los niveles de CXCL12 plasmáticos con distintos métodos:

1. En primer lugar, se ha analizado de forma directa el volumen de infarto medido en ml y la concentración de CXCL12 mediante una regresión lineal. Se ha observado una fuerte tendencia a presentar menor volumen de infarto con niveles plasmáticos mayores de CXCL12 al ingreso (coeficiente $\beta = -11,8\text{ml}$ (por ng/ml), IC95% -24,4 – 0,85ml, $p = 0,07$, Figura 32A), y sí se ha objetivado una correlación estadísticamente significativa con la concentración de CXCL12 a las 24 horas, observándose un volumen de infarto inferior en los pacientes con niveles más altos de CXCL12 (coeficiente $\beta = -15,7\text{ml}$ (por ng/ml), IC95% -29,7 – -1,63, $p = 0,03$, Figura 32B).

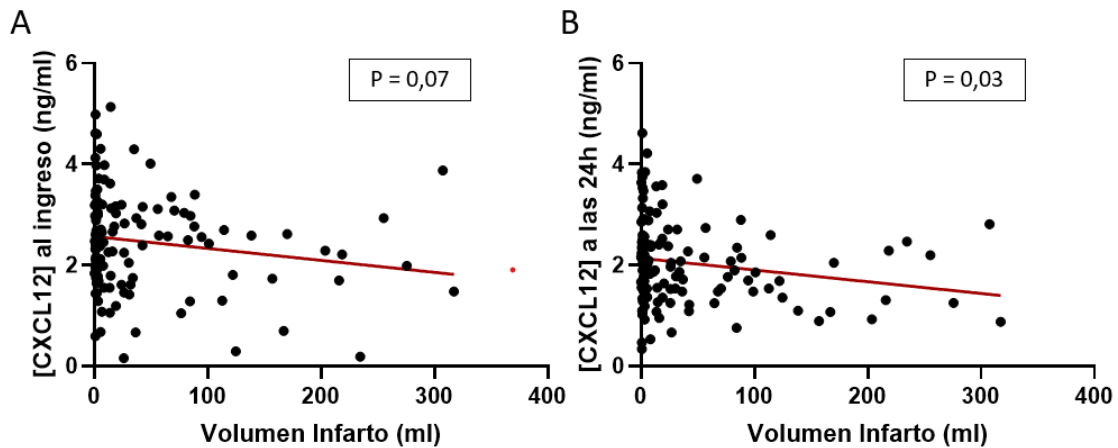


Figura 32: Correlación entre la concentración de CXCL12 plasmática al ingreso (A) y a las 24 horas (B) con el volumen de infarto (ml). Análisis realizado con regresión lineal. Se indican los valores P.

En el análisis predictivo, las variables que mejor predicen la posibilidad de presentar mayor volumen de infarto son el NIHSS al ingreso y padecer diabetes mellitus (Tabla 20).

Variable	Coefficiente (IC95%)	Valor P
NIHSS al ingreso (por cada punto)	3,95ml (2,52 – 5,38)	<0,01
Diabetes	33,57ml (4,93 – 62,21)	0,02

Tabla 20: Variables con mayor asociación con el volumen de infarto a las 24-72 horas en el modelo predictivo mediante el método *backward stepwise*, excluyendo las variables con $p > 0.10$. Se excluyen del modelo la edad ($p = 0,89$), sexo ($p = 0,35$), ictus diurno ($p = 0,50$), [CXCL12] al ingreso ($p = 0,60$), [CXCL12] a las 24 horas ($p = 0,27$), tiempo inicio-puerta ($p = 0,11$), tratamiento con fibrinólisis IV ($p = 0,53$), tratamiento con trombectomía mecánica ($p = 0,88$).

2. Como se expuso en el análisis descriptivo, la distribución del volumen de infarto no se distribuye de forma homogénea, siendo el tamaño notablemente mayor en el último tercil. Por ello, se ha realizado un análisis categorizado para valorar diferencias distribuyendo a la muestra en tres terciles y también comparando el tercil superior y el resto de pacientes:

* Para comparar el conjunto de pacientes subdivididos en terciles, se ha utilizado una regresión logística ordinal. Se ha objetivado una diferencia estadísticamente significativa con concentraciones más bajas de CXCL12 a las 24 horas (OR 0,58 por ng/ml, IC95% 0,39 – 0,87, $p < 0,01$ Figura 33B) y también una fuerte tendencia a presentar mayor volumen de infarto con menor concentración plasmática de CXCL12 al ingreso (OR 0,73 por ng/ml, IC95% 0,52 – 1,02, $p = 0,07$, Figura 33A).

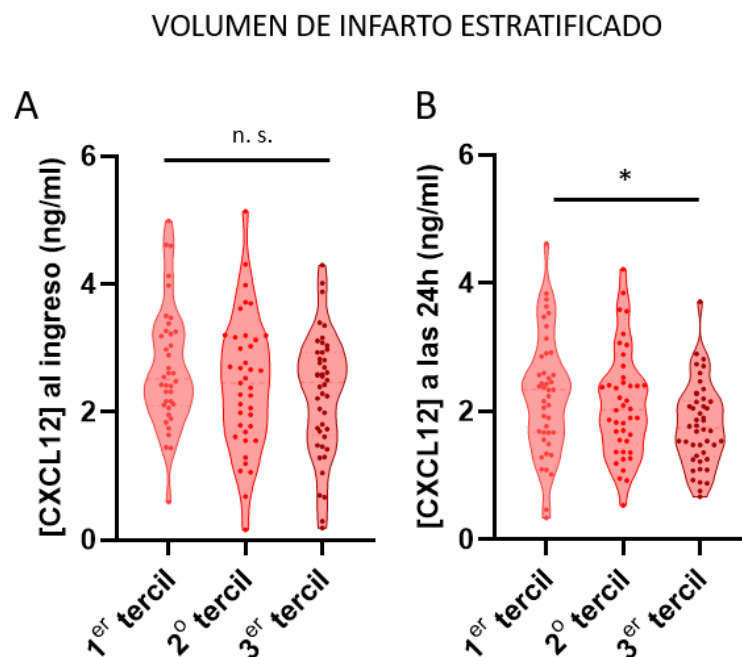


Figura 33: Relación entre la concentración plasmática de CXCL12 al ingreso (A) y a las 24 horas (B) y el volumen de infarto estratificado. Se categorizado el volumen de infarto en tres grupos, siendo el primer tercil el grupo con ictus de menor tamaño. Los datos representados con un diagrama de violín. En análisis se ha realizado mediante una regresión logística ordinal (* $P < 0,05$, n.s: no significativo).

* Dado que el principal aumento de volumen de infarto se da entre los pacientes del último tercil, se ha realizado un análisis entre este grupo y el resto de los pacientes. El grupo de pacientes con mayor volumen de infarto presentan niveles más bajos de CXCL12 a las 24 horas (OR 0,52 por ng/ml, IC95% 0,31 – 0,85, $p = 0,01$, Figura 34B) y se observa la misma tendencia, pero no significativa, con la concentración de CXCL12 al

ingreso (OR 0,74 por ng/ml, IC95% 0,50 – 1,10, $p = 0,14$, Figura 34A). En el modelo predictivo, las principales variables relacionadas con un mayor volumen de infarto son la gravedad al ingreso medida por la escala NIHSS ($p < 0,01$), el tiempo inicio-puerta (min) ($p = 0,02$) y la concentración de CXCL12 a las 24 horas ($p = 0,04$). Estos datos se resumen en la Tabla 21.

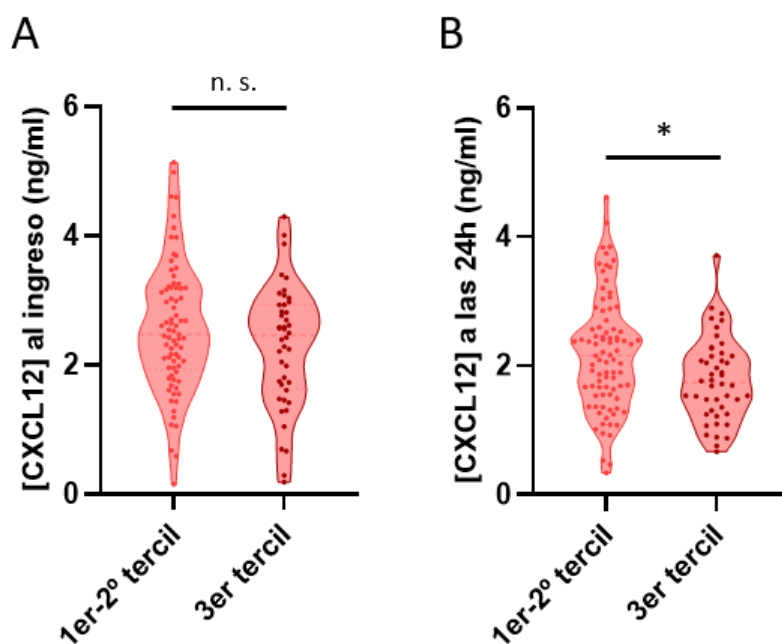


Figura 34: Relación entre la concentración plasmática de CXCL12 al ingreso (A) y a las 24 horas (B) y el volumen de infarto estratificado. Se ha categorizado el volumen de infarto en dos, comparando el último tercil (grupo con ictus de mayor volumen) con el resto de pacientes. Los datos representados con un diagrama de violín. En análisis se ha realizado mediante una regresión logística (* $P < 0,05$, n.s: no significativo).

Variable	Odds Ratio (IC95%)	Valor P
NIHSS al ingreso	1,15 (1,08 – 1,23)	<0,01
Tiempo inicio-puerta (min)	1,008 (1,002 – 1,014)	0,02
[CXCL12] a las 24 horas (ng/ml)	0,52 (0,28 – 0,97)	0,04

Tabla 21: Variables con mayor asociación con la posibilidad de presentar una mayor volumen de infarto categorizado (último tercil vs. Primer-segundo tercil) en el modelo predictivo mediante el método *backwards stepwise*, excluyendo las variables con $p > 0,10$. Se excluyen del modelo la edad ($p = 0,97$), sexo ($p = 0,65$), diabetes ($p = 0,71$), ictus diurno ($p = 0,31$), [CXCL12] al ingreso ($p = 0,68$), tratamiento con fibrinólisis IV ($p = 0,58$) y tratamiento con tromboectomía mecánica ($p = 0,22$).

Por último, se ha analizado la correlación entre la concentración de CXCL12 plasmática y la posibilidad de presentar una transformación hemorrágica. En la población estudiada, se observa una mayor posibilidad de presentar una transformación hemorrágica (incluyendo cualquier tipo y gravedad) con concentraciones menores de CXCL12 a las 24 horas (OR 0,56 por ng/ml, IC95% 0,33 – 0,97, $p = 0,04$, Figura 35B); no se observan diferencias estadísticamente significativas con la concentración de CXCL12 al ingreso (OR 0,69 por ng/ml, IC95% 0,45 – 1,08, $p = 0,11$, Figura 35A), si bien la tendencia es la misma. En el modelo predictivo, las dos variables que mejor predicen la posibilidad de tener una transformación hemorrágica son la diabetes ($p = 0,048$) y el tratamiento con trombectomía mecánica ($p < 0,01$) (Tabla 22). No es posible establecer una conclusión entre la relación de los niveles de CXCL12 y la posibilidad de presentar una transformación hemorrágica sintomática dado el escaso número observado en nuestra serie ($N = 6$), aunque la tendencia es la misma: OR 0,66 si analizamos la concentración de CXCL12 al ingreso y OR 0,68 con la concentración de CXCL12 a las 24 horas.

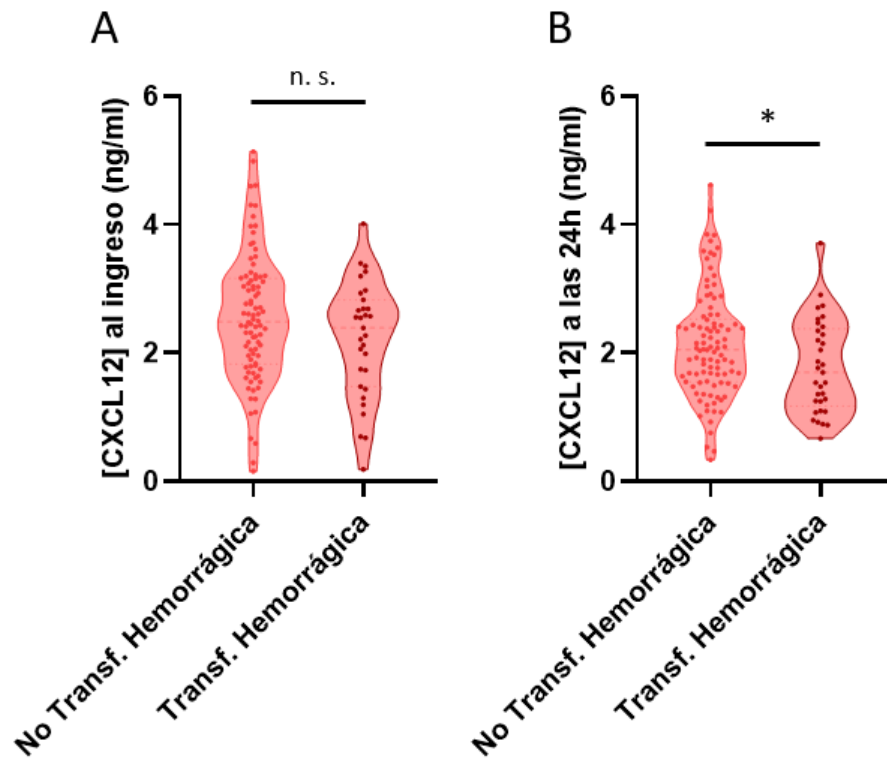


Figura 35: Relación entre la concentración plasmática de CXCL12 al ingreso (A) y a las 24 horas (B) y la posibilidad de presentar una transformación hemorrágica (cualquier tipo). Los datos representados con diagrama de violín. En análisis se ha realizado mediante una regresión logística (* $P < 0,05$, n.s: no significativo).

Variable	Odds Ratio (IC95%)	Valor P
Trombectomía mecánica	7,62 (1,68 – 34,51)	<0,01
Diabetes	2,80 (1,01 – 7,77)	0,048

Tabla 22: Variables con mayor asociación con la posibilidad de presentar una transformación hemorrágica (cualquier tipo) en el modelo predictivo mediante el método *backward stepwise*, excluyendo las variables con $p > 0.10$. Se excluyen del modelo la edad ($p = 0,18$), sexo ($p = 0,89$), ictus diurno ($p = 0,81$), NIHSS al ingreso ($p = 0,17$), [CXCL12] al ingreso ($p = 0,48$), [CXCL12] a las 24 horas ($p = 0,17$), tiempo inicio-puerta ($p = 0,25$), tratamiento con fibrinólisis IV ($p = 0,22$).

4.3.8. Correlación entre la concentración plasmática de CXCL12 y el pronóstico a los tres meses

Por último, se ha analizado la relación entre la concentración de CXCL12 y la evolución clínica de los pacientes a los tres meses. Para valorar la capacidad funcional se ha utilizado la escala de Rankin modificada.

- En el análisis dicotómico entre pacientes con independencia ($ERm \leq 2$) y paciente dependientes o fallecidos ($ERm > 2$) a los tres meses, no se han identificado diferencias significativas entre los niveles de CXCL12 al ingreso (OR 1,16 por ng/ml, IC95% 0,80 – 1,68, $p = 0,44$), a las 24 horas (OR 1,13, IC95% 0,74 – 1,75, $p = 0,57$) ni a los tres meses, aunque en este último tiempo si se aprecia una tendencia a un mejor pronóstico con niveles más elevados ($n = 48$, OR 1,74 por ng/ml, IC95% 0,73 – 4,19, $p = 0,21$). Cabe destacar que el número de muestras analizadas a los tres meses es inferior ($N = 48$) debido a las restricciones sufridas por la pandemia por la COVID-19, lo que limita la potencia estadística para obtener conclusiones. Estos datos se muestran en la Tabla 23 y en la Figura 36.

Variable	ERm ≤ 2	ERm > 2	OR (IC95%)	P
[CXCL12] al ingreso (ng/ml)	2,53	2,37	1,16 (0,80 – 1,68)	0,44
[CXCL12] a las 24 horas (ng/ml)	2,08	1,99	1,13 (0,74 – 1,75)	0,57
[CXCL12] a los 3 meses (ng/ml)	2,42	2,13	1,74 (0,73 – 4,19)	0,21

Tabla 23: Análisis entre la capacidad funcional de los pacientes a los 3 meses y la concentración de CXCL12 al ingreso, a las 24 horas y a los tres meses. Se ha dividido el conjunto de pacientes en dos grupos: aquellos con independencia funcional ($ERm \leq 2$) y aquellos dependientes o fallecidos ($ERm > 2$). El análisis se ha realizado con regresión logística. ERm: Escala de Rankin modificada, OR: *odds ratio*.

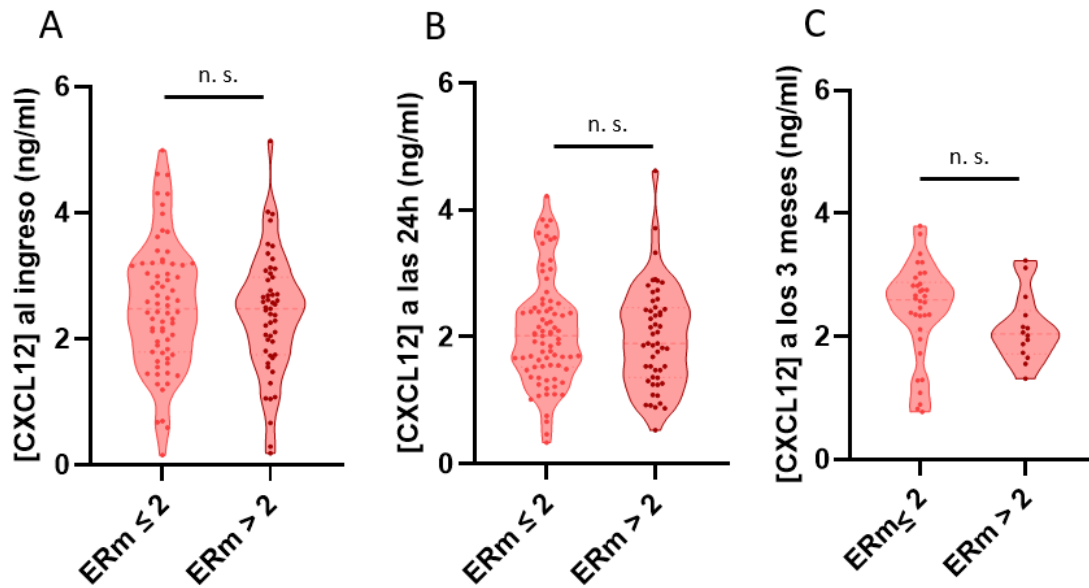


Figura 36: Correlación entre la concentración plasmática de CXCL12 al ingreso (A) y a las 24 horas (B) y a los 3 meses (C) y la posibilidad de conseguir una independencia funcional a los tres meses. Se divide a la muestra en dos grupos, los pacientes con independencia funcional ($ERm \leq 2$) y aquellos dependientes o fallecidos ($ERm > 2$). Los datos representados con un diagrama de violín. En análisis se ha realizado mediante una regresión logística (n.s.: no significativo).

En el análisis predictivo, las dos variables que más se relacionan con la posibilidad de conseguir una independencia funcional son la edad y la gravedad al ingreso medida por la escala NIHSS (Tabla 24).

Variable	Odds Ratio (IC95%)	Valor P
Edad, por año	0,95 (0,92 – 0,99)	<0,01
NIHSS en urgencias, por punto	0,86 (0,81 – 0,92)	<0,01

Tabla 24: Variables con mayor asociación con la probabilidad de ser independiente a los tres meses ($ERm \leq 2$) en el modelo predictivo mediante el método *backward stepwise*, excluyendo las variables con $p > 0.10$. Se excluyen del modelo el sexo ($p = 0,97$), diabetes ($p = 0,30$), ictus diurno ($p = 0,95$), [CXCL12] al ingreso ($p = 0,19$), [CXCL12] a las 24 horas ($p = 0,81$), tiempo inicio-puerta ($p = 0,18$), tratamiento con fibrinólisis IV ($p = 0,17$) o con trombectomía mecánica ($p = 0,65$).

- Tampoco se ha observado una correlación entre la concentración de CXCL12 y el pronóstico medido por la ERM con un *shift analysis* mediante regresión logística ordinal (Tabla 25).

Variable	Odds Ratio (IC95%)	Valor P
[CXCL12] al ingreso (ng/ml)	0,94 (0,67 – 1,32)	0,71
[CXCL12] a las 24 horas (ng/ml)	0,89 (0,61 – 1,29)	0,54
[CXCL12] a los tres meses (ng/ml)	0,65 (0,33 – 1,29)	0,22

Tabla 25: *Shift analysis* de la Escala de Rankin modificada y la concentración de CXCL12 al ingreso, a las 24 horas y a los tres meses. Análisis realizado con regresión logística ordinal.

En la serie analizada, hay un número bajo de pacientes fallecidos ($n = 9$), por lo que no pueden establecerse conclusiones relevantes. En el análisis univariante no existen diferencias significativas en la concentración de CXCL12 tanto al ingreso (OR 1,35, IC95% 0,68 – 2,70, $p = 0,39$) como a las 24 horas (OR 1,08, IC95% 0,46 – 2,56, $p = 0,86$). No es posible realizar un análisis predictivo por el reducido número de eventos.

4.4. Estudio de la relación de la concentración de CXCL12 plasmática con el fenotipo de los neutrófilos y la concentración plasmática de NETs

Una vez realizado el análisis para determinar la influencia de la concentración de CXCL12 con el pronóstico neurológico y radiológico, el siguiente paso es valorar si existe alguna asociación entre la concentración de CXCL12 y el fenotipo de los neutrófilos y con la concentración plasmática de NETs.

4.4.1. Correlación entre la concentración plasmática de CXCL12 y el fenotipo de los neutrófilos.

Para valorar el fenotipo de los neutrófilos, diferenciando los neutrófilos jóvenes (*fresh*) o envejecidos (*aged*), se ha realizado una valoración indirecta a través del grado de segmentación del núcleo celular. Como se ha expuesto previamente, los neutrófilos jóvenes presentan una menor segmentación nuclear, mientras los envejecidos tienen un mayor número de lóbulos o segmentaciones del núcleo.

Se han valorado un total de 199 frotis, de los cuales 42 finalmente no han podido ser analizados por fallos en el procesamiento. De los 157 válidos, 61 eran frotis de muestras obtenidas al ingreso, 77 a las 24 horas del ingreso y 19 a los 3 meses (Figura 37).

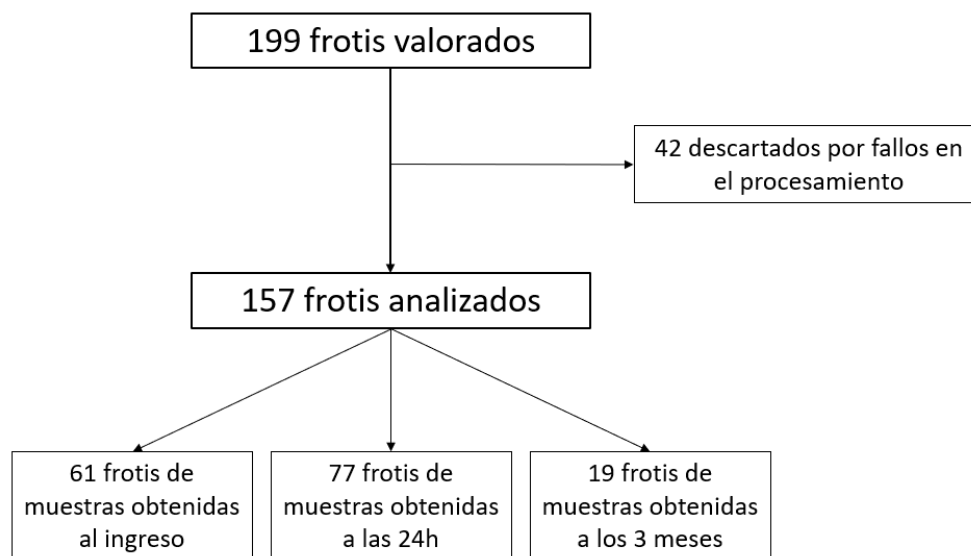


Figura 37: Cuadro explicativo en el que se describen los frotis valorados y el número obtenidas en cada tiempo.

Al ingreso, la media de segmentaciones del núcleo de los neutrófilos fue de $3,33 \pm 0,09$, a las 24 horas de $3,30 \pm 0,08$ y a los tres meses de $3,34 \pm 0,07$. Estadísticamente no se han identificado diferencias significativas entre los distintos tiempos de medición,

siendo la diferencia de medias entre las muestras al ingreso y a las 24h de 0,03 segmentaciones (IC95% -0,001 – 0,06, $p = 0,06$), y la diferencia de medias entre las muestras a las 24 horas y a los tres meses de 0,04 segmentaciones (IC95% -0,001 – 0,08, $p = 0,06$). Estos datos sugieren una menor segmentación de los neutrófilos a las 24 horas del ictus, y por ello una mayor presencia de neutrófilos jóvenes, pero la magnitud del efecto es escasa. Los datos se muestran en la Tabla 26 y en la Figura 38.

Segmentaciones del núcleo	Ingreso (N = 61)	24 horas (N = 77)	3 meses (N = 19)
3 o menos (media, \pm DE)	69,1 (\pm 8,1)	71,2 (\pm 6,7)	67,7 (\pm 6,4)
4 núcleos (media, \pm DE)	28,5 (\pm 7,1)	27,1 (\pm 6,0)	30,4 (\pm 6,0)
5 o más (media, \pm DE)	2,4 (\pm 1,6)	1,7 (\pm 1,4)	1,8 (\pm 1,0)
Media de núcleos (\pm DE)	3,33 (\pm 0,09)	3,30 (\pm 0,08)	3,34 (\pm 0,07)

Tabla 26: Análisis descriptivo del número de segmentos del núcleo de los neutrófilos, analizando 100 neutrófilos por frotis. Se expone la media de neutrófilos con 3 o menos, 4 y 5 o más segmentaciones. También se indica el número medio de lobulaciones del núcleo de los neutrófilos en cada tiempo.

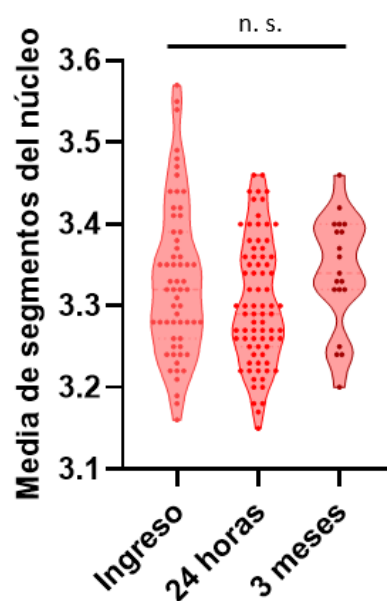


Figura 38: Número de segmentaciones del núcleo de los neutrófilos al ingreso, a las 24 horas y a los tres meses. Se muestran los datos con un diagrama de violín. n.s: no significativo.

Con respecto a las variaciones del fenotipo en función del momento del ictus (diurno vs. nocturno), no se han identificado cambios significativos en el número de lobulaciones del núcleo de los neutrófilos. En la muestra al ingreso (que es la que tiene más diferencias en la hora de recogida, el resto se han obtenido a las $8h \pm 3h$) hay una tendencia a presentar menos segmentación en los ictus diurnos (3,32 en los diurnos vs. 3,36 en los nocturnos, $p = 0,08$). Estos datos se muestran en la Tabla 27.

	Diurno	Nocturno	P
Media lóbulos al ingreso (\pmDE)	3,32 \pm 0,01 (N = 48)	3,36 \pm 0,03 (N = 13)	0,08
Media lóbulos a las 24h (\pmDE)	3,30 \pm 0,01 (N = 60)	3,29 \pm 0,02 (N = 17)	0,49
Media lóbulos a los 3 meses (\pmDE)	3,34 \pm 0,02 (N = 12)	3,33 \pm 0,02 (N = 7)	0,44

Tabla 27: Análisis de la media de lóbulos del núcleo de los neutrófilos en función del momento de inicio del ictus (diurno/nocturno). Análisis realizado mediante test de Mann-Whitney.

Por último, se ha analizado la relación entre la concentración de CXCL12 y el número de lobulaciones del núcleo de los neutrófilos, sin identificarse una correlación estadísticamente significativa a ningún tiempo (datos mostrados en la Tabla 28 y la Figura 39). Por lo tanto, no se han observado diferencias del fenotipo del neutrófilo mediante este método en función de la concentración plasmática de CXCL12.

	Coefficiente β (IC95%)	Valor P
Ingreso	0,01 (-0,01 – 0,04)	0,30
24 horas	-0,01 (-0,02 – 0,02)	0,85
3 meses	-0,03 (-0,08 – 0,02)	0,20

Tabla 28: Correlación entre la concentración de CXCL12 a distintos tiempos (ingreso, 24 horas y 3 meses) y la media de lobulaciones del núcleo de los neutrófilos. Análisis realizado con regresión lineal.

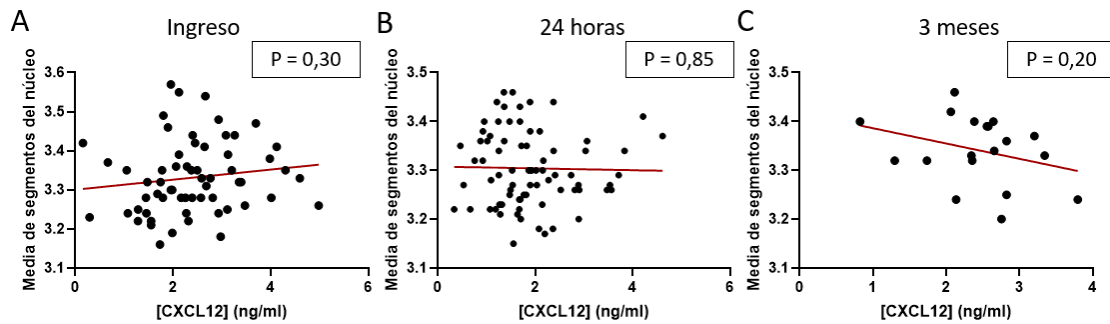


Figura 39: Correlación entre la concentración de CXCL12 plasmática al ingreso (A) y a las 24 horas (B) y a los 3 meses (C) con la media de lóbulos del núcleo de los neutrófilos en el frotis. Análisis realizado con regresión lineal, no se observan una correlación significativa. Se indican los valores P.

4.4.2. Correlación entre la concentración plasmática de CXCL12 y la concentración plasmática de NETs

Uno de los principales mecanismos de los neutrófilos implicado en la inmunotrombosis es la producción de NETs. Por ello, el siguiente objetivo es explorar si existe una correlación entre la concentración plasmática de CXCL12 y NETs que pudiera sugerir una relación entre el fenotipo de los neutrófilos y la NETosis.

Como marcadores de la NETosis, se han realizado en la muestra obtenida al ingreso determinaciones de la mieloperoxidasa (MPO), de la elastasa del neutrófilo (NE por sus siglas en inglés) y del ADN libre (cfDNA, por sus siglas en inglés) De los tres marcadores, el ADN libre es el menos específico del proceso de NETosis. La concentración plasmática de NE y MPO no sigue una distribución normal, por lo que en el análisis se ha realizado utilizando usando el logaritmo del valor. Los datos se resumen en la Tabla 29.

Variable	Media (\pm DE)
ADN libre, ng/ml	764,9 (129,9)
Mieloperoxidasa, ng/ml (log)	4,00 (0,71)
Elastasa del neutrófilo, ng/ml (log)	3,65 (0,59)

Tabla 29: Descripción de la media y desviación estándar de la concentración plasmática de ADN libre, mieloperoxidasa y elastasa del neutrófilo.

Por último, se ha observado una correlación positiva entre los niveles de CXCL12 al ingreso y la concentración de ADN libre ($\beta = 31,1$ ng/ml por ng/ml, IC95% 5,64 – 58,2, $p = 0,02$, $R^2 = 0,06$) y de MPO ($\beta = 0,14$ (log) por ng/ml, IC95% 0,01 – 0,27, $p = 0,04$, $R^2 = 0,04$), y existe la misma tendencia en el caso de la elastasa, pero no estadísticamente significativa ($\beta = 0,10$ (log) por ng/ml, IC95% -0,01 – 0,21, $p = 0,06$, $R^2 = 0,03$). Estos datos se muestran en la Figura 40.

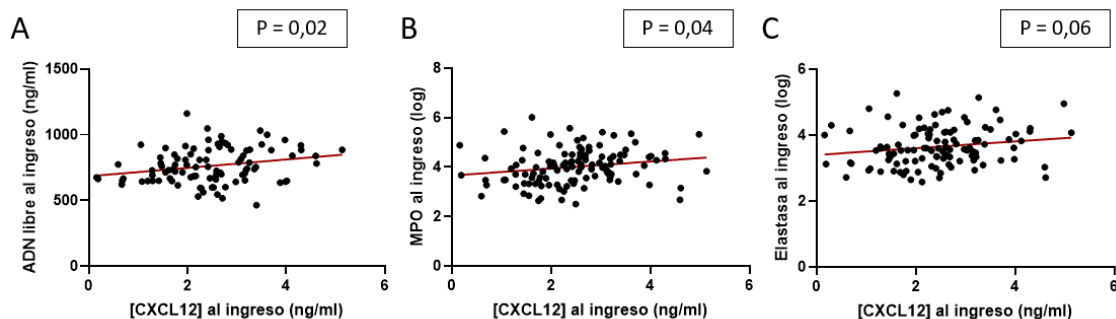


Figura 40: Correlación entre la concentración de CXCL12 plasmática al ingreso (A) y a las 24 horas (B) y a los 3 meses (C) con la concentración plasmática de NETs. Análisis realizado con regresión lineal. Se indican los valores P.

DISCUSIÓN



5. DISCUSIÓN

Las enfermedades cerebrovasculares son una de las principales causas de muerte y de discapacidad a nivel mundial. Los avances en el tratamiento en fase aguda de los pacientes con ictus isquémico han mejorado el pronóstico en las últimas décadas, pero siguen existiendo importantes limitaciones. Por una parte, la fibrinólisis intravenosa tiene una ventana temporal terapéutica muy estrecha, está contraindicada en situaciones que puedan condicionar un aumento del riesgo hemorrágico y hay pacientes en los que, pese a recibir dicho tratamiento, no se consigue una recanalización arterial o una mejoría clínica. Por otra parte, la trombectomía mecánica ha revolucionado el tratamiento de los pacientes con oclusión de gran vaso, que son los que tienen una mayor morbi-mortalidad, pero tiene un alto coste y es necesario disponer de instalaciones adecuadas y personal con un alto grado de formación.

En este sentido, es preciso encontrar nuevas terapias que mejoren el pronóstico de los pacientes que sufren un ictus isquémico. Desde hace décadas se han investigado numerosos tratamientos cerebroprotectores, aunque actualmente ninguno se emplea en la práctica clínica habitual. Sin embargo, en los últimos años se ha intensificado el estudio de nuevas dianas terapéuticas, que incluye el desarrollo de fármacos inmunomoduladores para prevenir el daño cerebral secundario a los procesos inflamatorios asociados al ictus (Lyden et al., 2021).

Nuestro grupo mantiene una línea de investigación constante en la búsqueda de dianas farmacológicas para modificar la respuesta inmune en el ictus isquémico. La principal vía de estudio se ha basado en el receptor TLR4 y su potencial terapéutico en las enfermedades cerebrovasculares (Caso et al., 2007; García-Culebras et al., 2019;

Hernández-Jiménez et al., 2023). Asimismo, se ha profundizado en el conocimiento de los distintos fenotipos de neutrófilos y su implicación en la isquemia cerebral ((Cuartero et al., 2013; García-Culebras et al., 2019). Junto al grupo de investigación de Andrés Hidalgo (CNIC), se está estudiando la implicación de los ritmos circadianos en el fenotipo de los neutrófilos (jóvenes vs. envejecidos) y su influencia en el pronóstico de las enfermedades vasculares (Adrover et al., 2019, 2020).

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es conocer el papel de CXCL12, una de las principales citocinas implicadas en el *aging* del neutrófilo, y su influencia en el pronóstico de los pacientes con ictus isquémico.

5.1. Descripción de la cohorte analizada

La cohorte que ha sido reclutada para este estudio presenta una proporción muy elevada de pacientes tratados con fibrinólisis intravenosa y, especialmente, con trombectomía mecánica. Esto se debe a que la selección de pacientes se ha realizado en un hospital terciario que actúa como centro de ictus de referencia para un área amplia del sur de Madrid, al que se derivan directamente pacientes que tienen una alta probabilidad de ser tratados con trombectomía mecánica según la escala Madrid Direct (Rodríguez-Pardo et al., 2020). Además, se ha seleccionado una cohorte sin comorbilidad oncológica, infecciosa o autoinmune, con buena situación funcional previa y con ictus isquémico de poco tiempo de evolución (hasta 6 horas), que hace que sean candidatos en la mayor parte de los casos a recibir algún tratamiento recanalizador en fase aguda. Sin embargo, esto hace que los resultados puedan no ser aplicables a un grupo de pacientes con ictus más leves, con síntomas de mayor tiempo de evolución o

con mayor comorbilidad. Cabe destacar también que se han excluido pacientes con ictus lacunares, que no pueden ser tratados con trombectomía mecánica.

Los pacientes seleccionados presentaban una edad elevada (mediana de 78,3 años), frecuentemente asociaban factores de riesgo vascular (hipertensión arterial 64,9%, dislipemia 55,2%, diabetes 19,4%), y más de un 40% recibían tratamiento antiagregante o anticoagulante antes del ictus, por lo que supone una cohorte con edad y comorbilidad similar a la población tratada habitualmente en nuestro centro salvo por los criterios de exclusión anteriormente mencionados.

5.2. Correlación entre CXCL12 y las principales variables demográficas, antecedentes personales y tratamiento previo

Previamente se han publicado estudios que valoran la influencia de la concentración sérica o plasmática de CXCL12 con la evolución de pacientes con ictus isquémico agudo (Bogoslovsky et al., 2011; Kim et al., 2012; Duan et al., 2015; Liu et al., 2015; Sobrino et al., 2020), pero no se ha analizado el papel de las principales variables demográficas y patologías previas en la concentración de dicha citocina.

En primer lugar, **se ha observado una correlación positiva entre la edad de los pacientes y la concentración plasmática de CXCL12**, tanto al ingreso como a las 24 horas. Esto ha sido descrito también en estudios en otras patologías: en pacientes con osteoporosis se ha observado una concentración plasmática de CXCL12 más elevada a mayor edad (Carbone et al., 2017) y, a nivel tisular, se observa la misma tendencia en timo y próstata (Begley et al., 2005; Hernández-López et al., 2010). De momento no es posible establecer una causa fisiopatológica que relacione la edad con la producción de

CXCL12, aunque una posible hipótesis es que con niveles mayores de CXCL12 exista un menor daño vascular y por ello presenten eventos vasculares a edad más tardía.

Por otra parte, **se han identificado diferencias significativas de la concentración plasmática de CXCL12 en pacientes con diabetes mellitus, siendo menor en aquellos que sufren dicha enfermedad.** En los estudios publicados sobre la influencia de CXCL12 en la diabetes mellitus, se han descrito efectos diversos en función del momento de la enfermedad. En primer lugar, niveles elevados de CXCL12 podrían favorecer la regeneración y proliferación de las células β pancreáticas, lo que supondría un papel protector para el desarrollo de una diabetes mellitus tipo I (Vidaković et al., 2015). Sin embargo, una vez que se ha desarrollado la enfermedad, CXCL12 aumenta la angiogénesis, lo que puede tener un efecto deletéreo en circunstancias específicas como la retinopatía o en la nefropatía diabética (Vidaković et al., 2015). En otro estudio reciente en modelo murino, se ha observado que los ratones con neutrófilos constitutivamente jóvenes (CXCR2loxP/MRP8Cre+) tienen una mayor sensibilidad a la insulina (Baragetti et al., 2023). Por ello, CXCL12 podría ser un factor protector para prevenir el desarrollo de diabetes mellitus, sin poder determinar si, una vez que se ha establecido esta enfermedad, condicionaría cambios en la circulación cerebral que pudieran influir en el pronóstico de los pacientes.

En el resto de las variables analizadas, no se han identificado diferencias significativas. Con respecto al sexo, estudios previos señalan que los varones pueden tener niveles más altos de CXCL12 (Carbone et al., 2017); en nuestra muestra no se ha identificado dicha asociación, aunque la tendencia es similar. Otro aspecto descrito con anterioridad (si bien los resultados pueden ser contradictorios con respecto a otros estudios), es que los pacientes con niveles más elevados de CXCL12 tenían más posibilidad de presentar

un nuevo ictus isquémico (Schutt et al., 2012); sin embargo, en nuestra cohorte no se han identificado cambios relevantes en la concentración de CXCL12 en función de si los pacientes tenían antecedentes de ictus isquémico, de hemorragia intracraneal o de infarto de miocardio.

5.3. Variabilidad de la concentración de CXCL12 en relación con la hora de inicio de síntomas

Categorizar los ictus en función de la hora de inicio es complejo, ya que puede haber diferentes aproximaciones válidas en función de la región y la población a estudio. Por ejemplo, un primer metaanálisis (Elliott, 1998) mostró un aumento del riesgo de ictus por la mañana. Para ello, subdividió los tiempos horarios en cuatro segmentos (0h-6h-12h-18h) y también en seis franjas (0h-4h-8h-12h-16h-20h), lo que refleja, ya desde los primeros estudios, la dificultad para caracterizar adecuadamente los intervalos temporales.

Con el aumento de interés en la influencia de los ritmos circadianos en la fisiopatología del ictus isquémico, se han intentado establecer consensos para poder dividir los ictus en nocturnos y diurnos. Una posible definición consiste en considerar los ictus diurnos como aquellos que se producen en la fase activa, es decir, de 07:00 a 23:00h (Saver et al., 2023). Sin embargo, estos datos son más fáciles de aplicar en grandes grupos poblacionales que en cohortes más reducidas como la presentada en esta tesis doctoral. Además, estas definiciones rígidas no tienen en cuenta la variación de las horas de luz en función de la estación del año en regiones alejadas del trópico ni los cambios de horario de verano/invierno, que dificulta aún más poder establecer los mismos criterios generales a todos los pacientes.

Madrid, ciudad donde se ha reclutado a la totalidad de los pacientes, tiene la peculiaridad de encontrarse en el mismo huso horario que Europa central, que incluye ciudades ubicadas notablemente más al este como Berlín o Varsovia. Por ello, la hora del amanecer es posterior que en la mayoría de regiones europeas y norteamericanas. Por ejemplo, el día 23 de septiembre (equinoccio de otoño), la hora del amanecer en Madrid es a las 08:03h, frente a las 06:54h en Berlín, las 06:48h en Londres y las 6:33h en Boston. Considerando lo anteriormente expuesto y para facilitar el análisis, se ha considerado un ictus diurno como aquel sucedido entre las 08:00h y las 19:59h y nocturno aquel que se inicia entre las 20:00h y las 07:59h.

En nuestra cohorte no se han identificado diferencias significativas en la gravedad al ingreso, en el volumen de infarto o en el pronóstico a los 3 meses en los intervalos temporales estudiados. Estos resultados difieren con respecto a otros estudios poblacionales (Elliott, 1998; Ryu et al., 2022), lo que puede justificarse en nuestro caso por haber analizado una muestra reducida de pacientes con criterios de selección estrictos.

Por otro lado, estudios previos han mostrado diferencias fisiológicas en la concentración de CXCL12 a lo largo del día, siendo menor por la mañana (Ella et al., 2016). Sin embargo, en nuestro trabajo no se han podido replicar estas conclusiones, ya que **no se han observado diferencias en la concentración de CXCL12 en función del momento de inicio del ictus**, aunque no se han realizado mediciones seriadas en distintas franjas horarias que permitan valorar las variaciones circadianas de esta citocina a lo largo del tiempo en cada paciente. Tampoco se ha realizado un abordaje específico para registrar el cronotipo y los ritmos circadianos habituales del paciente (por ejemplo: a qué hora se

acuesta o se despierta habitualmente) y poder así definir con mayor precisión su ciclo sueño/vigila.

5.4. Correlación entre CXCL12 y la gravedad neurológica y radiológica al ingreso.

En nuestra cohorte, se ha observado que los pacientes con **una concentración de CXCL12 más elevada al ingreso presentan una fuerte tendencia a tener inicialmente una gravedad clínica menor medida por la escala NIHSS** ($p = 0,08$), siendo CXCL12 una de las dos variables seleccionadas mediante el modelo predictivo realizado. Asimismo, se ha observado la misma **tendencia a presentar un menor daño isquémico precoz medido con la escala ASPECTS con concentraciones mayores de CXCL12** ($p = 0,06$). Estos datos son relevantes, ya que traducen la afectación clínica y radiológica antes de administrar ningún tratamiento. Aunque no pueden establecerse conclusiones, ya que los datos obtenidos no son estadísticamente significativos, los resultados sugieren que con concentraciones más elevadas de CXCL12 hay un menor daño cerebral ante una lesión isquémica. Esto se encuentra en línea con la hipótesis inicial, que se ampliará en apartados posteriores, en la que planteamos que niveles elevados de CXCL12 se relacionarían con una mayor proporción de neutrófilos jóvenes (*fresh*) y por lo tanto con un menor daño en enfermedades vasculares. Sin embargo, puede haber otros mecanismos que relacionen CXCL12 con un mejor pronóstico, entre ellos que pueda favorecer la angiogénesis. De hecho, como se expondrá más adelante, son interesantes las tendencias observadas en la circulación colateral del AngioTC al ingreso, que sugieren un mayor desarrollo de la misma con niveles más elevados de CXCL12.

No es posible realizar una comparación directa de nuestros resultados con el resto de los estudios publicados que correlacionan la gravedad de pacientes con ictus isquémico en función de la concentración de CXCL12, ya que utilizan criterios de selección diferentes. En todos ellos, se incluyen pacientes con ictus de hasta 24 horas de duración (Bogoslovsky et al., 2011; Kim et al., 2012; Duan et al., 2015; Liu et al., 2015; Sobrino et al., 2020), frente a menos de 6 horas en nuestra cohorte. Además, en solo uno de ellos (Liu et al., 2015) se especifica la mediana de tiempo desde el inicio de la sintomatología hasta la llegada al hospital (6,8 horas), por lo que menos del 50% de dichos pacientes cumplirían los criterios de inclusión de nuestro estudio. En otra publicación (Kim et al., 2012), las muestras fueron obtenidas pasadas 15 ± 7 horas desde el inicio de los síntomas. Al comparar nuestros criterios de inclusión con otros estudios, creemos que nuestro enfoque de priorizar la inclusión de pacientes y la obtención de muestras en un tiempo recortado de tiempo (< de 6 horas y a las 24 horas) es importante para evitar disminuir en la medida de lo posible variaciones secundarias a la respuesta inmune desencadenada por el ictus isquémico.

De los trabajos mencionados, sólo se analiza la correlación entre CXCL12 y la escala NIHSS al ingreso en tres estudios (Kim et al., 2012; Duan et al., 2015; Liu et al., 2015), que encuentran resultados contrarios a los obtenidos en nuestra cohorte, es decir, una correlación positiva entre CXCL12 y mayor gravedad al ingreso. Los resultados pueden no ser comparables ya que analizan población asiática, no excluyen los ictus lacunares y en uno de ellos se descarta a aquellos pacientes previamente anticoagulados (Kim et al., 2012). Como se ha descrito en apartados previos, CXCL12 es una citocina que tiene un papel tanto en homeostasis como en procesos patológicos. De hecho, no se puede descartar que en población asiática, que presentan con mayor frecuencia de

ateromatosis intracraneal y enfermedad isquémica de pequeño vaso, el papel de CXCL12 pudiera suponer un efecto nocivo por otros mecanismos diferentes a los descritos en nuestra población. Entre ellos, podría plantearse que desarrollen una angiogénesis patológica que incluso favoreciera microoclusiones vasculares o que CXCL12 pudiera tener un papel de en el desarrollo de la ateromatosis (Gao et al., 2019).

En ninguno de los artículos mencionados se ha analizado la relación entre CXCL12 y la puntuación de la ASPECTS al ingreso, por lo que no es posible establecer comparaciones.

5.5. Correlación de la concentración de CXCL12 con las principales variables analíticas

Una de las principales cuestiones es si la concentración de CXCL12 plasmática puede influir en el número de células sanguíneas circulantes.

A priori, podría considerarse que con concentraciones más elevadas de CXCL12 habría un número menor de neutrófilos circulantes, ya que la señalización CXCL12/CXCR4 está implicada en la retención de los neutrófilos en médula ósea (Nicolás-Ávila et al., 2017), y la administración de antagonistas de CXCR4 como AMD3100 provoca una liberación de neutrófilos a la circulación sanguínea (Devi et al., 2013).

Sin embargo, en nuestra cohorte **no se ha observado ninguna correlación entre el número total de leucocitos o de neutrófilos en sangre y la concentración de CXCL12.**

Por lo tanto, no se puede establecer que el posible efecto beneficioso de CXCL12 esté relacionado con cambios en el número total de neutrófilos circulantes (la neutrofilia ha sido descrita como un marcador de mal pronóstico en pacientes con ictus isquémico (Semerano et al., 2019)). Esto puede deberse a que la regulación de la liberación de

neutrófilos depende de la concentración de CXCL12 a nivel local en la médula ósea, más que a las concentraciones plasmáticas (Aroca-Crevillén et al., 2020).

Por otra parte, en nuestra muestra se ha observado una correlación negativa entre la concentración de CXCL12 y el número de plaquetas al ingreso. Como hipótesis, cabría esperar una asociación contraria, es decir, que la concentración CXCL12 fuera más elevada con recuentos plaquetarios mayores, ya que las plaquetas activadas pueden liberar CXCL12 (Leberzammer et al., 2022). Del mismo modo, se ha descrito que los neutrófilos pueden favorecer la producción de plaquetas en médula ósea a través de CXCL12/CXCR4 (Petzold et al., 2022). En nuestra cohorte, en todos los casos el número de plaquetas se encontraba dentro de la normalidad, por lo que su significado clínico es incierto, y esta asociación no se ha observado en la analítica extraída a las 24 horas. En definitiva, no se ha encontrado una clara explicación que justifique esta asociación, aunque podría ser objeto de estudios futuros.

Por último, en nuestra muestra no se ha observado una asociación entre CXCL12 y la concentración sérica de proteína C reactiva, que es un marcador inespecífico de inflamación. En un estudio llevado a cabo en pacientes de etnia asiática se encontró una correlación positiva entre la concentración de CXCL12 y de proteína C reactiva (Duan et al., 2015), que difiere de los resultados del presente trabajo, aunque como se ha expresado en otros apartados, no son poblaciones comparables.

En conjunto, nuestros hallazgos no apoyarían que CXCL12 se comporte como un marcador inflamatorio, ya que su concentración plasmática no se ha relacionado con otros reactantes de fase aguda habituales (leucocitosis, neutrofilia, elevación de proteína C reactiva), aunque no es posible establecer conclusiones definitivas ya que no se ha determinado la evolución temporal de la concentración en cada paciente.

5.6. Evolución de la concentración de CXCL12

En el presente estudio se ha valorado la concentración de CXCL12 en tres momentos distintos: en una primera analítica precoz al ingreso (menos de 6 horas de evolución desde el inicio de los síntomas), otra a las 24 horas (generalmente a la mañana siguiente del inicio, en la mayoría de casos entre las 12-30 horas de evolución) y por último una determinación en fase crónica a los 3 meses.

En el análisis realizado, se observa una menor concentración de CXCL12 a las 24 horas en relación con el resto de las determinaciones. Esto se encuentra en línea con la hipótesis de que CXCL12 no se comporta como un reactante de fase aguda. Además, al menos en nuestra cohorte, no se ha observado una elevación plasmática precoz secundaria a un posible aumento de su síntesis en las primeras horas tras una hipoxia tisular o isquemia.

En otros estudios, se ha descrito una elevación de CXCL12 entre los días 3 y 7 especialmente en pacientes con mejor pronóstico (Bogoslovsky et al., 2011; Sobrino et al., 2020), algo que no se ha podido valorar en nuestra cohorte por no haber obtenido muestras en tiempos más tardíos.

5.7. Asociación entre la concentración de CXCL12 y la evolución radiológica

5.7.1 Selección de modalidad de neuroimagen para medir el volumen de infarto (RM o TC craneal)

La selección de la prueba de imagen para medir el volumen final de infarto se ha realizado atendiendo a criterios clínicos. En general, la modalidad de imagen más utilizada fue el TC craneal (2/3 de los pacientes), lo cual se explica por la importante proporción de pacientes tratados con terapias de reperfusión, en los que se realiza por

protocolo un TC craneal a las 24 horas de tratamiento. Los estudios con RM craneal se han reservado para los casos en los que es preciso completar estudio topográfico (especialmente en los ictus de menor tamaño) o etiológico.

Esto, *a priori*, podría condicionar una mayor variabilidad en la medición del volumen de infarto en aquellos pacientes con ictus de pequeño tamaño, aunque en general en estos casos se ha realizado una RM craneal. Esta variabilidad también se ha minimizado al categorizar el volumen de infarto en terciles, en los que pequeñas variaciones del tamaño de isquemia no condicionan un cambio de categoría en la mayoría de las situaciones. Además, en estudios previos realizados en trombectomía mecánica, la medición del volumen de infarto por TC o RM craneal se correlaciona de forma similar con el pronóstico de los pacientes (Boers et al., 2018).

5.7.2 Correlación entre la concentración de CXCL12 y el volumen de infarto a las 24-72 horas

Uno de los objetivos principales de este estudio es conocer si existe una correlación entre la concentración de CXCL12 y el volumen de infarto, que es uno de los principales biomarcadores de la gravedad del ictus. Para analizar este resultado, primero se deben plantear algunas consideraciones:

1. Como se ha expuesto previamente, la cohorte analizada es atípica porque la mayoría de los pacientes reclutados han sido tratados con trombectomía mecánica y/o fibrinólisis intravenosa. Esto hace que, en una parte importante de los casos, no se esté valorando la evolución natural del ictus isquémico, sino que la lesión resultante es secundaria a un daño isquémico precoz y a un posible daño por reperfusión posterior. Este es un aspecto diferencial con respecto a otros estudios realizados,

que se llevaron antes de la introducción de la trombectomía mecánica en la práctica clínica habitual.

2. Con respecto al diseño del estudio, se ha establecido como criterio de exclusión que el paciente presente un infarto lacunar secundario a enfermedad isquémica de pequeño vaso. Los infartos lacunares, por definición, tienen un volumen pequeño, por lo que dificultarían la obtención de conclusiones acerca de la influencia de CXCL12 en el área de infarto final. Esto difiere de otros estudios llevados a cabo previamente, como el de Liu y colaboradores (20% de pacientes con ictus lacunar), Kim y colaboradores (50%) y Duan y colaboradores (20%) (Kim et al., 2012; Duan et al., 2015; Liu et al., 2015).
3. En la práctica clínica habitual del hospital en el que se ha realizado el presente trabajo, no se completa el estudio radiológico inicial con un TC perfusión si no modifica la actitud terapéutica. Por ello, en la gran mayoría de pacientes reclutados, no se dispone del estudio de perfusión cerebral para poder comparar el volumen del *core* / penumbra isquémica inicial con el área de infarto definitiva.

En nuestro estudio, se observa una **correlación inversa estadísticamente significativa entre el volumen de infarto y la concentración de CXCL12 en la analítica extraída a las 24 horas**. Este análisis se ha realizado tanto con los datos del volumen de infarto sin modificar como con el estudio categorizado por terciles. En este último caso, la concentración de CXCL12 a las 24 horas es una de las variables seleccionadas dentro del modelo predictivo, y tiene una asociación estadísticamente significativa.

Entre los distintos mecanismos que pueden estar asociados con el volumen de isquemia final, cabe destacar:

1. La hipótesis principal es que la concentración plasmática de CXCL12 tiene influencia en el fenotipo de los neutrófilos. Sería esperable que a mayor concentración de CXCL12 hubiera una mayor proporción de neutrófilos jóvenes. En estudios preclínicos en modelo de infarto de miocardio con isquemia-reperfusión, se observa una menor área de infarto y gravedad con neutrófilos constitutivamente jóvenes (ZT13, *Arntl^{ΔN}*) (Adrover et al., 2019), por lo que se han establecido CXCL12 o los agonistas de CXCR4 como potenciales dianas terapéuticas en las enfermedades vasculares. Sin embargo, esta asociación no se fue demostrada en el modelo de ictus isquémico con isquemia permanente (sin perfusión, distinto a la mayoría de nuestros pacientes), ya que se observó una mayor área de infarto con neutrófilos constitutivamente jóvenes (*Arntl^{ΔN}*) (Adrover et al., 2019). Nuestros datos se asemejan a los encontrados en isquemia cardiaca, pero dada la discrepancia de resultados con el modelo experimental de ictus isquémico, será necesario continuar esta vía de investigación en fase preclínica para poder conocer con mayor profundidad los mecanismos fisiopatológicos asociados.
2. CXCL12 es una citocina que puede modificar la infiltración de células del sistema inmune en el área isquémica, pero su efecto en el pronóstico es discordante entre los distintos estudios realizados en modelo animal. Por una parte, se ha asociado con un efecto beneficioso por modular la infiltración de monocitos (Werner et al., 2020) y células NK (Wang et al., 2023), mientras que en otros trabajos se describe una peor evolución neurológica que es mediada por la microglía (Walter et al., 2015) y por la infiltración linfocitaria (Ruscher et al., 2013).
3. Asimismo, se ha descrito que CXCL12 puede favorecer la angiogénesis bien de forma directa o de forma indirecta a través de un aumento de liberación de VEGF o

mediante el incremento de células progenitoras endoteliales (Shyu et al., 2008; Bogoslovsky et al., 2011). Esta angiogénesis podría ser beneficiosa y disminuir el volumen de infarto final. Sin embargo, las determinaciones analíticas se han realizado en una fase muy precoz del ictus (<6 horas y a las 24 horas) y la neuroimagen de control se ha realizado a las 24-72 horas, por lo que es posible que en ese momento pueda no haberse desarrollado una angiogénesis significativa que modifique el pronóstico inmediato de estos pacientes. Otra hipótesis es que CXCL12 pueda favorecer el desarrollo de la circulación colateral antes del ictus; aunque no se han observado diferencias estadísticamente significativas en el grado de colateralidad en el AngioTC realizado al ingreso en función de la concentración de CXCL12 plasmática, sí que se ha observado una tendencia a que los pacientes con un mayor desarrollo de la circulación colateral (grados 2-3 de la escala de Tan) tengan concentración más elevada de CXCL12. Dada la importancia de la circulación colateral en el pronóstico de los pacientes con un ictus isquémico, su posible relación con CXCL12 puede suponer una nueva línea de investigación; por ello se plantea realizar un estudio dirigido a este aspecto en el futuro optimizando la valoración de la circulación colateral mediante nuevas técnicas radiológicas como el AngioTC multifásico (Menon et al., 2015).

4. Por último, CXCL12 podría tener un efecto beneficioso directo como cerebroprotector. Estudios in vitro con cultivos neuronales han mostrado que CXCL12 disminuye la toxicidad de neurotóxicos como el H₂O₂, y su administración directa por vía estereotáxica en modelo murino de ictus disminuye el área de infarto (Shyu et al., 2008).

5.7.3. Asociación entre CXCL12 y transformación hemorrágica

Entre los resultados obtenidos, se ha observado **una correlación significativa en el análisis univariante entre la probabilidad de presentar una transformación hemorrágica y la concentración plasmática de CXCL12 a las 24 horas**, siendo menor la posibilidad de esta complicación en pacientes con niveles más altos de CXCL12.

En la cohorte reclutada, existen múltiples factores que pueden condicionar un aumento del riesgo de transformación hemorrágica, incluyendo la edad media avanzada, una proporción importante de pacientes con hipertensión arterial o diabetes mellitus y, especialmente, un alto porcentaje de individuos tratados con fibrinólisis IV o tromboectomía mecánica, que son tratamientos que pueden provocar directamente una hemorragia intracraneal.

Es preciso relacionar estos resultados con los del apartado anterior, ya que uno de los principales factores asociados con la posibilidad de presentar una transformación hemorrágica es el volumen de infarto. Por ello, es esperable que, en los pacientes con un volumen de infarto más grande y en los que se ha observado una menor concentración de CXCL12, presenten una mayor tasa de transformación hemorrágica.

En otros estudios, no se ha explorado la relación entre CXCL12 y la posibilidad de presentar esta complicación. Entre los procesos fisiopatológicos implicados podrían considerarse los siguientes:

1. En primer lugar, CXCL12 podría tener un efecto directo sobre el endotelio. Es una de las quimiocinas implicadas en la angiogénesis y en la migración de células progenitoras endoteliales (Bogoslovsky et al., 2011), por lo que niveles más elevados podrían prevenir un daño endotelial y, por lo tanto, disminuir la posibilidad de presentar una transformación hemorrágica. También se ha relacionado CXCL12 con

procesos de reparación y regeneración endotelial a través de su interacción con CXCR7 (Zhang et al., 2017). Por el contrario, en un estudio en modelo murino con oclusión de la ACM se observó un menor daño de la barrera hematoencefálica con la administración de AMD3100 (antagonista de CXCR4) asociado a una menor infiltración leucocitaria (Huang et al., 2013), que sería opuesto a los hallazgos observados en nuestra cohorte.

2. El efecto que pueda tener el fenotipo de los neutrófilos (jóvenes vs. envejecidos) es difícil de establecer. Por una parte, y como se ha recogido previamente, se ha relacionado a los neutrófilos jóvenes con un menor daño vascular (Adrover et al., 2019) que se asociaría con una menor probabilidad de presentar una transformación hemorrágica. Por el contrario, se ha descrito que los neutrófilos jóvenes tienen una mayor cantidad de gránulos (Adrover et al., 2020), y en ellos hay distintas enzimas como la MMP-9 relacionadas con el daño de la barrera-hematoencefálica, lo cual podría asociarse con un mayor riesgo de transformación hemorrágica.

Por todo lo anterior, es preciso realizar más estudios para poder establecer una conclusión acerca de si CXCL12 tiene un papel directo en los procesos implicados en la transformación hemorrágica o si, por el contrario, es un marcador indirecto.

5.8. Correlación entre CXCL12 y la evolución clínica

En el apartado anterior se ha mostrado una correlación inversa significativa entre el volumen de infarto y la concentración de CXCL12. Sin embargo, **no se ha podido encontrar una asociación entre los niveles plasmáticos de CXCL12 y el pronóstico de los pacientes medido por la ERm tanto al alta como a los tres meses.** Únicamente se ha observado una tendencia a presentar un mejor pronóstico funcional con

concentraciones más elevadas de CXCL12 a los tres meses, que ya ha sido descrito previamente (Sobrino et al., 2020), aunque es preciso destacar que el menor número de muestras obtenidas a este tiempo en nuestro estudio puede limitar la potencia estadística. Para poder explicar estos resultados, se plantean tres principales causas: la discrepancia que puede haber entre el volumen de infarto y la evolución clínica, las limitaciones de la ERm y un posible efecto directo de CXCL12.

5.8.1. Discrepancia entre volumen de infarto y la evolución clínica

El volumen de infarto es uno de los principales predictores en el pronóstico de los pacientes con ictus. Es uno de los biomarcadores más utilizados ya que tiene importantes ventajas, como aportar una información objetiva del daño cerebral y facilitar el desarrollo de estudios traslacionales desde la fase preclínica hasta el desarrollo de tratamientos, ya que en todas las etapas puede utilizarse como medida de eficacia de la intervención.

Sin embargo, el volumen de infarto no es el único responsable del pronóstico. En estudios clínicos es habitual utilizar escalas funcionales como la NIHSS, ERm o Barthel por no haber en ocasiones una correlación directa entre el área de isquemia y la evolución del paciente. De hecho, en el análisis realizado en los pacientes tratados en el ensayo clínico MR CLEAN, se observó que el volumen de infarto condicionaba el 14% de la evolución clínica (Compagne et al., 2019). En este sentido, es posible encontrar pacientes con un área de isquemia grande y un buen pronóstico funcional y, por el contrario, pacientes con un área de isquemia pequeña que presentan una mala evolución por el propio ictus o por complicaciones asociadas al mismo (Saver et al., 1999; Boers et al., 2018). Además, no sólo es importante el tamaño de la lesión, ya que

hay áreas cerebrales que se asocian a una mayor discapacidad que otras, como pueden ser, dentro del territorio de la ACM, la cápsula interna o el área M5 (Boers et al., 2018). Esta diferencia de la evolución, por lo tanto, puede deberse a otras variables como la edad, el sexo, la atrofia cerebral, la presencia de lesiones previas, complicaciones, variabilidad interindividual en recuperación y neuroplasticidad, así como los tratamientos de rehabilitación y ayuda social aportados (Saver et al., 1999). De hecho, y a semejanza de lo encontrado en nuestra cohorte, en el estudio REVASCAT se observó que las principales variables asociadas al pronóstico funcional a los tres meses fueron la edad y la escala NIHSS (Al-Ajlan et al., 2018).

Como se ha expuesto con anterioridad, la edad avanzada de los pacientes reclutados es uno de los principales factores de confusión a tener en cuenta, ya que hemos observado que los pacientes con mayor edad tienen concentraciones más elevadas de CXCL12, y estos a su vez presentan una peor evolución pese a no tener un mayor volumen de infarto. Todo ello limita la interpretación final de los resultados.

5.8.2. Limitaciones de la ERm para determinar el pronóstico de los pacientes

La ERm es la principal escala utilizada en los estudios clínicos, aunque tiene ventajas y limitaciones (Kasner, 2006):

1. Por una parte, es una escala que tiene un importante consenso en la comunidad científica, se ha empleado en la mayoría de los ensayos clínicos y está aceptada por las agencias reguladoras. Es muy rápida de aplicar y tiene una aceptable concordancia entre exploradores (Banks and Marotta, 2007). Además, incluye todos los rangos de discapacidad (desde pacientes asintomáticos a fallecidos) y permite

realizar análisis tanto ordinales como dicotómicos al poder categorizar a los pacientes en grupos.

2. Por el contrario, tiene escasa sensibilidad para cambios pequeños en la capacidad funcional del paciente, y hay aspectos como el lenguaje, la cognición, trastornos emocionales y el dolor que no se trasladan de forma directa a esta escala. Además, la afectación será distinta en función del grado previo de actividad: que un paciente presente una hemianopsia será mucho más limitante en un individuo joven cuyo oficio depende de la conducción que en un paciente de edad avanzada y más sedentario.

En este sentido, la ERm puede no tener suficiente sensibilidad para determinar pequeñas diferencias en el pronóstico en una población envejecida y con comorbilidad como la de nuestra cohorte.

5.8.3. Implicación directa de CXCL12 en el pronóstico neurológico

Los estudios de CXCL12 han mostrado resultados contrapuestos tanto en fase preclínica como en humanos. En algunos trabajos se muestra un efecto beneficioso de esta citocina y en otros un papel deletéreo, ya que modula la actividad de distintos tipos celulares además de los neutrófilos. De hecho, el trabajo de Ruscher y colaboradores plantea un papel diferente de CXCL12 en función del tiempo de evolución, con una función cerebroprotectora inicial y posteriormente perjudicial (Ruscher et al., 2013). En modelo murino, la administración de un antagonista de CXCR4 (AMD3100) se ha relacionado con una disminución de la activación de la microglía (Walter et al., 2015) y en el propio trabajo de Ruscher y colaboradores muestra una menor infiltración de linfocitos T CD3⁺/CD4⁺, en ambos casos observando un mejor pronóstico funcional sin

modificación del volumen de infarto. Por ello, podría considerarse que niveles más elevados de CXCL12 se asocien inicialmente a un tamaño de infarto menor, pero que posteriormente no impliquen un mejor pronóstico neurológico.

A nivel clínico, en los estudios en los que se compara CXCL12 con la evolución clínica y radiológica no se ha encontrado esta discrepancia entre volumen de infarto y evolución clínica (Kim et al., 2012; Liu et al., 2015; Sobrino et al., 2020), que podría deberse a las diferencias en los criterios de inclusión y tratamiento mencionadas previamente.

5.9. Correlación de CXCL12 con el fenotipo del neutrófilo

Para determinar si la concentración plasmática de CXCL12 influye en el ritmo circadiano de los neutrófilos, se ha valorado tanto el fenotipo de estas células en un frotis sanguíneo como la concentración plasmática de NETs al ingreso.

5.9.1. Frotis sanguíneo

Para la evaluación del fenotipo de los neutrófilos se ha realizado una aproximación indirecta a través del grado de segmentación de su núcleo. Mediante este método se ha observado una **baja variabilidad, y las tendencias encontradas son de escasa magnitud y no son estadísticamente significativas**. Entre los resultados obtenidos cabe destacar:

1. En la analítica inicial al ingreso, en la que hay una mayor variabilidad en la hora a la que fue extraída, hay una tendencia a presentar un menor número de lobulaciones del núcleo en los ictus diurnos. Esto podría deberse a que, de forma fisiológica por los ritmos circadianos, existe una mayor liberación de neutrófilos al amanecer, mientras que por la tarde y noche predominan neutrófilos más envejecidos (Ella et al., 2016; Aroca-Crevillén et al., 2020).

2. En la analítica a las 24 horas hay una tendencia a presentar menos segmentaciones del núcleo. Esto puede ser secundario a una mayor liberación de neutrófilos en la fase aguda del ictus (Emsley, 2003; Ross et al., 2007) que condicione una mayor presencia de neutrófilos jóvenes o con formas inmaduras en la circulación.
3. No se ha observado una correlación entre la concentración de CXCL12 y el número de lobulaciones del núcleo de los neutrófilos en ninguno de los tiempos analizados. A priori, sería esperable que con concentraciones más bajas de CXCL12 hubiera una mayor proporción de neutrófilos envejecidos, que tienen un mayor número de segmentaciones del núcleo (Adrover et al., 2016; Ella et al., 2016), pero no se ha podido confirmar esta hipótesis en nuestra cohorte.

Esta valoración mediante el grado de segmentación del núcleo presenta limitaciones, ya que no se ha estudiado de forma directa el fenotipo de los neutrófilos. Por ello, no es posible confirmar ni descartar la hipótesis de que la concentración de CXCL12 plasmática puede regular el proceso de envejecimiento del neutrófilo. Para poder profundizar en los mecanismos, plantearemos estudios futuros en los que se valore el fenotipo con citometría de flujo (los neutrófilos jóvenes presentan marcadores específicos como CXCR2^{HI}, CD62L^{HI} y CXCR4^{LO} y los envejecidos CXCR4^{HI} y CD62L^{LO}) (Adrover et al., 2016) o con estudios de transcriptómica que relacionen una diferente transcripción del neutrófilo en función de la concentración de CXCL12. Además, puede considerarse también ampliar el número de muestras obtenidas de cada paciente para determinar si existen variaciones en cada caso a lo largo del tiempo.

Otra posible limitación es que, pese a que se ha obtenido una analítica en fase muy precoz (<6 horas desde el inicio de los síntomas), ya se haya iniciado una respuesta

inmune que dificulte detectar las diferencias de fenotipo observadas en situaciones fisiológicas.

5.9.2 Correlación entre la concentración de CXCL12 y NETs plasmáticos

Otra de las asociaciones encontradas es una **correlación positiva entre la concentración plasmática de CXCL12 al ingreso y los marcadores plasmáticos de NETs** (cfDNA, NE, MPO). Los NETs producidos por los neutrófilos están íntimamente relacionados con procesos de inmunotrombosis y se correlacionan con un peor pronóstico en pacientes con ictus isquémico.

La evidencia previa no permite establecer con claridad la fisiopatología detrás de este hallazgo, ya que no se han encontrado publicaciones que analicen esta cuestión en las enfermedades cardiovasculares. Se ha descrito que el proceso de envejecimiento de los neutrófilos mediado por CXCR2 provoca una degranulación progresiva y una menor capacidad para producir NETs (Adrover et al., 2020). Puede considerarse que la función antagonista de este proceso por CXCL12/CXCR4 favorecería una mayor proporción de neutrófilos jóvenes y esto, a su vez, dar lugar a un aumento de los niveles plasmáticos de NETs. En el mismo sentido, en otros estudios con modelo murino se observa una disminución de la transcripción de genes relacionados con la NETosis (MPO, NE, PADI4) al administrar AMD3100 (antagonista de CXCR4) (Ngamsri et al., 2021), y también una disminución de la NETosis con antagonistas de CXCR4 o con inhibidores de CXCL12 (Kim et al., 2019; Chen et al., 2023). Por el contrario, en el modelo de Frenette y colaboradores, los neutrófilos que presentan un fenotipo envejecido mediado por la activación de receptores TLR presentan una mayor capacidad de producir NETs (Zhang et al., 2015).

También debe considerarse que la medición de los NETs es indirecta, a partir de una muestra de sangre venosa, que puede no reflejar su concentración en el área isquémica y verse influenciada por distintos procesos sistémicos o por variabilidad interindividual. En este sentido, sería más apropiada la medición de NETs directamente en muestras sanguíneas obtenidas de la arteria afectada en los procedimientos de trombectomía mecánica o por un análisis histológico (esto último no es viable en estudios clínicos).

En definitiva, nuestros resultados sugieren que hay una correlación positiva entre las concentraciones plasmáticas de CXCL12 y de los marcadores de NETosis, pero esto tendría un efecto teóricamente contrario: en nuestra cohorte tener niveles elevados de CXCL12 se asocia a una disminución del volumen de infarto y en otros estudios los marcadores de NETs se relacionan con un peor pronóstico global. Además, no se ha podido establecer una correlación entre el fenotipo del neutrófilo y el grado de NETosis por las limitaciones comentadas en el apartado previo. Será necesario realizar nuevos estudios que permitan determinar los mecanismos y procesos fisiopatológicos asociados.

5.10. Limitaciones

La presente tesis doctoral ha presentado importantes limitaciones debidas a la situación sanitaria y social causada por la pandemia por la COVID-19. En marzo de 2020, en el momento en el que el proceso de reclutamiento estaba optimizado, se interrumpió la inclusión de pacientes por la priorización de la actividad clínica sobre la investigadora, por los evidentes problemas logísticos presentes en dicho momento (incluyendo la limitación de movilidad motivada por el estado de alarma) y por la incapacidad para

determinar inicialmente si un paciente presentaba una infección viral activa. Por ello, fue necesario parar el reclutamiento de pacientes durante 6 meses.

Tras este periodo, se limitaron las consultas ambulatorias durante el siguiente año y medio, por lo que estas se realizaron únicamente de forma telefónica salvo por necesidad clínica. Esta situación limitó la posibilidad de completar el análisis de la evolución neurológica mediante la escala NIHSS o realizar test adicionales como el MoCA o el EuroQOL. Además, dificultó la posibilidad de conseguir muestras sanguíneas de forma ambulatoria en la revisión a los tres meses. En todos los casos se pudo continuar valorando la ERm, ya que está validada para su uso por vía telefónica (Savio et al., 2013; Fernández Sanz et al., 2022).

Asimismo, es preciso incidir en las limitaciones posteriores por la interrupción de la cadena de suministros sufrida en los últimos años, que prolongó el tiempo habitual para poder obtener el material y los kits precisos para el análisis de las muestras.

Todo ello ha condicionado una demora en el reclutamiento de la cohorte y en la obtención de resultados.

Por otra parte, y como se ha reflejado a lo largo de la discusión, una dificultad encontrada en la interpretación de los resultados es que no están claramente establecidos los mecanismos en modelo animal que relacionen el efecto de CXCL12 con el pronóstico del ictus isquémico. Sin embargo, esto supone una oportunidad y abre nuevas vías de investigación tanto en fase preclínica como traslacional.

CONCLUSIONES

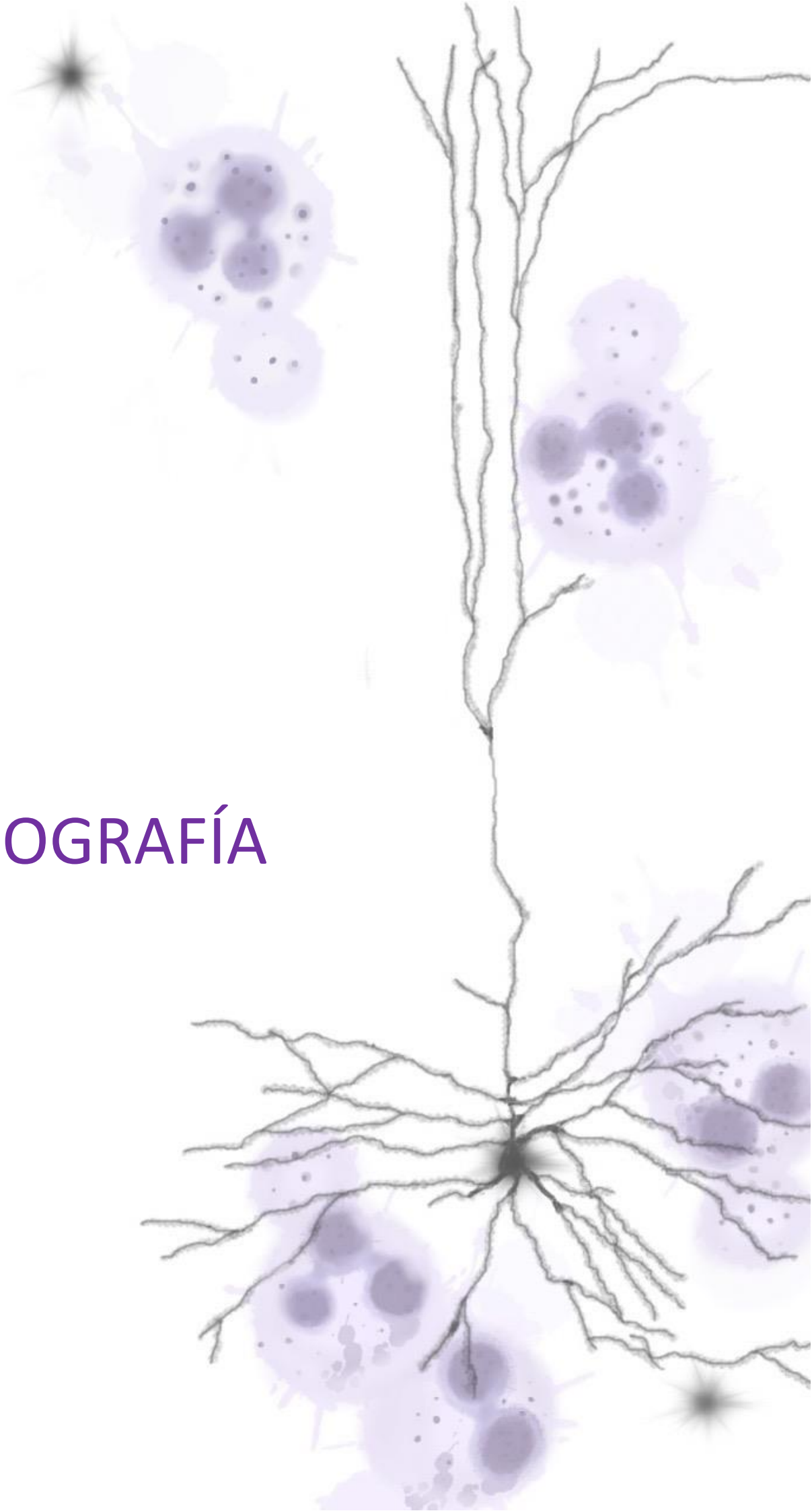


6. CONCLUSIONES

1. En nuestra cohorte se observa una correlación positiva entre la concentración de CXCL12 y la edad, así como una menor concentración de CXCL12 en los pacientes diabéticos. No se han objetivado otras asociaciones relevantes con otras variables demográficas o antecedentes personales.
2. En la muestra estudiada, se detecta una tendencia a presentar una mayor gravedad clínica a la llegada medida por la escala NIHSS en pacientes con menor concentración plasmática de CXCL12, siendo ésta una de las variables incluidas en el modelo predictivo.
3. En nuestra cohorte, se ha observado una correlación negativa estadísticamente significativa entre la concentración de CXCL12 a las 24 horas y el volumen de infarto cerebral, siendo una de las variables seleccionadas en el modelo predictivo, lo cual sugiere un efecto cerebroprotector de esta quimiocina.
4. Se ha observado una menor concentración de CXCL12 a las 24 horas en aquellos pacientes con transformación hemorrágica.
5. Pese a las diferencias en el volumen de infarto descritas, no se ha observado una correlación entre el pronóstico funcional a los tres meses medido por la escala de Rankin modificada y la concentración de CXCL12.
6. En la población estudiada, no se han objetivado diferencias en la concentración plasmática de CXCL12 en función de la hora de presentación del ictus en los intervalos de tiempo estudiados.

7. No se ha observado una correlación entre la concentración de CXCL12 y el número de leucocitos totales ni de los neutrófilos circulantes. Tampoco con la posibilidad de presentar una infección durante el ingreso.
8. No se ha podido relacionar el fenotipo de los neutrófilos determinado mediante el grado de segmentación de su núcleo con la concentración plasmática de CXCL12.
9. Se ha detectado una débil correlación positiva entre la concentración de CXCL12 y marcadores de NETs plasmáticos, por lo que podría haber diferencias en el fenotipo o actividad de los neutrófilos en función de la concentración de dicha quimiocina.
10. En conclusión, en nuestra cohorte, niveles más altos de CXCL12 se relacionan con un mejor pronóstico radiológico, es decir, con menor volumen de infarto y menor posibilidad de tener una transformación hemorrágica. Sin embargo, no se ha podido establecer una asociación con el pronóstico funcional a los tres meses ni con el fenotipo de los neutrófilos determinado por el grado de segmentación del núcleo, por lo que se deben realizar nuevos estudios para establecer los mecanismos implicados.

BIBLIOGRAFÍA



7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, H. P., Bendixen, B. H., Kappelle, L. J., Biller, J., Love, B. B., Gordon, D. L., et al. (1993). Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 24, 35–41. doi: 10.1161/01.STR.24.1.35
- Adrover, J. M., Aroca-Crevillén, A., Crainiciuc, G., Ostos, F., Rojas-Vega, Y., Rubio-Ponce, A., et al. (2020). Programmed ‘disarming’ of the neutrophil proteome reduces the magnitude of inflammation. *Nat. Immunol.* doi: 10.1038/s41590-019-0571-2
- Adrover, J. M., del Fresno, C., Crainiciuc, G., Cuartero, M. I., Casanova-Acebes, M., Weiss, L. A., et al. (2019). A Neutrophil Timer Coordinates Immune Defense and Vascular Protection. *Immunity* 50, 390-402.e10. doi: 10.1016/j.immuni.2019.01.002
- Adrover, J. M., Nicolás-Ávila, J. A., and Hidalgo, A. (2016). Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. *Trends Immunol.* 37, 334–345. doi: 10.1016/j.it.2016.03.005
- Agarwal, S., Bivard, A., Warburton, E., Parsons, M., and Levi, C. (2018). Collateral response modulates the time–penumbra relationship in proximal arterial occlusions. *Neurology* 90, e316–e322. doi: 10.1212/WNL.0000000000004858
- Al-Ajlan, F. S., Al Sultan, A. S., Minhas, P., Assis, Z., De Miquel, M. A., Millán, M., et al. (2018). Posttreatment Infarct Volumes when Compared with 24-Hour and 90-Day Clinical Outcomes: Insights from the REVASCAT Randomized Controlled Trial. *Am. J. Neuroradiol.* 39, 107–110. doi: 10.3174/ajnr.A5463
- Alamowitch, S., Turc, G., Palaiodimou, L., Bivard, A., Cameron, A., De Marchis, G. M., et al. (2023). European Stroke Organisation (ESO) expedited recommendation on tenecteplase for acute ischaemic stroke. *Eur. Stroke J.*, 23969873221150022. doi: 10.1177/23969873221150022
- Albers, G. W., Caplan, L. R., Easton, J. D., Fayad, P. B., Mohr, J. P., Saver, J. L., et al. (2002). Transient ischemic attack—proposal for a new definition. *N. Engl. J. Med.* 347, 1713–1716. doi: 10.1056/NEJMs020987
- Albers, G. W., Goldstein, L. B., Hess, D. C., Wechsler, L. R., Furie, K. L., Gorelick, P. B., et al. (2011). Stroke Treatment Academic Industry Roundtable (STAIR) recommendations for maximizing the use of intravenous thrombolytics and expanding treatment options with intra-arterial and neuroprotective therapies. *Stroke* 42, 2645–2650. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.618850
- Albers, G. W., Marks, M. P., Kemp, S., Christensen, S., Tsai, J. P., Ortega-Gutierrez, S., et al. (2018). Thrombectomy for Stroke at 6 to 16 Hours with Selection by Perfusion Imaging. *N. Engl. J. Med.* 378, 708–718. doi: 10.1056/NEJMoa1713973
- Alvarez-Sabín, J., Quintana, M., Masjuan, J., Oliva-Moreno, J., Mar, J., Gonzalez-Rojas, N., et al. (2017). Economic impact of patients admitted to stroke units in Spain. *Eur. J. Health Econ. HEPAC Health Econ. Prev. Care* 18, 449–458. doi: 10.1007/s10198-016-0799-9
- Amarenco, P., Bogousslavsky, J., Callahan, A., Goldstein, L. B., Hennerici, M., Rudolph, A. E., et al. (2006). High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack. *N. Engl. J. Med.* 355, 549–559. doi: 10.1056/NEJMoa061894

- Amarenco, P., Lavallée, P. C., Labreuche, J., Albers, G. W., Bornstein, N. M., Canhão, P., et al. (2016). One-Year Risk of Stroke after Transient Ischemic Attack or Minor Stroke. *N. Engl. J. Med.* 374, 1533–1542. doi: 10.1056/NEJMoa1412981
- Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G. L., Metzler, K. D., and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 459–489. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074942
- Anderson, C. S., Robinson, T., Lindley, R. I., Arima, H., Lavados, P. M., Lee, T.-H., et al. (2016). Low-Dose versus Standard-Dose Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke. *N. Engl. J. Med.* 374, 2313–2323. doi: 10.1056/NEJMoa1515510
- Aroca-Crevillén, A., Adrover, J. M., and Hidalgo, A. (2020). Circadian Features of Neutrophil Biology. *Front. Immunol.* 11, 576. doi: 10.3389/fimmu.2020.00576
- Aziz, I. S., McMahan, A. M., Friedman, D., Rabinovich-Nikitin, I., Kirshenbaum, L. A., and Martino, T. A. (2021). Circadian influence on inflammatory response during cardiovascular disease. *Curr. Opin. Pharmacol.* 57, 60–70. doi: 10.1016/j.coph.2020.11.007
- Ballesteros, I., Cuartero, M. I., Pradillo, J. M., de la Parra, J., Pérez-Ruiz, A., Corbí, A., et al. (2014). Rosiglitazone-induced CD36 up-regulation resolves inflammation by PPAR γ and 5-LO-dependent pathways. *J. Leukoc. Biol.* 95, 587–598. doi: 10.1189/jlb.0613326
- Ballesteros, I., Rubio-Ponce, A., Genua, M., Lusito, E., Kwok, I., Fernández-Calvo, G., et al. (2020). Co-option of Neutrophil Fates by Tissue Environments. *Cell* 183, 1282–1297.e18. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.003
- Bang, O. Y., Chung, J.-W., Lee, M. J., Seo, W.-K., Kim, G.-M., Ahn, M.-J., et al. (2020). Cancer-Related Stroke: An Emerging Subtype of Ischemic Stroke with Unique Pathomechanisms. *J. Stroke* 22, 1–10. doi: 10.5853/jos.2019.02278
- Bang, O. Y., Ovbiagele, B., and Kim, J. S. (2015). Nontraditional Risk Factors for Ischemic Stroke: An Update. *Stroke* 46, 3571–3578. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.010954
- Banks, J. L., and Marotta, C. A. (2007). Outcomes Validity and Reliability of the Modified Rankin Scale: Implications for Stroke Clinical Trials: A Literature Review and Synthesis. *Stroke* 38, 1091–1096. doi: 10.1161/01.STR.0000258355.23810.c6
- Baragetti, A., Da Dalt, L., Moregola, A., Svecla, M., Terenghi, O., Mattavelli, E., et al. (2023). Neutrophil aging exacerbates high fat diet induced metabolic alterations. *Metabolism* 144, 155576. doi: 10.1016/j.metabol.2023.155576
- Barber, P. A., Demchuk, A. M., Zhang, J., and Buchan, A. M. (2000). Validity and reliability of a quantitative computed tomography score in predicting outcome of hyperacute stroke before thrombolytic therapy. *The Lancet* 355, 1670–1674. doi: 10.1016/S0140-6736(00)02237-6
- Barkho, B. Z., Munoz, A. E., Li, X., Li, L., Cunningham, L. A., and Zhao, X. (2008). Endogenous Matrix Metalloproteinase (MMP)-3 and MMP-9 Promote the Differentiation and Migration of Adult Neural Progenitor Cells in Response to Chemokines. *Stem Cells Dayt. Ohio* 26, 3139–3149. doi: 10.1634/stemcells.2008-0519
- Becker, K., Kindrick, D., Relton, J., Harlan, J., and Winn, R. (2001). Antibody to the alpha4 integrin decreases infarct size in transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32, 206–211. doi: 10.1161/01.str.32.1.206
- Begley, L., Monteleon, C., Shah, R. B., MacDonald, J. W., and Macoska, J. A. (2005). CXCL12 overexpression and secretion by aging fibroblasts enhance human

- prostate epithelial proliferation in vitro. *Aging Cell* 4, 291–298. doi: 10.1111/j.1474-9726.2005.00173.x
- Benjamin, E. J., Muntner, P., Alonso, A., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., et al. (2019). Heart Disease and Stroke Statistics—2019 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 139. doi: 10.1161/CIR.0000000000000659
- Bhat, V. M., Cole, J. W., Sorkin, J. D., Wozniak, M. A., Malarcher, A. M., Giles, W. H., et al. (2008). Dose-Response Relationship Between Cigarette Smoking and Risk of Ischemic Stroke in Young Women. *Stroke* 39, 2439–2443. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.510073
- Bhatt, N., Malik, A. M., and Chaturvedi, S. (2018). Stroke in young adults: Five new things. *Neurol. Clin. Pract.* 8, 501–506. doi: 10.1212/CPJ.0000000000000522
- Bivard, A., Zhao, H., Churilov, L., Campbell, B. C. V., Coote, S., Yassi, N., et al. (2022). Comparison of tenecteplase with alteplase for the early treatment of ischaemic stroke in the Melbourne Mobile Stroke Unit (TASTE-A): a phase 2, randomised, open-label trial. *Lancet Neurol.* 21, 520–527. doi: 10.1016/S1474-4422(22)00171-5
- Bleul, C. C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., et al. (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382, 829–833. doi: 10.1038/382829a0
- Boehme, A. K., Esenwa, C., and Elkind, M. S. V. (2017). Stroke Risk Factors, Genetics, and Prevention. *Circ. Res.* 120, 472–495. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.308398
- Boers, A. M. M., Jansen, I. G. H., Beenen, L. F. M., Devlin, T. G., San Roman, L., Heo, J. H., et al. (2018). Association of follow-up infarct volume with functional outcome in acute ischemic stroke: a pooled analysis of seven randomized trials. *J. NeuroInterventional Surg.* 10, 1137–1142. doi: 10.1136/neurintsurg-2017-013724
- Bogoslovsky, T., Spatz, M., Chaudhry, A., Maric, D., Luby, M., Frank, J., et al. (2011). Stromal-Derived Factor-1 α Correlates With Circulating Endothelial Progenitor Cells and With Acute Lesion Volume in Stroke Patients. *Stroke* 42, 618–625. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.596007
- Boisseau, W., Desilles, J.-P., Fahed, R., Kyheng, M., Zuber, K., Sabben, C., et al. (2019). Neutrophil count predicts poor outcome despite recanalization after endovascular therapy. *Neurology* 93, e467–e475. doi: 10.1212/WNL.00000000000007859
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* 33, 657–670. doi: 10.1016/j.immuni.2010.11.011
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., et al. (2004). Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Sci. New Ser.* 303, 1532–1535.
- Brioschi, S., Wang, W.-L., Peng, V., Wang, M., Shchukina, I., Greenberg, Z. J., et al. (2021). Heterogeneity of meningeal B cells reveals a lymphopoietic niche at the CNS borders. *Science* 373, eabf9277. doi: 10.1126/science.abf9277
- Brown, G. C., and Neher, J. J. (2014). Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 209–216. doi: 10.1038/nrn3710
- Brundel, B. J. J. M., Ai, X., Hills, M. T., Kuipers, M. F., Lip, G. Y. H., and de Groot, N. M. S. (2022). Atrial fibrillation. *Nat. Rev. Dis. Primer* 8, 21. doi: 10.1038/s41572-022-00347-9

- Burn, G. L., Foti, A., Marsman, G., Patel, D. F., and Zychlinsky, A. (2021). The Neutrophil. *Immunity* 54, 1377–1391. doi: 10.1016/j.immuni.2021.06.006
- Cai, W., Liu, S., Hu, M., Huang, F., Zhu, Q., Qiu, W., et al. (2020). Functional Dynamics of Neutrophils After Ischemic Stroke. *Transl. Stroke Res.* 11, 108–121. doi: 10.1007/s12975-019-00694-y
- Campbell, B. C. V., De Silva, D. A., Macleod, M. R., Coutts, S. B., Schwamm, L. H., Davis, S. M., et al. (2019a). Ischaemic stroke. *Nat. Rev. Dis. Primer* 5, 70. doi: 10.1038/s41572-019-0118-8
- Campbell, B. C. V., Ma, H., Ringleb, P. A., Parsons, M. W., Churilov, L., Bendszus, M., et al. (2019b). Extending thrombolysis to 4·5–9 h and wake-up stroke using perfusion imaging: a systematic review and meta-analysis of individual patient data. *The Lancet* 394, 139–147. doi: 10.1016/S0140-6736(19)31053-0
- Campbell, B. C. V., Mitchell, P. J., Churilov, L., Yassi, N., Kleinig, T. J., Dowling, R. J., et al. (2018). Tenecteplase versus Alteplase before Thrombectomy for Ischemic Stroke. *N. Engl. J. Med.* 378, 1573–1582. doi: 10.1056/NEJMoa1716405
- Campbell, B. C. V., Mitchell, P. J., Churilov, L., Yassi, N., Kleinig, T. J., Dowling, R. J., et al. (2020). Effect of Intravenous Tenecteplase Dose on Cerebral Reperfusion Before Thrombectomy in Patients With Large Vessel Occlusion Ischemic Stroke: The EXTEND-IA TNK Part 2 Randomized Clinical Trial. *JAMA.* doi: 10.1001/jama.2020.1511
- Candelise, L., Gattinoni, M., Bersano, A., Micieli, G., Sterzi, R., and Morabito, A. (2007). Stroke-unit care for acute stroke patients: an observational follow-up study. 369.
- CAPRIE Steering Committee (1996). A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). CAPRIE Steering Committee. *Lancet Lond. Engl.* 348, 1329–1339. doi: 10.1016/s0140-6736(96)09457-3
- Carbone, L. D., Bůžková, P., Fink, H. A., Robbins, J. A., Bethel, M., Hamrick, M. W., et al. (2017). Association of Plasma SDF-1 with Bone Mineral Density, Body Composition, and Hip Fractures in Older Adults: The Cardiovascular Health Study. *Calcif. Tissue Int.* 100, 599–608. doi: 10.1007/s00223-017-0245-8
- Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L. A., Nombela-Arrieta, C., Chèvre, R., A-González, N., et al. (2013). Rhythmic Modulation of the Hematopoietic Niche through Neutrophil Clearance. *Cell* 153, 1025–1035. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.040
- Caso, J. R., Pradillo, J. M., Hurtado, O., Lorenzo, P., Moro, M. A., and Lizasoain, I. (2007). Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* 115, 1599–1608. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.603431
- Cayuela, A., Cayuela, L., Escudero-Martínez, I., Rodríguez-Domínguez, S., González, A., Moniche, F., et al. (2016). Análisis de las tendencias en la mortalidad por enfermedades cerebrovasculares en España 1980-2011. *Neurología* 31, 370–378. doi: 10.1016/j.nrl.2014.09.002
- Cayuela, A., Cayuela, L., Ortega Belmonte, M. J., Rodríguez-Domínguez, S., Escudero-Martínez, I., and González, A. (2022). Has stroke mortality stopped declining in Spain? *Neurol. Engl. Ed.* 37, 550–556. doi: 10.1016/j.nrleng.2019.06.007

- Ceradini, D. J., Kulkarni, A. R., Callaghan, M. J., Tepper, O. M., Bastidas, N., Kleinman, M. E., et al. (2004). Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat. Med.* 10, 858–864. doi: 10.1038/nm1075
- Chamorro, A., Amaro, S., Castellanos, M., Segura, T., Arenillas, J., Martí-Fàbregas, J., et al. (2014). Safety and efficacy of uric acid in patients with acute stroke (URICO-ICTUS): a randomised, double-blind phase 2b/3 trial. *Lancet Neurol.* 13, 453–460. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70054-7
- Chamorro, Á., Lo, E. H., Renú, A., Van Leyen, K., and Lyden, P. D. (2021). The future of neuroprotection in stroke. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 92, 129–135. doi: 10.1136/jnnp-2020-324283
- Chang, Y., Kim, B. M., Bang, O. Y., Baek, J.-H., Heo, J. H., Nam, H. S., et al. (2018). Rescue Stenting for Failed Mechanical Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke: A Multicenter Experience. *Stroke* 49, 958–964. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.020072
- Chatterjee, M., and Gawaz, M. (2013). Platelet-derived CXCL12 (SDF-1 α): basic mechanisms and clinical implications. *J. Thromb. Haemost.* 11, 1954–1967. doi: 10.1111/jth.12404
- Chaturvedi, S., Adams, H. P., and Woolson, R. F. (1999). Circadian Variation in Ischemic Stroke Subtypes. *Stroke* 30, 1792–1795. doi: 10.1161/01.STR.30.9.1792
- Chen, J., Bai, Y., Xue, K., Li, Z., Zhu, Z., Li, Q., et al. (2023). CREB1-driven CXCR4hi neutrophils promote skin inflammation in mouse models and human patients. *Nat. Commun.* 14, 5894. doi: 10.1038/s41467-023-41484-3
- Chen, R.-L., Balami, J. S., Esiri, M. M., Chen, L.-K., and Buchan, A. M. (2010). Ischemic stroke in the elderly: an overview of evidence. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 256–265. doi: 10.1038/nrneurol.2010.36
- Choi, M. H., Park, G. H., Lee, J. S., Lee, S. E., Lee, S.-J., Kim, J.-H., et al. (2018). Erythrocyte Fraction Within Retrieved Thrombi Contributes to Thrombolytic Response in Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 49, 652–659. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.019138
- Chu, H. X., Broughton, B. R. S., Kim, H. A., Lee, S., Drummond, G. R., and Sobey, C. G. (2015). Evidence That Ly6C(hi) Monocytes are Protective in Acute Ischemic Stroke by Promoting M2 Macrophage Polarization. *Stroke* 46, 1929–1937. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.009426
- Clark, S. R., Ma, A. C., Tavener, S. A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M. M., et al. (2007). Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat. Med.* 13, 463–469. doi: 10.1038/nm1565
- Clarkson, B. D. S., Ling, C., Shi, Y., Harris, M. G., Rayasam, A., Sun, D., et al. (2014). T cell-derived interleukin (IL)-21 promotes brain injury following stroke in mice. *J. Exp. Med.* 211, 595–604. doi: 10.1084/jem.20131377
- CLOTS (Clots in Legs Or sTockings after Stroke) Trials Collaboration, Dennis, M., Sandercock, P., Reid, J., Graham, C., Forbes, J., et al. (2013). Effectiveness of intermittent pneumatic compression in reduction of risk of deep vein thrombosis in patients who have had a stroke (CLOTS 3): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 382, 516–524. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61050-8
- Colchero, M. A., Rivera-Dommarco, J., Popkin, B. M., and Ng, S. W. (2017). In Mexico, Evidence Of Sustained Consumer Response Two Years After Implementing A

- Sugar-Sweetened Beverage Tax. *Health Aff. (Millwood)* 36, 564–571. doi: 10.1377/hlthaff.2016.1231
- Compagne, K. C. J., Boers, A. M. M., Marquering, H. A., Berkhemer, O. A., Yoo, A. J., Beenen, L. F. M., et al. (2019). Follow-up infarct volume as a mediator of endovascular treatment effect on functional outcome in ischaemic stroke. *Eur. Radiol.* 29, 736–744. doi: 10.1007/s00330-018-5578-9
- Coutts, S. B., Berge, E., Campbell, B. C., Muir, K. W., and Parsons, M. W. (2018). Tenecteplase for the treatment of acute ischemic stroke: A review of completed and ongoing randomized controlled trials. *Int. J. Stroke* 13, 885–892. doi: 10.1177/1747493018790024
- Cruz-Flores, S., Rabinstein, A., Biller, J., Elkind, M. S. V., Griffith, P., Gorelick, P. B., et al. (2011). Racial-Ethnic Disparities in Stroke Care: The American Experience: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 42, 2091–2116. doi: 10.1161/STR.0b013e3182213e24
- Cuartero, M. I., Ballesteros, I., Moraga, A., Nombela, F., Vivancos, J., Hamilton, J. A., et al. (2013). N2 neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke: modulation by the PPAR γ agonist rosiglitazone. *Stroke* 44, 3498–3508. doi: 10.1161/STROKEAHA.113.002470
- Cugurra, A., Mamuladze, T., Rustenhoven, J., Dykstra, T., Beroshvili, G., Greenberg, Z. J., et al. (2021). Skull and vertebral bone marrow are myeloid cell reservoirs for the meninges and CNS parenchyma. *Science* 373, eabf7844. doi: 10.1126/science.abf7844
- Cutolo, M. (2011). Circadian and circannual rhythms in RA. *Nat. Rev. Rheumatol.* 7, 500–502. doi: 10.1038/nrrheum.2011.115
- Darbousset, R., Thomas, G. M., Mezouar, S., Frère, C., Bonier, R., Mackman, N., et al. (2012). Tissue factor–positive neutrophils bind to injured endothelial wall and initiate thrombus formation. *Blood* 120, 2133–2143. doi: 10.1182/blood-2012-06-437772
- Dawson, J., Béjot, Y., Christensen, L. M., De Marchis, G. M., Dichgans, M., Hagberg, G., et al. (2022). European Stroke Organisation (ESO) guideline on pharmacological interventions for long-term secondary prevention after ischaemic stroke or transient ischaemic attack. *Eur. Stroke J.* 7, I–XLI. doi: 10.1177/23969873221100032
- Dawson, J., Merwick, Á., Webb, A., Dennis, M., Ferrari, J., Fonseca, A. C., et al. (2021). European Stroke Organisation expedited recommendation for the use of short-term dual antiplatelet therapy early after minor stroke and high-risk TIA. *Eur. Stroke J.* 6, CLXXXVII–CXCI. doi: 10.1177/23969873211000877
- Demaerschalk, B. M., Kleindorfer, D. O., Adeoye, O. M., Demchuk, A. M., Fugate, J. E., Grotta, J. C., et al. (2016). Scientific Rationale for the Inclusion and Exclusion Criteria for Intravenous Alteplase in Acute Ischemic Stroke: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 47, 581–641. doi: 10.1161/STR.0000000000000086
- Denorme, F., Portier, I., Rustad, J. L., Cody, M. J., de Araujo, C. V., Hoki, C., et al. (2022). Neutrophil extracellular traps regulate ischemic stroke brain injury. *J. Clin. Invest.* 132, e154225. doi: 10.1172/JCI154225

- Devi, S., Wang, Y., Chew, W. K., Lima, R., A-González, N., Mattar, C. N. Z., et al. (2013). Neutrophil mobilization via plerixafor-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow. *J. Exp. Med.* 210, 2321–2336. doi: 10.1084/jem.20130056
- Díaz-Guzmán, J., Egido, J.-A., Gabriel-Sánchez, R., Barberá-Comes, G., Fuentes-Gimeno, B., Fernández-Pérez, C., et al. (2012). Stroke and transient ischemic attack incidence rate in Spain: the IBERICTUS study. *Cerebrovasc. Dis. Basel Switz.* 34, 272–281. doi: 10.1159/000342652
- Dichgans, M., Pulit, S. L., and Rosand, J. (2019). Stroke genetics: discovery, biology, and clinical applications. *Lancet Neurol.* 18, 587–599. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30043-2
- Dimitrijevic, O. B., Stamatovic, S. M., Keep, R. F., and Andjelkovic, A. V. (2007). Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Stroke* 38, 1345–1353. doi: 10.1161/01.STR.0000259709.16654.8f
- Doyle, K. P., Quach, L. N., Solé, M., Axtell, R. C., Nguyen, T.-V. V., Soler-Llavina, G. J., et al. (2015). B-Lymphocyte-Mediated Delayed Cognitive Impairment following Stroke. *J. Neurosci.* 35, 2133–2145. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4098-14.2015
- Duan, X.-X., Zhang, G.-P., Wang, X.-B., Yu, H., Wu, J.-L., Liu, K.-Z., et al. (2015). The diagnostic and prognostic value of serum CXCL12 levels in patients with ischemic stroke. *Neurol. Sci.* 36, 2227–2234. doi: 10.1007/s10072-015-2341-8
- Ducroux, C., Di Meglio, L., Loyau, S., Delbosc, S., Boisseau, W., Deschildre, C., et al. (2018). Thrombus Neutrophil Extracellular Traps Content Impair tPA-Induced Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 49, 754–757. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.019896
- Durrington, H. J., Farrow, S. N., Loudon, A. S., and Ray, D. W. (2014). The circadian clock and asthma. *Thorax* 69, 90–92. doi: 10.1136/thoraxjnl-2013-203482
- Ekker, M. S., Verhoeven, J. I., Vaartjes, I., Van Nieuwenhuizen, K. M., Klijn, C. J. M., and De Leeuw, F.-E. (2019). Stroke incidence in young adults according to age, subtype, sex, and time trends. *Neurology* 92, e2444–e2454. doi: 10.1212/WNL.0000000000007533
- Elkind, M. S. V., Ramakrishnan, P., Moon, Y. P., Boden-Albala, B., Liu, K. M., Spitalnik, S. L., et al. (2010). Infectious burden and risk of stroke: the northern Manhattan study. *Arch. Neurol.* 67, 33–38. doi: 10.1001/archneurol.2009.271
- Ella, K., Csépanyi-Kömi, R., and Káldi, K. (2016). Circadian regulation of human peripheral neutrophils. *Brain. Behav. Immun.* 57, 209–221. doi: 10.1016/j.bbi.2016.04.016
- Elliott, W. J. (1998). Circadian Variation in the Timing of Stroke Onset: A Meta-analysis. *Stroke* 29, 992–996. doi: 10.1161/01.STR.29.5.992
- Emberson, J., Lees, K. R., Lyden, P., Blackwell, L., Albers, G., Bluhmki, E., et al. (2014). Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *The Lancet* 384, 1929–1935. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60584-5
- Emerging Risk Factors Collaboration, Kaptoge, S., Di Angelantonio, E., Lowe, G., Pepys, M. B., Thompson, S. G., et al. (2010). C-reactive protein concentration and risk of coronary heart disease, stroke, and mortality: an individual participant meta-analysis. *Lancet Lond. Engl.* 375, 132–140. doi: 10.1016/S0140-6736(09)61717-7

- Emsley, H. (2003). An early and sustained peripheral inflammatory response in acute ischaemic stroke: relationships with infection and atherosclerosis. *J. Neuroimmunol.* 139, 93–101. doi: 10.1016/S0165-5728(03)00134-6
- Ermine, C. M., Bivard, A., Parsons, M. W., and Baron, J.-C. (2021). The ischemic penumbra: From concept to reality. *Int. J. Stroke* 16, 497–509. doi: 10.1177/1747493020975229
- Esposito, E., Li, W., T. Mandeville, E., Park, J.-H., Şencan, I., Guo, S., et al. (2020). Potential circadian effects on translational failure for neuroprotection. *Nature* 582, 395–398. doi: 10.1038/s41586-020-2348-z
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M.-I., Corella, D., Arós, F., et al. (2018). Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *N. Engl. J. Med.* 378, e34. doi: 10.1056/NEJMoa1800389
- Fang, H.-J., Zhou, Y.-H., Tian, Y.-J., Du, H.-Y., Sun, Y.-X., and Zhong, L.-Y. (2016). Effects of intensive glucose lowering in treatment of type 2 diabetes mellitus on cardiovascular outcomes: A meta-analysis of data from 58,160 patients in 13 randomized controlled trials. *Int. J. Cardiol.* 218, 50–58. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.04.163
- Fernández, G., Moraga, A., Cuartero, M. I., García-Culebras, A., Peña-Martínez, C., Pradillo, J. M., et al. (2018). TLR4-Binding DNA Aptamers Show a Protective Effect against Acute Stroke in Animal Models. *Mol. Ther.* 26, 2047–2059. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.05.019
- Fernández Sanz, A., Ruiz Serrano, J., Tejada Meza, H., and Marta Moreno, J. (2022). Validación del cuestionario simplificado de la escala modificada Rankin (smRSq) telefónico en castellano. *Neurología* 37, 271–276. doi: 10.1016/j.nrl.2019.03.003
- Fiorelli, M., Bastianello, S., von Kummer, R., del Zoppo, G. J., Larrue, V., Lesaffre, E., et al. (1999). Hemorrhagic transformation within 36 hours of a cerebral infarct: relationships with early clinical deterioration and 3-month outcome in the European Cooperative Acute Stroke Study I (ECASS I) cohort. *Stroke* 30, 2280–2284. doi: 10.1161/01.str.30.11.2280
- Fisher, M., and Savitz, S. I. (2022). Pharmacological brain cytoprotection in acute ischaemic stroke — renewed hope in the reperfusion era. *Nat. Rev. Neurol.* 18, 193–202. doi: 10.1038/s41582-021-00605-6
- Franck, G., Mawson, T. L., Folco, E. J., Molinaro, R., Ruvkun, V., Engelbertsen, D., et al. (2018). Roles of PAD4 and NETosis in Experimental Atherosclerosis and Arterial Injury. *Circ. Res.* 123, 33–42. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312494
- Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., et al. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* 16, 183–194. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.017
- Fuchs, T. A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D. D., et al. (2010). Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 15880–15885. doi: 10.1073/pnas.1005743107
- Furie, K. (2020). Epidemiology and Primary Prevention of Stroke.
- Gao, J.-H., He, L.-H., Yu, X.-H., Zhao, Z.-W., Wang, G., Zou, J., et al. (2019). CXCL12 promotes atherosclerosis by downregulating ABCA1 expression via the CXCR4/GSK3β/β-catenin/T120/TCF21 pathway. *J. Lipid Res.* 60, 2020–2033. doi: 10.1194/jlr.RA119000100

- García-Culebras, A., Durán-Laforet, V., Peña-Martínez, C., Moraga, A., Ballesteros, I., Cuartero, M. I., et al. (2019). Role of TLR4 (Toll-Like Receptor 4) in N1/N2 Neutrophil Programming After Stroke. *Stroke* 50, 2922–2932. doi: 10.1161/STROKEAHA.119.025085
- Gelderblom, M., Gallizioli, M., Ludewig, P., Thom, V., Arunachalam, P., Rissiek, B., et al. (2018). IL-23 (Interleukin-23)-Producing Conventional Dendritic Cells Control the Detrimental IL-17 (Interleukin-17) Response in Stroke. *Stroke* 49, 155–164. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.019101
- Gelderblom, M., Leypoldt, F., Steinbach, K., Behrens, D., Choe, C.-U., Siler, D. A., et al. (2009). Temporal and Spatial Dynamics of Cerebral Immune Cell Accumulation in Stroke. *Stroke* 40, 1849–1857. doi: 10.1161/STROKEAHA.108.534503
- George, P. M., and Steinberg, G. K. (2015). Novel Stroke Therapeutics: Unraveling Stroke Pathophysiology and Its Impact on Clinical Treatments. *Neuron* 87, 297–309. doi: 10.1016/j.neuron.2015.05.041
- Ghasemzadeh, M., and Hosseini, E. (2015). Intravascular leukocyte migration through platelet thrombi: directing leukocytes to sites of vascular injury. *Thromb. Haemost.* 113, 1224–1235. doi: 10.1160/TH14-08-0662
- Ghozy, S., Kacimi, S. E. O., Azzam, A. Y., Farahat, R. A., Abdelaal, A., Kallmes, K. M., et al. (2022). Successful mechanical thrombectomy in acute ischemic stroke: revascularization grade and functional independence. *J. NeuroInterventional Surg.* 14, 779–782. doi: 10.1136/neurintsurg-2021-018436
- Gliem, M., Mausberg, A. K., Lee, J.-I., Simiantonakis, I., van Rooijen, N., Hartung, H.-P., et al. (2012). Macrophages prevent hemorrhagic infarct transformation in murine stroke models. *Ann. Neurol.* 71, 743–752. doi: 10.1002/ana.23529
- Golombek, D. A., and Rosenstein, R. E. (2010). Physiology of Circadian Entrainment. *Physiol. Rev.* 90, 1063–1102. doi: 10.1152/physrev.00009.2009
- Gómez-Moreno, D., Adrover, J. M., and Hidalgo, A. (2018). Neutrophils as effectors of vascular inflammation. *Eur. J. Clin. Invest.* 48, e12940. doi: 10.1111/eci.12940
- Goyal, M., Fargen, K. M., Turk, A. S., Mocco, J., Liebeskind, D. S., Frei, D., et al. (2014). 2C or not 2C: defining an improved revascularization grading scale and the need for standardization of angiography outcomes in stroke trials. *J. NeuroInterventional Surg.* 6, 83–86. doi: 10.1136/neurintsurg-2013-010665
- Goyal, M., Menon, B. K., van Zwam, W. H., Dippel, D. W. J., Mitchell, P. J., Demchuk, A. M., et al. (2016). Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *The Lancet* 387, 1723–1731. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00163-X
- Guyon, A. (2014). CXCL12 chemokine and its receptors as major players in the interactions between immune and nervous systems. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 65. doi: 10.3389/fncel.2014.00065
- Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Dávalos, A., Guidetti, D., et al. (2008). Thrombolysis with Alteplase 3 to 4.5 Hours after Acute Ischemic Stroke. *N. Engl. J. Med.* 359, 1317–1329. doi: 10.1056/NEJMoa0804656
- Hall, C. N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N. B., Mishra, A., Sutherland, B. A., et al. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. *Nature* 508, 55–60. doi: 10.1038/nature13165

- Haupt, M., Gerner, S. T., Bähr, M., and Doepfner, T. R. (2023). Neuroprotective Strategies for Ischemic Stroke—Future Perspectives. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 4334. doi: 10.3390/ijms24054334
- Hernandez, P. A., Gorlin, R. J., Lukens, J. N., Taniuchi, S., Bohinjec, J., Francois, F., et al. (2003). Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. *Nat. Genet.* 34, 70–74. doi: 10.1038/ng1149
- Hernández-Jiménez, M., Abad-Santos, F., Cotgreave, I., Gallego, J., Jilma, B., Flores, A., et al. (2023). Safety and Efficacy of ApTOLL in Patients With Ischemic Stroke Undergoing Endovascular Treatment: A Phase 1/2 Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol.* doi: 10.1001/jamaneurol.2023.1660
- Hernández-Jiménez, M., Martín-Vílchez, S., Ochoa, D., Mejía-Abril, G., Román, M., Camargo-Mamani, P., et al. (2022). First-in-human phase I clinical trial of a TLR4-binding DNA aptamer, ApTOLL: Safety and pharmacokinetics in healthy volunteers. *Mol. Ther. Nucleic Acids* 28, 124–135. doi: 10.1016/j.omtn.2022.03.005
- Hernández-López, C., Varas, A., Sacedón, R., Martínez, V. G., Hidalgo, L., Valencia, J., et al. (2010). The CXCL12/CXCR4 Pair in Aged Human Thymus. *Neuroimmunomodulation* 17, 217–220. doi: 10.1159/000258728
- Higashida, R. T., Furlan, A. J., Roberts, H., Tomsick, T., Connors, B., Barr, J., et al. (2003). Trial design and reporting standards for intra-arterial cerebral thrombolysis for acute ischemic stroke. *Stroke* 34, e109-137. doi: 10.1161/01.STR.0000082721.62796.09
- Hill, M. D., Goyal, M., Menon, B. K., Nogueira, R. G., McTaggart, R. A., Demchuk, A. M., et al. (2020). Efficacy and safety of nerinetide for the treatment of acute ischaemic stroke (ESCAPE-NA1): a multicentre, double-blind, randomised controlled trial. *Lancet Lond. Engl.* 395, 878–887. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30258-0
- Hillbom, M., Saloheimo, P., and Juvela, S. (2011). Alcohol Consumption, Blood Pressure, and the Risk of Stroke. *Curr. Hypertens. Rep.* 13, 208–213. doi: 10.1007/s11906-011-0194-y
- Hindricks, G., Potpara, T., Dagres, N., Arbelo, E., Bax, J. J., Blomström-Lundqvist, C., et al. (2021). 2020 ESC Guidelines for the diagnosis and management of atrial fibrillation developed in collaboration with the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS). *Eur. Heart J.* 42, 373–498. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa612
- Holodinsky, J. K., Zerna, C., Malo, S., Svenson, L. W., and Hill, M. D. (2022). Association between influenza vaccination and risk of stroke in Alberta, Canada: a population-based study. *Lancet Public Health* 7, e914–e922. doi: 10.1016/S2468-2667(22)00222-5
- Huang, J., Li, Y., Tang, Y., Tang, G., Yang, G.-Y., and Wang, Y. (2013). CXCR4 Antagonist AMD3100 Protects Blood–Brain Barrier Integrity and Reduces Inflammatory Response After Focal Ischemia in Mice. *Stroke* 44, 190–197. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.670299
- Iadecola, C., and Anrather, J. (2011). The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat. Med.* 17, 796–808. doi: 10.1038/nm.2399

- Iadecola, C., Buckwalter, M. S., and Anrather, J. (2020). Immune responses to stroke: mechanisms, modulation, and therapeutic potential. *J. Clin. Invest.* 130, 2777–2788. doi: 10.1172/JCI135530
- Jain, A., and Pasare, C. (2017). Innate Control of Adaptive Immunity: Beyond the Three-Signal Paradigm. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 198, 3791–3800. doi: 10.4049/jimmunol.1602000
- Jang, I. K., Gold, H. K., Ziskind, A. A., Fallon, J. T., Holt, R. E., Leinbach, R. C., et al. (1989). Differential sensitivity of erythrocyte-rich and platelet-rich arterial thrombi to lysis with recombinant tissue-type plasminogen activator. A possible explanation for resistance to coronary thrombolysis. *Circulation* 79, 920–928. doi: 10.1161/01.cir.79.4.920
- Janssens, R., Struyf, S., and Proost, P. (2018). Pathological roles of the homeostatic chemokine CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev.* 44, 51–68. doi: 10.1016/j.cytogfr.2018.10.004
- January, C. T., Wann, L. S., Calkins, H., Chen, L. Y., Cigarroa, J. E., Cleveland, J. C., et al. (2019). 2019 AHA/ACC/HRS Focused Update of the 2014 AHA/ACC/HRS Guideline for the Management of Patients With Atrial Fibrillation: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines and the Heart Rhythm Society in Collaboration With the Society of Thoracic Surgeons. *Circulation* 140. doi: 10.1161/CIR.0000000000000665
- Jickling, G. C., and Dziedzic, T. (2019). Neutrophil count is related to stroke outcome following endovascular therapy. *Neurology* 93, 194–195. doi: 10.1212/WNL.00000000000007851
- Jiménez-Alcázar, M., Rangaswamy, C., Panda, R., Bitterling, J., Simsek, Y. J., Long, A. T., et al. (2017). Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science* 358, 1202–1206. doi: 10.1126/science.aam8897
- Jin, W.-N., Gonzales, R., Feng, Y., Wood, K., Chai, Z., Dong, J.-F., et al. (2018). Brain Ischemia Induces Diversified Neuroantigen-Specific T-Cell Responses That Exacerbate Brain Injury. *Stroke* 49, 1471–1478. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.020203
- Jin, W.-N., Shi, S. X.-Y., Li, Z., Li, M., Wood, K., Gonzales, R. J., et al. (2017). Depletion of microglia exacerbates postischemic inflammation and brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37, 2224–2236. doi: 10.1177/0271678X17694185
- Johnson, C. O., Nguyen, M., Roth, G. A., Nichols, E., Alam, T., Abate, D., et al. (2019). Global, regional, and national burden of stroke, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurol.* 18, 439–458. doi: 10.1016/S1474-4422(19)30034-1
- Jolugbo, P., and Ariëns, R. A. S. (2021). Thrombus Composition and Efficacy of Thrombolysis and Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke. *Stroke* 52, 1131–1142. doi: 10.1161/STROKEAHA.120.032810
- Kang, L., Yu, H., Yang, X., Zhu, Y., Bai, X., Wang, R., et al. (2020). Neutrophil extracellular traps released by neutrophils impair revascularization and vascular remodeling after stroke. *Nat. Commun.* 11, 2488. doi: 10.1038/s41467-020-16191-y
- Kasner, S. E. (2006). Clinical interpretation and use of stroke scales. *Lancet Neurol.* 5, 603–612. doi: 10.1016/S1474-4422(06)70495-1

- Kebir, H., Kreymborg, K., Ifergan, I., Dodelet-Devillers, A., Cayrol, R., Bernard, M., et al. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* 13, 1173–1175. doi: 10.1038/nm1651
- Kelly-Hayes, M., Beiser, A., Kase, C. S., Scaramucci, A., D'Agostino, R. B., and Wolf, P. A. (2003). The influence of gender and age on disability following ischemic stroke: the Framingham study. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 12, 119–126. doi: 10.1016/S1052-3057(03)00042-9
- Kim, J. S., Kim, Y.-J., Ahn, S.-H., and Kim, B. J. (2018). Location of cerebral atherosclerosis: Why is there a difference between East and West? *Int. J. Stroke* 13, 35–46. doi: 10.1177/1747493016647736
- Kim, S.-W., Lee, H., Lee, H.-K., Kim, I.-D., and Lee, J.-K. (2019). Neutrophil extracellular trap induced by HMGB1 exacerbates damages in the ischemic brain. *Acta Neuropathol. Commun.* 7, 94. doi: 10.1186/s40478-019-0747-x
- Kim, Y. S., Baek, W., Kim, M. K., Kim, H. Y., Lee, K.-Y., Lee, Y. J., et al. (2012). Association between Serum Stromal Cell-Derived Factor-1 α and Long-Term Outcome of Acute Ischemic Stroke. *Eur. Neurol.* 67, 363–369. doi: 10.1159/000335351
- Kim, Y.-E., Huh, K., Park, Y.-J., Peck, K. R., and Jung, J. (2022). Association Between Vaccination and Acute Myocardial Infarction and Ischemic Stroke After COVID-19 Infection. *JAMA* 328, 887–889. doi: 10.1001/jama.2022.12992
- Kleinschnitz, C., Kraft, P., Dreykluft, A., Hagedorn, I., Göbel, K., Schuhmann, M. K., et al. (2013). Regulatory T cells are strong promoters of acute ischemic stroke in mice by inducing dysfunction of the cerebral microvasculature. *Blood* 121, 679–691. doi: 10.1182/blood-2012-04-426734
- Kleinschnitz, C., Schwab, N., Kraft, P., Hagedorn, I., Dreykluft, A., Schwarz, T., et al. (2010). Early detrimental T-cell effects in experimental cerebral ischemia are neither related to adaptive immunity nor thrombus formation. *Blood* 115, 3835–3842. doi: 10.1182/blood-2009-10-249078
- Klijn, C. J., Paciaroni, M., Berge, E., Korompoki, E., Kőrv, J., Lal, A., et al. (2019). Antithrombotic treatment for secondary prevention of stroke and other thromboembolic events in patients with stroke or transient ischemic attack and non-valvular atrial fibrillation: A European Stroke Organisation guideline. *Eur. Stroke J.* 4, 198–223. doi: 10.1177/2396987319841187
- Knight, J. S., Luo, W., O'Dell, A. A., Yalavarthi, S., Zhao, W., Subramanian, V., et al. (2014). Peptidylarginine Deiminase Inhibition Reduces Vascular Damage and Modulates Innate Immune Responses in Murine Models of Atherosclerosis. *Circ. Res.* 114, 947–956. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.114.303312
- Kolaczowska, E., and Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 159–175. doi: 10.1038/nri3399
- Konsman, J. P., Drukarch, B., and Van Dam, A.-M. (2007). (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 112, 1–25. doi: 10.1042/CS20060043
- Kotadia, I. D., Sim, I., Mukherjee, R., O'Hare, D., Chiribiri, A., Birns, J., et al. (2021). Secondary Stroke Prevention Following Embolic Stroke of Unknown Source in the Absence of Documented Atrial Fibrillation: A Clinical Review. *J. Am. Heart Assoc.* 10, e021045. doi: 10.1161/JAHA.121.021045

- Krishnamurthi, R. V., Feigin, V. L., Forouzanfar, M. H., Mensah, G. A., Connor, M., Bennett, D. A., et al. (2013). Global and regional burden of first-ever ischaemic and haemorrhagic stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet Glob. Health* 1, e259–e281. doi: 10.1016/S2214-109X(13)70089-5
- Kvistad, C. E., Næss, H., Helleberg, B. H., Idicula, T., Hagberg, G., Nordby, L. M., et al. (2022). Tenecteplase versus alteplase for the management of acute ischaemic stroke in Norway (NOR-TEST 2, part A): a phase 3, randomised, open-label, blinded endpoint, non-inferiority trial. *Lancet Neurol.* 21, 511–519. doi: 10.1016/S1474-4422(22)00124-7
- Lafon, A., Pereira, B., Dufour, T., Rigouby, V., Giroud, M., Béjot, Y., et al. (2014). Periodontal disease and stroke: a meta-analysis of cohort studies. *Eur. J. Neurol.* 21, 1155–1161, e66-67. doi: 10.1111/ene.12415
- Lalancette-Hébert, M., Gowing, G., Simard, A., Weng, Y. C., and Kriz, J. (2007). Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 2596–2605. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5360-06.2007
- Langhorne, P., Ramachandra, S., and Stroke Unit Trialists' Collaboration (2020). Organised inpatient (stroke unit) care for stroke: network meta-analysis. *Cochrane Database Syst. Rev.* doi: 10.1002/14651858.CD000197.pub4
- Lapostolle, A., Loyer, C., Elhorany, M., Chaigneau, T., Bielle, F., Alamowitch, S., et al. (2023). Neutrophil Extracellular Traps in Ischemic Stroke Thrombi Are Associated With Poor Clinical Outcome. *Stroke Vasc. Interv. Neurol.* 3, e000639. doi: 10.1161/SVIN.122.000639
- Laridan, E., Denorme, F., Desender, L., François, O., Andersson, T., Deckmyn, H., et al. (2017). Neutrophil extracellular traps in ischemic stroke thrombi: NETs in Stroke. *Ann. Neurol.* 82, 223–232. doi: 10.1002/ana.24993
- Leberzammer, J., Agten, S. M., Blanchet, X., Duan, R., Ippel, H., Megens, R. T. A., et al. (2022). Targeting platelet-derived CXCL12 impedes arterial thrombosis. *Blood* 139, 2691–2705. doi: 10.1182/blood.2020010140
- Lecour, S., Du Pré, B. C., Bøtker, H. E., Brundel, B. J. J. M., Daiber, A., Davidson, S. M., et al. (2022). Circadian rhythms in ischaemic heart disease: key aspects for preclinical and translational research: position paper of the ESC working group on cellular biology of the heart. *Cardiovasc. Res.* 118, 2566–2581. doi: 10.1093/cvr/cvab293
- Lees, K. R., and Bluhmki, E. (2010). Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. 375.
- Leng, Y., Blackwell, T., Cawthon, P. M., Ancoli-Israel, S., Stone, K. L., and Yaffe, K. (2020). Association of Circadian Abnormalities in Older Adults With an Increased Risk of Developing Parkinson Disease. *JAMA Neurol.* 77, 1270. doi: 10.1001/jamaneurol.2020.1623
- Leproult, R., and Van Cauter, E. (2010). Role of Sleep and Sleep Loss in Hormonal Release and Metabolism. *Endocr. Dev.* 17, 11–21. doi: 10.1159/000262524
- Li, M., and Ransohoff, R. M. (2008). Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: A migration from immunology to neurobiology. *Prog. Neurobiol.* 84, 116–131. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.11.003

- Li, X., Lyu, J., Li, R., Jain, V., Shen, Y., Del Águila, Á., et al. (2022). Single-cell transcriptomic analysis of the immune cell landscape in the aged mouse brain after ischemic stroke. *J. Neuroinflammation* 19, 83. doi: 10.1186/s12974-022-02447-5
- Liesz, A., Suri-Payer, E., Veltkamp, C., Doerr, H., Sommer, C., Rivest, S., et al. (2009). Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat. Med.* 15, 192–199. doi: 10.1038/nm.1927
- Liu, P., Xiang, J.-W., and Jin, S.-X. (2015). Serum CXCL12 levels are associated with stroke severity and lesion volumes in stroke patients. *Neurol. Res.* 37, 853–858. doi: 10.1179/1743132815Y.0000000063
- Logallo, N., Kvistad, C. E., and Thomassen, L. (2015). Therapeutic Potential of Tenecteplase in the Management of Acute Ischemic Stroke. *CNS Drugs* 29, 811–818. doi: 10.1007/s40263-015-0280-9
- Love, S. (2006). Oxidative Stress in Brain Ischemia. *Brain Pathol.* 9, 119–131. doi: 10.1111/j.1750-3639.1999.tb00214.x
- Lu, D.-Y., Tang, C.-H., Yeh, W.-L., Wong, K.-L., Lin, C.-P., Chen, Y.-H., et al. (2009). SDF-1 α up-regulates interleukin-6 through CXCR4, PI3K/Akt, ERK, and NF- κ B-dependent pathway in microglia. *Eur. J. Pharmacol.* 613, 146–154. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.03.001
- Lyden, P., Brott, T., Tilley, B., Welch, K. M., Mascha, E. J., Levine, S., et al. (1994). Improved reliability of the NIH Stroke Scale using video training. NINDS TPA Stroke Study Group. *Stroke* 25, 2220–2226. doi: 10.1161/01.STR.25.11.2220
- Lyden, P., Buchan, A., Boltze, J., Fisher, M., Ansari, S., Broderick, J. P., et al. (2021). Top Priorities for Cerebroprotective Studies—A Paradigm Shift: Report From STAIR XI. *Stroke* 52, 3063–3071. doi: 10.1161/STROKEAHA.121.034947
- Ma, H., Campbell, B. C. V., Parsons, M. W., Churilov, L., Levi, C. R., Hsu, C., et al. (2019). Thrombolysis Guided by Perfusion Imaging up to 9 Hours after Onset of Stroke. *N. Engl. J. Med.* 380, 1795–1803. doi: 10.1056/NEJMoa1813046
- Ma, Q., Jones, D., Borghesani, P. R., Segal, R. A., Nagasawa, T., Kishimoto, T., et al. (1998). Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9448–9453. doi: 10.1073/pnas.95.16.9448
- Maaijwee, N. A. M. M., Rutten-Jacobs, L. C. A., Arntz, R. M., Schaapsmeeders, P., Schoonderwaldt, H. C., van Dijk, E. J., et al. (2014). Long-term increased risk of unemployment after young stroke: A long-term follow-up study. *Neurology* 83, 1132–1138. doi: 10.1212/WNL.0000000000000817
- Markus, H. S. (2004). Cerebral perfusion and stroke. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75, 353–361. doi: 10.1136/jnnp.2003.025825
- Martin, R. L., Lloyd, H. G. E., and Cowan, A. I. (1994). The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci.* 17, 251–257. doi: 10.1016/0166-2236(94)90008-6
- Martinod, K., Demers, M., Fuchs, T. A., Wong, S. L., Brill, A., Gallant, M., et al. (2013). Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 8674–8679. doi: 10.1073/pnas.1301059110
- Martinod, K., and Deppermann, C. (2021). Immunothrombosis and thromboinflammation in host defense and disease. *Platelets* 32, 314–324. doi: 10.1080/09537104.2020.1817360

- Mas, J.-L., Derumeaux, G., Guillon, B., Massardier, E., Hosseini, H., Mechtouff, L., et al. (2017). Patent Foramen Ovale Closure or Anticoagulation vs. Antiplatelets after Stroke. *N. Engl. J. Med.* 377, 1011–1021. doi: 10.1056/NEJMoa1705915
- Maugeri, N., Campana, L., Gavina, M., Covino, C., De Metrio, M., Panciroli, C., et al. (2014). Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J. Thromb. Haemost.* 12, 2074–2088. doi: 10.1111/jth.12710
- McNeil, J. J., Wolfe, R., Woods, R. L., Tonkin, A. M., Donnan, G. A., Nelson, M. R., et al. (2018). Effect of Aspirin on Cardiovascular Events and Bleeding in the Healthy Elderly. *N. Engl. J. Med.* 379, 1509–1518. doi: 10.1056/NEJMoa1805819
- Menon, B. K., Buck, B. H., Singh, N., Deschaintre, Y., Almekhlafi, M. A., Coutts, S. B., et al. (2022). Intravenous tenecteplase compared with alteplase for acute ischaemic stroke in Canada (ACT): a pragmatic, multicentre, open-label, registry-linked, randomised, controlled, non-inferiority trial. *The Lancet* 400, 161–169. doi: 10.1016/S0140-6736(22)01054-6
- Menon, B. K., d’Esteire, C. D., Qazi, E. M., Almekhlafi, M., Hahn, L., Demchuk, A. M., et al. (2015). Multiphase CT Angiography: A New Tool for the Imaging Triage of Patients with Acute Ischemic Stroke. *Radiology* 275, 510–520. doi: 10.1148/radiol.15142256
- Meschia, J. F., Bushnell, C., Boden-Albala, B., Braun, L. T., Bravata, D. M., Chaturvedi, S., et al. (2014). Guidelines for the Primary Prevention of Stroke. *Stroke* 45, 3754–3832. doi: 10.1161/STR.0000000000000046
- Mestas, J., and Hughes, C. C. W. (2004). Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. *J. Immunol.* 172, 2731–2738. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.2731
- Morrison, H. W., and Filosa, J. A. (2013). A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *J. Neuroinflammation* 10, 4. doi: 10.1186/1742-2094-10-4
- Mracsko, E., Liesz, A., Stojanovic, A., Lou, W. P.-K., Osswald, M., Zhou, W., et al. (2014). Antigen dependently activated cluster of differentiation 8-positive T cells cause perforin-mediated neurotoxicity in experimental stroke. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 34, 16784–16795. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1867-14.2014
- Musiek, E. S., and Holtzman, D. M. (2016). Mechanisms linking circadian clocks, sleep, and neurodegeneration. *Science* 354, 1004–1008. doi: 10.1126/science.aah4968
- Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., et al. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382, 635–638. doi: 10.1038/382635a0
- Nam, K.-W., Kim, T. J., Lee, J. S., Kwon, H.-M., Lee, Y.-S., Ko, S.-B., et al. (2018). High Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio Predicts Stroke-Associated Pneumonia. *Stroke* 49, 1886–1892. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.021228
- Naranjo, L., Ostos, F., Gil-Etayo, F. J., Hernández-Gallego, J., Cabrera-Marante, Ó., Pleguezuelo, D. E., et al. (2021). Presence of Extra-Criteria Antiphospholipid Antibodies Is an Independent Risk Factor for Ischemic Stroke. *Front. Cardiovasc. Med.* 8, 665741. doi: 10.3389/fcvm.2021.665741

- National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N. Engl. J. Med.* 333, 1581–1587. doi: 10.1056/NEJM199512143332401
- Navi, B. B., Kasner, S. E., Elkind, M. S. V., Cushman, M., Bang, O. Y., and DeAngelis, L. M. (2021). Cancer and Embolic Stroke of Undetermined Source. *Stroke* 52, 1121–1130. doi: 10.1161/STROKEAHA.120.032002
- Neuhaus, T., Stier, S., Totzke, G., Gruenewald, E., Fronhoffs, S., Sachinidis, A., et al. (2003). Stromal cell-derived factor 1 α (SDF-1 α) induces gene-expression of early growth response-1 (Egr-1) and VEGF in human arterial endothelial cells and enhances VEGF induced cell proliferation. *Cell Prolif.* 36, 75–86. doi: 10.1046/j.1365-2184.2003.00262.x
- Neumann, F.-J., Sousa-Uva, M., Ahlsson, A., Alfonso, F., Banning, A. P., Benedetto, U., et al. (2019). 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *Eur. Heart J.* 40, 87–165. doi: 10.1093/eurheartj/ehy394
- Neves, A. R., Albuquerque, T., Quintela, T., and Costa, D. (2022). Circadian rhythm and disease: Relationship, new insights, and future perspectives. *J. Cell. Physiol.* 237, 3239–3256. doi: 10.1002/jcp.30815
- Ngamsri, K.-C., Putri, R. A., Jans, C., Schindler, K., Fuhr, A., Zhang, Y., et al. (2021). CXCR4 and CXCR7 Inhibition Ameliorates the Formation of Platelet–Neutrophil Complexes and Neutrophil Extracellular Traps through Adora2b Signaling. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 13576. doi: 10.3390/ijms222413576
- Nicolás-Ávila, J. Á., Adrover, J. M., and Hidalgo, A. (2017). Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer. *Immunity* 46, 15–28. doi: 10.1016/j.immuni.2016.12.012
- Nogueira, R. G., Jadhav, A. P., Haussen, D. C., Bonafe, A., Budzik, R. F., Bhuva, P., et al. (2018). Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *N. Engl. J. Med.* 378, 11–21. doi: 10.1056/NEJMoa1706442
- Novotny, J., Oberdieck, P., Titova, A., Pelisek, J., Chandraratne, S., Nicol, P., et al. (2020). Thrombus NET content is associated with clinical outcome in stroke and myocardial infarction. *Neurology* 94, e2346–e2360. doi: 10.1212/WNL.00000000000009532
- Noya, S. B., Colameo, D., Brüning, F., Spinnler, A., Mircsof, D., Opitz, L., et al. (2019). The forebrain synaptic transcriptome is organized by clocks but its proteome is driven by sleep. *Science* 366, eaav2642. doi: 10.1126/science.aav2642
- Oberlin, E., Amara, A., Bachelier, F., Bessia, C., Virelizier, J. L., Arenzana-Seisdedos, F., et al. (1996). The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382, 833–835. doi: 10.1038/382833a0
- Obrenovitch, T. P., Urenjak, J., Richards, D. A., Ueda, Y., Curzon, G., and Symon, L. (1993). Extracellular Neuroactive Amino Acids in the Rat Striatum During Ischaemia: Comparison Between Penumbral Conditions and Ischaemia with Sustained Anoxic Depolarisation. *J. Neurochem.* 61, 178–186. doi: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb03553.x
- O'Donnell, M. J., Xavier, D., Liu, L., Zhang, H., Chin, S. L., Rao-Melacini, P., et al. (2010). Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *The Lancet* 376, 112–123. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60834-3

- Ortega, S. B., Torres, V. O., Latchney, S. E., Whoolery, C. W., Noorbhai, I. Z., Poinsette, K., et al. (2020). B cells migrate into remote brain areas and support neurogenesis and functional recovery after focal stroke in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 117, 4983–4993. doi: 10.1073/pnas.1913292117
- Ostos, F., Rodríguez-López, A., Martín Jiménez, P., Sánchez, C. S., Martínez-Salio, A., Ballenilla, F., et al. (2023). Use of Tenecteplase in Acute Ischemic Stroke in the Time of SARS-CoV-2. *The Neurohospitalist*, 19418744231167491. doi: 10.1177/19418744231167491
- Papayannopoulos, V. (2018). Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 134–147. doi: 10.1038/nri.2017.105
- Papayannopoulos, V., Metzler, K. D., Hakkim, A., and Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol.* 191, 677–691. doi: 10.1083/jcb.201006052
- Peñaloza-Martínez, E., Moreno, G., Aroca-Crevillén, A., Huertas, S., Vicent, L., Rosillo, N., et al. (2022). Circadian rhythms in thrombosis and atherothrombotic events. *Front. Biosci.-Landmark* 27, 051. doi: 10.31083/j.fbl2702051
- Peña-Martínez, C., Durán-Laforet, V., García-Culebras, A., Cuartero, M. I., Moro, M. Á., and Lizasoain, I. (2022). Neutrophil Extracellular Trap Targeting Protects Against Ischemic Damage After Fibrin-Rich Thrombotic Stroke Despite Non-Reperfusion. *Front. Immunol.* 13, 790002. doi: 10.3389/fimmu.2022.790002
- Peña-Martínez, C., Durán-Laforet, V., García-Culebras, A., Ostos, F., Hernández-Jiménez, M., Bravo-Ferrer, I., et al. (2019). Pharmacological Modulation of Neutrophil Extracellular Traps Reverses Thrombotic Stroke tPA (Tissue-Type Plasminogen Activator) Resistance. *Stroke*. doi: 10.1161/STROKEAHA.119.026848
- Petzold, T., Zhang, Z., Ballesteros, I., Saleh, I., Polzin, A., Thienel, M., et al. (2022). Neutrophil “plucking” on megakaryocytes drives platelet production and boosts cardiovascular disease. *Immunity* 55, 2285–2299.e7. doi: 10.1016/j.immuni.2022.10.001
- Pham, T.-T., Lee, E.-S., Kong, S.-Y., Kim, J., Kim, S.-Y., Joo, J., et al. (2019). Night-shift work, circadian and melatonin pathway related genes and their interaction on breast cancer risk: evidence from a case-control study in Korean women. *Sci. Rep.* 9, 10982. doi: 10.1038/s41598-019-47480-2
- Pir, G. J., Parray, A., Ayadathil, R., Pananchikkal, S. V., Mir, F. A., Muhammad, I., et al. (2022). Platelet–Neutrophil Association in NETs-Rich Areas in the Retrieved AIS Patient Thrombi. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 14477. doi: 10.3390/ijms232214477
- Pisters, R., Lane, D. A., Marin, F., Camm, A. J., and Lip, G. Y. H. (2012). Stroke and Thromboembolism in Atrial Fibrillation: – Systematic Review of Stroke Risk Factors and Risk Stratification Schema –. *Circ. J.* 76, 2289–2304. doi: 10.1253/circj.CJ-12-1036
- Planas, A. M. (2018). Role of Immune Cells Migrating to the Ischemic Brain. *Stroke* 49, 2261–2267. doi: 10.1161/STROKEAHA.118.021474
- Powers, W. J., Rabinstein, A. A., Ackerson, T., Adeoye, O. M., Bambakidis, N. C., Becker, K., et al. (2019). Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: 2019 Update to the 2018 Guidelines for the Early Management of Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 50. doi: 10.1161/STR.0000000000000211

- Psychogios, M., Brehm, A., López-Cancio, E., Marco De Marchis, G., Meseguer, E., Katsanos, A. H., et al. (2022). European Stroke Organisation guidelines on treatment of patients with intracranial atherosclerotic disease. *Eur. Stroke J.* 7, XLII–LXXX. doi: 10.1177/23969873221099715
- Pujol, F., Kitabgi, P., and Boudin, H. (2005). The chemokine SDF-1 differentially regulates axonal elongation and branching in hippocampal neurons. *J. Cell Sci.* 118, 1071–1080. doi: 10.1242/jcs.01694
- Rao, V. L., Bowen, K. K., and Dempsey, R. J. (2001). Transient focal cerebral ischemia down-regulates glutamate transporters GLT-1 and EAAC1 expression in rat brain. *Neurochem. Res.* 26, 497–502. doi: 10.1023/a:1010956711295
- Renú, A., Millán, M., San Román, L., Blasco, J., Martí-Fàbregas, J., Terceño, M., et al. (2022). Effect of Intra-arterial Alteplase vs Placebo Following Successful Thrombectomy on Functional Outcomes in Patients With Large Vessel Occlusion Acute Ischemic Stroke: The CHOICE Randomized Clinical Trial. *JAMA* 327, 826–835. doi: 10.1001/jama.2022.1645
- Ripamonti, L., Riva, R., Maioli, F., Zenesini, C., and Procaccianti, G. (2017). Daily Variation in the Occurrence of Different Subtypes of Stroke. *Stroke Res. Treat.* 2017, 9091250. doi: 10.1155/2017/9091250
- Rocha, M., and Jovin, T. G. (2017). Fast Versus Slow Progressors of Infarct Growth in Large Vessel Occlusion Stroke: Clinical and Research Implications. *Stroke* 48, 2621–2627. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.017673
- Rodríguez-Pardo, J., Riera-López, N., Fuentes, B., Alonso De Leciñana, M., Secades-García, S., Álvarez-Fraga, J., et al. (2020). Prehospital selection of thrombectomy candidates beyond large vessel occlusion: M-DIRECT scale. *Neurology* 94, e851–e860. doi: 10.1212/WNL.0000000000008998
- Ross, A. M., Hurn, P., Perrin, N., Wood, L., Carlini, W., and Potempa, K. (2007). Evidence of the Peripheral Inflammatory Response in Patients With Transient Ischemic Attack. *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 16, 203–207. doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2007.05.002
- Rueda, P., Richart, A., Récalde, A., Gasse, P., Vilar, J., Guérin, C., et al. (2012). Homeostatic and tissue reparation defaults in mice carrying selective genetic invalidation of CXCL12/proteoglycan interactions. *Circulation* 126, 1882–1895. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.113290
- Rupalla, K., Allegrini, P. R., Sauer, D., and Wiessner, C. (1998). Time course of microglia activation and apoptosis in various brain regions after permanent focal cerebral ischemia in mice. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 96, 172–178. doi: 10.1007/s004010050878
- Ruscher, K., Kuric, E., Liu, Y., Walter, H. L., Issazadeh-Navikas, S., Englund, E., et al. (2013). Inhibition of CXCL12 signaling attenuates the postischemic immune response and improves functional recovery after stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 33, 1225–1234. doi: 10.1038/jcbfm.2013.71
- Ryu, W.-S., Hong, K.-S., Jeong, S.-W., Park, J. E., Kim, B. J., Kim, J.-T., et al. (2022). Association of ischemic stroke onset time with presenting severity, acute progression, and long-term outcome: A cohort study. *PLOS Med.* 19, e1003910. doi: 10.1371/journal.pmed.1003910
- Sabatine, M. S., Giugliano, R. P., Keech, A. C., Honarpour, N., Wiviott, S. D., Murphy, S. A., et al. (2017). Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with

- Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* 376, 1713–1722. doi: 10.1056/NEJMoa1615664
- Sacco, R. L., Kasner, S. E., Broderick, J. P., Caplan, L. R., Connors, J. J. (Buddy), Culebras, A., et al. (2013). An Updated Definition of Stroke for the 21st Century: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 44, 2064–2089. doi: 10.1161/STR.0b013e318296aeca
- Sarraj, A., Hassan, A. E., Abraham, M. G., Ortega-Gutierrez, S., Kasner, S. E., Hussain, M. S., et al. (2023). Trial of Endovascular Thrombectomy for Large Ischemic Strokes. *N. Engl. J. Med.* 388, 1259–1271. doi: 10.1056/NEJMoa2214403
- Saver, J. L., Carroll, J. D., Thaler, D. E., Smalling, R. W., MacDonald, L. A., Marks, D. S., et al. (2017). Long-Term Outcomes of Patent Foramen Ovale Closure or Medical Therapy after Stroke. *N. Engl. J. Med.* 377, 1022–1032. doi: 10.1056/NEJMoa1610057
- Saver, J. L., Johnston, K. C., Homer, D., Wityk, R., Koroshetz, W., Truskowski, L. L., et al. (1999). Infarct volume as a surrogate or auxiliary outcome measure in ischemic stroke clinical trials. The RANTTAS Investigators. *Stroke* 30, 293–298. doi: 10.1161/01.str.30.2.293
- Saver, J. L., Klerman, E. B., Buchan, A. M., Calleja, P., Lizasoain, I., Bahr-Hosseini, M., et al. (2023). Consensus Recommendations for Standardized Data Elements, Scales, and Time Segmentations in Studies of Human Circadian/Diurnal Biology and Stroke. *Stroke* 54, 1943–1949. doi: 10.1161/STROKEAHA.122.041394
- Savio, K., Pietra, G. L. D., Oddone, E., Reggiani, M., and Leone, M. A. (2013). Reliability of the modified Rankin Scale applied by telephone. *Neurol. Int.* 5, e2. doi: 10.4081/ni.2013.e2
- Scheiermann, C., Gibbs, J., Ince, L., and Loudon, A. (2018). Clocking in to immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 18, 423–437. doi: 10.1038/s41577-018-0008-4
- Scheiermann, C., Kunisaki, Y., and Frenette, P. S. (2013). Circadian control of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 190–198. doi: 10.1038/nri3386
- Schilling, M., Besselmann, M., Leonhard, C., Mueller, M., Ringelstein, E. B., and Kiefer, R. (2003). Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp. Neurol.* 183, 25–33. doi: 10.1016/s0014-4886(03)00082-7
- Schloss, M. J., Horckmans, M., Nitz, K., Duchene, J., Drechsler, M., Bidzhekov, K., et al. (2016). The time-of-day of myocardial infarction onset affects healing through oscillations in cardiac neutrophil recruitment. *EMBO Mol. Med.* 8, 937–948. doi: 10.15252/emmm.201506083
- Schutt, R. C., Burdick, M. D., Strieter, R. M., Mehrad, B., and Keeley, E. C. (2012). Plasma CXCL12 Levels as a Predictor of Future Stroke. *Stroke J. Cereb. Circ.* 43, 3382–3386. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.660878
- Selvaraj, U. M., Ortega, S. B., Hu, R., Gilchrist, R., Kong, X., Partin, A., et al. (2017). Preconditioning-induced CXCL12 upregulation minimizes leukocyte infiltration after stroke in ischemia-tolerant mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 37, 801–813. doi: 10.1177/0271678X16639327
- Semerano, A., Laredo, C., Zhao, Y., Rudilosso, S., Renú, A., Llull, L., et al. (2019). Leukocytes, Collateral Circulation, and Reperfusion in Ischemic Stroke Patients

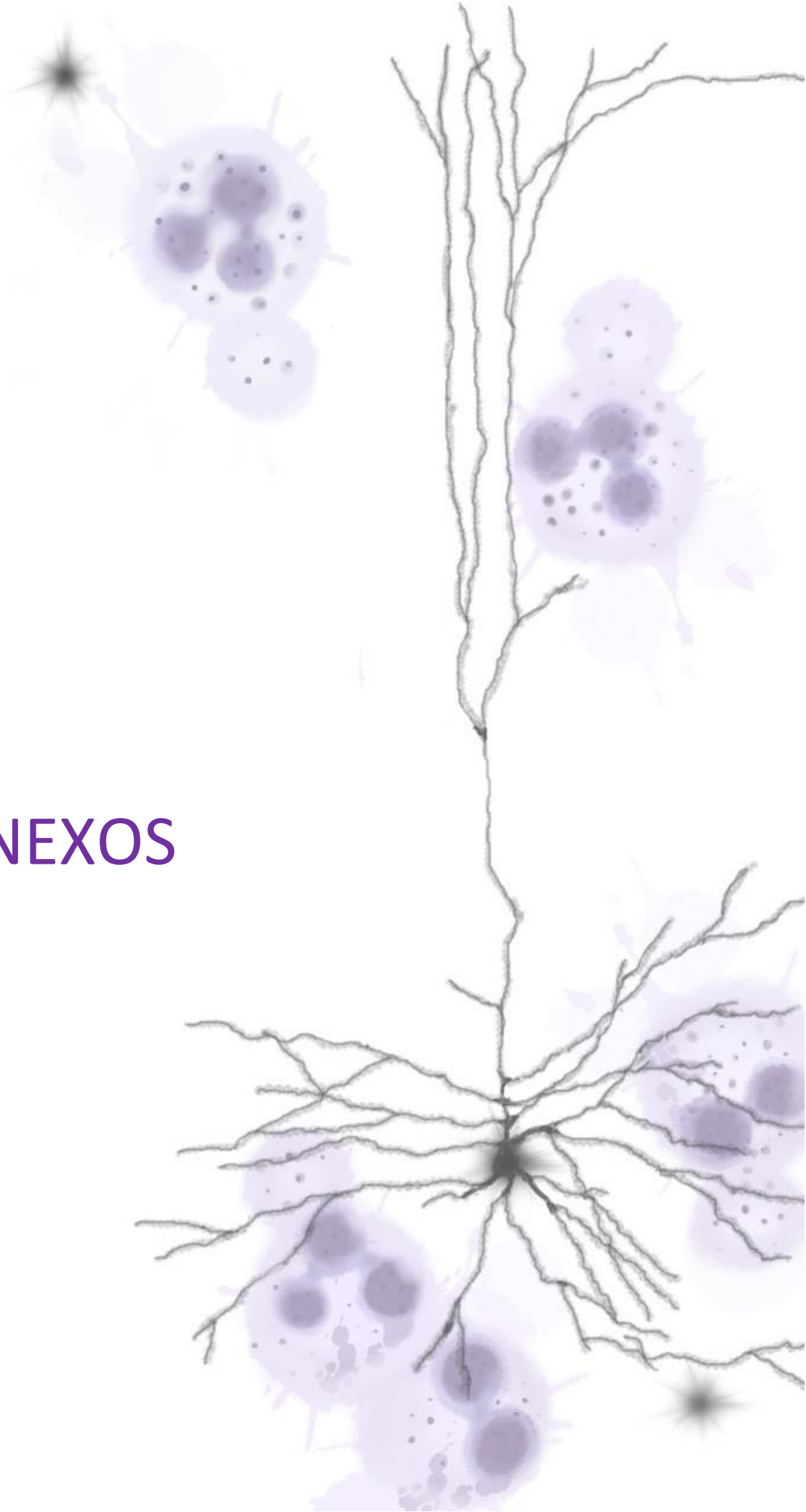
- Treated With Mechanical Thrombectomy. *Stroke* 50, 3456–3464. doi: 10.1161/STROKEAHA.119.026743
- Shah, A. S. V., Lee, K. K., McAllister, D. A., Hunter, A., Nair, H., Whiteley, W., et al. (2015). Short term exposure to air pollution and stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, h1295. doi: 10.1136/bmj.h1295
- Sherman, D. G., Albers, G. W., Bladin, C., Fieschi, C., Gabbai, A. A., Kase, C. S., et al. (2007). The efficacy and safety of enoxaparin versus unfractionated heparin for the prevention of venous thromboembolism after acute ischaemic stroke (PREVAIL Study): an open-label randomised comparison. 369.
- Shichita, T., Ooboshi, H., and Yoshimura, A. (2023). Neuroimmune mechanisms and therapies mediating post-ischaemic brain injury and repair. *Nat. Rev. Neurosci.* 24, 299–312. doi: 10.1038/s41583-023-00690-0
- Shichita, T., Sugiyama, Y., Ooboshi, H., Sugimori, H., Nakagawa, R., Takada, I., et al. (2009). Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nat. Med.* 15, 946–950. doi: 10.1038/nm.1999
- Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T., et al. (1995). Structure and Chromosomal Localization of the Human Stromal Cell-Derived Factor 1 (SDF1) Gene. *Genomics* 28, 495–500. doi: 10.1006/geno.1995.1180
- Shyu, W.-C., Lin, S.-Z., Yen, P.-S., Su, C.-Y., Chen, D.-C., Wang, H.-J., et al. (2008). Stromal Cell-Derived Factor-1 α Promotes Neuroprotection, Angiogenesis, and Mobilization/Homing of Bone Marrow-Derived Cells in Stroke Rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 324, 834–849. doi: 10.1124/jpet.107.127746
- Sobrino García, P., García Pastor, A., García Arratibel, A., Vicente Peracho, G., Rodríguez Cruz, P. M., Pérez Sánchez, J. R., et al. (2013). Clasificación etiológica del ictus isquémico: comparación entre la nueva clasificación A-S-C-O y la clasificación del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología. *Neurología* 28, 417–424. doi: 10.1016/j.nrl.2012.07.005
- Sobrino, T., Rodríguez-Yáñez, M., Campos, F., Iglesias-Rey, R., Millán, M., de la Ossa, N. P., et al. (2020). Association of High Serum Levels of Growth Factors with Good Outcome in Ischemic Stroke: a Multicenter Study. *Transl. Stroke Res.* 11, 653–663. doi: 10.1007/s12975-019-00747-2
- Song, Y.-M., and Cho, H.-J. (2008). Risk of Stroke and Myocardial Infarction After Reduction or Cessation of Cigarette Smoking: A Cohort Study in Korean Men. *Stroke* 39, 2432–2438. doi: 10.1161/STROKEAHA.107.512632
- Spronk, E., Sykes, G., Falcione, S., Munsterman, D., Joy, T., Kamtchum-Tatuene, J., et al. (2021). Hemorrhagic Transformation in Ischemic Stroke and the Role of Inflammation. *Front. Neurol.* 12, 661955. doi: 10.3389/fneur.2021.661955
- Sreeramkumar, V., Adrover, J. M., Ballesteros, I., Cuartero, M. I., Rossaint, J., Bilbao, I., et al. (2014). Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science* 346, 1234–1238. doi: 10.1126/science.1256478
- Strazzullo, P., D’Elia, L., Kandala, N.-B., and Cappuccio, F. P. (2009). Salt intake, stroke, and cardiovascular disease: meta-analysis of prospective studies. *BMJ* 339, b4567–b4567. doi: 10.1136/bmj.b4567
- Stumm, R. K., Rummel, J., Junker, V., Culmsee, C., Pfeiffer, M., Kriegelstein, J., et al. (2002). A Dual Role for the SDF-1/CXCR4 Chemokine Receptor System in Adult Brain: Isoform-Selective Regulation of SDF-1 Expression Modulates CXCR4-Dependent

- Neuronal Plasticity and Cerebral Leukocyte Recruitment after Focal Ischemia. *J. Neurosci.* 22, 5865–5878. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-14-05865.2002
- Suri, R. (2005). The use of human deoxyribonuclease (rhDNase) in the management of cystic fibrosis. *BioDrugs Clin. Immunother. Biopharm. Gene Ther.* 19, 135–144. doi: 10.2165/00063030-200519030-00001
- Tan, I. Y. L., Demchuk, A. M., Hopyan, J., Zhang, L., Gladstone, D., Wong, K., et al. (2009). CT angiography clot burden score and collateral score: correlation with clinical and radiologic outcomes in acute middle cerebral artery infarct. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 30, 525–531. doi: 10.3174/ajnr.A1408
- Tao, C., Nogueira, R. G., Zhu, Y., Sun, J., Han, H., Yuan, G., et al. (2022). Trial of Endovascular Treatment of Acute Basilar-Artery Occlusion. *N. Engl. J. Med.* 387, 1361–1372. doi: 10.1056/NEJMoa2206317
- Tashiro, K., Tada, H., Heilker, R., Shirozu, M., Nakano, T., and Honjo, T. (1993). Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261, 600–603. doi: 10.1126/science.8342023
- The GBD 2016 Lifetime Risk of Stroke Collaborators (2018). Global, Regional, and Country-Specific Lifetime Risks of Stroke, 1990 and 2016. *N. Engl. J. Med.* 379, 2429–2437. doi: 10.1056/NEJMoa1804492
- Thomalla, G., Simonsen, C. Z., Boutitie, F., Andersen, G., Berthezene, Y., Cheng, B., et al. (2018). MRI-Guided Thrombolysis for Stroke with Unknown Time of Onset. *N. Engl. J. Med.* 379, 611–622. doi: 10.1056/NEJMoa1804355
- Thosar, S. S., Butler, M. P., and Shea, S. A. (2018). Role of the circadian system in cardiovascular disease. *J. Clin. Invest.* 128, 2157–2167. doi: 10.1172/JCI80590
- Thun, M. J., Apicella, L. F., and Henley, S. J. (2000). Smoking vs Other Risk Factors as the Cause of Smoking-Attributable Deaths: Confounding in the Courtroom. *JAMA* 284, 706. doi: 10.1001/jama.284.6.706
- Tsao, C. W., Aday, A. W., Almarzooq, Z. I., Anderson, C. A. M., Arora, P., Avery, C. L., et al. (2023). Heart Disease and Stroke Statistics—2023 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, CIR.0000000000001123. doi: 10.1161/CIR.0000000000001123
- Turc, G., Bhogal, P., Fischer, U., Khatri, P., Lobotesis, K., Mazighi, M., et al. (2019). European Stroke Organisation (ESO)- European Society for Minimally Invasive Neurological Therapy (ESMINT) guidelines on mechanical thrombectomy in acute ischemic stroke. *J. NeuroInterventional Surg.* 11, 535–538. doi: 10.1136/neurintsurg-2018-014568
- Urra, X., Villamor, N., Amaro, S., Gómez-Choco, M., Obach, V., Oleaga, L., et al. (2009). Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 994–1002. doi: 10.1038/jcbfm.2009.25
- Vallés, J., Lago, A., Santos, M. T., Latorre, A. M., Tembl, J., Salom, J., et al. (2017). Neutrophil extracellular traps are increased in patients with acute ischemic stroke: prognostic significance. *Thromb. Haemost.* 117, 1919–1929. doi: 10.1160/TH17-02-0130
- Van de Werf, F. (1999). Single-bolus tenecteplase compared with front-loaded alteplase in acute myocardial infarction: the ASSENT-2 double-blind randomised trial. *The Lancet* 354, 716–722. doi: 10.1016/S0140-6736(99)07403-6

- Verma, R., Cronin, C. G., Hudobenko, J., Venna, V. R., McCullough, L. D., and Liang, B. T. (2017). Deletion of the P2X4 receptor is neuroprotective acutely, but induces a depressive phenotype during recovery from ischemic stroke. *Brain. Behav. Immun.* 66, 302–312. doi: 10.1016/j.bbi.2017.07.155
- Vernooij, M. W. (2007). Incidental Findings on Brain MRI in the General Population. *N. Engl. J. Med.*
- Vidaković, M., Grdović, N., Dinić, S., Mihailović, M., Uskoković, A., and Arambašić Jovanović, J. (2015). The Importance of the CXCL12/CXCR4 Axis in Therapeutic Approaches to Diabetes Mellitus Attenuation. *Front. Immunol.* 6, 403. doi: 10.3389/fimmu.2015.00403
- Walter, H. L., van der Maten, G., Antunes, A. R., Wieloch, T., and Ruscher, K. (2015). Treatment with AMD3100 attenuates the microglial response and improves outcome after experimental stroke. *J. Neuroinflammation* 12, 24. doi: 10.1186/s12974-014-0232-1
- Wang, J., Hossain, M., Thanabalasuriar, A., Gunzer, M., Meininger, C., and Kubes, P. (2017). Visualizing the function and fate of neutrophils in sterile injury and repair. *Science* 358, 111–116. doi: 10.1126/science.aam9690
- Wang, S., de Fabritus, L., Kumar, P. A., Werner, Y., Ma, M., Li, D., et al. (2023). Brain endothelial CXCL12 attracts protective natural killer cells during ischemic stroke. *J. Neuroinflammation* 20, 8. doi: 10.1186/s12974-023-02689-x
- Warach, S. J., Dula, A. N., Milling, T. J., Miller, S., Allen, L., Zuck, N. D., et al. (2022). Prospective Observational Cohort Study of Tenecteplase Versus Alteplase in Routine Clinical Practice. *Stroke* 53, 3583–3593. doi: 10.1161/STROKEAHA.122.038950
- Warnatsch, A., Ioannou, M., Wang, Q., and Papayannopoulos, V. (2015). Neutrophil extracellular traps license macrophages for cytokine production in atherosclerosis. *Science* 349, 316–320. doi: 10.1126/science.aaa8064
- Wattananit, S., Tornero, D., Graubardt, N., Memanishvili, T., Monni, E., Tatarishvili, J., et al. (2016). Monocyte-Derived Macrophages Contribute to Spontaneous Long-Term Functional Recovery after Stroke in Mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 4182–4195. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4317-15.2016
- Wegrzyn, L. R., Tamimi, R. M., Rosner, B. A., Brown, S. B., Stevens, R. G., Eliassen, A. H., et al. (2017). Rotating Night-Shift Work and the Risk of Breast Cancer in the Nurses' Health Studies. *Am. J. Epidemiol.* 186, 532–540. doi: 10.1093/aje/kwx140
- Werner, Y., Mass, E., Ashok Kumar, P., Ulas, T., Händler, K., Horne, A., et al. (2020). Cxcr4 distinguishes HSC-derived monocytes from microglia and reveals monocyte immune responses to experimental stroke. *Nat. Neurosci.* 23, 351–362. doi: 10.1038/s41593-020-0585-y
- Whiteley, W. N., Slot, K. B., Fernandes, P., Sandercock, P., and Wardlaw, J. (2012). Risk factors for intracranial hemorrhage in acute ischemic stroke patients treated with recombinant tissue plasminogen activator: a systematic review and meta-analysis of 55 studies. *Stroke* 43, 2904–2909. doi: 10.1161/STROKEAHA.112.665331
- Wu, H., Dunnett, S., Ho, Y.-S., and Chang, R. C.-C. (2019). The role of sleep deprivation and circadian rhythm disruption as risk factors of Alzheimer's disease. *Front. Neuroendocrinol.* 54, 100764. doi: 10.1016/j.yfrne.2019.100764

- Yamaguchi, J., Kusano, K. F., Masuo, O., Kawamoto, A., Silver, M., Murasawa, S., et al. (2003). Stromal Cell–Derived Factor-1 Effects on Ex Vivo Expanded Endothelial Progenitor Cell Recruitment for Ischemic Neovascularization. *Circulation* 107, 1322–1328. doi: 10.1161/01.CIR.0000055313.77510.22
- Yoshimura, S., Sakai, N., Yamagami, H., Uchida, K., Beppu, M., Toyoda, K., et al. (2022). Endovascular Therapy for Acute Stroke with a Large Ischemic Region. *N. Engl. J. Med.* 386, 1303–1313. doi: 10.1056/NEJMoa2118191
- Yu, X., Chen, D., Zhang, Y., Wu, X., Huang, Z., Zhou, H., et al. (2012). Overexpression of CXCR4 in mesenchymal stem cells promotes migration, neuroprotection and angiogenesis in a rat model of stroke. *J. Neurol. Sci.* 316, 141–149. doi: 10.1016/j.jns.2012.01.001
- Zhang, D., Chen, G., Manwani, D., Mortha, A., Xu, C., Faith, J. J., et al. (2015). Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. *Nature* 525, 528–532. doi: 10.1038/nature15367
- Zhang, H., Prabhakar, P., Sealock, R., and Faber, J. E. (2010). Wide genetic variation in the native pial collateral circulation is a major determinant of variation in severity of stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 30, 923–934. doi: 10.1038/jcbfm.2010.10
- Zhang, M., Qiu, L., Zhang, Y., Xu, D., Zheng, J. C., and Jiang, L. (2017). CXCL12 enhances angiogenesis through CXCR7 activation in human umbilical vein endothelial cells. *Sci. Rep.* 7, 8289. doi: 10.1038/s41598-017-08840-y
- Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121–127. doi: 10.1016/s1074-7613(00)80165-x

ANEXOS



8. ANEXOS

Anexo 1: escala *National Institute of Health Stroke Scale* (NIHSS)

ESCALA NIHSS		
1a. Nivel de conciencia	0	Alerta
	1	Somnolencia: reacciona con estimulación mínima
	2	Obnubilado o estuporoso
	3	Coma
1b. Preguntas verbales	0	Ambas preguntas correctas
¿En qué mes estamos?	1	1 respuesta correcta
¿Qué edad tienes?	2	Ninguna respuesta correcta
1c. Órdenes motoras	0	Ambos movimientos correctos
Cierre y abra los ojos	1	Un movimiento correcto
Cierre y abra la boca	2	Ambas órdenes incorrectas
2. Movimiento ocular	0	Normal
	1	Parálisis parcial de la mirada
	2	Desviación forzada o parálisis que no vence con maniobras oculocefálicas
3. Campo visual	0	Normal
	1	Hemianopsia parcial, cuadrantanopsia
	2	Hemianopsia completa homónima
	3	Hemianopsia bilateral, ceguera
4. Parálisis facial	0	Normal
	1	Paresia leve (asimetría, borramiento del surco nasogeniano)
	2	Parálisis parcial (parálisis de la cara inferior)
	3	Parálisis completa (superior e inferior)
5. Motor brazo	0	No claudica. Mantiene la posición 10 segundos
	1	Claudica en menos de 10 seg sin tocar plano
5a. brazo derecho	2	Eleva contra gravedad, pero claudica tocando el plano de la cama en menos de 10 segundos
5b. brazo izquierdo	3	Moviliza la extremidad, pero no puede elevarla contra gravedad
	4	No realiza ningún movimiento
6. Motor pierna	0	No claudica. Mantiene la posición 5 segundos
	1	Claudica en menos de 5 seg sin tocar plano
6a. pierna derecha	2	Eleva contra gravedad, pero claudica tocando el plano de la cama en menos de 5 segundos
6b. pierna izquierda	3	Moviliza la extremidad, pero no puede elevarla contra gravedad
	4	No realiza ningún movimiento
7. Ataxia de extremidades	0	No hay ataxia
	1	Ataxia de una extremidad

	2	Ataxia de dos extremidades
8. Sensibilidad	0	Normal
	1	Déficit leve o moderado (hipoestesia)
	2	Pérdida completa de la sensibilidad (anestesia)
9. Lenguaje	0	Lenguaje normal, sin afasia
	1	Afasia leve o moderada
	2	Afasia grave
	3	Afasia global, mutismo
10. Disartria	0	Articulación normal
	1	Disartria leve o moderada
	2	Disartria grave ininteligible o anartria
11. Extinción y negligencia	0	Normal
	1	Inatención o extinción de una modalidad
	2	Negligencia o extinción de más de una modalidad

Anexo 2: dictamen favorable del Comité de Ética e Investigación del i+12



Hospital Universitario
12 de Octubre
Comunidad de Madrid



Nº CEIm: 18/520

DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN

Dña. **MARÍA UGALDE DÍEZ**, Secretaria del Comité de Ética de la Investigación con medicamentos del **HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE**.

CERTIFICA

Que este Comité en la reunión celebrada el día **18/12/2018** ha evaluado la propuesta del investigador para que se realice el proyecto de investigación, titulado: **“Dianas terapéuticas del ciclo circadiano de los neutrófilos en las enfermedades neurovasculares”**.

Entendiendo que dicho estudio se ajusta a las normas éticas esenciales y criterios deontológicos que rigen en este Centro, cumpliendo los requisitos metodológicos necesarios y las normas de funcionamiento interno del Comité. Se han ponderado los aspectos metodológicos éticos y legales y se recogerá la decisión adoptada en el acta correspondiente.

Este Comité **INFORMA FAVORABLEMENTE** a la realización de dicho proyecto.

El estudio será realizado en el **Hospital Universitario 12 de Octubre** por la Dra. **MORO SANCHEZ, M^a Angeles** como Investigador Principal.

Lo que firmo en Madrid, a 18 de diciembre de 2018.

Firmado digitalmente por UGALDE DIEZ DULCE
MARIA - 05242157C
Nombre de reconocimiento (DN): c=ES,
serialNumber=DCE5-05242157C,
givenName=DULCE MARIA, sn=UGALDE DIEZ,
cn=UGALDE DIEZ DULCE MARIA - 05242157C
Fecha: 2018.12.18 09:23:44 +01'00'

Firmado: *Dra. Maria Ugalde Diez*
Secretaria del CEIm Hospital Universitario 12 de Octubre.



ANEXO I: COMPOSICIÓN DEL CEIm

Nº CEIm: 18/520

TÍTULO: *Dianas terapéuticas del ciclo circadiano de los neutrófilos en las enfermedades neurovasculares*

Investigador Principal: MORO SANCHEZ, Mª Angeles

Dª MARIA UGALDE DIEZ, SECRETARIA DEL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACION DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO 12 DE OCTUBRE DE MADRID

Hace constar que:

1. En la reunión ordinaria celebrada el día **18/12/2018**, se decidió emitir el informe correspondiente al proyecto de Investigación de referencia.
2. El CEIm del Hospital Universitario 12 de Octubre, tanto en su composición como en sus PNTs, cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95)
3. La composición del Ceim del Hospital Universitario 12 de Octubre que evaluó el proyecto fue la siguiente:
- 4.

PRESIDENTE	Dra. Mª del Puy Goyache Goñi	Farmacéutico Adjunto de Farmacia Hospitalaria
SECRETARIA	Dra. María Ugalde Díez	Dra. en Ciencias Biológicas
VICEPRESIDENTE	Dr. Luis Manuel Manso Sánchez	Medico Oncología
VOCALES:	Dª Cristina Martín-Arriscado Arroba	Licenciada Estadística
	Dª Mª Luisa Albelda de la Haza	Licenciada Derecho
	Dr. Jorge Adeva Alfonso	Medico Oncología
	Dª. Montserrat Pilas Pérez	Diplomado Universitario en Enfermería
	Dr. Cesar Minué Lorenzo	Médico de Familia del Servicio Madrileña Salud
	Dra. Rocio Natalia Miranda Utrera	Medico Urología
	Dr. Julián Palomino Doza	Medico Cardiología
	Dr. Eduardo Gutiérrez Martínez	Medico Nefrología
	Dr. Rafael San Juan Garrido	Medico Microbiología
	Dr. Roberto Rodríguez Jiménez	Médico Psiquiatría
	Dra. Ana Jiménez Ubieto	Médico Hematología
	Dra. Estela Paz Artal	Medico Inmunología
	Dra. Eva Carro Diaz	Comisión de Investigación
	Dra. Mar Espino Hernández	Pediatra de Atención Primaria
	Dra. María del Carmen Riesco Martínez	Medico Oncología
	Dra. Mercedes Catalán González	Medico Intensivista
	Dra. Raquel Siguín Gómez	Farmacéutica Atención Primaria
	Dra. Sarahí Elizabeth Valdez Acosta	Farmacóloga Clínica (Secretaria Técnica CEIm)
	Dra. Yolanda Rodríguez Gil	Médico Anatomía Patológica
	Sr. Francisco Javier Mazuecos Gómez	Trabajador Social Ayuntamiento Madrid
	Sra. Sagrario Alegre Alonso	Coordinadora AECC
	Sra. Mª Pilar Hernández Suarez	Diplomado Universitario en Enfermería

Anexo 3: Consentimiento Informado para el paciente o representante



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL PACIENTE

Título Proyecto de investigación: “Dianas terapéuticas del ciclo circadiano de los neutrófilos en las enfermedades neurovasculares”

Responsable clínico del proyecto: Dr. Ostos. Médico Adjunto de Neurología del Hospital Universitario 12 de Octubre

Yo (nombre y apellidos) _____

con DNI _____ declaro bajo mi responsabilidad que:

- ❖ He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- ❖ He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- ❖ He hablado con: _____
- ❖ Comprendo que mi participación es voluntaria.
- ❖ Comprendo que puedo retirarme del estudio:
 - 1 Cuando quiera
 - 2 Sin tener que dar explicaciones
 - 3 Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Punto 1: DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que mis muestras y datos asociados se utilicen en este proyecto de investigación sobre posibles factores relacionados el envejecimiento de los neutrófilos en el ictus sen mi muestra.

Punto 2: DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que, una vez finalizada la investigación, mi muestra codificada (y datos asociados) se conserve en una colección de muestras en el Instituto de Investigación del Hospital Universitario Doce de Octubre para utilizarla en futuras investigaciones relacionadas con la enfermedades neurovasculares.

En Madrid, a ____ de _____ de _____

Fdo: _____

El paciente

Fdo: _____

El investigador

Versión Diciembre 2018



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL REPRESENTANTE

Título Proyecto de investigación: “Dianas terapéuticas del ciclo circadiano de los neutrófilos en las enfermedades neurovasculares”

Responsable clínico del proyecto: Dr. Ostos. Médico Adjunto de Neurología del Hospital Universitario 12 de Octubre

Yo, (nombre y apellidos) _____

en calidad de (relación con el participante) _____

de D./D^a (nombre del participante en el ensayo) _____

❖ He leído la hoja de información que se me ha entregado.

❖ He podido hacer preguntas sobre el estudio.

❖ He hablado con: _____

❖ Comprendo que mi participación es voluntaria.

❖ Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1 Cuando quiera

2 Sin tener que dar explicaciones

3 Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Punto 1: DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que mis muestras y datos asociados se utilicen en este proyecto de investigación sobre posibles factores relacionados el envejecimiento de los neutrófilos en el ictus sen mi muestra.

Punto 2: DOY NO DOY mi consentimiento voluntariamente para que, una vez finalizada la investigación, mi muestra codificada (y datos asociados) se conserve en una colección de muestras en el Instituto de Investigación del Hospital Universitario Doce de Octubre para utilizarla en futuras investigaciones relacionadas con la enfermedades neurovasculares.

En Madrid, a ____ de _____ de _____

Fdo: _____

El representante

Fdo: _____

El investigador

Versión Diciembre 2018

