

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Inmunotrombosis como diana terapéutica: efecto de la  
DNASA-I en el ictus isquémico experimental**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Gaohong Di**

**Director**

**Ignacio Lizasoain Hernández**

**Madrid**

**© Gaohong Di, 2024**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
FACULTAD DE MEDICINA



**TESIS DOCTORAL**

INMUNOTROMBOSIS COMO DIANA TERAPÉUTICA:  
EFECTO DE LA DNASA-I EN EL ICTUS ISQUÉMICO EXPERIMENTAL

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

GAOHONG DI

DIRECTOR

Ignacio Lizasoain Hernández



**TESIS DOCTORAL**



**INMUNOTROMBOSIS COMO DIANA TERAPÉUTICA:  
EFECTO DE LA DNASA-I EN EL ICTUS ISQUÉMICO EXPERIMENTAL**

**GAOHONG DI**

Dirigida por

**IGNACIO LIZASOAIN HERNÁNDEZ**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO: INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

**MADRID 2023**





真學也，幽問也，慎思也，明辨也，篤志也

« LI JI »



## AGRADECIMIENTOS

Los últimos tres años han sido una experiencia increíble para mí. En primer lugar, me gustaría agradecer a todos mis familiares, quienes me animaron a estudiar el doctorado y me brindaron un gran apoyo para que no tuviera que preocuparme demasiado por la situación en casa y pudiera concentrarme en realizar experimentos en España. Luego, me gustaría agradecer a Nacho, no solo por su ayuda en el trabajo y estudio durante mi tesis en Madrid, sino también por haberme enseñado mucho sobre la cultura española local y las técnicas de comunicación (incluso los chistes curiosos). Además, agradezco su gran ayuda en la redacción del trabajo (¿pueden imaginar lo difícil que es escribir una tesis en español siendo un hablante no nativo y sin talento lingüístico?). Fuiste tú quien me introdujo en esta misteriosa área de neurociencia. Antes de eso, yo era un médico que no tenía más que conocimientos clínicos. Esta estancia ha sido una experiencia compleja e interesante en mi vida. Gracias nuevamente por cuidarme durante mi doctorado. Eres el tutor más importante de mi vida, tanto por tu personalidad enérgica como por tu amplia experiencia en investigación.

En el orden cronológico de aparición de mis amigos durante mi doctorado, me gustaría agradecer a Jesús por enseñarme muchas técnicas experimentales y por responderme muchas preguntas sobre los experimentos. Agradezco a Lluís por brindarme la oportunidad de lograr la primera ligadura exitosa de la arteria cerebral, a David por enseñarme este complejo modelo de MCAO, a Cristina por acompañarme en la mayoría de mis experimentos en otro puesto, a Miguel y a Tania por genotipar los ratones que necesitaba, sin vosotros, mi experimento no habría terminado tan rápido. Gracias a Manuel y Carolina por brindarme inspiración y conocimientos experimentales que me permitieron definir la dirección del experimento. Agradezco a MA por permitirme acceder a las mejores condiciones experimentales del CNIC. Gracias a Sandra Vásquez por enseñarme a cultivar células, a Blanca por permitirme aprender sobre el ensayo ELISA, y a Lidia, Álvaro, Javier, Sandra, Enrique, Jorge, Carmen, Fernando, Alexandra, Nuria por ayudarme cuando yo estaba ocupado. Agradezco a mis padres y a la Dra. Qíng por su constante ayuda durante los últimos tres años. Gracias a CSC por la financiación.

Es un gran honor para mí conocerlos en esta vida limitada y espero que tengamos más oportunidades de encontrarnos en el futuro. Conocerlos es mi tesoro más preciado durante el doctorado.



## ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Abreviaturas</b> .....  | <b>13</b> |
| <b>Resumen</b> .....   | <b>17</b> |
| <b>Summary</b> .....   | <b>25</b> |
| <b>Introducción</b> .....  | <b>33</b> |
| <b>1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR</b> .....                           | <b>33</b> |
| 1.1. <i>DEFINICIÓN</i> .....   | 33        |
| 1.2. <i>CLASIFICACIÓN</i> .....                                      | 34        |
| 1.3. <i>EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO</i> .....                 | 36        |
| <b>2. FISIOPATOLOGÍA DEL ICTUS ISQUÉMICO</b> .....                   | <b>37</b> |
| 2.1. <i>LA CASCADA ISQUÉMICA</i> .....                               | 37        |
| 2.2. <i>LA RESPUESTA INFLAMATORIA TRAS ICTUS</i> .....               | 39        |
| 2.2.1. <i>Mediadores Inflamatorios</i> .....                         | 40        |
| 2.2.2. <i>Respuesta Celular</i> .....                                | 42        |
| 2.2.3. <i>Infiltración de Neutrófilos</i> .....                      | 45        |
| 2.2.4. <i>Los receptores Toll-like 4</i> .....                       | 47        |
| <b>3. TROMBOSIS ARTERIAL Y TRATAMIENTO DEL ICTUS ISQUÉMICO</b> ..... | <b>50</b> |
| 3.1. <i>TROMBOSIS Y PLAQUETA</i> .....                               | 51        |
| 3.2. <i>TROMBOSIS Y NETOSIS</i> .....                                | 52        |
| 3.3. <i>LA TERAPIA TROMBOLÍTICA</i> .....                            | 55        |
| 3.4. <i>MECANISMOS MOLECULARES DE LA FIBRINÓLISIS</i> .....          | 57        |
| <b>4. TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA</b> .....                           | <b>58</b> |
| 4.1. <i>LAS ESTRUCTURAS DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA</i> .....     | 59        |
| 4.2. <i>MECANISMOS DE TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA</i> .....           | 61        |
| 4.2.1. <i>Transformación Hemorrágica Temprana Y Tardía</i> .....     | 62        |
| 4.2.2. <i>Transformación Hemorrágica Y Trombolítico</i> .....        | 65        |
| <b>5. RITMO CIRCADIANO Y ICTUS ISQUÉMICO</b> .....                   | <b>65</b> |
| 5.1. <i>BIOLOGÍA CIRCADIANA Y RESPUESTAS INMUNES</i> .....           | 68        |
| 5.2. <i>REGULACIÓN CIRCADIANA Y NETOSIS</i> .....                    | 71        |
| <b>Hipótesis y objetivos</b> .....                                   | <b>77</b> |
| <b>Materiales y métodos</b> .....                                    | <b>83</b> |
| <b>1. DISEÑO EXPERIMENTAL Y PROTOCOLO</b> .....                      | <b>83</b> |
| 1.1. <i>DISEÑO EXPERIMENTAL BLOQUE I</i> .....                       | 84        |
| 1.2. <i>DISEÑO EXPERIMENTAL BLOQUE II</i> .....                      | 86        |
| <b>2. TÉCNICAS IN VIVO</b> .....                                     | <b>87</b> |
| 2.1. <i>ANIMALES</i> .....   | 87        |
| 2.2. <i>MODELO TROMBOEMBÓLICO IN SITU</i> .....                      | 89        |
| 2.3. <i>TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS IN VIVO</i> .....                | 91        |
| 2.4. <i>CARACTERÍSTICAS DEL RITMO CIRCADIANO</i> .....               | 91        |
| 2.5. <i>EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE SANGRADO</i> .....                  | 92        |
| 2.6. <i>EVALUACIÓN DE LOS DÉFICITS NEUROLÓGICOS</i> .....            | 92        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES Y DETERMINACIONES</b> .....   | <b>94</b>  |
| 3.1. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS .....  | 94         |
| 3.2. DETERMINACIONES .....  | 97         |
| <b>Resultados</b> .....   | <b>103</b> |
| <b>1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DNAsa-I EN EL ICTUS ISQUÉMICO. FUNCIÓN DE LOS NETS Y DEL RECEPTOR TLR4 PLAQUETARIO</b> .....                       | <b>103</b> |
| 1.1. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en el volumen de infarto.....   | 103        |
| 1.2. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en el déficit neurológico .....   | 106        |
| 1.3. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en la incidencia de la reperfusión.....   | 110        |
| 1.4. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en la presencia de NETs en el área infartada .....  | 112        |
| 1.5. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en los niveles plasmáticos de elastasa .....  | 114        |
| 1.6. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en la infiltración y polarización del neutrófilo.....   | 117        |
| 1.7. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en la incidencia de transformación hemorrágica (TH) .....   | 120        |
| <b>2. EFECTO DE LOS RITMOS CIRCADIANOS EN EL TRATAMIENTO CON DNAsa-I EN EL ICTUS ISQUÉMICO. FUNCIÓN DE LOS NETS</b> .....                           | <b>123</b> |
| 2.1. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio del volumen de infarto. ....                           | 123        |
| 2.2. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio del déficit neurológico.....                           | 125        |
| 2.3. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de la incidencia de reperfusión.....                   | 128        |
| 2.4. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de la presencia de NETs en el área infartada.....      | 129        |
| 2.5. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de los niveles plasmáticos de elastasa.....            | 131        |
| 2.6. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de la NETosis ex vivo .....                            | 133        |
| 2.7. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de la infiltración y polarización del neutrófilo ..... | 134        |
| <b>Discusión</b> .....  | <b>139</b> |
| <b>1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DNAsa-I EN EL ICTUS ISQUÉMICO. FUNCIÓN DE LOS NETs Y DEL RECEPTOR TLR4 PLAQUETARIO</b> .....                       | <b>139</b> |
| <b>2. EFECTO DE LOS RITMOS CIRCADIANOS EN EL TRATAMIENTO CON DNAsa-I EN EL ICTUS ISQUÉMICO. FUNCIÓN DE LOS NETs</b> .....                           | <b>149</b> |
| <b>Conclusiones</b> .....   | <b>159</b> |
| <b>Conclusions</b> .....  | <b>163</b> |
| <b>Bibliografía</b> .....   | <b>167</b> |

## **ABREVIATURAS**



**12-LOX:** 2-lipooxigenasa

**ACD:** citrato ácido dextrosa

**ACM:** arteria cerebral media

**ADP:** adenosín difosfato

**AIT:** ataque isquémico transitorio

**Akt:** proteína quinasa B

**AMPA:** ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico

**ATP:** adenosín trifosfato

**BDNF:** factores de crecimiento derivados del cerebro

**BHE:** barrera hematoencefálica

**CCL:** Ligando de quimioquina C-C

**CCR:** receptor de quimioquina C-C

**CE:** células endoteliales

**cfADN:** el ácido desoxirribonucleico libre de células

**COX:** ciclooxigenasa

**CXC:** quimiocina

**DAB:** diaminobencidina

**DAMPs:** patrones moleculares asociados a daño

**ECM:** la matriz extracelular

**ERK:** quinasa regulada por señales extracelulares

**FGF:** factor de crecimiento de fibroblastos

**Glb-IX-V:** glicoproteína de Tipo Ib-IX-V

**GPVI:** glicoproteína de Tipo VI

**GSDMD:** gasdermina D

**GTP:** guanosina-5'-trifosfato

**HSA:** hemorragia subaracnoidea

**ICAM:** molécula de adhesión celular intracelular

**IL-1:** interleucina

**iNOS:** la óxido nítrico sintasa inducible

**KA:** ácido kainato

**LAM:** moléculas de adhesión de leucocitos

**LPS:** lipopolisacárido

**LRP:** proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad

**Lys:** lisina

**MAC:** antígeno macrófago

**MAPK:** vía de quinasa de proteína activada por mitógenos

**MCAO:** oclusión transitoria de la arteria cerebral media

**MD-2:** molécula Diferenciadora 2

**MEK:** quinasa de proteína activada por mitógenos

**MMP:** metaloproteinasas de Matriz

**MM $\Phi$ :** macrófagos derivados de monocitos

**MPO:** mieloperoxidasa

**MyD88:** factor de diferenciación mieloide 88

**NAD:** nicotinamida adenina dinucleótido

**NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

**NADPH:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (oxidasa),

**NE:** elastasa de neutrófilos

**NETs:** trampas extracelulares de neutrófilos

**NF-kB:** Factor Nuclear-kB

**NGF:** factor de crecimiento nervioso

**NIHSS:** "National Institutes of Health Stroke Scale"

**NINCDS:** "National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke"

**NMDA:** n-metil-d-aspartato

**NO:** óxido nítrico

**NOS:** la óxido nítrico sintasa

**NOX:** NADPH Oxidasas

**OCSP:** "Oxfordshire Community Stroke Project"

**PAD4:** peptidil-arginina deiminasa 4

**PAI-1:** inhibidores del activador del plasminógeno 1

**PAMPs:** patrones moleculares asociados a patógenos

**PAR1:** receptor 1 activado por proteasa

**PARP-1:** poli-(ADP-ribosa)-polimerasa

**PC:** pericitos

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

**PDGF-CC:** factor de crecimiento derivado de plaquetas tipo cc

**PDGFR $\alpha$ :** receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa

**PER:** regulador del periodo circadiano

**PFA:** paraformaldehído

**PKC:** proteína quinasa C

**PLG:** plasminógeno

**PMA:** forbol 12-miristato 13-acetato

**PMN:** leucocitos polimorfonucleares

**PPAR $\gamma$ :** receptor activado por el proliferador de peroxisomas gamma

**PRP:** plasma rico en plaquetas

**PSGL-1:** ligando de glicoproteína de P-selectina-1

**PWB:** buffer de lavado de plaquetas "Platelet Wash Buffer"

**RM:** resonancia magnética

**ROS:** especies reactivas de oxígeno "*reactive oxygen species*"

**r-tPA:** activador del plasminógeno tisular recombinante o alteplasa

**SNC:** sistema nervioso central

**TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento transformante beta

**TH:** transformación hemorrágica

**TJ:** "tight junctions" unión estrecha

**TLR4:** receptor tipo 4 de Toll

**TLRs:** receptores tipo Toll

**tMCAO:** oclusión transitoria de la arteria cerebral media

**TNF- $\alpha$ :** factor de necrosis tumoral alfa

**TNK:** tenecteplasa

**TOAST:** "Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment"

**tPA:** activador del plasminógeno tisular

**TRIF:** adaptador que contiene el dominio tir-inductor de la interferón- $\beta$

**$\alpha$ 2-PI:** inhibidor de  $\alpha$ 2-plasmina

## **RESUMEN**



## INTRODUCCIÓN

El ictus es un conjunto de enfermedades que resultan en déficits neurológicos súbitos debido a la alteración del flujo sanguíneo en las estructuras del sistema nervioso. El ictus constituye una preocupación importante para la salud a nivel global, con más de 13 millones de casos nuevos comunicados anualmente y más de 100 millones de sobrevivientes en todo el mundo. Las terapias farmacológicas endovasculares dentro de las 4,5 horas o la trombectomía dentro de las 6 horas posteriores al inicio de los síntomas pueden mejorar la evolución de los mismos, restaurar el flujo sanguíneo cerebral y ayudar a la recuperación de las células nerviosas y sus funciones (Feske, 2021).

Tras el ictus isquémico se produce una disminución significativa en el flujo sanguíneo hacia el cerebro debido a la obstrucción de una arteria, lo que conlleva a una reducción en el suministro de oxígeno, glucosa y otros nutrientes esenciales para el funcionamiento de las células cerebrales. Esto inicia un ciclo perjudicial, conocido como cascada isquémica, debido a la acumulación de sodio, calcio y agua en las células cerebrales dañadas, lo que a su vez provoca la liberación de neurotransmisores excitatorios y un mayor daño celular. La microglía, células inmunes residentes del cerebro, se activan en respuesta a estas señales, cambiando a un estado ameboide y fagocítico (Jin et al., 2010). Además, la barrera hematoencefálica (BHE) dañada permite la infiltración de células inmunes, como neutrófilos y macrófagos, que se reclutan hacia la lesión. El tratamiento implica la recanalización de la arteria obstruida mediante la administración tPA. Sin embargo, debido al riesgo de transformación hemorrágica (TH), que es una complicación principal para los fármacos trombolíticos, estos medicamentos solo se pueden utilizar en pacientes seleccionados mediante criterios de cribado muy estrictos (Powers et al., 2019). La TH es una preocupación importante en los pacientes tratados con tPA, ya que el tPA aumenta hasta 10 veces la tasa de TH (Lees et al., 2010). Este incremento en el riesgo de transformación hemorrágica se debe a diversos mecanismos, todavía no bien explorados. Uno de los principales factores implicados es el propio mecanismo de acción del tPA que consiste en que promueve la reperfusión al degradar los coágulos sanguíneos basados en fibrina (Hong et al., 2021).

En cuanto a los efectos de los neutrófilos en la patología del ictus, a pesar de la creencia general de su efecto perjudicial, algunos subconjuntos de neutrófilos, conocidos como neutrófilos N2, han demostrado poseer propiedades beneficiosas en los experimentos. Además, los neutrófilos expresan TLR4 en su superficie, y la falta de este receptor puede modificar la función y el fenotipo de los neutrófilos en el contexto de la isquemia cerebral. Se ha observado que la falta de TLR4 confiere un efecto neuroprotector y aumenta la densidad de los neutrófilos infiltrados, la mayoría de los cuales son N2.

Por otro lado, en el proceso de inmunotrombosis, los neutrófilos desempeñan un papel fundamental al liberar NETs, que consisten en redes de ADN y proteínas antimicrobianas (Brinkmann et al., 2004). Estas NETs cuentan con varios componentes, como ADN e histonas, que activan la coagulación sanguínea y promueven la adhesión de las plaquetas, facilitando así la formación de trombos en los vasos sanguíneos (Carestia et al., 2013). La inhibición de PAD4 puede prevenir la formación de NET, lo que subraya la importancia de esta enzima en el proceso de NETosis. Además, el tratamiento con DNasa-I, una enzima conocida por degradar el ADN presente en las NETs puede ser eficaz para eliminar estas estructuras.

Varios estudios han investigado el efecto de la variación circadiana sobre la gravedad de los ictus agudos (Simonsen et al., 2016; Esposito et al., 2020). El sistema inmunitario está regulado por la biología circadiana a varios niveles (Lo et al., 2021). Los neutrófilos circulantes muestran oscilaciones circadianas en número y en fenotipo, y el reclutamiento de neutrófilos también varía, lo que puede influir en el resultado de la enfermedad en escenarios inflamatorios. Un programa intrínseco de los neutrófilos que se logra gracias al gen *Bmal1*, induce a cambios diurnos en los neutrófilos circulantes, a través del receptor de quimioquinas CXCR2 y CXCR4. Las señales autocrinas transmitidas a través de CXCR2 pueden provocar esta desgranulación progresiva, de modo que los neutrófilos, que se movilizan en la sangre durante la noche en los ratones, muestran reducciones marcadas en su contenido en los gránulos primarios durante el día, estas modificaciones diurnas son antagonizadas por CXCR4. La desgranulación temporal, regulada por el ritmo circadiano, predice la formación de NETs de manera crítica en función de la hora del día. Además, se demostró que el control genético de la formación de NETs está vinculado con el ritmo circadiano (Adrover et al., 2020).

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestra **hipótesis** es la siguiente: “la administración de DNAsa-I, como fármaco que facilita la eliminación de los NETs, tendrá un papel protector en el daño isquémico y mejorará la respuesta al tPA”. Experimentos con ratones TLR4KO, PAD4KO y DNAsaKO ampliarán nuestra comprensión del mecanismo inmunológico en el ictus. Además, la influencia de los ritmos circadianos en el pronóstico y el tratamiento del ictus será explorada a partir de datos experimentales.

Para estudiar esta hipótesis, establecimos los siguientes **objetivos**:

1. Estudiar el efecto del tratamiento con DNAsa-I en el ictus isquémico. Exploraremos la función de los NETs y del receptor TLR4 plaquetario.
2. Estudiar el efecto de los ritmos circadianos en el tratamiento con DNAsa-I en el ictus isquémico. Investigaremos la función de los NETs en los ratones PAD4 y DNAsa KO.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para completar los objetivos anteriores, se utilizaron ratones de salvaje C57BL/6 y ratones transgénicos como TLR4<sup>loxP/Pf4-cre</sup>, PAD4<sup>-/-</sup>, DNAsa<sup>-/-</sup>, C57BL/6<sup>-Ly6g/Cre-tdTomato</sup>. El modelo de MCAO que empleamos para esta tesis doctoral es el modelo tromboembólico in situ (Orset et al., 2007). Según los diferentes objetivos experimentales fijados, utilizamos diferentes medicamentos incluido: aspirina (tratamiento preventivo), tPA (tratamiento tardío para estudiar el fenómeno de transformación hemorrágica), DNAsa-I (inhibir la NETosis). Por otro lado, la MCAO se realizó en diferentes "Zeitgeber Time" según el ritmo circadiano de los ratones, incluidos ZT4-ZT7 y ZT13-ZT16.

Tras 24 horas de la oclusión, se realizaron test neurológicos y se determinó el volumen de infarto por estudios de resonancia magnética y los procesos de sangrado. Además, se recogieron muestras de cerebro y sangre para inmunofluorescencia, ELISA y otros análisis. Además, hay una serie de experimentos que llevamos a cabo, que consisten en el estudio del proceso de NETosis ex vivo 12 horas después de la MCAO.

## RESULTADOS

Efecto del tratamiento con DNAsa-I en el ictus isquémico. Función de los NETs y del receptor TLR4 plaquetario. Hemos encontrado que el tratamiento con DNAsa-I tiene efectos beneficiosos en la reducción del volumen de infarto y la mejora de los síntomas neurológicos en modelos de ictus isquémico. Este tratamiento disminuye la presencia de NETs en la corteza cerebral y reduce la concentración plasmática de elastasa.

Además, observamos que **la administración de DNAsa-I** no se relaciona ni con cambios en las incidencias de reperfusión espontánea, ni con alteraciones en la infiltración o polarización de los neutrófilos. Además, la administración de DNAsa-I no produce sangrado ni aumento de la transformación hemorrágica inducida por la administración tardía de tPA. Es importante destacar que **la adición de DNAsa-I al tratamiento con tPA** no incrementa la transformación hemorrágica inducida por la administración tardía del trombolítico. La adición de DNAsa-I al tratamiento con tPA produce un aumento del índice de recanalización arterial exitosa y una disminución del volumen de hemorragia en los animales que reperfundan.

El estudio también encontró una correlación positiva entre la presencia de NETs en la corteza y la infiltración de neutrófilos, así como entre la presencia de NETs y los niveles plasmáticos de elastasa. Además, evaluamos la influencia de la deficiencia de TLR4 en las plaquetas, lo que resultó en una reducción significativa del volumen de infarto y en una mejora en los síntomas neurológicos. Esta deficiencia de TLR4 plaquetario también disminuyó la presencia de NETs en la corteza y la concentración plasmática de elastasa. Además, el **pretratamiento crónico con aspirina** no produce cambios en los efectos de la DNAsa-I.

Efecto de los ritmos circadianos en el tratamiento con DNAsa-I en el ictus isquémico. Función de los NETs. Hemos observado que los animales que experimentaron la oclusión vascular durante su fase inactiva (período de reposo) presentaron infartos más grandes y un peor estado neurológico. Este resultado se asocia con una disminución en el porcentaje de reperfusión espontánea, un aumento en la presencia de NETs en los tejidos y un aumento de los niveles plasmáticos de elastasa y una mayor capacidad para producir NETosis ex vivo. También se observó una menor cantidad de neutrófilos, especialmente aquellos que expresan Ym1+ (neutrófilos N2).

Hemos demostrado que el tratamiento con DNAsa-I solo tiene un efecto protector cuando se administra durante la fase inactiva, y nuevamente, se relaciona con una disminución en la presencia de NETs en la corteza cerebral y una disminución de los niveles plasmáticos de elastasa durante este período. En los ratones con deficiencia de PAD4, se mantuvo el efecto de los ritmos circadianos en el volumen de infarto, y se observaron niveles más bajos de NETs, y el tratamiento con DNAsa-I no tuvo efecto protector en estos animales.

Por otro lado, en los ratones con deficiencia de DNAsa, se mantuvo el efecto de los ritmos circadianos en el volumen de infarto, y se observaron niveles más altos de NETs en comparación con los animales normales, pero el tratamiento con DNAsa-I produjo resultados similares a los observados en los animales WT.

## **CONCLUSIÓN**

Nuestros resultados demuestran que la administración de DNAsa-I es un tratamiento eficaz y seguro en modelos experimentales de ictus. Nuestro grupo había demostrado el efecto protector de DNAsa-I en un modelo tromboembólico de trombos ricos en plaquetas (modelo de cloruro férrico) y ahora hemos encontrado que también es protector cuando el trombo es rico en fibrina (administración de trombina). El mecanismo de acción por el que la DNAsa-I produce su efecto protector no está totalmente establecido, hemos demostrado que la disminución de los procesos de NETosis interviene de forma importante en el efecto encontrado sin afectar la infiltración o polarización de los neutrófilos. Además, el tratamiento único con DNAsa-I no produce sangrado, y cuando se coadministra con tPA aumenta los índices de recanalización, disminuye la hemorragia cuando se produce reperusión y no aumenta la transformación hemorrágica inducida por la administración tardía del trombolítico. Por último, es importante destacar que la DNAsa-I es eficaz cuando se administra durante la fase inactiva y que el pre-tratamiento con antiagregantes plaquetarios (aspirina) no altera el efecto protector de dicho fármaco. Nuestros datos cobran especial relevancia si tenemos en cuenta que en la actualidad están en marcha dos ensayos clínicos con DNAsa-I diseñados para mejorar los índices de reperusión temprana (EXTEND-IA Dada) o para disminuir la inflamación sistémica asociada al ictus (Rescindo). Se requieren estudios más amplios para determinar con exactitud la eficacia de este tratamiento, los mecanismos implicados y su traslación a la clínica.



## **SUMMARY**



## INTRODUCTION

Stroke is a group of disorders that result in acute neurological deficits due to altered blood flow to the structures of the nervous system. Stroke is a major global health problem, with more than 13 million new cases reported annually and more than 100 million survivors worldwide. Endovascular pharmacological therapies within 4.5 hours or thrombectomy within 6 hours of symptom onset can improve the course of symptoms, restore cerebral blood flow, and promote the recovery of neurons and their functions (Feske, 2021).

After an ischemic stroke, blood flow to the brain is significantly reduced due to the blockage of an artery, resulting in a reduction in the supply of oxygen, glucose, and other nutrients essential for brain cell function. This initiates a damaging cycle known as the ischemic cascade due to the accumulation of sodium, calcium and water in the damaged brain cells, which in turn leads to the release of excitatory neurotransmitters and further cell damage. Microglia, the brain's resident immune cells, are activated in response to these signals and switch to an amoeboid and phagocytic state (Jin et al., 2010). In addition, the damaged blood-brain barrier (BBB) allows infiltration of immune cells, such as neutrophils and macrophages, which are recruited to the lesion. Treatment involves recanalization of the occluded artery by administration of tPA. However, due to the risk of hemorrhagic transformation (HT), which is a major complication of thrombolytic drugs, these drugs can only be used in selected patients with very strict screening criteria (Powers et al., 2019). HT is a major concern in patients treated with tPA, as tPA increases the rate of HT by up to 10-fold (Lees et al., 2010). This increased risk of HT is due to several mechanisms that are not well explored. One of the most important is the mechanism of action of tPA itself, which is to promote reperfusion by degrading fibrin-based clots (Hong et al., 2021).

Regarding the effects of neutrophils in stroke pathology, despite the general belief of their detrimental effect, some subsets of neutrophils, known as N2 neutrophils, have been shown in experiments to have beneficial properties. In addition, neutrophils express TLR4 on their surface, and the absence of this receptor may alter neutrophil function and phenotype in the context of cerebral ischemia. It has been observed that the deficiency of TLR4 confers a neuroprotective effect and increases the density of infiltrating neutrophils, most of which are N2.

On the other hand, neutrophils play a key role in the process of immunothrombosis by releasing NETs, which consist of networks of DNA and antimicrobial proteins (Brinkmann et al., 2004). These NETs have several components, such as DNA and histones (H3 or H4), that activate blood coagulation and promote platelet adhesion, thereby facilitating thrombus formation in blood vessels (Carestia et al., 2013). Inhibition of PAD4 can prevent NETs formation, emphasizing the importance of this enzyme in the NETosis process. In addition, treatment with DNase-1, an enzyme known to degrade DNA present in NETs, may be effective in eliminating these structures.

Several studies have investigated the effect of circadian variation on the severity of acute stroke (Simonsen et al., 2016; Esposito et al., 2020). The immune system is regulated by circadian biology at multiple levels (Lo et al., 2021). Circulating neutrophils exhibit circadian oscillations in number and phenotype, and neutrophil recruitment also varies, which may influence disease outcome in inflammatory settings. An intrinsic neutrophil program driven by the Bmal1 gene induces diurnal changes in circulating neutrophils via the chemokine receptors CXCR2 and CXCR4. Autocrine signals transmitted by CXCR2 can induce this progressive degranulation such that neutrophils mobilized in the blood of mice at night show a marked reduction in their primary granule content during the day; these diurnal changes are antagonized by CXCR4. Temporal degranulation, regulated by circadian rhythm, predicts NETs formation in a critical time-of-day-dependent manner. In addition, genetic control of NETs formation was shown to be associated with circadian rhythm (Adrover et al., 2020).

## **HYPOTHESES AND OBJECTIVES**

Based on the above, our hypothesis is as follows: "Administration of DNase-1, as a drug that facilitates the clearance of NETs, will have a protective role in ischemic damage and will improve the response to tPA". Experiments with TLR4KO, PAD4KO and DNaseKO mice will further our understanding of the immunological mechanism in stroke. In addition, the influence of circadian rhythms on stroke prognosis and treatment will be explored from experimental data.

To study this hypothesis, we set the following objectives:

1. To study the effect of DNase-I treatment on ischemic stroke. We will investigate the

function of NETs and platelet TLR4 receptor.

2. To study the effect of circadian rhythm on DNase-I treatment in ischemic stroke. We will study the function of NETs in PAD4 and DNase KO mice.

## **MATERIALS AND METHODS**

To accomplish the above objectives, wild-type C57BL/6 mice and transgenic mice such as TLR4loxP/Pf4-cre, PAD4<sup>-/-</sup>, DNase<sup>-/-</sup>, C57BL/6-Ly6g/Cre-tdTomato mice were used. The MCAO model used in this thesis is the in situ thromboembolic model (Orset et al., 2007). According to the different experimental objectives, we used different drugs including: aspirin (preventive treatment), tPA (late treatment to study the phenomenon of HT), DNase-I (inhibition of NETosis). On the other hand, MCAO was performed at different "Zeitgeber Time" according to the circadian rhythm of mice, including ZT4-ZT7 and ZT13-ZT16.

After 24 hours of occlusion, neurological tests were performed and infarct volume was determined by MRI and hemorrhage. Brain and blood samples were collected for immunofluorescence, ELISA, and other analyses. In addition, we performed a series of experiments to study the ex vivo NETosis process 12 hours after MCAO.

## **RESULTS**

### Effect of DNase-I treatment in ischemic stroke. Role of NETs and platelet TLR4 receptor.

We have found that DNase-I treatment has beneficial effects in reducing infarct volume and improving neurological symptoms in ischemic stroke models. This treatment decreases the presence of NETs in the cerebral cortex and reduces the plasma concentration of elastase.

In addition, we observed that DNase-I administration is not associated with changes in the incidence of spontaneous reperfusion, nor with alterations in neutrophil infiltration or polarization. Furthermore, the administration of DNase-I does not produce bleeding or an increase in hemorrhagic transformation induced by late administration of tPA. Importantly, the addition of DNase-I to tPA treatment does not increase hemorrhagic transformation induced by late administration of the thrombolytic. The addition of DNase-I to tPA treatment results in an increase in the rate of successful arterial recanalization and a decrease in bleeding volume in reperfused animals.

The study also found a positive correlation between the presence of NETs in the cortex and neutrophil infiltration, as well as between the presence of NETs and plasma elastase levels. In addition, we evaluated the influence of TLR4 deficiency on platelets, which resulted in a significant reduction in infarct volume and improvement in neurological symptoms. This platelet TLR4 deficiency also decreased the presence of NETs in the cortex and plasma elastase concentration. In addition, chronic pretreatment with aspirin produced no change in the effects of DNase-I.

#### Effect of circadian rhythms on DNase-I treatment in ischemic stroke. Function of NETs.

We observed that animals that experienced vascular occlusion during their quiescent phase (resting period) had larger infarcts and worse neurological status. This result is associated with a decrease in the percentage of spontaneous reperfusion, an increase in the presence of NETs in tissues and an increase in plasma levels of elastase and a greater capacity to produce NETosis *ex vivo*. We also observed a lower number of neutrophils, especially those expressing Ym1+ (N2 neutrophils).

We have shown that DNase-I treatment only has a protective effect when administered during the inactive phase, and again, it is associated with a decrease in the presence of NETs in the cerebral cortex and a decrease in plasma elastase levels during this period. In PAD4-deficient mice, the effect of circadian rhythms on infarct volume was maintained, and lower levels of NETs were observed, and DNase-I treatment had no protective effect in these animals.

On the other hand, in DNase-deficient mice, the effect of circadian rhythms on infarct volume was maintained, and higher levels of NETs were observed compared with normal animals, but DNase-I treatment produced results similar to those observed in WT animals.

#### **CONCLUSION**

Our results demonstrate that administration of DNase-I is an effective and safe treatment in experimental stroke models. Our group had demonstrated the protective effect of DNase-I in a thromboembolic model of platelet-rich thrombus (ferric chloride model) and we have now found that it is also protective when the thrombus is fibrin-rich (thrombin administration). The mechanism of action by which DNase-I produces its protective effect is not fully established,

we have shown that decreased NETosis processes play an important role in the effect found without affecting neutrophil infiltration or polarization. Moreover, single treatment with DNase-I does not produce bleeding, and when coadministered with tPA increases recanalization rates, decreases bleeding when reperfusion occurs, and does not increase hemorrhagic transformation induced by late administration of the thrombolytic. Finally, it is important to highlight that DNase-I is effective when administered during the inactive phase and that pretreatment with antiplatelet agents (aspirin) does not alter the protective effect of this drug. Our data are particularly relevant if we take into account that two clinical trials with DNase-I designed to improve early reperfusion rates (EXTEND-IA DNase) or to reduce systemic inflammation associated with stroke (ReSCInD) are currently underway. Larger studies are required to accurately determine the efficacy of this treatment, the mechanisms involved, and its translation to the clinic.



# **INTRODUCCIÓN**



# 1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

## 1.1. DEFINICIÓN

La *enfermedad cerebrovascular* hace referencia a una serie de trastornos que afectan a los vasos sanguíneos del cerebro. Estos trastornos incluyen la aterosclerosis de las arterias cerebrales, la formación de coágulos, el estrechamiento, la obstrucción, la arteritis cerebral, las lesiones en las arterias cerebrales, los aneurismas cerebrales, las malformaciones vasculares intracraneales, las fístulas arteriovenosas cerebrales, entre otros. El rasgo común de estas enfermedades radica en la inducción de la isquemia o hemorragia en el tejido cerebral, lo que puede resultar en la discapacidad o muerte del paciente. En la práctica clínica, además, representan entre un cuarto y la mitad de todos los ingresos hospitalarios relacionados con enfermedades del sistema nervioso.

El término castellano *ictus*, cuyo correspondiente anglosajón es “*stroke*”, deriva del latín *ictus*, que significa ‘golpe’ o ‘ataque’. Se utiliza para describir un conjunto de enfermedades que resultan en déficits neurológicos súbitos debido a la alteración del flujo sanguíneo en las estructuras del sistema nervioso. Es aconsejable emplear este término *ictus* en lugar de otros nombres que solo abordan algunos de los tipos de episodios cerebrovasculares. Además, las denominaciones *accidente cerebrovascular*, *ataque cerebrovascular* y *apoplejía* se consideran sinónimos de *ictus*.

La principal causa de ictus es la obstrucción o ruptura de un vaso sanguíneo en la arteria cerebral y otros vasos sanguíneos terminales que proporcionan sangre al cerebro. Sus síntomas varían según el daño en la función nerviosa del área del tejido cerebral irrigada por el vaso sanguíneo afectado, y generalmente, estos síntomas empeoran con el tiempo. En el caso del ictus isquémico, sus síntomas consisten en el entumecimiento o debilidad súbita en un lado del cuerpo, confusión, problemas de visión, dificultad para caminar, dolor de cabeza intenso y dificultad para tragar. En contraste, el ictus hemorrágico por su parte se caracteriza por un repentino y fuerte dolor de cabeza, vómitos, entumecimiento o debilidad unilateral, confusión o pérdida de conciencia, problemas en el habla y la visión, además de la posibilidad de convulsiones (Hurford et al., 2020). Reconocer estos síntomas es esencial para una intervención médica inmediata y un tratamiento adecuado de esta afección cerebrovascular.

Tras una evaluación adecuada, si se cumplen los criterios para el tratamiento, las terapias farmacológicas endovasculares dentro de las 4,5 horas o la trombectomía dentro de las 6 horas posteriores al inicio de los síntomas pueden mejorar la evolución de los mismos, restaurar el flujo sanguíneo cerebral y ayudar a la recuperación de las células nerviosas y sus funciones (Feske, 2021).

## 1.2. CLASIFICACIÓN

Se ha desarrollado una clasificación de las enfermedades cerebrovasculares con el fin de unificar la terminología y los criterios en los países iberoamericanos, basándonos en las clasificaciones de ictus de NINCDS ("*Special report*", 1990), TOAST (Adams et al., 1993), *Laussane Stroke Registry* (Castillo y Bogousslavsky, 1997), OCSF (Bamford et al., 1991) y el grupo de enfermedades cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología (Arboix et al., 1998). En dicha clasificación, hemos optado por el uso de la palabra 'ictus' como la más apropiada para describir las enfermedades cerebrovasculares.

Además, se ha dividido el ictus en dos categorías: sintomático y asintomático. El primero se subdivide en ataque isquémico transitorio (AIT) y el propio ictus, y este último, a su vez, se agrupa en isquémico y hemorrágico. Además, se han establecido subtipos etiológicos para la isquemia cerebral focal (ictus isquémico), que abarcan enfermedad de grandes vasos o aterotrombótico, cardioembólico, enfermedad oclusiva de pequeño vaso, de causa inusual y de origen indeterminado (Adams y Biller, 2015). Mientras el ictus hemorrágico se clasifica en hemorragia subaracnoidea (HSA) y hemorragia intracerebral, que se subdivide esta última según la localización (Aguado et al., 2009).

En síntesis, la mayoría de los autores clasifican el ictus en dos categorías principales: isquémico y hemorrágico (Caplan, 2011), que son posteriormente subdivididos según su etiología (Figura 1):

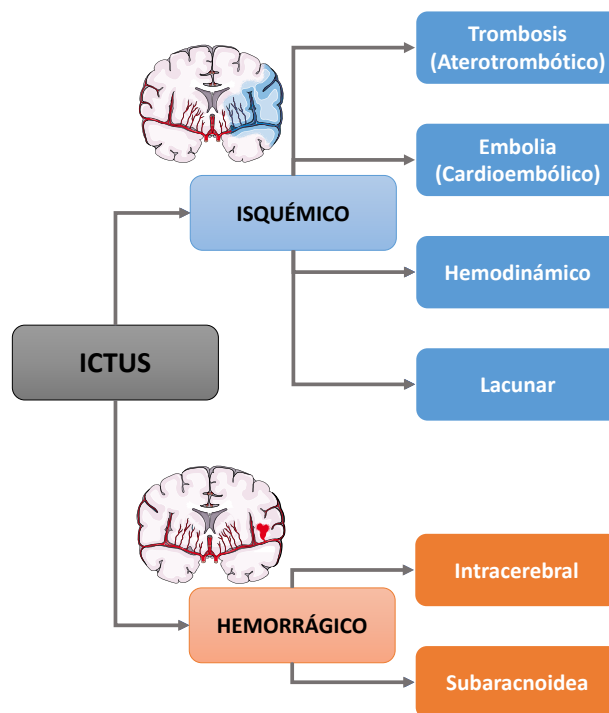
- 1) **Ictus Isquémico:** esta es la forma más común de ictus y se produce cuando el suministro de sangre a una parte del cerebro se interrumpe debido a la obstrucción de una arteria (Feske, 2021). Esta obstrucción puede deberse a:
  - Trombosis: formación de un coágulo sanguíneo (trombo) en una arteria cerebral

previamente estrechada debido a la aterosclerosis.

- Embolia: obstrucción de una arteria cerebral por un émbolo, que es un coágulo que se forma en otra parte del cuerpo (generalmente en el corazón) y luego se desplaza hasta el cerebro.
- Hemodinámico: ocurre cuando el flujo sanguíneo cerebral disminuye debido a una baja presión arterial o un bajo gasto cardíaco.
- Lacunar: implica pequeñas arterias cerebrales o arterias perforantes y generalmente resulta en infartos de menor tamaño.

2) **Ictus Hemorrágico**: en este caso, el ictus se produce debido a la ruptura de un vaso sanguíneo cerebral, lo que provoca una hemorragia en el cerebro. Sus causas principales son:

- Hemorragia Intracerebral: la sangre se acumula dentro del tejido cerebral debido a la ruptura de una arteria en el cerebro.
- Hemorragia Subaracnoidea: se produce cuando un aneurisma (una bolsa llena de sangre) en una arteria cerebral se rompe, liberando sangre en el espacio entre el cerebro y el cráneo.



**Figura 1. Clasificación de la enfermedad cerebrovascular según el tipo y subclasificación según el origen de la oclusión**

### **1.3. EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO**

El ictus constituye una preocupación importante para la salud a nivel global, con más de 13 millones de casos nuevos reportados anualmente y más de 100 millones de sobrevivientes en todo el mundo. Su incidencia varía notablemente según la región, con tasas más altas en países de ingresos bajos y medios. Es también una de las principales causas de mortalidad, siendo responsable de cerca de 5,5 millones de muertes al año (Donkor, 2018), lo que equivale a aproximadamente el 11% del total de las defunciones globales. El ictus en España es la primera causa de muerte entre las mujeres, la 2-3 entre hombres, la primera causa de discapacidad del adulto y la segunda causa de demencia tras la enfermedad de Alzheimer.

Entre los factores de riesgo del ictus, la edad consiste en un factor crítico, cuyo riesgo se aumenta drásticamente con la edad, a pesar de la tendencia al alza en la incidencia de ictus en poblaciones más jóvenes. En general, los hombres tienen un riesgo ligeramente mayor que las mujeres, pero estas tienden a experimentar ictus a edades más avanzadas, lo que contribuye a una mayor mortalidad relacionada con el ictus en las mujeres. También se ha demostrado que los ictus isquémicos dominan, representando el 85% de todos los casos (Donkor, 2018).

Por otro lado, los factores de riesgo, identificados mediante estudios epidemiológicos, pueden clasificarse en dos categorías: modificables y no modificables. Entre los del primer grupo figuran la hipertensión, diabetes, colesterol alto, enfermedades cardiovasculares, estilo de vida sedentario, fibrilación auricular, tabaquismo y consumo de alcohol (O'Donnell et al., 2010). Con respecto a los factores no modificables, la edad es un determinante clave del riesgo de ictus, duplicándose cada década después de los 55 años (Owolabi et al., 2009). La prevalencia de ictus en personas mayores de 80 años alcanzó el 27%, en comparación con el 13% en personas de entre 60 y 79 años (Rosamond et al., 2008). Una revisión de estudios epidemiológicos de 19 países que contenían información relevante específica por género, la edad promedio en el primer episodio de ictus fue de 68,6 años en hombres y 72,9 años en mujeres. Además, la tasa de incidencia de ictus en hombres fue un 33% más alta que en mujeres, y su prevalencia también fue un 41% mayor que en mujeres (Appelros et al., 2009).

La hipertensión constituye el factor más relevante después de la edad, aumentando el riesgo de ictus. Los datos del estudio de INTERSTROKE revelan que diez factores, incluidos hipertensión, colesterol alto, tabaquismo, alcohol, diabetes, estrés, obesidad, enfermedades cardíacas, inactividad física y mala alimentación, son responsables del 90% de los casos del ictus (O'Donnell et al., 2016). Las diferencias raciales se atribuyen a variables genéticas, ambientales y socioeconómicas, con el ictus hemorrágico vinculado a la hipertensión y el isquémico a factores como tabaquismo e hiperlipidemia. Además, estudios genéticos han identificado genes como APOE, MTHFR, ENOS y otros relacionados con ictus, compartiendo variación genética con rasgos vasculares (Gretarsdottir et al., 2008).

## 2. FISIOPATOLOGÍA DEL ICTUS ISQUÉMICO

El cerebro, el órgano principal afectado en un ictus, es altamente activo desde el punto de vista metabólico y requiere un flujo sanguíneo de aproximadamente 50 ml/100 g/min con una tasa metabólica de oxígeno de 3,5 cc/100 g/min. Las neuronas no pueden sobrevivir mucho tiempo con niveles inferiores a 5 ml/100 g/min (Doyle et al., 2008).

La fisiopatología del ictus isquémico se inicia cuando se produce una disminución significativa en el flujo sanguíneo hacia el cerebro debido a la obstrucción de una arteria, lo que conlleva a una reducción en el suministro de oxígeno, glucosa y otros nutrientes esenciales para el funcionamiento de las células cerebrales. Como resultado, se desencadenan una serie de eventos moleculares y celulares que tienen lugar a corto y largo plazo (Caplan, 2016). Esto inicia un ciclo perjudicial, conocido como cascada isquémica, debido a la acumulación de sodio, calcio y agua en las células cerebrales dañadas, lo que a su vez provoca la liberación de neurotransmisores excitatorios y un mayor daño celular.

### 2.1. LA CASCADA ISQUÉMICA

En el núcleo de la zona isquémica, clínicamente definida como un área con flujo sanguíneo cerebral regional <20%, la muerte neuronal aguda y la muerte celular ocurren rápidamente, minutos u horas después de la oclusión debido a un déficit de energía que conduce a un desequilibrio iónico intracelular y a una falla mitocondrial. En cambio, fuera del

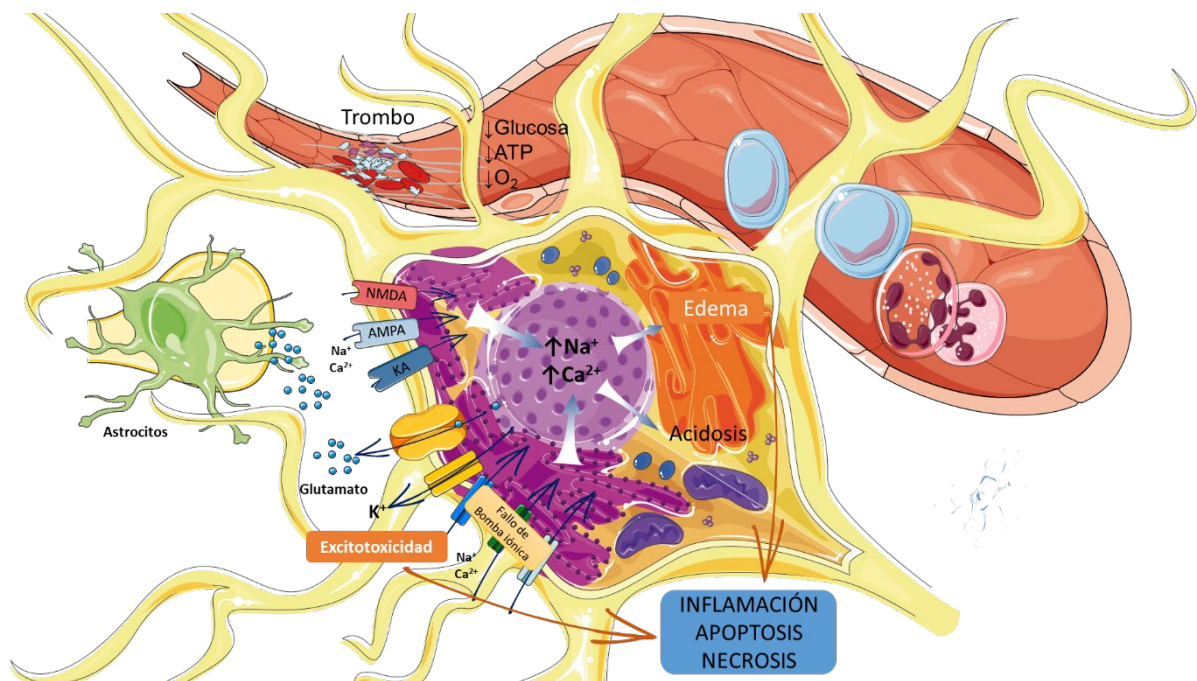
núcleo isquémico, el tejido cerebral permanece parcialmente perfundido, aunque con tasas de perfusión reducidas. Esta región se conoce como penumbra isquémica y a menudo se define por una tasa de perfusión reducida pero mayor que la observada en el núcleo isquémico (Jackman y Iadecola, 2015). Pese a que la función de las neuronas en la penumbra esté comprometida, pueden ser rescatadas si se restablece el flujo sanguíneo (Moskowitz et al., 2010). Con todo, incluso cuando se restablece el flujo sanguíneo, las neuronas en la penumbra se enfrentan a desafíos importantes para su supervivencia, como la excitotoxicidad y la propia acidosis del medio.

En primer lugar, la cascada isquémica produce un fallo en el metabolismo energético del cerebro debido a la disminución en la producción de adenosín trifosfato (ATP). La falta de oxígeno conduce a una desviación del metabolismo de la glucosa hacia la vía anaerobia, lo que resulta en un aumento del ácido láctico y acidosis. Esta acidosis inhibe la fosforilación oxidativa, contribuyendo a la depleción energética. La falta de oxígeno, además, da lugar a una despolarización inadecuada de las células afectadas, lo que lleva a la liberación excesiva de neurotransmisores excitadores como el glutamato. Esto activa receptores que permiten la entrada masiva de calcio y sodio en las neuronas, generando edema citotóxico y aumentando el daño cerebral.

La liberación descontrolada de glutamato provoca una elevación en la concentración de calcio intracelular y contribuye a la excitotoxicidad, un proceso en el que las células nerviosas mueren por una estimulación excesiva. Esto se debe en parte a la sobreactivación de receptores glutamatérgicos, incluyendo los receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metilo-4-isoxazolpropiónico (AMPA) y ácido kainato (KA), que permiten la entrada de calcio y sodio en las células, causando también edema citotóxico (Flores-Soto et al., 2012). Las concentraciones elevadas de calcio pueden dañar las mitocondrias y provocar la liberación de citocromo C, lo que conduce a un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa y, finalmente, a la muerte neuronal.

Niveles elevados de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y ADP intracelulares provocan la producción perjudicial de especies reactivas de oxígeno (ROS "*reactive oxygen species*") en las mitocondrias, lo que resulta en la degradación de macromoléculas celulares. La isquemia, por otro lado, activa la óxido nítrico sintasa (NOS), lo que aumenta la generación del óxido nítrico (NO). Este NO se

combina con el superóxido para producir peroxinitrito, un potente oxidante. La producción de NO y el estrés oxidativo también están relacionados con la sobreactivación de la poli (ADP-ribosa) polimerasa-1 (PARP-1). Debido a la isquemia, la PARP-1 agota las células de NAD<sup>+</sup>, lo que conduce a la falta de ATP, falla energética y, en última instancia, a la muerte neuronal (Gonzalez et al., 2007). Esto también explica por qué la ventana de tiempo efectiva de los agentes trombolíticos es de 4,5 horas, ya que la reperfusión conlleva un aumento repentino en la producción de radicales libres relacionados y, posteriormente, al desarrollo de edema cerebral y transformación hemorrágica (Crack y Taylor, 2005) (Figura 2).



**Figura 2. La cascada isquémica.** Principales eventos moleculares y celulares desencadenados por la isquemia y que llevan a la muerte celular

## 2.2. LA RESPUESTA INFLAMATORIA TRAS ICTUS

Durante el proceso de la respuesta inflamatoria tras un ictus, las neuronas moribundas liberan moléculas conocidas como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs “*damage-associated molecular patterns*”) y citocinas proinflamatorias. Estas señales alertan al sistema inmunológico de que algo está mal. La microglía, células inmunes residentes del cerebro, se

activan en respuesta a estas señales, cambiando a un estado ameboide y fagocítico (Jin et al., 2010). Además, la barrera hematoencefálica (BHE) dañada permite la infiltración de células inmunes, como neutrófilos y macrófagos, que se reclutan hacia la lesión. Estas células liberan citocinas proinflamatorias que contribuyen a la inflamación y fagocitan restos celulares, incluyendo neuronas muertas, para limpiar el tejido dañado (Iadecola y Anrather, 2011). Posteriormente, se inicia la resolución de la inflamación, en la que las señales antiinflamatorias y los mediadores especializados en resolución entran en juego para promover la reparación del tejido cerebral (Vogelgesang et al., 2014). Con el tiempo, se forma una cicatriz compuesta principalmente por astrocitos en el sitio del ictus, que sella la zona dañada, pero limita la regeneración neural (Liu et al., 2014).

### **2.2.1. Mediadores Inflamatorios**

El NO es una molécula de señalización importante que está involucrada en varios procesos fisiológicos. En el contexto del ictus, la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) se relaciona con la producción de NO (Iadecola et al., 1995), que puede causar el daño cerebral. La inhibición farmacológica de iNOS reduce el volumen del infarto, lo que sugiere un papel perjudicial del NO en la lesión cerebral isquémica (Han et al., 2002).

Las ROS son generadas por las células inflamatorias y pueden dar lugar al daño cerebral después de un ictus. Se producen a través de varias vías, incluyendo la enzima NADPH oxidasa (NOX) (Lambeth, 2004) y la mieloperoxidasa (MPO) (Takizawa et al., 2002). El superóxido es una ROS importante en el cerebro isquémico, y puede causar daño directo o reaccionar con el NO para generar peroxinitrito, lo que agrava la lesión cerebral.

Las Metaloproteinasas de Matriz (MMP) son enzimas proteolíticas que degradan componentes de la matriz extracelular y están involucradas en una variedad de procesos fisiológicos, como la regeneración neuronal, la proliferación celular, la angiogénesis y la apoptosis (Morancho et al., 2010). MMP-9 es una MMP inducible que desempeña un papel importante en el daño de la BHE durante la fase aguda del ictus isquémico, inicialmente secretada en forma latente, se activa por procesamiento proteolítico en el espacio extracelular. Estudios en modelos de roedores isquémicos han demostrado un aumento significativo en la expresión de MMP-9 pro/activa en las primeras 24 horas después de la isquemia (Park et al.,

2009). Esta enzima se origina inicialmente en las células endoteliales (CE) y neutrófilos, y después de varios días, también en los macrófagos. Se ha observado que los ratones knockout para MMP-9 tienen infartos más pequeños, lo que sugiere que MMP-9 puede también estar involucrada en el edema (Montaner et al., 2001). Por otro lado, los niveles de MMP en sangre pueden utilizarse como biomarcadores potenciales para predecir la gravedad del ictus (Abdelnaseer et al., 2017).

Las citoquinas son moléculas de señalización que se regulan al alza en el cerebro después de una variedad de lesiones, incluido un ictus. Se expresan no solo en células del sistema inmunológico, sino que también se han observado en células residentes del cerebro, como las células gliales y las neuronas (Huang et al., 2006). Algunas de las citoquinas más estudiadas en relación con la inflamación en el ictus consisten en la interleucina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleucina-6 (IL-6), la interleucina-10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) (Haqqani et al., 2005). Algunas de ellas, como IL-1 y TNF- $\alpha$ , parecen empeorar la lesión cerebral, mientras que otras, como IL-6, IL-10 y TGF- $\beta$ , pueden tener efectos neuroprotectores (Ooboshi et al., 2005).

Las quimioquinas son proteínas de señalización pequeñas que pertenecen a la familia de citocinas y tienen la capacidad de inducir la quimiotaxis dirigida en células cercanas, especialmente los leucocitos. Actualmente, se conocen 40 quimioquinas diferentes, que disponen de receptores únicos y superpuestos, y pertenecen a la superclase de receptores acoplados a proteínas G (Bajetto et al., 2001), al igual que las citocinas. Normalmente, tanto las quimioquinas como sus receptores se expresan en bajas concentraciones, pero tras una isquemia cerebral, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  aumentan la producción y liberación de quimioquinas específicas. De modo que las quimioquinas y sus receptores desempeñan un papel relevante en la modulación de diversos procesos patológicos y fisiológicos, siendo su papel en la inflamación postisquémica un contribuyente importante al daño cerebral isquémico (Chen et al., 2003). Se ha demostrado que varias quimioquinas de la familia CXC se regulan al alza después de la isquemia cerebral y median la infiltración de leucocitos, desempeñando un papel clave en la patogénesis del ictus. Por poner un ejemplo, la quimioquina CCL-2 y su receptor CCR2 median la respuesta inflamatoria patológica postisquémica y el daño de la BHE, aumentando su permeabilidad (Stamatovic et al., 2005) (Figura 3).

A la vista de lo anterior, todos estos mediadores desempeñan un papel crucial en la respuesta inflamatoria y el daño cerebral después de un ictus isquémico. La comprensión de sus efectos y regulación es fundamental para el desarrollo de enfoques terapéuticos destinados a reducir el daño cerebral y mejorar la recuperación después de un ictus.

### **2.2.2. Respuesta Celular**

La respuesta celular es un proceso complejo y dinámico que involucra múltiples tipos de células en el cerebro. En primer lugar, las neuronas, que son especialmente sensibles a la falta de oxígeno y glucosa, sufren daño y muerte en la zona afectada. Esto da lugar a la liberación de neurotransmisores excitadores y al aumento de la concentración de glutamato, agravando el daño (Figura 2).

En segundo lugar, los astrocitos, un tipo de célula glial, responden a la lesión al intentar controlar la homeostasis de iones y agua, liberar factores neurotróficos y eliminar neurotransmisores liberados durante la actividad sináptica. Tras un episodio de ictus, la falla de la bomba de sodio y potasio hace que los astrocitos se hinchen, provocando una elevada presión intracerebral y una menor perfusión cerebral (Syková, 2001). No obstante, estas células también liberan los factores de crecimiento derivados del cerebro (BDNF), el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2) y el factor de crecimiento nervioso (NGF), que son vitales para la neuroprotección y neurorreparación (Vogelgesang et al., 2014).

En tercer lugar, la microglía, células inmunes residentes del cerebro que representan entre el 5% y el 20% de la población de células gliales. Cuando se activan, adoptan un comportamiento similar al de los macrófagos en situaciones de inflamación sistémica. Tienen la capacidad de fagocitar desechos celulares y sustancias extrañas, además de producir citocinas y MMPs que pueden comprometer la integridad de la BHE (Iadecola y Anrather, 2011). Varios estudios (Zhou et al., 2013; Facci et al., 2014) han mostrado que, en la microglía activada de la zona infartada, se expresan receptores CD14 y el receptor tipo 4 de Toll (TLR4), lo que sugiere un posible mecanismo de activación de la microglía. Pero la activación de estas células en el contexto de un ictus isquémico es un proceso complejo con un doble papel (Lalancette-Hébert et al., 2012). Por un lado, la microglía activada puede secretar citocinas proinflamatorias, lo que agrava el daño tisular; por otro, también puede secretar factores

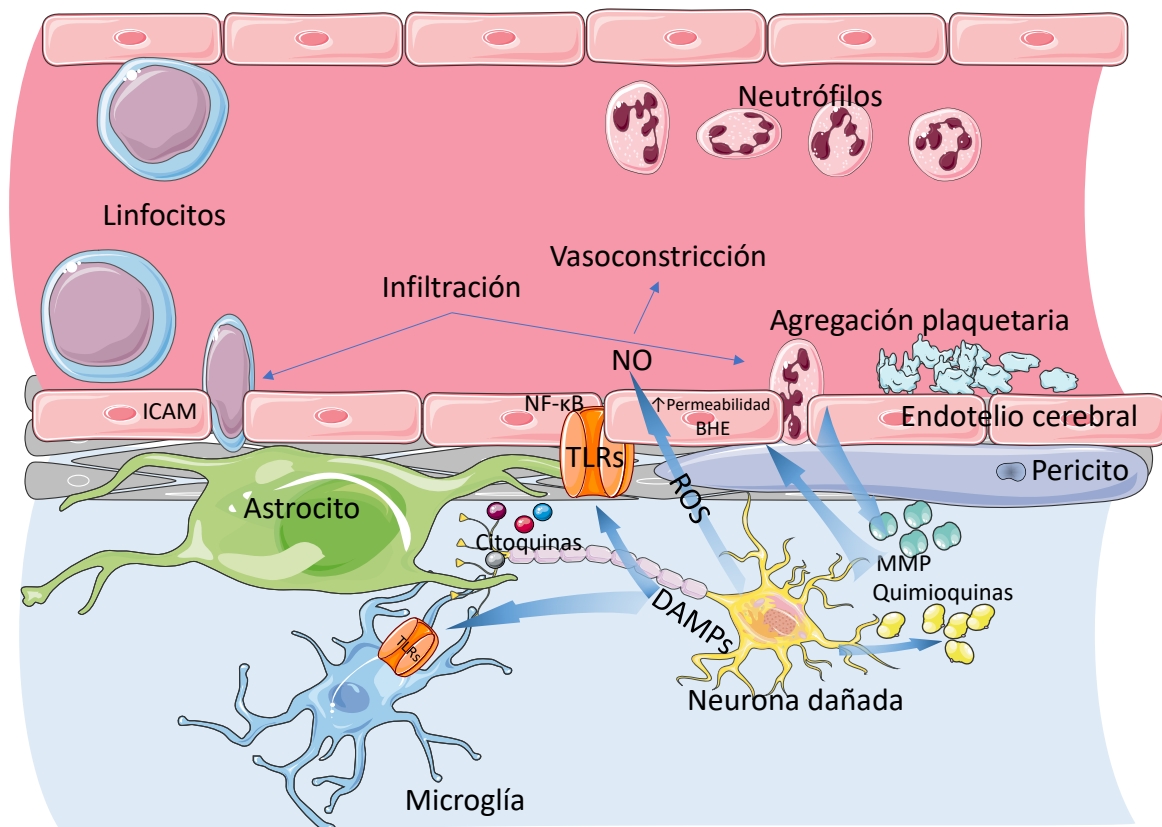
antiinflamatorios, lo que podría ayudar a mitigar parte del daño causado por la inflamación (Ponomarev et al., 2013). Además de sus funciones inmunológicas, desempeñan un papel crucial en la reparación cerebral y la plasticidad, ya que producen diversos factores neurotróficos que ayudan a la neurogénesis y la plasticidad sináptica (Singhal y Baune, 2017), destacando la diversidad de sus funciones tras un episodio isquémico.

Los pericitos son células similares a los macrófagos con propiedades de músculo liso que están contiguas a la lámina basal y están involucrados tanto en la angiogénesis como en la lesión (Yang y Rosenberg, 2015). Después de un ictus isquémico, dichas células responden rápidamente, lo que puede resultar tanto protector como perjudicial, como la separación, constricción y migración desde las paredes de los microvasos o la muerte celular (Fernández-Klett y Priller, 2015). No obstante, se ha descrito que, 7 días después del ictus isquémico en ratones, los pericitos se acumulaban en el área peri-infarto, lo que podría respaldar la reparación vascular; además, tienen la capacidad de diferenciarse en células de las líneas neural y vascular (Nakagomi et al., 2015).

Más adelante continuaremos mencionando las funciones específicas de las células cerebrales en la barrera hematoencefálica; aquí simplemente presentamos las respuestas de estas células después de la isquemia. Después de la inflamación isquémica, las células del sistema inmunológico circulante también activan mecanismos de respuesta. Los macrófagos derivados de monocitos (MMΦ) parecen tener principalmente funciones protectoras en la lesión cerebral isquémica. Se desarrollan a partir de monocitos después de infiltrarse en el parénquima cerebral. Los monocitos sanguíneos cuentan con dos subpoblaciones funcionalmente distintas (inflamatorias y patrulleras), y la abundancia de los monocitos inflamatorios en la circulación se ha relacionado con un resultado clínico desfavorable en el ictus (Kaito et al., 2013). Sin embargo, el bloqueo del reclutamiento de monocitos mediante anticuerpos específicos durante la primera semana tras el ictus abolió la recuperación a largo plazo y disminuyó la expresión tisular de genes antiinflamatorios en ratones sometidos a oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO). Esos resultados muestran que los monocitos reclutados espontáneamente en el cerebro lesionado poco después de la lesión contribuyen a la recuperación funcional a largo plazo tras el ictus (Wattananit et al., 2016). Además, dependiendo de las señales moleculares encontradas en el parénquima cerebral

postisquémico, los MMΦ pueden someterse a una activación clásica (M1, proinflamatoria) o alternativa (M2, antiinflamatoria en la mayoría de los casos), contribuyendo así a la resolución de la inflamación (Fumagalli et al., 2013).

Por último, comparados con otras células del sistema inmunológico, los linfocitos T son reclutados en las etapas posteriores de una lesión cerebral isquémica (Feng et al., 2017). Actualmente, se están llevando a cabo investigaciones para comprender mejor el papel de los diferentes subtipos de linfocitos T en el ictus isquémico. Varios estudios han demostrado que, después del ictus, los linfocitos CD4, los linfocitos T reguladores (Tregs), los linfocitos CD8, y los linfocitos  $\gamma\delta$ T infiltran el tejido cerebral (Xie y Yang, 2015). Numerosos grupos de investigación están centrando sus esfuerzos en modular la actividad de las células Tregs por su potencial actividad neuroprotectora.



**Figura 3. Eventos de la inflamación post-isquemia.** Rápidamente tras la isquemia se produce una liberación de DAMPs por las células dañadas que activa los TLRs liberando diferentes citoquinas a través de NF-κB. El estrés oxidativo, agravado durante la reperusión, disminuye la disponibilidad de NO en el endotelio, provocando una vasoconstricción. La microglía responde sintetizando citoquinas que amplifican la respuesta inmune. El endotelio expresa ICAMs que adhieren los leucocitos a la pared vascular

### **2.2.3. Infiltración de Neutrófilos**

Dentro de las células circulantes, los neutrófilos juegan un papel clave en un escenario de inflamación y en la respuesta inmunitaria innata. Los neutrófilos son los glóbulos blancos que se generan continuamente en la médula ósea a partir de los precursores mieloides, conocidos también como los leucocitos polimorfonucleares (PMN). Cada día se producen hasta  $2 \times 10^{11}$  neutrófilos en la médula ósea donde maduran adquiriendo un alto contenido en gránulos que están dotados de diversas proteínas implicadas en la respuesta inmunitaria (Liew y Kubes, 2019). Una vez completado su proceso de maduración, son liberados al torrente sanguíneo donde su vida media dura de 6-12h, tanto en los ratones como en los seres humanos (Summers et al., 2010; Borregaard, 2010). No obstante, la cantidad de los neutrófilos circulantes difiere entre ellos, puesto que en los seres humanos los neutrófilos representan el 50-70% del total de los glóbulos blancos, mientras que en los ratones sólo el 10-25% de los leucocitos son neutrófilos (Mestas y Hughes, 2004). Se ha de mencionar esta diferencia porque podría tener importancia desde el punto de vista traslacional, ya que la mayoría de los modelos animales difiere de los humanos en cuanto a la composición de la sangre. Los neutrófilos expresan TLR4 en su superficie que puede ser activado por patógenos o DAMPs (Prince et al., 2011).

Son los primeros en responder durante una situación de inflamación aguda como un ictus (Ruhnau et al., 2017; Gelderblom et al., 2009). Los neutrófilos expuestos a dosis subclínicas de lipopolisacárido (LPS) empeoran la patogénesis de la aterosclerosis y la estabilidad de la placa (Geng et al., 2019). Una de las formas en que los neutrófilos contribuyen a la formación de trombos consiste en interactuar con las plaquetas a través de P-selectina/PSGL1 (Sreeramkumar et al., 2014) y estabilizar el trombo mediante la formación de las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) (Laridan et al., 2017). En los últimos años han surgido pruebas que sugieren la presencia de subconjuntos de neutrófilos distintos en diferentes patologías como infecciones, inflamación y cáncer (Cuartero et al., 2013; Fridlender et al., 2009; Tsuda et al., 2004). En condiciones inflamatorias se ha descrito una dicotomía N1/N2 (similar a la tradicionalmente utilizada para los macrófagos M1/M2) (Fridlender et al., 2009; Shaul et al., 2016). Si bien esta dicotomía se describió en un principio en el ámbito del cáncer, también se ha hecho evidente en las enfermedades cardiovasculares (Cuartero et al., 2013; Ma et al., 2016).

La cascada inflamatoria se activa pocos segundos después de la oclusión del vaso en el compartimento intravascular (Iadecola y Anrather, 2011). Tras la lesión isquémica, los neutrófilos circulantes se activan y se adhieren al endotelio a través de diferentes moléculas de adhesión. En 15 minutos después de la isquemia, los neutrófilos empiezan a expresar varias moléculas de adhesión endotelial como PSGL-1, la molécula de adhesión celular intracelular (ICAM-1), integrinas (como CD11a, b y c) y el antígeno macrófago-1 (MAC). Estas moléculas permiten a los neutrófilos rodar y adherirse a los vasos cerebrales (Kataoka et al., 2004). Tras la adhesión, los neutrófilos siguen un gradiente de quimiocinas y empiezan a infiltrarse en el tejido lesionado. La infiltración de neutrófilos comienza entre 6 y 12 h después del ictus y alcanza su máximo 1-2 días después de la isquemia, pero al cabo de 7 días, quedan pocos neutrófilos en el lugar de la lesión (Cai et al., 2020). En esta fase aguda, los neutrófilos despliegan una serie de funciones que contribuyen a la fisiopatología de la enfermedad.

Los neutrófilos también producen ROS que dañan el tejido circundante (Prince et al., 2011). Además, pueden contribuir a la alteración de la BHE liberando diversas moléculas como MMP-9, catepsina G, la colagenasa, la gelatinasa o la heparinasa, que en conjunto contribuyen a la ruptura de la matriz extracelular y al daño vascular (Ruhnau et al., 2017). La alteración de la BBB también facilita la infiltración de neutrófilos en el tejido (Yang y Rosenberg, 2011). En pacientes con ictus, el recuento de neutrófilos se correlaciona directamente con el tamaño del infarto (Buck et al., 2008). Además, la mayoría de los genes regulados al alza en la sangre de los pacientes con ictus se expresan principalmente en los neutrófilos (Tang et al., 2006). Asimismo, el cociente neutrófilo-linfocito puede predecir la transformación hemorrágica posterior al ictus isquémico (Zhang et al., 2019). Todo ello contribuirá a empeorar el resultado neurológico (Kumar et al., 2013).

Si bien abundan investigaciones sobre los efectos perjudiciales de los neutrófilos en la literatura, no son siempre desfavorables para la patología del ictus, ya que varios estudios han señalado un posible papel neuroprotector en diversos casos (García-Culebras et al., 2019). Además, en la última década se ha descrito que los neutrófilos no son una población homogénea y que, por ejemplo, se ha demostrado que algunos subconjuntos de neutrófilos son beneficiosos e incluso presentan características pro-resolutivas. Estos neutrófilos han sido denominados neutrófilos N2 ya que expresan Ym1+ (un marcador M2 prototípico) y se

asociaron con la neuroprotección y con la resolución de la inflamación en el ictus experimental tras la activación de PPAR $\gamma$  (Cuartero et al., 2013). Esta activación PPAR $\gamma$  no sólo polariza los neutrófilos hacia un fenotipo N2, sino que también aumentó el número de los neutrófilos infiltrados, lo que diverge de la opinión clásica, en la que la teoría aceptada tradicionalmente afirmaba que la infiltración de neutrófilos se asociaba a más daño (Cuartero et al., 2013).

Como se ha señalado anteriormente, los neutrófilos expresan TLR4 en su superficie. La carencia de este receptor puede modular su función y reprogramarlos a un fenotipo alternativo en la isquemia cerebral, en concordancia con un reciente estudio que reveló que la falta de TLR4 confiere un efecto neuroprotector que es concomitante con un aumento de la densidad de los neutrófilos infiltrados en el núcleo isquémico (García-Culebras et al., 2019). En dicho estudio, además, el análisis estereológico de los neutrófilos infiltrados en un modelo de oclusión permanente de la arteria cerebral media mostró que, dentro de la población infiltrada, la mayoría de los neutrófilos eran N2. Esto sugiere un efecto protector de este subgrupo, que se corroboró mediante la depleción de los neutrófilos periféricos o el uso de los ratones en los que TLR4 estaba genéticamente anulado en el linaje mieloide.

Además de modificar N1/N2, TLR4 también modula la función de los neutrófilos. Con respecto a la producción de ROS, se ha descrito la participación de TLR4 en la generación de una explosión oxidativa en neutrófilos cuando es inducida por LPS (Remer et al., 2003). En esta línea los neutrófilos no envejecidos muestran una menor producción de ROS que los activados por el microbiota (Zhang et al., 2015). Este último estudio también reveló que los neutrófilos estimulados por LPS eran más propensos a sufrir el proceso de NETosis. Sin embargo, la NETosis también se ve influida por el TLR4 plaquetario.

#### **2.2.4. Los receptores *Toll-like 4***

Los receptores tipo Toll (TLRs) desempeñan un papel fundamental en los sistemas inmunológicos innato y adaptativo al modular diversas células del sistema inmunológico (Glezer et al., 2007). Comprenden TLR1 a TLR13 y se expresan tanto en la superficie celular como en el interior de la célula (TLRs endosomales). TLRs como TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10 y TLR11 se encuentran en la membrana celular, mientras que TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 están localizados en compartimentos intracelulares (Kawasaki y Kawai, 2014).

En el sistema nervioso central, se expresan diferentes combinaciones de TLRs en varias células, incluyendo microglía, neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células madre o progenitoras neurales, así como células endoteliales vasculares y células epiteliales (Okun et al., 2011). La activación de la vía de señalización mediada por TLRs regula la captación y presentación de antígenos, la maduración de células inmunitarias y la producción y liberación de citocinas. Cuando los TLRs se unen a patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), desencadenan respuestas inflamatorias (Blander et al., 2004). Esta señalización se divide en dos vías principales: la dependiente de MyD88 y la dependiente de TRIF, activando factores como NF- $\kappa$ B e IRF, que regulan la producción de citocinas proinflamatorias y factores antivirales (Balch et al., 2020). En el contexto de una lesión cerebral isquémica, la activación de TLRs puede tener efectos variables, desde neuroprotección hasta daño, dependiendo de las condiciones y la modulación de la respuesta inflamatoria (Durán-Laforet et al., 2021). Además, los TLRs y la peptidil-arginina deiminasa 4 (PAD4) regulan la formación de NETs, lo que contribuye a la lesión tisular inducida por la hipoxia (Vaibhav et al., 2020).

El TLR4 es un componente clave del sistema inmunológico que se diferencia de otros receptores de la misma familia en dos aspectos principales. En primer lugar, requiere la presencia de una proteína accesoria llamada factor de diferenciación mieloide 2 (MD-2) para activarse (Al-Ofi et al., 2019). En segundo lugar, cuando está activado, el TLR4 desencadena dos vías de señalización distintas: una vía dependiente de la proteína de respuesta primaria 88 (MyD88) y una vía independiente de MyD88. Para estudiar la eficacia de los ligandos que se unen al TLR4, se utilizan ampliamente modelos de roedores para simular trastornos tanto periféricos como del sistema nervioso central (SNC) que ocurren en humanos. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la traducción clínica de estos datos de modelos de roedores a humanos presenta desafíos significativos debido a las diferencias en la señalización de TLR4 y en las respuestas inmunológicas entre estas dos especies. Por ejemplo, el dominio de reconocimiento de ligando de TLR4 es diferente entre humanos y ratones, lo que significa que los agonistas que funcionan en ratones pueden no ser efectivos en humanos (Bsibsi et al., 2002). Además, la expresión de TLR4 en microglía y astrocitos difiere entre especies, lo que puede dar lugar a respuestas neuroinmunológicas diferentes cuando se activa TLR4.

Además, el TLR4 juega un papel importante en la respuesta inmunológica después de un ictus (Durán-Laforet et al., 2021). Nuestro grupo fue pionero en la demostración de que la ausencia de TLR4 mejora los resultados neurológicos en modelos animales de ictus (Caso et al., 2007), y esta relación también se ha observado en pacientes (Brea et al., 2011). Además, la administración de un aptámero de ADN que se une al TLR4 ha demostrado que tiene un efecto protector tanto en modelos animales de ictus como en pacientes en ensayos clínicos de fase I y II (Fernández et al., 2018; Hernández-Jiménez et al., 2022; Hernández-Jiménez et al., 2023;). La expresión de TLR4 tanto en el SNC como en las células circulantes complica la comprensión de su implicación en todo el organismo (Fernández et al., 2018), y se ha encontrado que las células periféricas tienen un papel clave en la fisiopatología del ictus, como se ha demostrado en ratones quiméricos con médula ósea que carecen de TLR4 (Yang et al., 2008).

En relación a la expresión elevada de TLR4 en células de sangre periférica, se observan hallazgos de importancia funcional significativa. La eliminación de TLR4 en neutrófilos resulta en una reducción en el tamaño de los infartos cerebrales en modelos murinos, al mismo tiempo que induce una polarización hacia el fenotipo N2 (García-Culebras et al., 2019). Los ratones deficientes de TLR4 en las plaquetas mantienen una función de coagulación normal en condiciones fisiológicas, pero presentan una activación y función plaquetarias deterioradas en un modelo de shock hemorrágico (Ding et al., 2014). Además, se ha corroborado la importancia crítica de TLR4 en la trombocitopenia inducida por el lipopolisacárido (LPS) (Clark et al., 2007). Experimentos más recientes, llevados a cabo por nuestro grupo de investigación, han revelado que el TLR4 plaquetario media la formación de NETs en el modelo fototrombotico (pMCAO) en ratones (Peña-Martínez et al., 2019). Estos resultados subrayan el papel esencial de TLR4 en las plaquetas en los procesos de trombosis y trombosis inmunológica, abriendo perspectivas prometedoras para la exploración de nuevas direcciones en el desarrollo de tratamientos.

### 3. TROMBOSIS ARTERIAL Y TRATAMIENTO DEL ICTUS ISQUÉMICO

Un trombo en el contexto de un ictus isquémico se forma como parte de un proceso complejo que implica la obstrucción de un vaso sanguíneo en el cerebro debido a la acumulación de material trombótico. El proceso comienza con una lesión en la pared interna de una arteria cerebral. Esta lesión puede deberse a diversos factores, como la acumulación de placa aterosclerótica, la inflamación en la pared arterial o el daño previo en el vaso sanguíneo. La causa principal es la rotura de una placa aterosclerótica (Hartwig e Italiano, 2003) que se desarrolla mediante la acumulación de depósitos de lípidos y macrófagos cargados de lípidos en la pared de la arteria. Cuando las plaquetas en la sangre detectan esta anomalía, entonces se produce un reclutamiento rápido en el sitio, mediante la interacción de receptores específicos de la superficie de las células plaquetarias con el colágeno y el factor von Willebrand (activación plaquetaria) (Savage et al., 1998; Denis y Wagner, 2007). Paralelamente a la activación plaquetaria, se desencadena una cascada de reacciones químicas que culminan en la formación de una red de fibrina. La fibrina es una proteína que actúa como una malla en la que se atrapan las plaquetas, los glóbulos rojos y otros elementos sanguíneos, creando así un coágulo sanguíneo más sólido. Con el tiempo, el trombo continúa creciendo a medida que más plaquetas se adhieren a la malla de fibrina.

Una vía importante de activación implica la escisión y, en consecuencia, la activación del receptor plaquetario PAR1 (receptor 1 activado por proteasa; también conocido como receptor de trombina) por la proteasa trombina (también conocida como factor II) (Coughlin, 2005), que se activa mediante la cascada de coagulación sanguínea. Luego, las plaquetas activadas liberan el contenido de los gránulos, que promueven aún más el reclutamiento, la adhesión, la agregación y la activación de las plaquetas. Esto puede obstruir aún más el vaso sanguíneo y reducir o bloquear completamente el flujo sanguíneo hacia el tejido cerebral distal. Si el trombo crece lo suficiente, puede obstruir por completo el vaso sanguíneo, lo que resulta en una falta de oxígeno y nutrientes para la región del cerebro irrigada por esa arteria. Esta obstrucción completa puede llevar a un ictus isquémico, causando daño cerebral. A diferencia del trombo venoso (trombo rojo), que se forma principalmente a partir de fibrina, el trombo arterial (trombo blanco) se forma principalmente a partir de plaquetas (Mackman, 2008).

### 3.1. TROMBOSIS Y PLAQUETA

Además del mecanismo previamente mencionado de formación de trombos plaquetarios, la interacción de los receptores plaquetarios con el colágeno también desencadena una cascada de señalización celular de adentro hacia afuera que culmina en la activación de la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  (Shattil et al., 2010). Este proceso implica la participación de proteínas intermediarias, talina y kindlina, que se unen al dominio citoplasmático de la integrina  $\beta\text{3}$ , induciendo un cambio en  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  de un estado inactivo a uno activo (Moser et al., 2008). La conformación activa de  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  aumenta su afinidad por varias proteínas adhesivas, incluyendo vWF, fibrinógeno, fibrina y fibronectina. Estas interacciones son críticas para que las plaquetas puedan formar agregados estables con otras plaquetas activadas, facilitando así el crecimiento de los trombos. La interacción de los receptores plaquetarios con el colágeno desencadena una serie de eventos intracelulares que llevan a la activación de la integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , lo que aumenta la afinidad de esta integrina por diversas proteínas adhesivas. Esta activación y las interacciones subsiguientes son esenciales para la formación de los agregados plaquetarios estables y para promover el crecimiento de los trombos en situaciones de respuesta a daño vascular o necesidad de detener el sangrado.

El papel de las plaquetas va más allá de su función bien establecida en la regulación de la hemostasia y la trombosis. Estas células sanguíneas desempeñan un papel específico en la regulación y asistencia de las respuestas inmunitarias y las reacciones inflamatorias (Von Hundelshausen y Weber, 2007). Después de la activación, las plaquetas expresan la selectina P, una molécula adhesiva que regula la interacción entre las plaquetas activadas y las células del sistema inmunitario que expresan su ligando, la glicoproteína P-selectina. Esto conduce a la formación de microagregados y facilita la interacción y adhesión de los leucocitos, como linfocitos, neutrófilos y monocitos. Además de la selectina P, las plaquetas también expresan una serie de otros receptores de superficie, como  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , CD40 ligando, la molécula de adhesión intercelular 2, las moléculas de adhesión de unión y los receptores de quimiocinas, que se cree que establecen conexiones entre el sistema inmunológico y las plaquetas.

Además, las plaquetas expresan los receptores Toll-like (TLRs), que son componentes clave de la inmunidad innata contra diversas infecciones, incluyendo virus, bacterias y tumores (Koupenova et al., 2015). Esto sugiere que las plaquetas consisten en un elemento integral del sistema inmunológico. Además, las plaquetas exhiben autofagia durante su activación y pueden tomar muestras del entorno sanguíneo, ayudando a otras células del sistema inmunológico al presentar patógenos extraños (Ouseph et al., 2015). La activación de TLR4 por el LPS en las plaquetas puede desencadenar una serie de respuestas importantes. Por un lado, puede conducir a la formación de los agregados de plaquetas y neutrófilos, lo que contribuye a la respuesta inmunológica y a la defensa del organismo contra infecciones. En cambio, este proceso dinámico también puede tener consecuencias perjudiciales, como la activación de NETosis (Clark et al., 2007), que puede promover lesiones en el huésped.

La aspirina, un medicamento ampliamente utilizado, ejerce su acción en las plaquetas a través, fundamentalmente, de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa-1 (COX-1), un componente clave en la cascada de coagulación. La aspirina se une de manera irreversible a la COX-1, lo que resulta en la reducción de la producción de prostaglandinas y tromboxano A<sub>2</sub>, compuestos proinflamatorios y proagregantes plaquetarios. Esta inhibición de la COX-1 disminuye la capacidad de las plaquetas para adherirse y formar coágulos (Franchi et al., 2017), lo que tiene un efecto antiagregante. Actúa como un inhibidor de la agregación plaquetaria y reduce el riesgo de formación de coágulos sanguíneos, lo que la convierte en un medicamento eficaz para la prevención de eventos cardiovasculares, como ataques cardíacos e ictus.

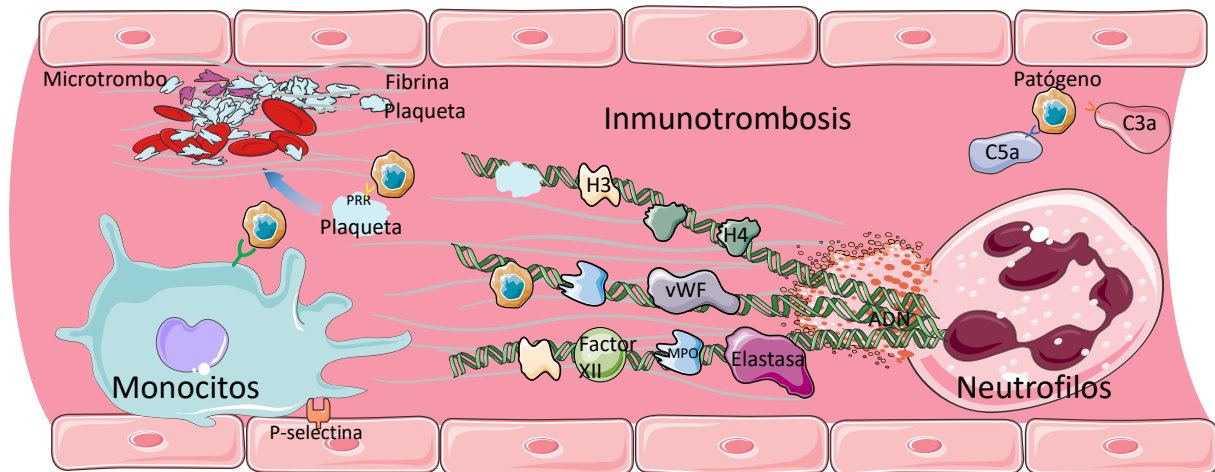
### **3.2. TROMBOSIS Y NETOSIS**

La formación de NETs es un proceso biológico que desempeña un papel esencial en la defensa inmunológica del organismo. Durante la NETosis, los neutrófilos experimentan cambios significativos en su morfología y liberan redes de cromatina cargadas de proteínas antimicrobianas. Estas NETs crean una barrera física contra varios patógenos, atrapan y matan a los microorganismos invasores y evitan su propagación. Aunque los detalles precisos de la formación de NETs no están completamente claros, se han identificado varios factores clave, como ROS, citoquinas como la IL-8, LPS, factor de complemento 5a y diversas sustancias

químicas activadoras. La enzima PAD4 juega un papel vital, ya que cataliza la citrulinación de histonas, un paso crítico en la NETosis (Martinod y Wagner, 2014).

La inhibición de PAD4 puede prevenir la formación de NETs, lo que subraya la importancia de esta enzima en el proceso de NETosis. Este mecanismo inmunológico es fundamental para la respuesta del cuerpo ante las amenazas microbianas. El término "NETosis" se refiere al proceso de formación de NETs. Inicialmente, la NETosis se describió como un proceso de muerte celular distinto de la apoptosis y la necrosis, en el cual las membranas nucleares y granulares se desintegran, y el contenido nuclear se descondensa en el citoplasma. Luego, la membrana plasmática se rompe, liberando la cromatina junto con las proteínas granulares al espacio extracelular. En ciertas situaciones, los neutrófilos pueden inducir la NETosis sin que esto conlleve su muerte, preservando su capacidad fagocítica. Actualmente, se reconocen dos tipos de NETosis (Huang et al., 2022): una "suicida" y otra "vital". En la NETosis suicida, la activación del neutrófilo por estímulos como el PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) conduce a la activación del complejo NADPH oxidasa y a la citrulinación de histonas por medio de PAD4, lo que desencadena la formación de NETs seguida de la lisis celular. En la NETosis vital, el proceso es más rápido y no depende de ROS. La enzima PAD4 se activa sin la necesidad de ROS, lo que induce la descondensación de la cromatina. En este caso, el neutrófilo libera NETs sin comprometer su integridad celular.

La inmunotrombosis es un proceso biológico que se desencadena en respuesta a la formación de trombos en los vasos sanguíneos, particularmente en los microvasos. Su principal función es crear una especie de estructura intravascular que facilita la detección, contención y eliminación de patógenos, como bacterias o virus, presentes en la sangre, protegiendo así la salud del organismo sin causar daños graves. Sin embargo, si este proceso no se regula adecuadamente, puede contribuir al desarrollo de trastornos asociados con la trombosis, lo que subraya la relevancia de comprender y controlar este mecanismo biológico (Engelmann y Massberg, 2013) (Figura 4).



**Figura 4. Principios básicos de la inmunotrombosis.** Los monocitos y sus microvesículas desempeñan un papel crucial al expresar el factor tisular intravascular en los sitios de exposición a patógenos, lo que inicia la vía extrínseca de la coagulación. Además, las NETs inducen la inmunotrombosis a través de múltiples mecanismos lo que potencia la formación de trombos. Estos incluyen la activación del factor XII, la liberación de vWF y de histonas H3 y H4, que activan las plaquetas, así como la presentación de MPO y elastasa, que oxidan los anticoagulantes. El sistema del complemento, en particular los componentes activados del complemento como C3a y C5a, también contribuyen a promover la inmunotrombosis a través de la activación de las plaquetas

En el proceso de inmunotrombosis, los neutrófilos desempeñan un papel fundamental al liberar NETs, que consisten en redes de ADN y proteínas antimicrobianas (Brinkmann et al., 2004). Estas NETs cuentan con varios componentes, como ADN e histonas (H3 o H4), que activan la coagulación sanguínea y promueven la adhesión de las plaquetas, facilitando así la formación de trombos en los vasos sanguíneos (Carestia et al., 2013). Varios receptores en la superficie de las plaquetas también son importantes para participar en la activación de la trombosis inmune, tales como TLR4, GPCR (PAR1/4, P2Y12), glicoproteínas (integrina  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ , GPVI y GIIb-IX-V), y oxigenasas (COX-1, 12-LOX) (Gremmel et al., 2016). La interacción entre los neutrófilos y las plaquetas crea un andamiaje intravascular que no solo atrapa patógenos para su destrucción, sino que puede dar lugar a patologías relacionadas con la trombosis. De hecho, se ha observado la presencia de NETs en contextos de las trombosis arterial y venosa en estudios clínicos y experimentales (Martinod y Wagner, 2014). De acuerdo con la estructura y el mecanismo inmunológico de las NETs, la NETosis se puede prevenir de varias maneras. Una de ellas es mediante PAD4, una enzima clave en la citrulinación de histonas, la deficiencia de PAD4 impide la descondensación de la cromatina y la liberación de NETs (Martinod et al., 2013).

También se puede evitar la formación de NETs mediante el uso de inhibidores de PAD4, como cl-amidine, que inhibe su actividad enzimática. Además, el tratamiento con DNAsa-I, una enzima conocida por degradar el ADN presente en las NETs, puede ser eficaz para eliminar estas estructuras. De hecho, se han realizado muchos experimentos con animales que utilizan estos métodos para estudiar la trombosis y la NETosis inmunitarias (Martinod y Wagner, 2014).

### **3.3. LA TERAPIA TROMBOLÍTICA**

El ictus, como ya hemos comentado, es la segunda causa de muerte a nivel mundial (primera en mujeres en España) y su carga aumentó significativamente de 1990 a 2019. Los hallazgos indican que la mayoría de la carga global del ictus (86% de las muertes) ocurre en los países de ingresos bajos y medianos (GBD 2019 Stroke Collaborators, 2019). El ictus isquémico sigue siendo la causa predominante de todos los nuevos casos de ictus, seguido de la hemorragia intracerebral y la hemorragia subaracnoidea. Por ello, las estrategias y medidas de prevención primaria del ictus están lejos de ser suficientes. Por otro lado, es fundamental implementar adecuadamente las medidas de prevención secundaria, así como proporcionar un tratamiento agudo y una rehabilitación apropiados para mejorar los resultados en casos de ictus.

Tras años de investigación enfocada en la terapia farmacológica de esta enfermedad, se publicaron por primera vez tratamientos farmacológicos agudos beneficiosos para pacientes con ictus isquémico (NINDS, 1995). Este tratamiento implica la recanalización de la arteria obstruida mediante la administración intravenosa de activador del plasminógeno tisular recombinante o alteplasa (r-tPA o tPA). Recientemente, también se ha aprobado para uso clínico un nuevo fármaco derivado de r-tPA, tenecteplasa (TNK) (Huang et al., 2015). En comparación con el r-tPA, TNK cuenta con ventajas como menos efectos secundarios y una vida media más larga. Actualmente, la reperusión de arterias obstruidas mediante la administración intravenosa de r-tPA o TNK es el único tratamiento farmacológico aprobado para la fase aguda del ictus isquémico (Campbell et al., 2018; Campbell et al., 2020). Sin embargo, debido al riesgo de transformación hemorrágica (TH), que es una complicación principal para los fármacos trombolíticos, estos medicamentos solo se pueden utilizar en

pacientes seleccionados mediante criterios de cribado muy estrictos (Powers et al., 2019). Se excluyen pacientes mayores de 80 años, pacientes con diabetes o hiperglucemia, pacientes que toman anticoagulantes, pacientes con hipertensión, antecedentes de ictus, lesiones cerebrales extensas o efecto de masa antes del tratamiento, así como pacientes más allá del período de tratamiento de 4,5 horas. Dada la corta ventana terapéutica de la terapia trombolítica y los criterios de tratamiento restrictivos, solo un pequeño grupo de pacientes con ictus isquémico puede ser elegible para este enfoque terapéutico.

En países europeos, solo el 7,3% de los pacientes con ictus isquémico agudo recibe la trombólisis intravenosa, y únicamente el 1,9% se somete al tratamiento endovascular. Las tasas más elevadas a nivel nacional son del 20,6% para la trombólisis intravenosa en los Países Bajos y del 5,6% para el tratamiento endovascular en Malta (Aguar de Sousa, 2019).

En comparación con la terapia de trombectomía (retirada mecánica del trombo mediante dispositivos intraluminales), que tiene una tasa de recanalización del 70% (Goyal et al., 2016), la terapia de trombólisis intravenosa presenta una tasa de recanalización de alrededor del 30% con cerca de un 50% de pacientes que no responden al tratamiento trombolítico. Así, comparando con la aplicación de trombolíticos, la trombectomía es más apropiada para abordar la obstrucción en vasos sanguíneos de mayor calibre y requiere la intervención de profesionales médicos altamente capacitados. En algunos casos evaluados, se opta por una combinación de trombectomía y trombólisis como parte del tratamiento. Entre los pacientes tratados con el r-tPA, factores como la ubicación del trombo, un tamaño más pequeño, la mejora en su permeabilidad y el tiempo transcurrido hasta la evaluación de la recanalización se relacionaron con un mayor éxito en la recanalización (Riedel et al., 2011; Menon et al., 2018).

En la actualidad, se están evaluando diversas mejoras en la trombólisis con el objetivo de reducir sus efectos secundarios, especialmente la TH. Algunos enfoques principales abarcan el uso de r-tPA o TNK incluso en grupos de pacientes considerados previamente excluidos (Li et al., 2022; Tsvigoulis et al., 2023), terapias combinadas con r-tPA que pueden extender la ventana terapéutica, o la identificación de pacientes que son más propensos a beneficiarse de esta terapia (Fischer et al., 2022). Estas investigaciones tienen como objetivo mejorar la eficacia y seguridad de la trombólisis como tratamiento del ictus isquémico (Zhu et al., 2022). En vista de lo anterior, entendemos que las limitaciones de la trombólisis consisten en una

ventana de tratamiento estrecha, una tasa de recanalización baja y una predisposición a la transformación hemorrágica.

### **3.4. MECANISMOS MOLECULARES DE LA FIBRINÓLISIS**

El tPA y sus derivados son elementos fundamentales en la trombólisis. Se trata de serina proteasas de cerca de 70 kDa que son abundantes tanto en el plasma como en el SNC. Su actividad catalítica se encuentra en el dominio proteasa, y también posee dos dominios “kringle” que son responsables de su interacción con la fibrina (Rijken et al., 1982). En el torrente sanguíneo, esta molécula se halla unida a los inhibidores del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), los cuales inhiben su actividad.

En condiciones fisiológicas, tanto la coagulación como la fibrinólisis están reguladas con precisión por la participación medida de sustratos, activadores, inhibidores, cofactores y receptores. Los enlaces moleculares entre estos sistemas permiten la eliminación localizada y oportuna de depósitos de fibrina en curso o inducidos de forma aguda (Kolev y Machovich, 2003).

La coagulación se inicia con la generación de trombina, que promueve la formación de trombos mediante la conversión de fibrinógeno en fibrina y la activación plaquetaria. Por otro lado, la fibrinólisis implica la acción de la plasmina, la principal proteasa fibrinolítica. El plasminógeno (PLG), un zimógeno plasmático, se convierte en plasmina mediante activadores como el tPA y la uroquinasa (uPA). La plasmina, a su vez, escinde tanto el tPA como el uPA, transformándolos en formas más activas. La fibrina regula su propia degradación uniéndose tanto a PLG como a tPA en su superficie, lo que facilita la generación de plasmina (Cesarman-Maus y Hajjar, 2005). Una vez formada, la plasmina escinde la fibrina, generando productos de degradación solubles y exponiendo residuos de lisina carboxi terminal (Lys). Los “kringles” de tPA y PLG contienen sitios de unión a lisina, lo que aumenta la afinidad por la fibrina y, por ende, la generación de plasmina y la eliminación de fibrina. La disolución de la fibrina también está regulada por inhibidores de la activación de PLG, como el PAI-1, y por inhibidores de la plasmina, como el inhibidor de  $\alpha$ 2-plasmina ( $\alpha$ 2-PI).

Además, varios tipos de células, como las endoteliales, monocitos, macrófagos, neutrófilos y células tumorales, promueven la generación de plasmina al expresar receptores de la superficie celular. Estos receptores facilitan la actividad fibrinolítica en la superficie celular, actúan como cofactores en la generación de plasmina y proporcionan entornos especializados que están protegidos de los inhibidores circulantes (Hajjar, 2003).

#### 4. TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA

La transformación hemorrágica (TH) es el sangrado que ocurre en una región del cerebro afectada por ictus. Se presenta en alrededor del 10% al 40% de los pacientes y está vinculada a un aumento en la morbilidad y mortalidad (Terruso et al., 2009). La gravedad de la TH puede variar desde un sangrado microscópico hasta hemorragias más extensas. En estudios clínicos, a menudo se divide la TH en cuatro categorías: el infarto hemorrágico petequeial pequeño (HI1), el infarto hemorrágico petequeial confluyente (HI2), la hemorragia parenquimatosa pequeña (PH1) (que involucra menos del 30% del infarto, con un efecto de masa leve) y la hemorragia parenquimatosa grande (PH2, que involucra más del 30% del infarto, con un efecto de masa pronunciado) (Fiorelli et al., 1999).

La TH ocurre cuando se restablece el flujo sanguíneo cerebral en la vasculatura previamente dañada. Existe cierta incertidumbre acerca de si los mecanismos que causan las hemorragias petequeiales más pequeñas son los mismos que los que causan las hemorragias parenquimatosas más grandes. Algunos argumentan que estas difieren, ya que la hemorragia petequeial se relaciona con la duración y gravedad de la isquemia, mientras que la hemorragia parenquimatosa puede no estar directamente relacionada con estos factores (Thomalla et al., 2007). Además, se considera que la hemorragia petequeial puede indicar una reperfusión temprana en el tejido cerebral aún viable, lo que la convierte en un posible marcador de buen pronóstico (Molina et al., 2002). La lesión y remodelación de los vasos sanguíneos que componen la BHE y forman parte de la unidad neurovascular (vaso-glía-neurona) desempeñan un papel importante en estos procesos (Hamann et al., 1999).

#### **4.1. LAS ESTRUCTURAS DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA**

La barrera hematoencefálica (BHE) se refiere a las propiedades únicas de la microvasculatura del SNC. Los vasos sanguíneos en el SNC son vasos continuos no fenestrados, y presentan una serie de características adicionales que les permiten regular de manera precisa el movimiento de moléculas, iones y células entre la sangre y el SNC (Daneman, 2012). Esta capacidad altamente restrictiva de la BHE permite que sus CE mantengan rigurosamente la homeostasis del SNC, lo cual es esencial para el adecuado funcionamiento neuronal, así como para proteger el SNC contra toxinas, patógenos, inflamación, lesiones y enfermedades.

Existen tres sitios principales de barrera que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del SNC: las CE de los microvasos cerebrales, que forman la BHE; las células epiteliales del plexo coroideo, que secretan líquido cefalorraquídeo y establecen la BHE; y las CE de la membrana aracnoidea en la superficie del cerebro (Abbott et al., 2010). Estas barreras no solo son cruciales para regular la homeostasis iónica en el SNC, sino que también juegan un papel esencial en la regulación del tráfico molecular entre la sangre y el cerebro, la separación de grupos de neurotransmisores centrales y periféricos, y la limitación de la entrada al cerebro de proteínas plasmáticas y leucocitos circulantes.

En el caso de la BHE, las CE no funcionan de manera aislada, sino que operan dentro de una "unidad neurovascular" (NVU) altamente organizada. Esta NVU es una estructura modular que integra la población neuronal local junto con su glía astrocítica asociada y junto con las células que forman el tubo microvascular que proporciona el flujo sanguíneo, incluyendo el endotelio y los pericitos. Además, en las arteriolas también participa el músculo liso. Cabe destacar que la microglía, las células inmunes residentes en el SNC, están asociadas con la NVU. En condiciones fisiológicas, esta microglía se encuentra en estado de reposo, pero pueden activarse en situaciones patológicas. A continuación, presentamos los componentes fundamentales de la BHE.

Las **CE** son células epiteliales escamosas simples modificadas derivadas del mesodermo que forman las paredes de los vasos sanguíneos. En arterias y venas de mayor diámetro, se encuentran docenas de CE, mientras que los capilares más pequeños consisten en una única

CE que se pliega sobre sí misma para formar la luz del vaso. Las CE están además unidas por uniones estrechas, las cuales forman una barrera paracelular de alta resistencia a las moléculas y iones. Estas uniones presentan una permeabilidad selectiva en tamaño para moléculas no cargadas de hasta 4 nm (Van Itallie et al., 2008; Westergaard y Brightman, 1973) y luego disminuyen significativamente la permeabilidad para moléculas más grandes. Las CE en el SNC experimentan tasas extremadamente bajas de transcitosis en comparación con las CE periféricas, lo que restringe en gran medida el movimiento transcelular de solutos mediado por vesículas (Coomber y Stewart, 1985). Esta barrera paracelular y transcelular altamente restrictiva crea una polaridad celular con distintos compartimentos de membrana, uno orientado hacia la luz del vaso sanguíneo y otro hacia el tejido circundante (Betz et al., 1980), lo que permite un control preciso del intercambio entre la sangre y el cerebro mediante procesos de transporte celular regulados.

En cuanto a los transportadores expresados por las CE del SNC, se dividen en dos categorías principales: los transportadores de difusión pasiva, que permiten el paso de sustancias sin requerir energía adicional, y los transportadores de transporte activo, que utilizan energía metabólica para mover selectivamente moléculas, como la glucosa, hacia el cerebro, asegurando un suministro constante de energía para su funcionamiento. Estos transportadores son esenciales para regular qué sustancias pueden acceder al SNC y mantener su ambiente interno protegido y estable. Además, las CE del SNC expresan niveles extremadamente bajos de moléculas de adhesión de leucocitos (LAM) (Henninger et al., 1997), en comparación con las CE en otros tejidos, lo que limita significativamente la entrada de células inmunitarias al SNC.

Las **células murales** comprenden tanto células del músculo liso vascular que rodean los vasos sanguíneos de mayor tamaño como pericitos, que recubren parcialmente las paredes endoteliales de la microvasculatura. Los pericitos (PC) son células que se encuentran en la superficie abluminal del tubo endotelial microvascular y están incrustadas en la membrana basal vascular. Estas células tienen extensiones celulares largas que recorren la superficie abluminal del endotelio, a menudo abarcando múltiples CE. Los pericitos contienen proteínas contráctiles y tienen la capacidad de contraerse para controlar el diámetro de los capilares (Hall et al., 2014).

La **membrana basal** rodea el tubo vascular y consta de dos componentes principales: la membrana basal vascular interna y la membrana basal parenquimatosa externa, también conocida como glía limitante perivascular. La alteración de estas membranas basales por las metaloproteinasas de la matriz es un componente importante en la disfunción de la BHE y la infiltración de leucocitos observada en diversos trastornos neurológicos (Del Zoppo et al., 2006).

Los **astrocitos** son células gliales esenciales que extienden procesos celulares polarizados que envuelven procesos neuronales o vasos sanguíneos (Abbott et al., 2006). Esta interacción neurovascular permite a los astrocitos transmitir señales que regulan el flujo sanguíneo en respuesta a la actividad neuronal (Gordon et al., 2011). Esto incluye la regulación de la contracción o dilatación de las células del músculo liso vascular que rodean las arteriolas, así como de los pericitos que rodean los capilares.

La **microglía** son células inmunes parenquimatosas residentes en el SNC. Estas células tienen un papel relevante en la regulación del desarrollo neuronal, en la respuesta inmunitaria innata y en la cicatrización de heridas, así como pueden actuar como células presentadoras de antígenos en la inmunidad adaptativa (Ajami et al., 2007). Además, diversas poblaciones de células inmunitarias circulantes, como los neutrófilos, células T y macrófagos, pueden interactuar con los vasos sanguíneos del SNC y se cree que regulan las propiedades de la BHE en respuesta a infecciones, lesiones y enfermedades mediante la liberación de especies reactivas de oxígeno que pueden aumentar la permeabilidad vascular (Hudson et al., 2005).

## **4.2. MECANISMOS DE TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA**

La isquemia cerebral focal daña componentes de la BHE e induce procesos inflamatorios que alteran las relaciones entre las CE, la matriz extracelular (ECM) y las células astrocíticas. Esto resulta en cambios significativos en la barrera de permeabilidad microvascular. A las pocas horas de MCAO, se detectan aumentos focales en la permeabilidad a fibrinógeno, IgG y otras proteínas grandes. Los niveles de integrinas expresadas por las CE, como  $\alpha 1\beta 1$ ,  $\alpha 3\beta 1$  y  $\alpha 6\beta 1$ , disminuyen rápidamente después de la MCAO y las MMP se activan como respuesta al daño isquémico, lo que induce la remodelación de la lámina basal y la activación de quimioquinas.

Las MMP son proteasas dependientes de zinc con la capacidad de degradar fibronectina y lamininas. Dado que la lámina basal está compuesta por el colágeno, la fibronectina, la laminina y el sulfato de heparina, y actúa como un importante andamio para las CE cerebrales, las MMP se consideran iniciadores evidentes de la ruptura de la BHE. Después de la isquemia o reperfusión, se ha demostrado que las MMP se sobreexpresan en el cerebro, ya sea a través de vías de citocinas proinflamatorias (a través de NF- $\kappa$ B) o mediante la activación de HIF-1 $\alpha$  y furina (Lenglet et al., 2014). La inhibición de las MMP con agentes farmacológicos o el uso de animales knockout para las MMP reduce la disrupción de la BHE (Rosenberg et al., 1998).

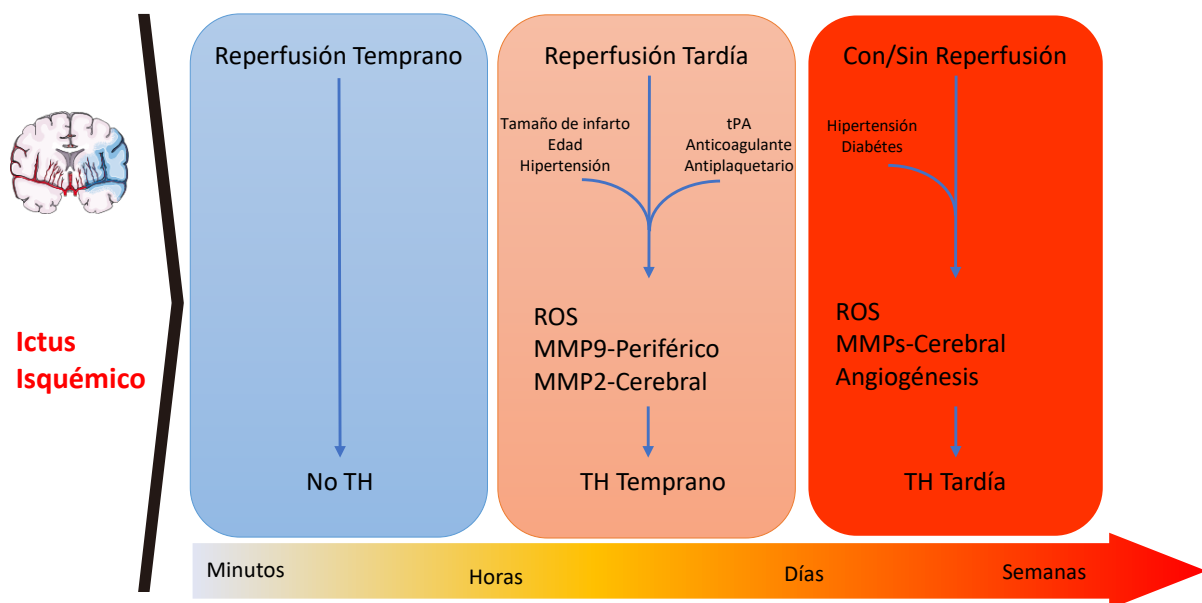
Además, tras la muerte de las neuronas, se produjo una liberación importante de glutamato y calcio por parte de las neuronas, que se une a los receptores de NMDA. Esta activación excesiva de los receptores NMDA es en gran medida responsable del edema citotóxico de las neuronas (Sharp et al., 2003), y puede dañar las células circundantes y debilitar la integridad de los vasos sanguíneos cerebrales, aumentando el riesgo de hemorragia.

#### **4.2.1. TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA TEMPRANA Y TARDÍA**

Existe una relación entre la duración de la isquemia y la TH inducida por la reperfusión. Un estudio llevado a cabo en ratas con MCAO reveló que la reperfusión después de 5 horas resultó en un 81,8% de las ratas desarrollando TH. En contraste, en el caso de la MCAO permanente, la tasa de TH fue solo del 18,2%. Estos hallazgos en roedores son consistentes con lo observado en pacientes. En el ser humano, se ha asociado el aumento en el tiempo transcurrido desde el inicio de la isquemia hasta la reperfusión con un incremento en el riesgo de TH, tanto en pacientes tratados con tPA como en pacientes no tratados (Copin y Gasche, 2008). Además, se ha demostrado que la recanalización realizada más allá de las 6 horas desde el inicio del ictus es un predictor independiente de TH en los casos de ictus. Por otro lado, la reperfusión temprana se asocia con un riesgo reducido de TH. En consecuencia, el tiempo transcurrido desde el inicio del ictus hasta la reperfusión se configura como un factor crítico para determinar la tasa de TH, y períodos más prolongados de isquemia aumentan la probabilidad de desarrollar TH cuando se restablece el flujo sanguíneo.

En los seres humanos, la gravedad de TH puede variar por el volumen de hemorragia. La TH también se suele dividir en grupos sintomáticos y asintomáticos según el deterioro del

estado neurológico, definido como un aumento de más de 4 puntos en la escala NIHSS (NIHSS: “National Institutes of Health Stroke Scale”) durante las primeras 36 horas después del inicio del ictus. Estas clasificaciones clínicas son útiles porque las hemorragias más graves son más probables de ser sintomáticas, lo que podría afectar negativamente los pronósticos del ictus. Por lo tanto, resulta esencial prevenirlas. Sin embargo, incluso las llamadas TH "asintomáticas" pueden empeorar los pronósticos del ictus (Park et al., 2012), por lo que el reducir las TH más pequeñas también puede beneficiar a los pacientes con ictus (Latour et al., 2004). Además, para discernir las diferencias en la TH según el mecanismo, se ha dividido el proceso en etapas tempranas y tardías, considerando la fase temprana como el período dentro de las primeras 24 horas después del ictus (Figura 5).



**Figura 5. TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA TEMPRANA Y TARDÍA.** Modificado de (Jickling et al., 2014)

Las ROS juegan un papel significativo en la TH temprana. La reperusión del tejido isquémico conlleva la generación de ROS desde diversas fuentes, que incluyen las mitocondrias intracelulares, la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa), la xantina oxidasas, los receptores de la membrana celular y mediadores inflamatorios (Fraser, 2011). El aumento de ROS como resultado de la isquemia-reperusión puede ocasionar daño en la unidad neurovascular, afectando a las CE, pericitos, células del músculo liso y astrocitos.

Este fenómeno resulta en una mayor permeabilidad de la BHE y un incremento en la probabilidad de TH. El daño provocado por las especies reactivas de oxígeno en la unidad neurovascular, a nivel capilar, puede predisponer a hemorragias petequiales, mientras que, a nivel de las arteriolas pequeñas, la lesión causada por los ROS, tanto en las CE como en las del músculo liso, puede dar lugar a las hemorragias parenquimatosas con un mayor grado de hemorragia.

A los 30 minutos de la isquemia cerebral focal, los leucocitos circulantes comienzan a adherirse a las CE vasculares (Sandoval y Witt, 2008). Después de 6 horas, los neutrófilos empiezan a infiltrar al cerebro de ratas con tMCAO (Zhang et al., 1994). En un modelo de MCAO en ratas, el bloqueo de la infiltración de neutrófilos redujo la MMP-9 en el cerebro (Justicia et al., 2003). La adhesión y migración de los leucocitos a través de la vasculatura activa una serie de cascadas de señalización (proteínas quinasa C, quinasa de adhesión focal) que incrementan la permeabilidad de la BHE. Las MMPs, incluyendo MMP-9, MMP-2 y MMP-3, son moléculas clave involucradas en la apertura de la BHE y la TH después de un ictus (Asahi et al., 2000). Estos resultados sugieren que el aumento en la expresión de las MMP en la TH temprana podría derivar de la liberación de neutrófilos infiltrados después del ictus.

El mecanismo exacto mediante el cual las MMP derivadas de la sangre alteran la BHE y contribuyen a la TH no está completamente claro. La MMP-9 plasmática puede abrir la BHE desde el lado luminal del vaso al actuar directamente sobre las proteínas de unión estrecha (TJ), o bien puede ser absorbida por las CE y afectar a la lámina basal. Alternativamente, los neutrófilos que infiltran el cerebro podrían liberar MMP que actúa directamente sobre las TJ y/o la lámina basal (Rosell et al., 2008). Las acciones de las MMP sobre la lámina basal podrían alterar el complejo endotelial-pericito-astrocito y facilitar la lesión de la BHE, promoviendo así la TH.

Existe una alteración persistente de la BHE que comienza un día después del ictus y que puede durar varias semanas (Strbian et al., 2008). Esta apertura retrasada y prolongada de la BHE está mediada predominantemente por las MMP derivadas del cerebro y otras proteasas cerebrales (plasmina, tPA endógeno, uroquinasa y catepsinas), así como la neuroinflamación, la remodelación vascular y la neovascularización. La remodelación vascular y la angiogénesis son componentes importantes de la recuperación después del ictus. Para que se incorporen

nuevos vasos a la vasculatura existente, varios factores de crecimiento, MMP y otras moléculas forman nuevos vasos y la unidad neurovascular. Durante esta remodelación vascular, los vasos se vuelven más permeables y son propensos a la TH.

Varios factores clínicos se han asociado con TH. La gravedad del ictus y el tamaño del infarto son los factores que mejor se correlacionan con la TH. Otros factores incluyen la edad, la presión arterial sistólica basal, la hipertensión preexistente, la glucosa sérica y el uso de antiplaquetarios. Hoy en día, el uso preventivo de antiplaquetarios se ha vuelto común entre las personas mayores. El tratamiento del ictus y la prevención y el manejo de complicaciones en estos pacientes son complicados. El uso de antiplaquetarios antes del tratamiento con tPA o el inicio del uso de antiplaquetarios dentro de las primeras 24 horas del tratamiento con tPA aumenta el riesgo de TH (Powers et al., 2019).

Hasta la fecha, ninguno de estos enfoques ha sido traducido con éxito a humanos. Los objetivos que se han evaluado incluyen la reducción de las ROS, la inhibición de las MMP y la modulación de objetivos que afectan la permeabilidad de la BHE.

#### **4.2.2. TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA Y TROMBOLÍTICO**

La TH es una preocupación importante en los pacientes tratados con tPA, ya que el tPA aumenta hasta 10 veces la tasa de TH (Lees et al., 2010). Este incremento en el riesgo de transformación hemorrágica se debe a diversos mecanismos. Una de las principales causas consiste en que el tPA promueve la reperfusión al degradar los coágulos sanguíneos basados en fibrina (Hong et al., 2021).

No obstante, el tPA también contribuye a la transformación hemorrágica a través de los mecanismos que van más allá de su papel en la trombólisis y la reperfusión. Esto se logra, en parte, mediante el aumento de las MMP, además de los efectos mediados por los receptores específicos (Turner y Sharp, 2016). El tPA actúa sobre el receptor 1 activado por la proteasa para incrementar la expresión de MMP-9 a través de NFκB (Cheng et al., 2006; Gerzanich et al., 2018).

Asimismo, el tPA se une al receptor alfa del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRα) para activar PDGF-CC. Es importante destacar que la unión del tPA al PDGFRα en los pies de los astrocitos aumenta la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, y que los

niveles elevados de PDGF-CC se asocian con la transformación hemorrágica en pacientes con ictus (Su et al., 2008; Qiu et al., 2022). Por otro lado, el tPA también se une al receptor de la LRP en las CE, las microglías y los astrocitos para aumentar la expresión de MMP-3 y MMP-9, y promueve la desgranulación de los neutrófilos y la liberación de MMP-9 en la sangre (Mantuano et al., 2017).

Por lo tanto, en pacientes tratados con tPA, la TH puede ocurrir no solo como resultado de una mayor reperusión, sino también por los efectos del tPA sobre la actividad de las metaloproteinasas, el PDGFR $\alpha$  y la señalización del receptor LRP (Shi et al., 2021). Tras un ictus, los factores de remodelación vascular están regulados positivamente y las estructuras microvasculares se desestabilizan. Estos factores alteran la BHE. La recanalización tardía de los vasos presente en un infarto relativamente maduro puede dañar la BHE, lo que resulta en TH. La activación de las células inmunes por tPA, desempeña un papel potencial en el proceso que se agrave aún más el daño de la BHE (Kim, 2019; Candelario-Jalil et al., 2022).

## 5. RITMO CIRCADIANO Y ICTUS ISQUEMICO

Los experimentos en modelos de isquemia cerebral en roedores suelen llevarse a cabo durante el día. El día es el período de sueño e inactividad para los roedores que son animales nocturnos. Esto puede producir una discrepancia al intentar extrapolar los resultados de la neuroprotección obtenida en ratones con los ensayos clínicos que se llevan a cabo en pacientes. Los estudios de neuroprotección en animales se realizan durante el día (periodo de inactividad en el animal) mientras que los ensayos clínicos se realizan durante el día que es el periodo de actividad en los humanos (Esposito et al., 2020). Por otro lado, los ritmos circadianos se componen de ritmos exógenos (ambientales o conductuales) y ritmos circadianos endógenos (sistemas fisiológicos regulados por el SNC y múltiples genes de reloj, que regulan la función cardiovascular, metabólica, inmune e inflamatoria entre otras) (Thosar et al., 2018). El trastorno del ritmo circadiano causado por el trabajo por turnos, los desfases horarios, los cambios en los patrones de actividad entre semana y fin de semana, o alteraciones en los ritmos circadianos del sueño y la vigilia, puede aumentar el riesgo de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares (Chellappa et al., 2019).

Varios estudios han investigado el efecto de la variación circadiana sobre la gravedad de los ictus agudos (Simonsen et al., 2016; Esposito et al., 2020). En un estudio multicéntrico en que participaron más de 17 000 pacientes con ictus o AIT, en comparación con el ictus diurno, el nocturno se asocia más con un deterioro neurológico temprano (dentro de 72 horas) (Ryu et al., 2022). Otros estudios afirmaron que los pacientes cuyo ictus comenzó alrededor de la medianoche tenían volúmenes centrales isquémicos mayores al momento del ingreso, y el crecimiento central era más pronunciado (Reidler et al., 2023). El deterioro neurológico temprano, dentro de las primeras 72 horas después del inicio del ictus, resulta más notable cuando el ictus ocurre por la noche comparando con un episodio diurno, lo que sugiere un mayor potencial del ritmo circadiano para mejorar el resultado funcional.

También existen diferencias en los ritmos circadianos respecto a los tratamientos relacionados con el ictus. La administración nocturna de antihipertensivos, en comparación con la administración durante el día, mejora los perfiles generales de la presión arterial durante 24 horas (Bowles et al., 2018). De igual modo, la administración nocturna de aspirina en dosis bajas, en comparación con la administración al despertar, reduce de manera más significativa la reactividad plaquetaria matutina, la cual está influida por el sistema circadiano y se lleva a cabo a través de las vías dependientes de la ciclooxigenasa 1(COX-1) (Bonten et al., 2015). Además, las terapias fueron más efectivas cuando el inicio del ataque cerebrovascular y la administración de la terapia se llevaron a cabo durante la fase diurna inactiva. Este efecto podría explicarse por la excitotoxicidad diferencial, la capacidad amortiguadora de las ROS y la dinámica del flujo sanguíneo en la penumbra, lo que conduce a un crecimiento diferencial del infarto y a un mayor volumen de penumbra a proteger (Esposito et al., 2020). La evidencia preliminar también sugiere que los tratamientos para el ictus agudo, como la trombólisis sistémica y la trombectomía endovascular, tienen diferentes eficacias en distintos momentos del día; los resultados parecen ser mejores cuando estas terapias se administran por la mañana (Lorenzano et al., 2014; Hajdu et al., 2021). En resumen, las estrategias para manipular el reloj circadiano pueden afectar el tratamiento y el pronóstico después del ictus, lo cual tengan un efecto potencial en el tratamiento traslacional (Tiedt et al., 2022).

## 5.1. BIOLOGÍA CIRCADIANA Y RESPUESTAS INMUNES

El sistema inmunitario está regulado por la biología circadiana a varios niveles (Lo et al., 2021). Las células mieloides, como los neutrófilos, monocitos y macrófagos, se sabe que oscilan en número tanto en ratones como en humanos (Cayrol et al., 2008; Timmons et al., 2020). La expresión de genes de reloj en estas células sigue patrones circadianos. Algunos estudios muestran que la ablación mieloide específica del gen circadiano *Bmal1* conduce a un fenotipo proinflamatorio general en ratones tras un ictus (Curtis et al., 2015; Sutton et al., 2017). Los ratones con deficiencia *Bmal1* en células que expresan CD11b, incluida la microglía, mostraron un aumento menos potente de la expresión de IL6 tras la oclusión de la arteria cerebral media en comparación con los ratones control, con una atenuación del daño neuronal (Connolly et al., 1997). Del mismo modo, los ritmos circadianos también regulan la polarización de los macrófagos (Timmons et al., 2020). Cabe subrayar que tanto los monocitos como los macrófagos poseen un potente reloj molecular y participan en varios procesos inflamatorios de forma dependiente del gen circadiano *Bmal1*, como son la fagocitosis y la migración (Carter et al., 2016; Kitchen et al., 2020).

Las células microgliales son las primeras células inmunitarias en responder en el SNC. Las funciones esenciales de la microglía están bajo el control de un reloj molecular interno en condiciones fisiológicas e inflamatorias (Fonken et al., 2015; Nakazato et al., 2017a), un efecto en el que REV-ERB- $\alpha$ , un receptor nuclear y componente del reloj circadiano, puede estar implicado. La oscilación horaria en la inmunorreactividad microglial en el hipocampo, que se ve interrumpida en los ratones *Rev-erb $\alpha$ -/-*, conduce a una activación microglial espontánea en el hipocampo y a una mayor expresión de transcripciones proinflamatorias, así como a una astrogliosis secundaria (Griffin et al., 2019). Aunque su papel específico en el contexto del ictus es menos conocido, la alteración del gen de reloj en la microglía, a través de la inducción de la neuroinflamación crónica, está implicada en la aparición de la enfermedad de Alzheimer (Ni et al., 2019).

La biología circadiana influye en la excitotoxicidad y el estrés oxidativo o nitrosativo en las neuronas. En los modelos de trauma cerebral en roedores, los niveles extracelulares de glutamato y el receptor NMDA dependen de la hora del día (Estrada-Rojo et al., 2018). Además,

la lesión neuronal regulada por p53 y Akt (proteína quinasa B) después de una isquemia cerebral focal varía según el tiempo de Zeitgeber (Beker et al., 2018). Los genes Bmal1 y Per2 también aumentan el daño oxidativo y pueden contribuir a la regulación de la apoptosis y la autofagia. El ritmo circadiano puede regular el compartimento vascular. En la penumbra, el flujo sanguíneo puede diferir durante un ictus en la fase activa en comparación con la fase inactiva. En los ratones knockout para Bmal1, la cobertura de pericitos de los microvasos cerebrales disminuye, lo que resulta en mayor permeabilidad de la barrera que afecta a la función de la BHE (Nakazato et al., 2017b).

Los niveles de trombogénesis y trombólisis endógena (Montagnana et al., 2009) varían según la hora del día en que se inicia el ictus. El PAI-1, que está bajo control del circadiano endógeno, alcanza su punto máximo temprano en la mañana y está regulado por los genes del reloj PER2, BMAL1 y BMAL2 (Oishi et al., 2009). Además, los pacientes con vasos recanalizados después de la trombólisis tenían niveles más bajos de PAI-1 al ingreso que los de los pacientes en quienes el tPA no indujo la recanalización (Ribo et al., 2004). Con todo, aún está por explorar si el ritmo circadiano de PAI-1 es responsable de la dependencia diurna de la eficacia del tPA.

Además, los neutrófilos circulantes muestran oscilaciones circadianas en número y en fenotipo, y el reclutamiento de neutrófilos también varía, lo que puede influir en el resultado de la enfermedad en escenarios inflamatorios. En respuesta al daño cerebral isquémico, los neutrófilos son rápidamente reclutados al tejido lesionado por la activación de las plaquetas y por las citocinas proinflamatorias derivadas de las células necróticas y de los patrones moleculares asociados al daño, como HMGB1, a través de la familia de TLRs (Sreeramkumar et al., 2014; García-Culebras et al., 2019). Durante esta fase aguda, los neutrófilos son responsables de la lesión cerebral asociada al ictus, del edema, de la alteración de la BBB y la transformación hemorrágica, así como del empeoramiento neurológico mediante la liberación de elastasa, la producción de ERO y el fenómeno de obstrucción de los microvasos por un fenómeno de no-reflujo (Kumar et al., 2013; Zhang et al., 2019). Un estudio demostró que después de la MCAO, la lesión cerebral solo se exacerbaba en los ratones enriquecidos con los neutrófilos frescos, lo que sugiere que la migración preferencial de este subtipo durante la inflamación contribuye a la lesión tisular (Adrover et al., 2019). Sin embargo, distintos fenotipos de los neutrófilos también podrían contribuir de manera diferencial al fenómeno de

no reflujo y/o la microtrombosis, mecanismos que aún están por estudiarse. Todos estos hallazgos pueden tener relevancia traslacional ya que las oscilaciones circadianas también se encuentran en los neutrófilos humanos (Ella et al., 2016; Adrover et al., 2020).

Aparte de los efectos a nivel molecular y celular, la biología circadiana también podría interactuar con los mecanismos del ictus que involucran el sueño, las hormonas, el metabolismo, la temperatura y la regulación vascular, así como la administración de fármacos. Una consecuencia relevante de la alteración del sueño y del ritmo circadiano constituye la activación sostenida del eje del estrés y la liberación anormal del cortisol. El cortisol elevado durante períodos prolongados altera el metabolismo, aumenta la grasa visceral, eleva el riesgo de la diabetes tipo 2, así como incrementa la presión arterial y la disfunción vascular (Vyas et al., 2012). La alteración del sueño y del ritmo circadiano suele estar presente tras un ictus, y la apatía posterior al episodio aumenta en aquellos con una fragmentación del sueño y una menor eficiencia del sueño.

En conjunto, estos datos sugieren que el ritmo circadiano y el reloj molecular de las células inmunitarias es un factor importante en el desarrollo del infarto tras un ictus. La investigación futura debería preguntarse cómo optimizar los tratamientos de los ictus dirigidos a la inflamación en función de la hora de inicio (Figura 6).

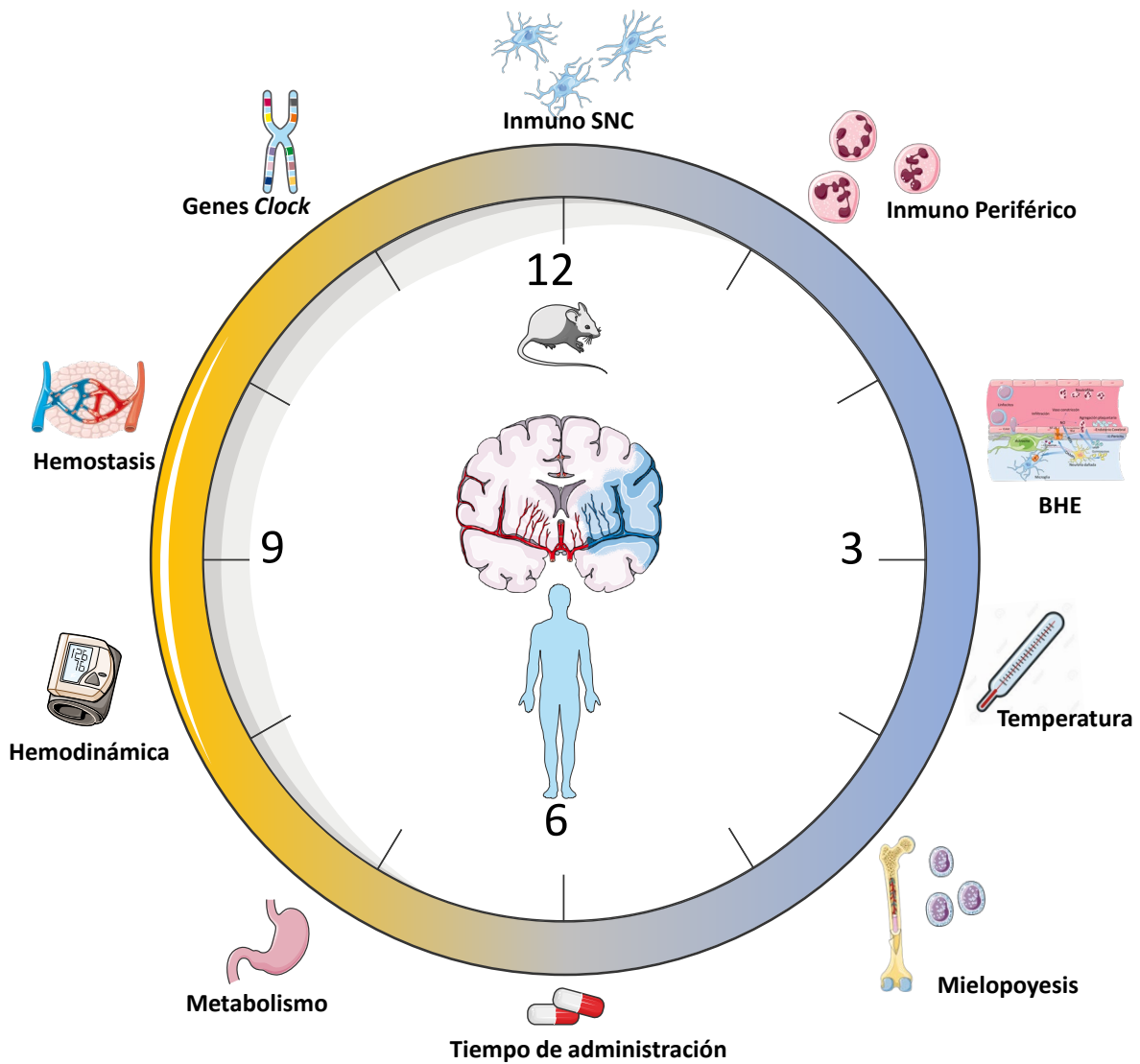


Figura 6. Los ritmos circadianos afectan múltiples vías moleculares, celulares y fisiológicas

## 5.2. REGULACIÓN CIRCADIANA Y NETOSIS

Durante la NETosis, las ROS desempeñan un papel fundamental en la señalización, conectando las vías regulatorias ascendentes con el proceso NETosis. Las ROS pueden generarse mediante dos fuentes principales: la NADPH oxidasa y la respiración mitocondrial. Esta primera requiere la GTPasa Rac y la fosforilación de p47phox por la proteína quinasa C (PKC) y la vía de Raf-MAPK/ERK quinasa (MEK) – quinasa regulada por señales extracelulares (ERK). La segunda fuente también contribuye a la producción de ROS. La generación de ROS en los neutrófilos está estrechamente relacionada con su metabolismo, que puede variar entre los distintos subconjuntos de neutrófilos.

La dinámica del citoesqueleto de actina, regulada por el glutatión de cisteína mediada por ROS de actina y tubulina, es esencial para la formación de NETs. Las ROS también orquestan la degradación del citoesqueleto de actina mediante la activación de la proteasa NE (elastasa de neutrófilos). La NE, a su vez, se traslada al núcleo y escinde las histonas para promover la descondensación de la cromatina. Otro factor, PAD4, citrulina las histonas, reduciendo su carga positiva y favoreciendo la descondensación de la cromatina. La activación del ciclo celular, la señalización de reparación del ADN y la ruptura de la envoltura nuclear constituyen pasos cruciales en la NETosis. El desmontaje del citoesqueleto y la descondensación de la cromatina reducen la estabilidad de la membrana plasmática. La muerte celular y la permeabilización de la membrana en la NETosis se aceleran por el inflammasoma y por el ensamblaje de los poros de gasdermina D (GSDMD) en la membrana plasmática. La activación de GSDMD está estrechamente vinculada con la liberación de NE de los gránulos.

Los mecanismos moleculares de NETosis anteriormente mencionados pueden verse afectados por el ritmo circadiano. En un estudio se reveló que la función microcirculatoria coronaria y la función diastólica cardíaca se redujeron significativamente, junto con la función diastólica dependiente del endotelio de los microvasos notablemente deteriorada en el grupo de los ratones con trastornos del ritmo en comparación con el grupo de control (Wang et al., 2023). En particular, la alteración del ritmo condujo a un aumento de los niveles de NETs en dichos ratones, que causan la disfunción endotelial al inhibir la actividad de las células endoteliales microvasculares y la capacidad de migración, además de inducir la apoptosis.

Otro estudio ha abordado cómo los neutrófilos, encargados de eliminar patógenos, deben equilibrar una defensa antimicrobiana eficiente con la preservación de la salud vascular (Adrover et al., 2019). En él se identificó un programa intrínseco de los neutrófilos que se logra gracias al gen *Bmal1*, el cual regula la expresión de la quimioquina CXCL2. Esta regulación induce a cambios diurnos en los neutrófilos circulantes, que se denomina “envejecimiento de neutrófilos”, a través del receptor de quimioquinas CXCR2. Estas modificaciones diurnas son antagonizadas por CXCR4 y regulan la actividad de los neutrófilos para salir de los vasos sanguíneos durante la noche, mejorando así su capacidad antimicrobiana en los tejidos. Sin embargo, se reveló en ese estudio que el envejecimiento prolongado de los neutrófilos

intravasculares puede llevar a problemas de inflamación y coagulación. También se explicó cómo un reloj interno, impulsado por el gen *Bmal1*, coordina a los neutrófilos para equilibrar la defensa inmunitaria y la protección vascular, con implicaciones en la resistencia a infecciones y posibles efectos secundarios (Hidalgo et al., 2022).

Durante la granulopoyesis, los neutrófilos sintetizan los gránulos que almacenan péptidos antimicrobianos, moléculas de adhesión y enzimas proteolíticas (Shichita et al., 2012). La formación de NETs depende del contenido de los gránulos de los neutrófilos. Recientemente se ha demostrado que la desgranulación ocurre no solo durante la activación aguda, como se observa durante las infecciones y la exposición a patrones moleculares asociados a patógenos, sino que también puede tener lugar en la circulación en condiciones de estado estacionario. Las señales autocrinas transmitidas a través de CXCR2 pueden provocar esta desgranulación progresiva, de modo que los neutrófilos, que se movilizan en la sangre durante la noche en los ratones, muestran reducciones marcadas en su contenido en los gránulos primarios durante el día. La degranulación temporal, regulada por el ritmo circadiano, predice la formación de NETs de manera crítica en función de la hora del día. De hecho, el análisis de los neutrófilos aislados en diferentes momentos evidenció diferencias sustanciales en la formación de NETs ex vivo, tanto en los ratones como en los seres humanos, y esta distinción podría recapitularse en los tejidos vivos sometidos a una lesión por isquemia-reperfusión o una lesión pulmonar aguda. Además, se demostró que el control genético de la formación de NETs no solo está vinculado con el ritmo circadiano, sino también con la delección específica del gen clock *Bmal1*, que albergan neutrófilos de tipo nocturno, o el gen *CXCR4*, que alberga neutrófilos de tipo diurno. En particular, la eliminación de estas moléculas sensibles al tiempo exclusivamente en los neutrófilos hizo que la formación de NETs y la gravedad de la enfermedad pulmonar fueran independientes del momento del día en ratones (Adrover et al., 2020).

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, en esta tesis doctoral nos centramos en el efecto del tratamiento con DNAsa-I en un modelo de ictus. Además, estudiamos los procesos de NETosis, el papel de los receptores TLR4 en el pronóstico de ictus y la influencia del tratamiento con DNAsa-I en los procesos de transformación hemorrágica inducida por la administración tardía de tPA. Por último, exploramos el efecto de los ritmos circadianos en el efecto del tratamiento con DNAsa-I y en los procesos de NETosis.



## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 1. JUSTIFICACIÓN

A medida que la población envejece, aumenta el número de pacientes con enfermedades cerebrovasculares y cada vez son más las personas mayores que toman aspirina como medida preventiva contra las enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares. A pesar de las considerables inversiones realizadas en la búsqueda de fármacos cerebroprotectores, la traslación de las terapias efectivas desde el entorno experimental a la clínica ha resultado en fracaso. Los métodos de tratamiento actuales de reperfusión (trombolisis y trombectomía) presentan numerosas limitaciones (fenómenos de no-reperfusión, estrecha ventana terapéutica, etc...), y además se asocian con complicaciones tan graves como la transformación hemorrágica (TH). Esto reduce significativamente la eficacia del tratamiento, mermando la calidad de vida del paciente.

Últimamente se ha descrito que los NETs desempeñan un papel crucial en el proceso patológico tras un ictus, a través de varios mecanismos, como la promoción de la coagulación y su interacción con las plaquetas, induciendo inmunotrombosis entre otros. Previamente, nuestro laboratorio ha demostrado que los NETs desempeñan un papel clave en el ictus en un modelo de trombosis rico en plaquetas (Peña-Martínez et al., 2019). Además, el tPA induce la degranulación de los neutrófilos, formando NETs y provocando TH y resistencia trombolítica (Guo et al., 2018; Wang et al., 2021).

En este contexto, nuestro laboratorio ya ha obtenido resultados previos en relación con el efecto protector de la DNAsa-I y su relación con los NETs y el receptor TLR4. Los experimentos usando ratones TLR4KO, PAD4KO y DNAsaKO contribuirá a una comprensión más profunda del mecanismo inmunológico en los diferentes procesos tras un ictus.

Por otra parte, tanto los datos experimentales como los clínicos sugieren que los ritmos circadianos regulan la función inmune a través de genes reloj, lo cual afecta tanto al pronóstico como al efecto de los diferentes tratamientos para el ictus. Los experimentos de ritmos circadianos explorarán en mayor profundidad el impacto de estos en el pronóstico y tratamiento del ictus.

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los antecedentes expuestos sugieren que los NETs y los cambios en el ritmo circadiano desempeñan un papel fundamental en el daño y en el pronóstico tras un ictus. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestra **hipótesis** es la siguiente: “la administración de DNAsa-I, como fármaco que facilita la eliminación de los NETs, tendrá un papel protector en el daño isquémico y mejorará la respuesta al tPA”.

Con el fin de responder a la hipótesis planteada en la presente tesis doctoral, hemos diseñado dos grandes **objetivos** de experimentos:

### 1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DNAsa-I EN EL ICTUS ISQUÉMICO. FUNCIÓN DE LOS NETs Y DEL RECEPTOR TLR4 PLAQUETARIO.

En este objetivo estudiaremos el efecto del tratamiento con DNAsa-I, los mecanismos implicados, los efectos de la co-administración con tPA y la influencia de un pre-tratamiento con fármacos antiagregantes como la aspirina. Hemos fijado los siguientes subobjetivos:

- 1.1. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en el volumen de infarto.
- 1.2. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en el déficit neurológico.
- 1.3. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en la incidencia de la reperusión.
- 1.4. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en la presencia de NETs del área infartada.
- 1.5. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en los niveles plasmáticos de elastasa.
- 1.6. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en la infiltración y polarización del neutrófilo.
- 1.7. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en la incidencia de transformación hemorrágica.

## 2. EFECTO DE LOS RITMOS CIRCADIANOS EN EL TRATAMIENTO CON DNAsa-I EN EL ICTUS ISQUÉMICO. FUNCIÓN DE LOS NETs.

En este segundo objetivo estudiaremos la influencia de los ritmos circadianos en la administración de la DNAsa-I y exploraremos la implicación de los NETs mediante el uso de animales genéticamente manipulados de pérdida (PAD4KO) o ganancia (DNAsaKO) de NETosis. Hemos fijados los siguientes subobjetivos:

- 2.1. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio del volumen de infarto.
- 2.2. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio del déficit neurológico.
- 2.3. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de la incidencia de reperfusión.
- 2.4. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de la presencia de NETs en el área infartado.
- 2.5. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de los niveles plasmáticos de elastasa.
- 2.6. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de la NETosis exvivo.
- 2.7. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de la infiltración y polarización del neutrófilo.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. DISEÑO EXPERIMENTAL Y PROTOCOLO

Con el fin de llevar a cabo los objetivos de la presente tesis doctoral se realizaron dos grandes bloques de experimentos:

### 1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DNAsa-I EN EL ICTUS ISQUÉMICO. FUNCIÓN DE LOS NETs Y DEL RECEPTOR TLR4 PLAQUETARIO. Se llevaron a cabo los siguientes subobjetivos:

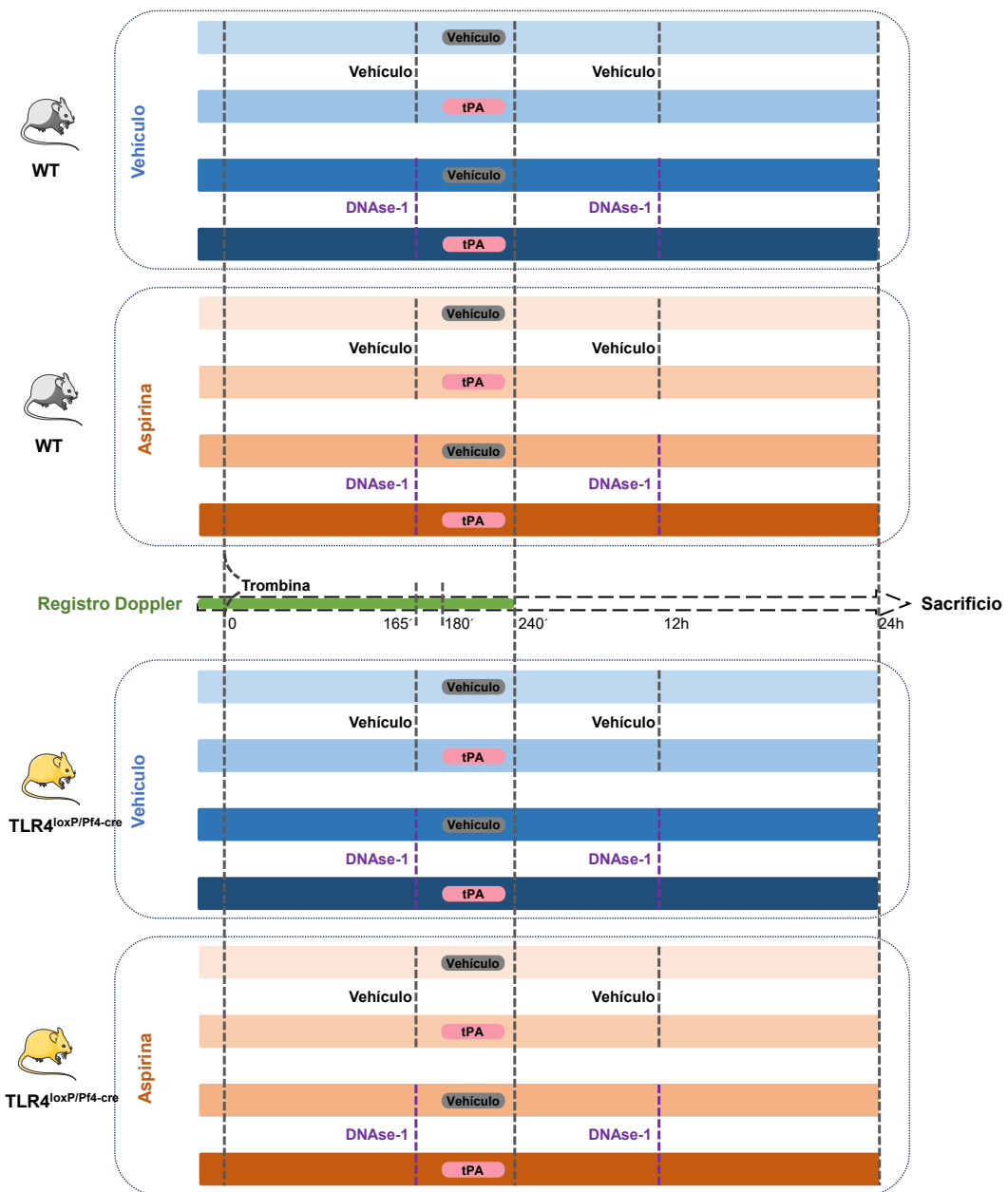
- 1.8. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en el volumen de infarto.
- 1.9. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en el déficit neurológico.
- 1.10. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en la incidencia de la reperusión.
- 1.11. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en la presencia de NETs del área infartada.
- 1.12. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en los niveles plasmáticos de elastasa.
- 1.13. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en la infiltración y polarización del neutrófilo.
- 1.14. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en la incidencia de transformación hemorrágica.

### 2. EFECTO DE LOS RITMOS CIRCADIANOS EN EL TRATAMIENTO CON DNAsa-I EN EL ICTUS ISQUÉMICO. FUNCIÓN DE LOS NETs.

- 2.8. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio del volumen de infarto.
- 2.9. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio del déficit neurológico.
- 2.10. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de la incidencia de reperusión.
- 2.11. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de la presencia de NETs del área infartado.
- 2.12. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de los niveles plasmáticos de elastasa.
- 2.13. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de la NETosis exvivo.
- 2.14. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de la infiltración y polarización del neutrófilo.

## 1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL BLOQUE I

Para estudiar el efecto del tratamiento con DNAsa-I en el ictus isquémico y la función de los NETs y del receptor TLR4 plaquetario se escogió como base el modelo tromboembólico in situ (Orset et al., 2007). A fin de realizar la agrupación, se consideraron dos factores: i) el genotipo del ratón (animales WT y TLR4KO plaquetario); y ii) el tratamiento que se les administra: salino -vehículo-, tPA, DNAsa-I, DNAsa-I+tPA. Además, añadimos un grupo extra de animales pretratados con aspirina. En consecuencia, hacen un total de 16 grupos (Figura 7).



**Figura 7. Protocolo experimental** seguido para el estudio del efecto del tratamiento con DNAsa-I en el ictus isquémico. Función de los NETs y del receptor TLR4 plaquetario. (Bloque I de experimentos)

Además, se establecieron los siguientes criterios de exclusión (casos que fueron descartados para las determinaciones posteriores):

- Animales con “reperusión espontánea”: se producía cuando no existía una isquemia estable, o bien se producía la recanalización de cualquiera rama arterial lo que suponía infartos muy variables.

- Animales con “daño estriatal”: podía ser producido por una inyección demasiado rápida que hace que la trombina fluya hacia otras arterias proximales (las arterias más basales como lenticuloestriatales), provocando de esta manera una obstrucción excesiva.

### 1.1.1. Grupo experimental adicional: efecto antiplaquetario de aspirina

Se dividieron los ratones WT en dos grupos según si recibían el tratamiento preventivo con aspirina. Cada grupo dispone de 6 ratones. En el grupo tratado con aspirina, tras 3 días consecutivos de administración, se evaluó el tiempo de sangrado por la cola a las 2 horas después de la última dosis de aspirina (Figura 8). Además, se sacrificaron para sacar su sangre. Se recogieron la sangre total y el plasma para el análisis de agregación plaquetario (Figura 9).

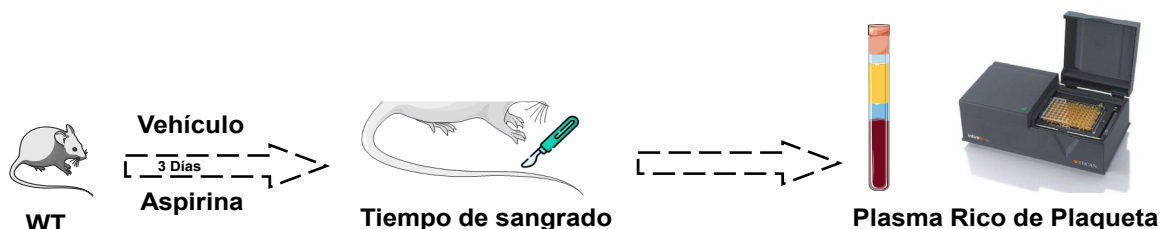


Figura 8. Protocolo experimental seguido para estudiar el efecto antiplaquetario de aspirina

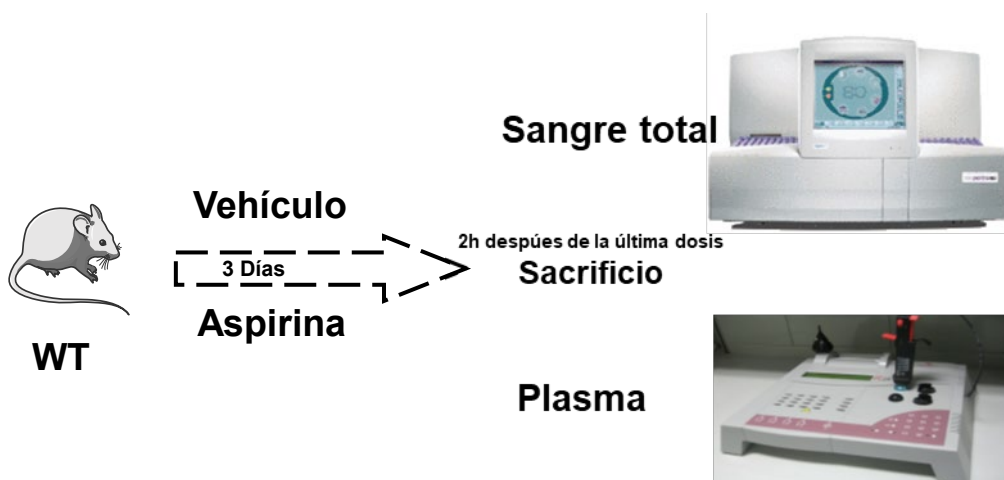
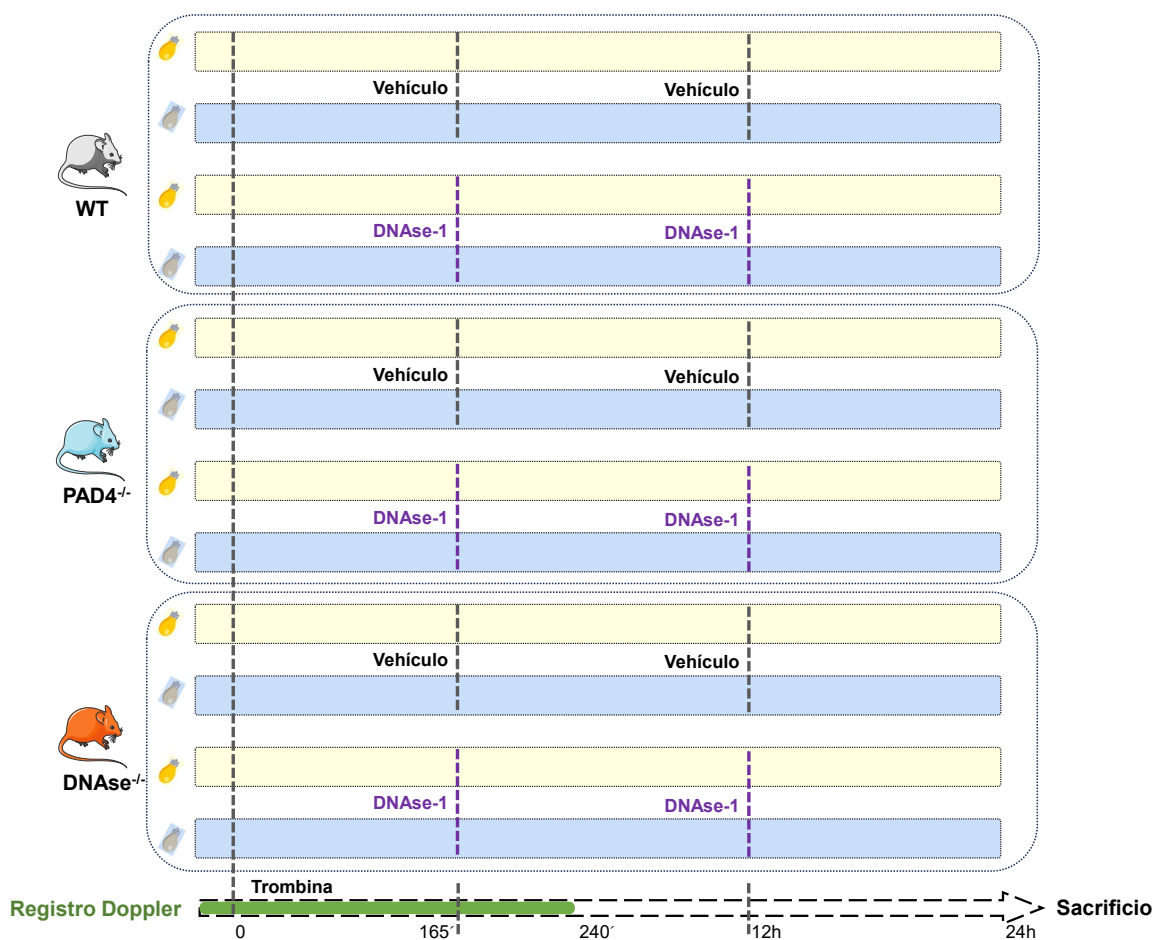


Figura 9. Protocolo experimental seguido para estudiar el efecto antiplaquetario de aspirina

## 1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL BLOQUE II

Para estudiar el efecto de los ritmos circadianos en el tratamiento con DNAsa-I en el ictus isquémico y la función de los NETs, se utilizaron ratones WT, ratones con deficiencia de PAD4 y ratones con deficiencia de DNAsa. Estos grupos de distintos genotipos, además, se dividieron en cuatro subgrupos en función del ritmo circadiano estudiado y si recibían el tratamiento con DNAsa-I, formando así en total 12 grupos (Figura 10). Los criterios de exclusión fueron los mismos que los de Bloque I.

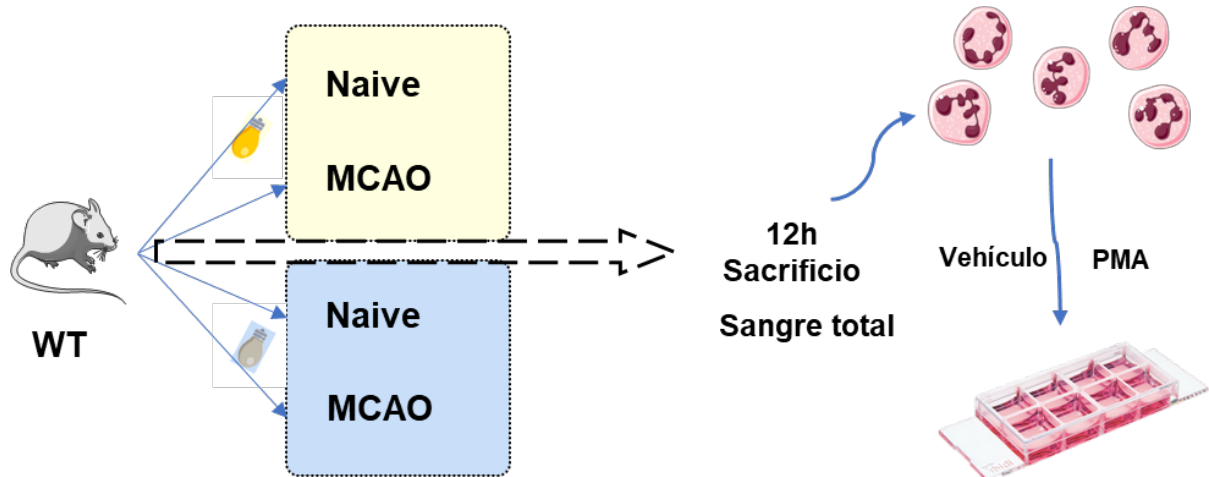


**Figura 10. Protocolo experimental** seguido para el estudio del efecto de los ritmos circadianos en el tratamiento con DNAsa-I en el ictus isquémico. Función de los NETs (Bloque II de experimentos)

### 1.2.1. Grupo experimental adicional: Protocolo para el estudio de NETosis ex vivo

Para evaluar el efecto del ritmo circadiano en la NETosis ex vivo, utilizamos los ratones de *tdTomato catch-up* para etiquetar los neutrófilos. Estos ratones se separaron en cuatro grupos

según la combinación de dos criterios: 1) el horario (diurno/nocturno) y 2) si se ha sometido a una oclusión de la arteria cerebral media (MCAO). La MCAO se realizó en cada fase comentada. Después de 12 horas de la MCAO, se sacrificaron los ratones y se obtuvo la sangre para realizar los cultivos de neutrófilos exvivo. Se estimularon con agentes inductores de NETosis. Luego, se midió el contenido de NETs usando inmunofluorescencia (Figura 11).



**Figura 11. Protocolo experimental seguido para el estudio de NETosis exvivo**

## 2. TÉCNICAS IN VIVO

### 2.1. ANIMALES

Todos los procedimientos experimentales con animales se rigieron por las directrices del Comité de Experimentación animal de la Universidad Complutense de Madrid (directivas de la UE 86/609/CEE y 2003/65/CE, y española RD53/2013) y con el PROEX nº 016/18 aprobado por la Comunidad de Madrid. Los animales tuvieron acceso a bebida y comida *ad libitum* durante todo el procedimiento y se mantuvieron bajo las condiciones estándares de humedad y temperatura siguiendo un ciclo invertido de luz/oscuridad de 12 horas.

Se utilizaron ratones machos C57BL/6 wild-type (Envigo, España) de entre 8-12 semanas de edad y con un peso comprendido entre 20-25g. Los ratones TLR4<sup>loxP/loxP</sup> fueron amablemente cedidos por los profesores Timothy R. Billiar y Matthew D. Neal, de la Universidad de Pittsburgh (EE.UU.) (Neal et al., 2012). Por otro lado, se consiguieron ratones transgénicos que expresan Cre recombinasa bajo el promotor del factor plaquetario 4 (Pf4-cre)

de los laboratorios Jackson Labs (Bar Harbor, ME, E.E. U.U.). Los ratones TLR4<sup>loxP/loxP</sup> se cruzaron con los ratones Pf4-cre, generando así la supresión específica de TLR4 y creando dos grupos celulares específicos con sus correspondientes controles:

- 1) Control de tipo salvaje (WT): TLR4<sup>loxP/loxP</sup> (En los experimentos preliminares, demostramos que no había diferencias estadísticas en el volumen del infarto cerebral entre ratones WT, TLR4<sup>loxP/loxP</sup> y TLR4<sup>pf4-cre</sup>. por lo tanto utilizamos ratones WT comprados en envigo en experimentos posteriores.)
- 2) Supresión específica de TLR4 de plaquetas: TLR4<sup>loxP/Pf4-cre</sup>
- 3) Supresión total de PAD4: PAD4<sup>-/-</sup> (los cuales fueron cedidos por la Profesora Moro del CNIC).
- 4) Supresión total de DNAsa: DNAsa<sup>-/-</sup> (son ratones de DNAsa1/DNAsa1B3 doble KO, los cuales fueron cedidos por la Profesora Moro del CNIC).
- 5) Control de tipo salvaje (WT) con tdTomato catch-up: C57BL/6<sup>-Ly6g/Cre-tdTomato</sup> (los cuales fueron cedidos por la Profesora Moro del CNIC).

El genotipo de los ratones de 4 semanas se analizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando el ADN genómico obtenido de la biopsia de la cola o de la oreja. La extracción del ADN genómico se realizó digiriendo un pequeño fragmento de la cola en el tampón de lisis (100 mM de NaCl, 10 mM de EDTA, 0,5% de SDS y 10 mM Tris pH8) con la proteinasa K (0,1 mg/ml) (Sigma Aldrich, EE.UU.) durante 16h a 55°C, seguido de una extracción con fenol/cloroformo/isoamilo (Invitrogen, EE.UU.) y una precipitación con etanol y acetato de sodio. Finalmente, el ADN se dejó secar y se resuspendió en 100 µl de tampón TE (10 mM de EDTA y 10mM Tris pH 8), de los cuales se utilizaron 2 µl (~100 ng de ADN genómico) como molde para la PCR (Tabla I).

| Genes   | Secuencia de Cebadores 5' → 3' |                                   |
|---|--------------------------------|-----------------------------------|
| <b>TLR4-loxP</b>  | Forward                        | AGG GAG ATG TGT GTG AAG AAG CCT   |
|   | Reverse                        | TGA CTT TCT CAG TTT GGT CCT GGG   |
| <b>Pf4-cre</b>  | Forward                        | CCA AGT CCT ACTGTT TCT CAC TC     |
|   | Reverse                        | TGC ACA GTC AGC AGG TT            |
| Pad4  | Forward                        | AGC TTT GTA AGG GGC ATC CT        |
|   | Reverse                        | TCA AAG TAC CTG ATG TGT TGA CTG   |
| DNase 1 L3  | Forward                        | CAC AGA GCA CGA GAC AAG TCA C     |
|   | Reverse                        | AAC AAG CAC CAA GAG CCT CAC       |
| DNase 1 LAC   | Forward                        | CTG GAC AGC GAC CCT GAG AG        |
|   | Reverse                        | GCA GTG TTC CCAT TAG CCC TG       |
| R26Tomato<br>(oIMR9020<br>oIMR9021<br>oIMR9103<br>oIMR9105) | WT Forward                     | AAG GGA GCT GCA GTG GAG TA        |
|   | WT Reverse                     | CCG AAA ATC TGT GGG AAG TC        |
|   | Mutant Reverse                 | GGC ATT AAA GCA GCG TAT CC        |
|   | Mutant Forward                 | CTG TTC CTG TAC GGC ATG G         |
| <b>Control interno</b>                                      | Forward                        | CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT   |
|   | Reverse                        | GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C |

**Tabla I. Secuencias de los cebadores utilizados para el genotipado de las diferentes colonias de ratones**

## 2.2. MODELO TROMBOEMBÓLICO *IN SITU*

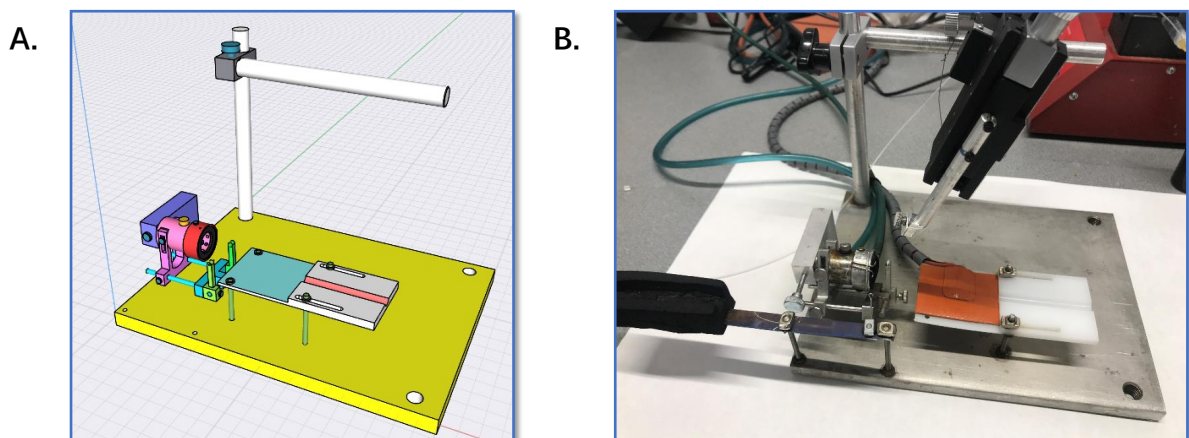
El modelo tromboembólico in situ (Orset et al., 2007), consiste en la inyección de trombina en la arteria cerebral media (ACM) que promueve la formación de un trombo rico en fibrina con la consecuente oclusión de la ACM. La inyección de trombina se realizó con las micropipetas elaboradas con la ayuda de un puller vertical (Pp-83 o PC-10, Narishige, Japón) a partir de los capilares graduados (15mm/μl) (Ref. 555/5, Assistant Germany, Alemania). La punta se moldea en una forma triangular utilizando el papel de lija de grano 10.000, fijado en el electrorrotor. Dicha forma es lo suficientemente afilada para prevenir el sangrado de la herida de inyección al retirar la micropipeta, evitando así el sangrado provocado por la cirugía. Para cargar la micropipeta con trombina ( $\alpha$ -trombina de ratón, Innovative Research, EE.UU.), la micropipeta se acopló a un sistema neumático que constaba de una jeringa conectada a un tubo de silicona. Luego, se descendió la punta hasta alcanzar la trombina y se aplicó la presión negativa para cargarla. La micropipeta cargada se mantuvo a -80°C hasta su utilización.

A fin de simplificar y acelerar el manejo de la fijación de la cabeza del ratón, hemos diseñado una plataforma quirúrgica específica para los modelos del ictus en ratones. La

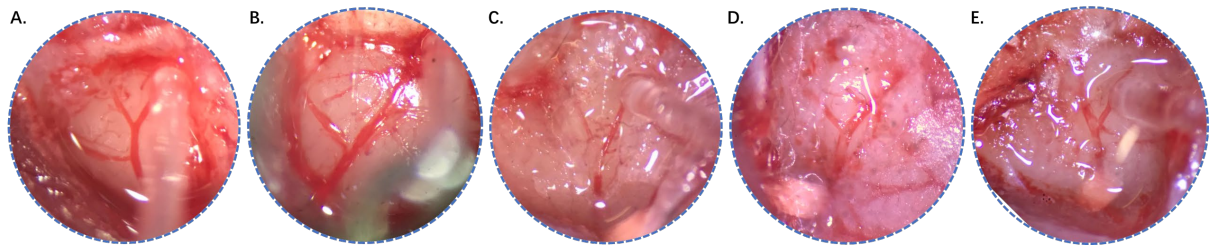
plataforma tiene instalado un micromanipulador mecánico de tres ejes (Narishige MM-33N) para facilitar la ubicación de la bifurcación de la ACM con la micropipeta (Figura 12).

Para localizar la ACM, se realizó una incisión en la piel entre el ojo y la oreja, desde la sutura sagital hasta el arco zigomático, que permitió exponer el músculo temporal. Luego, se procedió a una incisión longitudinal en la inserción de este músculo a lo largo de la sutura temporo-parietal y se retrajo el músculo para exponer el hueso temporal. Utilizando una lupa binocular (PZMIV, World Precision Instruments, USA), se identificó la ACM por transparencia, se abrió una perforación de 2-3 mm de diámetro en el lugar donde se visualizaba la bifurcación de las ramas rostral y caudal, y por último se retiraron las meninges. Después se colocó la sonda láser Doppler sobre la superficie de la rama arterial usando el borde del cráneo.

Finalmente, se colocó la micropipeta cargada en el micromanipulador, que se bajó lentamente y de forma paralela al tronco común de la ACM mientras se introducía su punta en el lumen del vaso. Aplicando la presión positiva del sistema, se inyectó 1  $\mu$ l de trombina en sentido contrario al flujo sanguíneo. Para permitir la estabilización del coágulo, se retiró la pipeta a los 20 minutos de la oclusión. Se consideró que la oclusión era estable cuando se producía una caída brusca y sostenida del flujo sanguíneo cerebral, según se medía en el registro de la sonda Doppler (<30%), acompañada de un cambio de color en el vaso. La recuperación total o parcial del flujo (>30%) en cualquier rama de la arteria se consideró como la reperfusión espontánea (Figura 13).



**Figura 12. Plataforma quirúrgica específica para modelos de ictus en ratones. A.** Diseño 3D de la plataforma por la aplicación Shapr3D. **B.** Producto final de la plataforma



**Figura 13. Oclusión y perfusión de la arteria cerebral media (ACM).** A. ACM: flujo sanguíneo normal. B. Penetración de la micropipeta. C. Oclusión de la ACM a los 20 mins. D. Oclusión de la ACM a las 4h. E. Recuperación parcial a las 4h por la infusión de tPA

## 2.3. TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS IN VIVO

### 2.3.1. Aspirina

Se administraron 60 mg/kg utilizando una aguja de sonda gástrica a las 50 h, 26 h, 2h antes de la MCAO. La dosis preventiva la calculamos de acuerdo a trabajos previos (Lauer et al., 2011; Chan et al., 2019).

### 2.3.2. tPA

Se administraron 10 mg/kg de tPA (Actilyse, Boehringer Ingelheim, Alemania) mediante una bomba (PhD 2000, Harvard Apparatus, EE. UU.) en la vena caudal de la base de la cola (10% bolo, 90% infusión) a las 3h tras la MCAO (García-Yébenes et al., 2011).

### 2.3.3. DNasa-I

Se administraron 10 µg de DNasa-I (proteína recombinante humana DNasa-I) por vía intravenosa, seguida de una inyección de 50 µg/250 µl del mismo compuesto por vía intraperitoneal 15 minutos antes administrar tPA, y nuevamente a las 12 horas (De Meyer et al., 2012).

## 2.4. CARACTERÍSTICAS DEL RITMO CIRCADIANO:

ZT, que significa "*Zeitgeber Time*" en alemán, se utiliza para estandarizar las mediciones del tiempo en los estudios relacionados con los ritmos circadianos. ZT0 se define como el momento en que comienza la fase activa del ciclo, como el encendido de las luces. A partir de

ese punto, se numeran las horas del ciclo, de manera que ZT12 sería el punto medio del ciclo, correspondiendo a la transición entre la fase activa y la fase de reposo (apagado de las luces).

**ZT4-ZT7:** Se ajustó el ciclo de iluminación de la habitación donde se encontraba el ratón: con luz de 8:00 a. m. (ZT0) a 20:00 p. m. (ZT12) y sin luz de 20:00 p. m. a 8:00 a. m. Se mantuvo esta programación durante tres semanas antes de iniciar la cirugía. La cirugía comenzó al mediodía, a las 12:00 p. m. (ZT4).

**ZT13-ZT16:** con luz de 14:00 p. m. (ZT0) a 2:00 a. m. (ZT12) y sin luz de 2:00 a. m. a 14:00 p. m. Se mantuvo esta programación durante tres semanas antes de iniciar la cirugía. La cirugía comenzó a las 6:00 a. m. (ZT16). O con luz de 20:00 p. m. (ZT0) a 8:00 a. m. (ZT12) y sin luz de 8:00 a. m. a 20:00 p. m. La cirugía comenzó al mediodía, a las 12:00 p. m. (ZT16).

Aunque los ratones estaban bajo anestesia durante la cirugía, tuvimos que ajustar los parámetros de iluminación para no afectar a los resultados experimentales.

Para los ratones de ZT4 a ZT7, en una habitación con iluminación normal, utilizamos únicamente las luces blancas para el microscopio.

Para los ratones de ZT13 a ZT16, todos los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo en una habitación oscura y se utilizó la luz blanca del microscopio para colocar la micropipeta e inyectar la trombina, tardando aproximadamente 4 minutos. Para el resto de los procedimientos, empleamos luz roja para iluminación indirecta (620~625 nm, 100 lm).

## **2.5. EVALUACIÓN DEL TIEMPO DE SANGRADO**

Los animales fueron anestesiados con isoflurano (2%) y se mantuvo su temperatura corporal en torno a los 37°C. Se hizo una incisión en la cola de 3 mm de longitud con un bisturí, y se introdujo la punta de corte en un tubo Eppendorf con el suero salino a una temperatura constante de 37°C. Se registró el tiempo (en segundos) de sangrado de cada animal, con un límite máximo de 5 minutos, momento que se consideró que la prueba había concluido.

## **2.6. EVALUACIÓN DE LOS DÉFICITS NEUROLÓGICOS**

### **2.6.1. Escala de neuroseveridad modificada**

Para evaluar el déficit después de la MCAO, se llevó a cabo la escala de neuroseveridad

modificada (Tabla II) (Hernández-Jiménez et al., 2017) 24 horas después de la oclusión. El propósito de esta escala es cuantificar el grado de déficit mediante la evaluación del comportamiento neurológico en una escala en la que un mayor déficit se refleja en una puntuación más alta, con una puntuación máxima de 24 indicando la ausencia de déficit. Esta escala comprende la evaluación de la función motora, incluyendo la actividad espontánea, la simetría de las extremidades, el equilibrio, la escalada y coordinación, así como la función sensorial, abarcando las respuestas táctiles, visuales y propioceptivas, en la parte del cuerpo opuesta al hemisferio cerebral lesionado (parte contralateral al daño) (García et al., 1995).

|                                   | Puntuación  |  | Protocolo  |
|-----------------------------------|-------------|--|--|
| <b>Motor</b>                      |             |  |  |
| Actividad espontánea              | 1<br>2<br>3 | No se levanta<br>No se aproxima a las esquinas de la jaula<br>Exploración normal                     | Colocar al ratón en una jaula amplia   |
| Motor                             | 1<br>2<br>3 | Movimientos mínimos de un lado<br>Movimiento alterado al caminar<br>Simetría normal                  | Sujetar al ratón de la cola y observar la extensión de las extremidades                      |
| Escalar                           | 1<br>2<br>3 | Se agarra por segundos, pero acaba cayendo<br>Se agarra, pero no puede moverse<br>Se agarra y camina | Colocar al ratón sobre una rejilla con la cabeza hacia abajo                                 |
| Equilibrio y coordinación         | 1<br>2<br>3 | Se sujeta, pero cae<br>Se sujeta, pero es incapaz de caminar<br>Se sujeta y camina                   | Colocar al ratón en una barra de 1,5 cm de diámetro.   |
| <b>Sensorial</b>                  |             |  |  |
| Propiocepción                     | 1<br>2<br>3 | No reacciona<br>Reacción lenta<br>Normal   | Presionar el cuello del ratón con un bastoncillo   |
| Vibrisas                          | 1<br>2<br>3 | No reacciona<br>Reacción lenta<br>Normal   | Tocar las vibrisas con un bastoncillo por detrás, evita que los ratones vean tus movimientos |
| Respuesta táctil patas delanteras | 1<br>2<br>3 | No reacciona<br>Reacción lenta<br>Normal   | Tocar el área palmar de las patas traseras con una aguja                                     |
| Respuesta táctil patas traseras   | 1<br>2<br>3 | No reacciona<br>Reacción lenta<br>Normal   | Tocar el área palmar de las patas traseras con una aguja                                     |

**Tabla II. Escala de Neuroseveridad modificada**

### 2.6.2. Prueba del cilindro

La prueba del cilindro examina el uso de las extremidades anteriores durante la exploración vertical espontánea de un cilindro, y es sensible a las asimetrías en el uso de las extremidades. Esta prueba evalúa la preferencia en el uso de las extremidades anteriores durante la actividad exploratoria normal. Cuando se colocan en un cilindro, los ratones se levantan espontáneamente hasta ponerse de pie utilizando la pared del cilindro como apoyo,

utilizando una o ambas patas delanteras. El ratón puede elegir qué extremidad anterior usar para soportar peso, lo que se considera indicativo de cuál extremidad anterior es más funcional.

Los ratones se colocaron en un cilindro plástico transparente (180 mm altura, 60 mm diámetro) durante 3 minutos. La sesión de prueba se grabó en vídeo desde abajo. El uso de la pata delantera fue calificado por un experimentador que desconocía el grupo de tratamiento. Los animales no requirieron entrenamiento previo, pero se colocaron en el cilindro dos veces antes de la cirugía para adaptarse y para obtener las puntuaciones iniciales. Luego, fueron evaluados a las 24h después de la cirugía, puntuando la pata utilizada para soportar el peso (calificó el uso independiente de la pata delantera izquierda o derecha, o el uso simultáneo de ambas patas delanteras) (Soblosky et al., 2001; Schallert et al., 2000; Baskin et al., 2003).

### 3. TÉCNICAS EXPERIMENTALES Y DETERMINACIONES

#### 3.1. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

A las 24 horas después de MCAO, se colocó al ratón en una caja plástica transparente, conectándolo con el equipo de anestesia inhalatoria a través de un tubo de silicona (oxígeno e isoflurano). Se expuso al animal al anestésico al 3% hasta confirmar la parada respiratoria y se aseguró su muerte mediante exanguinación (extracción de sangre intracardiaca).

##### 3.1.1. Obtención de muestras del plasma sanguíneo

- **Plasma 4h:** Después de 4 horas del registro por el Doppler, se realizó una incisión de aproximadamente 5 mm cerca de la clavícula izquierda del cuello del ratón. Se localizó la vena yugular izquierda del ratón siguiendo la estructura anatómica y se recogió 150 µl de sangre venosa utilizando una jeringa de 30G previamente empapada con citrato al 3,8%.

- **Plasma 24h:** La obtención del plasma cardíaco se llevó a cabo a las 24 horas después de la isquemia mediante la punción cardíaca en el ventrículo derecho usando una jeringuilla de 25G previamente tratada con citrato de sodio al 3,8%.

La sangre obtenida se mezcló con citrato al 10% y se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos. Se recolectó la fase superior, que carecía de células, y se almacenó a -80°C para su uso posterior.

### **3.1.2. Obtención de las muestras para verificar el efecto de aspirina**

Se sacrificaron los ratones a las 2 horas después de la última dosis de aspirina. Para el hemograma, se recogió la sangre en tubos de Microvetter 100EDTA. Y para la prueba de coagulación, la sangre se recolectó en tubos de citrato de 0,109M y se centrifugó durante 10 minutos a 2500g en la temperatura ambiental. Estas muestras se utilizaron dentro de las siguientes 4 horas.

### **3.1.3. Preparación del tejido para los estudios histológicos y de inmunofluorescencia**

Se sacrificaron los ratones, después de lo cual se reperfundieron con 30 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7,4 utilizando una jeringa de 50 ml durante 3 minutos. A continuación, se pasaron 30 ml de paraformaldehído (PFA) al 4% en PB 0,1 M pH 7,4 a la misma velocidad durante 3 minutos. Tras extraer el cerebro, este se mantuvo durante la noche a 4°C en PFA, seguido de 2 días en sacarosa al 30% en PB 0,1 M hasta que el cerebro se hundió en el fondo del recipiente; por último, se congeló en isopentano y se almacenó a -80°C hasta su uso.

A fin de obtener las muestras para los estudios en el cerebro (TH, Inmunofluorescencia), se cortaron las secciones coronales de cerebro de 30 µm de grosor con la ayuda de un criostato (JUNG CM1800, Leica, EE. UU.). Se cortaron un cerebro en 10 series y luego se almacenó a -80°C en un tubo de 2ml con anticongelante para su uso posterior.

Una vez seleccionadas las secciones a estudiar, se lavaron 3 veces con PBS 1x y luego se incubaron con los diferentes anticuerpos primarios (Tabla III) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron las secciones 3 veces en 0,25% Triton-X-PBS y luego se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios durante 2 horas a temperatura ambiente y en la oscuridad. Tras finalizar las incubaciones, se visualizaron las secciones en el microscopio confocal Zeiss LSM710.

| Epítipo  | Anticuerpo primario  | Anticuerpo secundario  | Anticuerpo terciario  | Suero de bloqueo |
|----------|--|--|---|------------------|
| IgG      | Goat anti mouse Biotinylated IgG<br>Ref: BA-9200<br>1:500                                    | Vectarstain elite ABC kit<br>Ref: PK-6105  | -----   | Cabra            |
| NIMP     | Anti-Neutrophil antibody [NIMP-R14]<br>50ug;<br>Ref: ab2557<br>1:200                         | Donkey Anti-Rat IgG H&L (Alexa Fluor® 647) preadsorbed<br>Ref: ab150155<br>1:200 | -----   | Burro            |
| Elastasa | Anti-Neutrophil Elastase antibody<br>100ug<br>Ref: ab68672<br>1:500                          | Donkey anti rabbit Cy3 500 µG;<br>Ref: AP182C<br>1:200                           | -----   | Burro            |
| Histona  | anti-Histone H3 (citrulline R2 + R8 + R17) antibody<br>Ref: ab5103<br>1:400                  | Donkey Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488)<br>Ref: ab150073<br>1:200          | -----   | Burro            |
| Ym1      | Anti-Ym1 Antibody, Polyclonal Rabbit polyclonal IgG anti mouse, 300ul;<br>Ref:60130<br>1:400 | Goat Anti-Rabbit IgG Antibody (H+L), Biotinylated<br>Ref: BA-1000-1.5<br>1:200   | Estreptavidina, conjugado Alexa Fluor™ 488 1mg;<br>Ref: S11223<br>1:200 | Cabra            |
| MPO      | Human/Mouse Myeloperoxidase/MPO Antibody<br>Ref:AF3667<br>1:200                              | Donkey anti-Goat IgG (H+L) Secondary Antibody, Biotin<br>Ref:A16003<br>1:500     | Streptavidin, Alexa Fluor™ 405 conjugate<br>Ref: S32351<br>1:500        | Cabra            |

**Tabla III. Anticuerpos utilizados en los estudios histológicos y de inmunofluorescencia**

### 3.1.4. Preparación de los neutrófilos para estudios de NETs ex vivo

Se utilizó un tubo de EDTA para recolectar la sangre del corazón de los ratones naive y sometidos a MCAO. La sangre se disolvió en un tampón de lisis hasta que se desaparecieron los glóbulos rojos. Posteriormente, los neutrófilos marcados con tdTomato se separaron mediante el uso de FACS Aria (BD Biosciences). Las células seleccionadas se dispusieron en el centro de una placa de ibidi sin tocar las paredes y se incubaron durante 30 minutos a una concentración de CO<sub>2</sub> del 5% y a 37°C. Luego, se añadió el PMA (forbol miristato acetato) o el vehículo y se incubaron durante 2 horas adicionales. Finalmente, las células se fijaron usando el 4% PFA y se almacenaron a 4°C para su posterior análisis mediante la inmunofluorescencia (Lefrançois et al., 2018).

### 3.1.5. Preparación del plasma rico en plaquetas (PRP) para estudios de agregación plaquetaria

Se extrajo la sangre cardiaca de los animales previamente anestesiados con una jeringuilla con 100 U de CLEXANE. Inmediatamente se añadió el citrato ácido dextrosa (ACD) correspondiente al 10% de volumen total de sangre y 300 ul de buffer de lavado de plaquetas

(PWB), manteniendo la temperatura a 37°C durante todo el procedimiento de aislamiento de plaquetas mediante un baño de agua. La mezcla de sangre/ACD/PWB se centrifugó a 250g durante 2 minutos. Se recogió el PRP, y las capas remanentes se sometieron a un segundo lavado con 400 µl de PWB durante otros 2 minutos para generar un pool de PRP. Este pool se centrifugó a 2000g durante 1 minuto. Se retiró el sobrenadante, y el pellet de células se resuspendió en 1 mL de PWB. Se realizó el conteo de plaquetas utilizando la cámara de Neubauer. El PRP se centrifugó a 2000g durante 1 minuto, y el pellet de células se resuspendió a la concentración requerida en un buffer de Tyrodes junto con Ca<sup>2+</sup> (1 mM) y apirasa (0,02 U/mL). Las plaquetas se dejaron reposar durante 30 minutos a 37°C antes de utilizarlas para la agregación plaquetaria.

La agregación plaquetaria se evaluó mediante la agregometría de transmisión de luz en una placa de 96 pocillos. Las plaquetas aisladas se ajustaron a una concentración de 3 x 10<sup>8</sup>/mL y se estimularon posteriormente con diferentes concentraciones de trombina (0,01-1 U/mL). La placa se analizó empleando un lector de placas Infinite F-50 (TECAN) con un filtro de excitación de 405 nm durante 20 minutos (10 ciclos con 1 minuto de agitación entre cada ciclo).

Se calculó el porcentaje de agregación plaquetaria siguiendo la siguiente fórmula:

$$\% \text{ agregación plaquetaria} = \frac{(\text{DO plaquetas sin estimular} - \text{DO plaquetas estimuladas})}{(\text{DO plaquetas sin estimular} - \text{DO Buffer tirodes})} \times 100$$

## **3.2. DETERMINACIONES**

### **3.2.1. Cálculo del volumen de infarto**

- Tinción de TTC: Después de la extracción del cerebro, se realizaron 8 cortes coronales de 1 mm de grosor con la ayuda de una matriz (RBMS-200C, World Precision Instruments, EE.UU.). Estos cortes se tiñeron durante 5 minutos con TTC al 2-3% (Panreac, España) en PB 0,2M pH 7,4. El TTC es una sal que se reduce a formazán por la cadena respiratoria mitocondrial y precipita, dando una coloración rojiza donde hay viabilidad celular y dejando la zona infartada de color blanco. Finalmente, se colocaron las secciones teñidas sobre una plantilla milimetrada y se fotografiaron con una cámara digital.

- Resonancia magnética: para determinar el volumen de infarto se tomaron imágenes por

resonancia magnética (RMI) [Icon (1T-MRI); Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Germany] en todos los ratones a las 24h después de la cirugía.

La cuantificación del volumen de infarto se llevó a cabo a través del software Image J, (Image J, EE. UU.). El volumen de infarto expresado en porcentaje de hemisferio infartado corregido (%HI corregido) se calculó para cada animal. Se calcularon las áreas de tejido infartado (Volinf), el hemisferio ipsilateral (Vollps) y el hemisferio contralateral (Volcon) para cada sección. Se calculó el %HI corregido mediante la siguiente fórmula (Hernández-Jiménez et al., 2013):

$$\%HI \text{ corregido} = (\text{Volinf} \cdot 100 / \text{Vollps}) \cdot (\text{Volcon} / \text{Vollps}).$$

### 3.2.2. Cálculo del área hemorrágica

Para calcular el área de hemorragia se utilizó la tinción de las peroxidasas endógenas. Esta tinción tiñe los glóbulos rojos y, a continuación, se mide el área en la que se encuentran extravasados. Los glóbulos rojos tienen un alto contenido de peroxidasas. La oxidación del sustrato diaminobencidina (DAB) les da un color marrón a los eritrocitos, lo que permite su detección directa y visualización (Wakisaka et al., 2010). Para llevar a cabo dicha tinción se utilizaron 18 secciones coronales de 30 µm de grosor, separadas cada una por 360 µm y desde bregma 2,8 mm a bregma -3,7 mm. Las secciones fueron previamente hidratadas con PBS y luego incubadas con la tinción DAB durante 15 minutos (Peroxidase substrate kit, Vector Laboratories, EE. UU.). La cuantificación se realizó mediante la estereología. La estimación del volumen ocupado por los eritrocitos extravasados se llevó a cabo con un microscopio (Nikon Eclipse 90i Nikon Corporation, Japón) con un objetivo de 10x. El área de hemorragia se estimó mediante el principio de Cavalieri, que se basa en el recuento de los puntos asociados a un área en las hemorragias.

$$\text{Volumen} = a(p) \cdot d \cdot \sum^p$$

Siendo,  $a(p)$  el área asociada al punto,  $d$  la distancia entre dos secciones consecutivas y  $\sum^p$  en sumatorio de los puntos.

### **3.2.3. Cuantificación de las células infiltradas por estereología**

Para la cuantificación del número de células NIMP R14<sup>+</sup> o de células Ym1<sup>+</sup> infiltradas en el tejido isquémico, se aplicó el método del fraccionador óptico, que permite estimar el número total de células presentes en una estructura determinada (Gundersen et al., 1988). Para ello, se obtuvieron los cortes seriados de 30  $\mu\text{m}$  de grosor, tomando uno de cada 12 secciones consecutivas, con un espacio de 360  $\mu\text{m}$  entre ellas. Se utilizó un microscopio de fluorescencia (LSM710; Zeiss, Alemania) y el software Zen 2010 (Zeiss, Alemania). Como criterios de medición, se seleccionaron 5 secciones equidistantes por cada cerebro y fueron sumadas y expresadas como la cantidad estimada.

### **3.2.4. ELISAs**

Para la determinación de las concentraciones sanguíneas de la elastasa, se desarrollaron los ensayos de ELISA. Todos ellos se realizaron siguiendo las instrucciones de la casa comercial y siempre analizando las muestras por duplicado. El kit comercial usado fue Mouse Neutrophil Elastase ELISA Kit (Ref: ab252356Abcam. EE. UU.).

### **3.2.5. Cuantificación de NETs ex vivo por estereología**

Se empleó un microscopio de fluorescencia (LSM710; Zeiss, Alemania) y el *software* Zen 2010 (Zeiss, Alemania) para localizar los NETs. Alineamos la ventana del microscopio en el centro de cada pocillo y, posteriormente, utilizamos las funciones de *z-stack* y *tiles* debajo del objetivo de 10x para adquirir las imágenes de las tres áreas del escaneo. Luego, empleamos el *software* ImageJ (Image J, EE. UU.) para llevar a cabo el análisis y determinar el número de neutrófilos y el número de NETs. Los resultados se expresan como el porcentaje de NETs en relación con el número total de neutrófilos.

### **3.2.6. Estadística**

Todos los datos fueron analizados usando el programa PRISM 9.0 (GraphPad Software Inc., EE. UU.). Además, todos los resultados se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Se consideró significativo un valor de  $p < 0,05$ . Se realizaron las pruebas paramétricas y no paramétricas, dependiendo de si la muestra se ajustaba a la distribución

normal, evaluando esto mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para comparar los dos grupos, se empleó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney, mientras que la prueba paramétrica utilizada fue la t de Student. Para realizar más comparaciones de dos grupos, se aplicó un análisis de varianza de una vía (ANOVA de una sola vía), seguido de la prueba de Newman-Keuls si la muestra no se ajustaba a la distribución normal, o el test de Kruskal-Wallis con la prueba de Dunns como posprueba en el caso de que la muestra no se ajustara a la distribución normal.

Algunas imágenes se generan utilizando materiales de *Servier Medical Art*.

## **RESULTADOS**



# 1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DNAsa-I EN EL ICTUS ISQUÉMICO.

## FUNCIÓN DE LOS NETs Y DEL RECEPTOR TLR4 PLAQUETARIO

### 1.1. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en el volumen de infarto

Como ya hemos comentado previamente, se decidió trabajar con un protocolo de administración de DNAsa-I (inyección iv e ip a las 2h45min + inyección ip 12 horas, después de la MCAO) y/o tPA (a las 3 horas tras la inducción de la MCAO), comparando los tratamientos siempre con un grupo control (tratado con vehículo) de cada genotipo. Los experimentos se realizaron durante la fase inactiva del animal (ZT4-ZT7).

Los resultados del volumen de infarto obtenidos mediante resonancia magnética a las 24 horas después de la oclusión (MCAO) muestran que el tratamiento con DNAsa-I, usando el modelo tromboembólico *in situ* que produce un trombo rico en fibrina, reduce de forma significativa el volumen de infarto cuando se compara con el grupo tratado con vehículo ( $18,5\pm 1,4\%$  vs.  $13,4\pm 1,4\%$ ,  $p < 0,01$ ; Figura 14A). Estos datos demuestran que la DNAsa-I produce un efecto protector y sugiere la posible implicación de los NETs en este tipo de infartos. El tratamiento con tPA a las 3 horas no produce una disminución del tamaño de infarto, de acuerdo con resultados previos (Peña-Martínez et al., 2022; García-Yébenes et al., 2011) y la combinación de ambos fármacos, DNAsa-I+tPA, tampoco produce un efecto protector (Figura 14A). Es importante señalar que la adición del tPA anula el efecto protector de la DNAsa-I, efecto que puede tener una importante relevancia clínica y que necesita ser explorada.

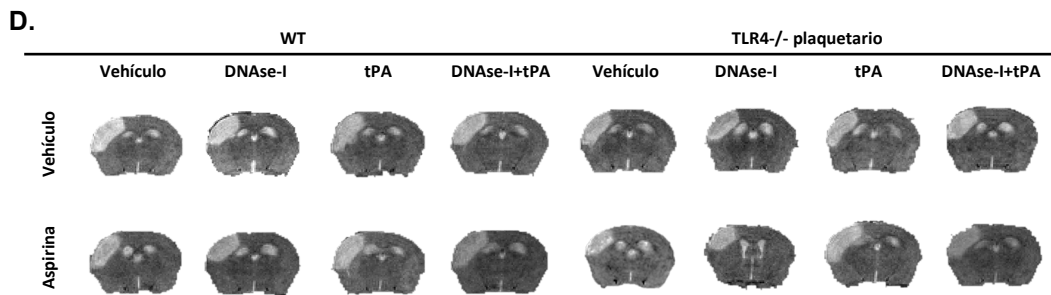
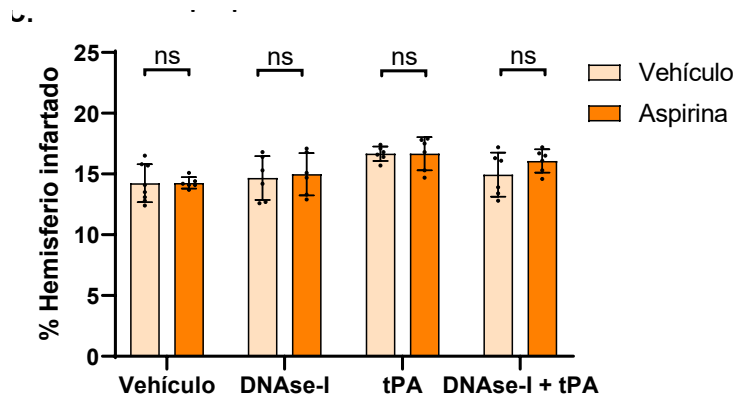
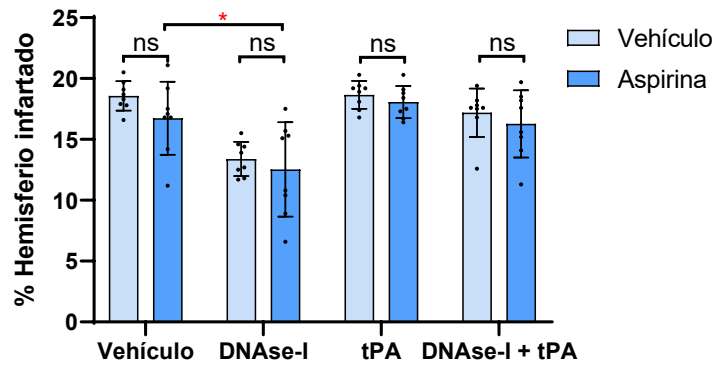
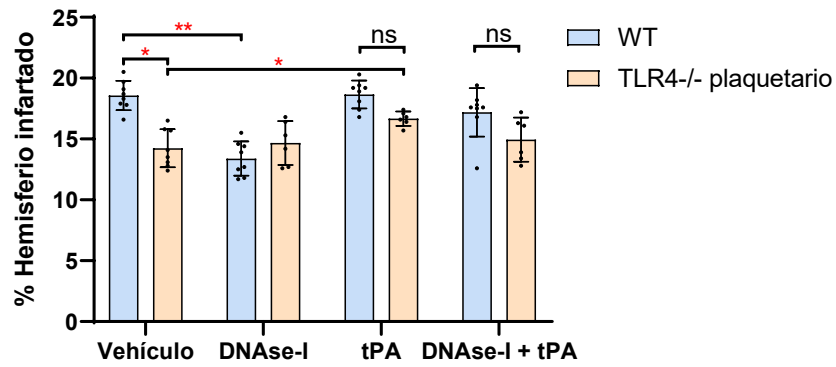
Nuestro grupo había demostrado previamente que el receptor TLR4 plaquetario media la formación de NETs en un modelo fototrombótico que produce trombos ricos en plaquetas (Peña-Martínez et al., 2019). Para estudiar la participación de este receptor en el modelo tromboembólico, se utilizaron animales carentes de TLR4 plaquetario ( $TLR4^{loxP/Pf4-cre}$ ; que a partir de ahora se nombrarán como  $TLR4^{-/-}$  plaquetario). Los resultados que se obtuvieron muestran que, en estos animales, el volumen de infarto es menor que el de los respectivos WT

(WT vehículo vs TLR4<sup>-/-</sup> vehículo 18,5±1,4% vs 14,2±1,5%, p<0,05; Figura 14A), lo que apoya la participación del TLR4 plaquetario en el daño isquémico y en la formación de NETs también en este modelo de isquemia producido por un trombo rico en fibrina. Es importante destacar que, en los animales, la DNAsa-I no produce ningún cambio en los volúmenes de infarto en los grupos estudiados. Sin embargo, la administración de tPA sí produce un aumento del volumen de infarto cuando se compara con su grupo control (TLR4<sup>-/-</sup> vehículo vs TLR4<sup>-/-</sup> tPA; 14,2±1,5 vs 16,6±0,6% p<0,05; Figura 14A), a diferencia de lo que pasa cuando se usan animales WT que expresan el receptor TLR4. Se requieren más estudios para explorar los mecanismos implicados y la relevancia de este hallazgo.

Por último, para estudiar si un tratamiento crónico previo con antiagregantes plaquetarios pudiera afectar el efecto de la administración de DNAsa-I, se utilizaron animales pre-tratados con aspirina (60 mg/kg vía intragástrica a las 50 h, 26 h, 2h antes de la MCAO).

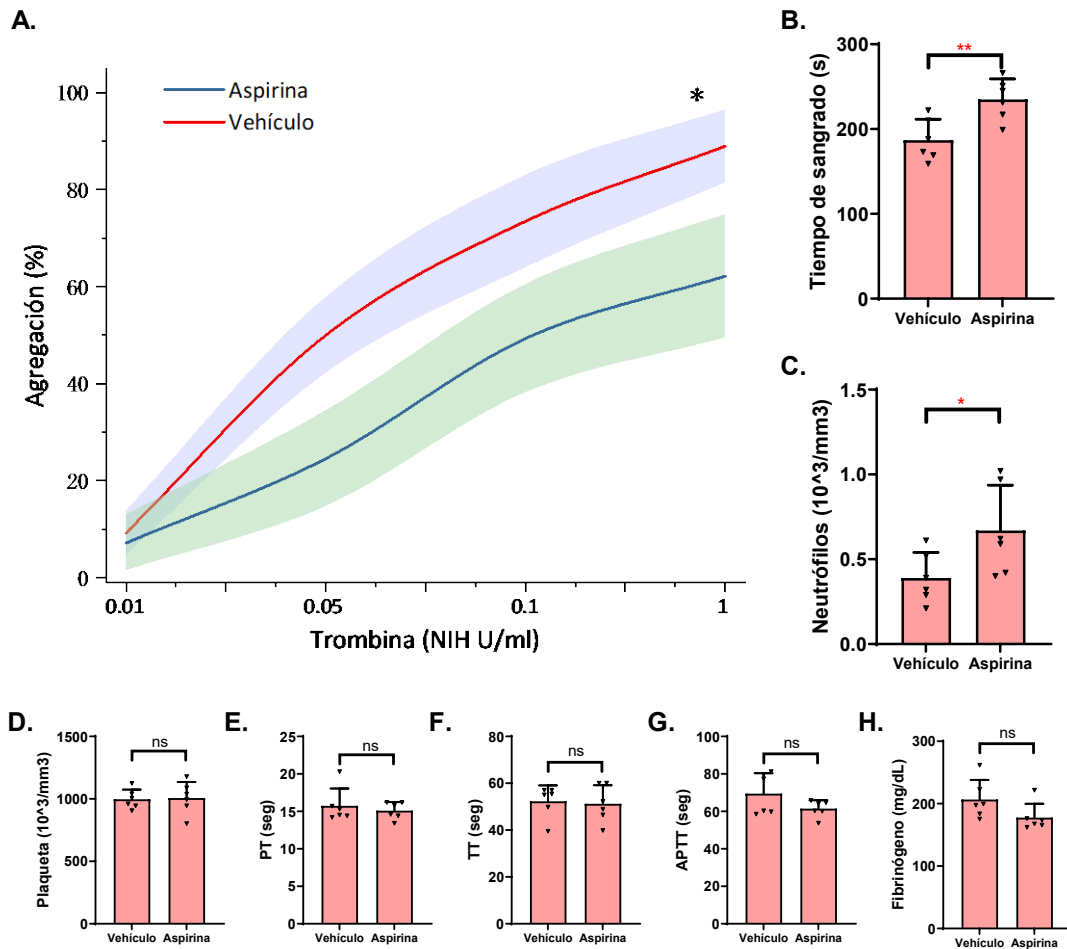
En primer lugar, el tratamiento crónico con aspirina en animales WT produjo una disminución significativa de la agregación plaquetaria (a nivel de 1NIH U/ml, 88,9% vs 62,1% p<0,05; Figura 15A), un aumento del tiempo de sangrado (186,8±24,8 vs 234,8±24,3 p<0,01; Figura 15B) y un mayor número en el conteo de neutrófilos (0,39±0,15 vs 0,67±0,27 p<0,05; Figura 15C). El tratamiento con aspirina no produjo cambios en otros parámetros como recuento de plaquetas ni en pruebas de coagulación (Figura 15 D-H).

La administración crónica de aspirina no produjo cambios en los volúmenes de infarto en ninguno de los grupos estudiados y en ambos genotipos de animales estudiados (Figura 14B y C). El efecto protector del tratamiento con DNAsa-I no se vio alterado por un tratamiento crónico con aspirina.



**Figura 14. Efecto del tratamiento con DNasa-I en el volumen de infarto.**

A-C. Volúmenes de infarto, determinados 24 h tras la oclusión. D. Fotos representativas de los volúmenes de infarto, observados por resonancia magnética, de cada grupo experimental. Datos representados como la media  $\pm$  SEM; n=6-8 t-test \*p<0,05; \*\*p<0,01.



**Figura 15. Efecto del tratamiento previo con aspirina en parámetros sanguíneos.** A. Agregación plaquetaria. B. Tiempo de sangrado. C. Recuento de neutrófilos. D. Recuento de plaquetas. E-H. Pruebas de coagulación (PT tiempo de protrombina, TT tiempo de trombina, APTT tiempo de tromboplastina parcial activado, Fibrinógeno). Se representan como la media  $\pm$  SEM; n=6; t-test \*p<0,05, \*\*p<0,01.

## 1.2. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en el déficit neurológico

Para evaluar el déficit neurológico a nivel de función motora después de la MCAO, se llevaron a cabo dos pruebas diferentes a las 24 horas después de la oclusión: la escala de neuroseveridad modificada y la prueba del cilindro que examina el uso de las extremidades anteriores del animal y es sensible a las asimetrías en el uso de dichas extremidades.

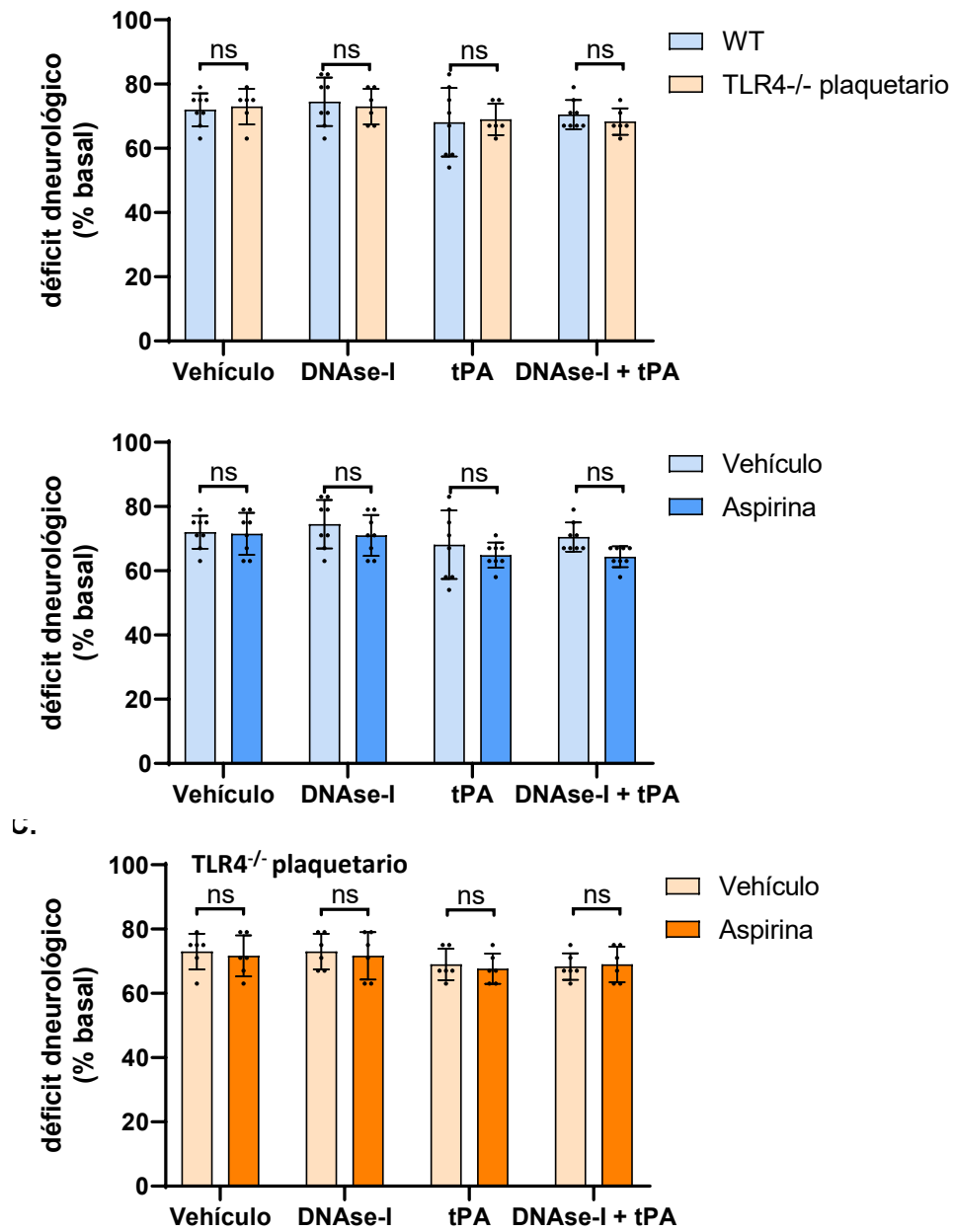
La escala de neuroseveridad utilizada a las 24 horas después de la oclusión no fue sensible para detectar cambios en la función neurológica de los animales en ninguno de los grupos estudiados (Figura 16A-C). Sin embargo, la prueba del cilindro fue capaz de detectar déficits

neurológicos que se correlacionaron con los cambios encontrados en el volumen de infarto (Figura 17A-C).

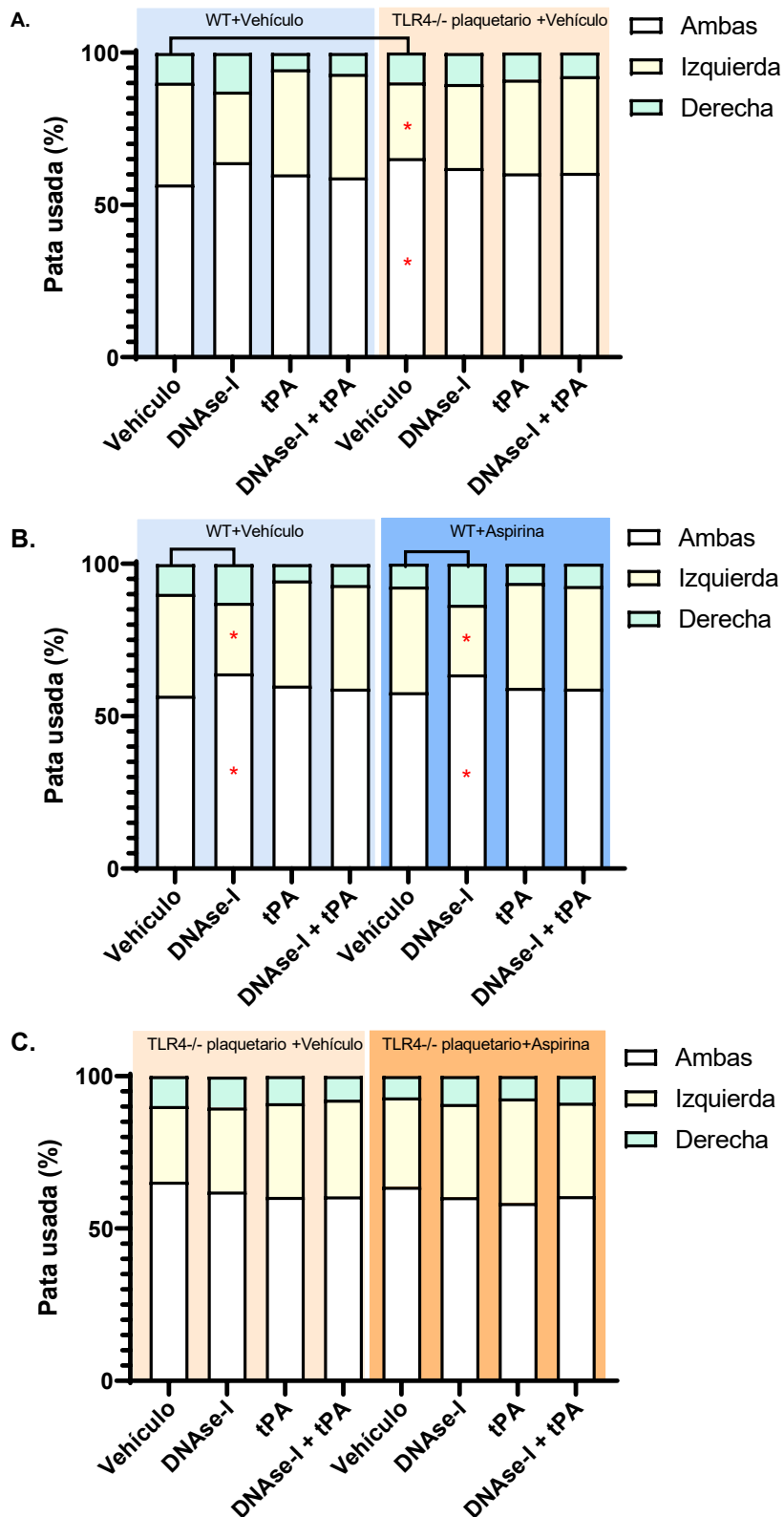
El tratamiento con DNAsa-I, en los animales WT, produjo una mejora significativa de los síntomas neurológicos, determinados con la prueba del cilindro, comparados con el grupo de vehículo (DNAsa-I vs vehículo; ambas patas: 64,0% vs.56,7%, pata izquierda: 23,2% vs. 33,4%, \*  $p < 0,05$ ; Figura 17B). Estos datos correlacionan con la protección encontrada en el volumen de infarto del tratamiento con la DNAsa-I.

Sin embargo, el tratamiento con DNAsa-I no produce ningún cambio en los déficits neurológicos cuando se utilizan los animales deficientes en el receptor TLR4 plaquetario, de acuerdo con la ausencia de cambios en los volúmenes de infarto encontrado en los grupos estudiados (Figura 17A). Es importante destacar que los ratones TLR4<sup>-/-</sup> plaquetario también mostraron una mejora en el comportamiento neurológico, comparado con el grupo de ratones WT (WT vehículo vs TLR4<sup>-/-</sup> vehículo; ambas patas: 56,7% vs.65,4%, pata izquierda: 33,4% vs.24,8%, \*  $p < 0,05$ ; Figura 17A), de acuerdo con el efecto protector que se ve en el volumen de infarto (Figura 14A).

Por último, la administración crónica de aspirina no produjo ningún cambio en los déficits neurológicos en ninguno de los grupos estudiados y en ambos genotipos de animales estudiados (Figura 17B y C). El efecto de mejoría de los déficits neurológicos del tratamiento con DNAsa-I no se vio alterado por un tratamiento crónico con aspirina.



**Figura 16. Efecto del tratamiento con DNasa-I en el déficit neurológico. A-C.** Evaluación del déficit neurológico medido por la escala de Neuroseveridad. n=6-8.



**Figura 17. Efecto del tratamiento con DNase-I en el déficit neurológico. A-C.** Evaluación del déficit neurológico medido por la prueba de cilindro. Se representan como los porcentajes de la frecuencia de uso de la pata izquierda, la pata derecha y ambas patas. n=6-8; \* p<0,05.

### 1.3. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en la incidencia de la reperfusión

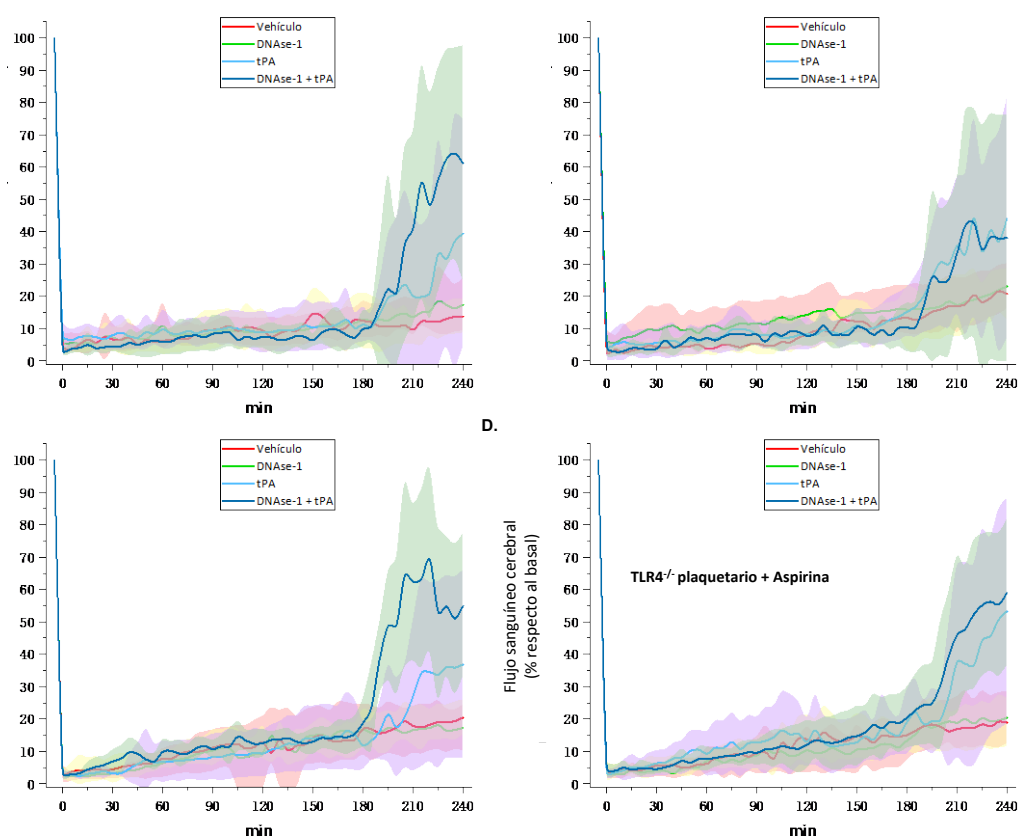
Para estudiar los mecanismos implicados en el efecto protector de la DNAsa-I, en primer lugar, estudiamos la incidencia de reperfusión medida por registro de la sonda Doppler. Consideramos que la oclusión es estable cuando se produce una caída brusca y sostenida del flujo sanguíneo cerebral por debajo del 30% medida por la sonda Doppler y acompañada de un cambio de color en el vaso. La recuperación total o parcial del flujo (>30%) en cualquier rama de la arteria se considera como reperfusión espontánea.

El tratamiento con DNAsa-I no modificó los índices de reperfusión espontánea, caracterizada según los criterios de láser-doppler y visuales, en ninguno de los grupos y genotipos estudiados (Figura 18E). Los porcentajes de reperfusión espontánea que encontramos están por debajo del 14,2% de los casos, sin diferencias entre los diversos grupos (Figura 18E). Estos animales fueron descartados de todos los estudios posteriores.

La administración única de DNAsa-I no aumentó el flujo sanguíneo medido por la sonda Doppler hasta 4 horas después de la oclusión (Figura 18E). La administración de tPA a las 3 horas tras la oclusión produjo una recanalización arterial exitosa en el 37,5% de los animales WT. Estos resultados están de acuerdo con datos preliminares publicados por nuestro grupo en este modelo de ictus (Peña-Martínez et al., 2022). Sin embargo, en aquellos animales que habían recibido un tratamiento con DNAsa-I, la combinación de ambos fármacos (DNAsa-I + tPA) sí aumentó el índice de recanalización hasta un 75% de los casos ( $p < 0,01$ ; Figura 18E), lo que sugiere que el tPA es más eficaz para recanalizar cuando se han eliminado los NETs.

La administración única de DNAsa-I tampoco aumentó el flujo sanguíneo en los animales  $TLR4^{loxP/Pf4-cre}$ , carentes de TLR4 plaquetario. La administración de tPA a las 3 horas tras la oclusión produjo una recanalización exitosa en el 50% de los animales cuando se compara con los animales WT (Figura 18E), lo que apoya que los NETs están implicados en los fenómenos de “no-reflujo” (no-reflow) impidiendo una recanalización más eficaz. La combinación de ambos fármacos (DNAsa-I + tPA) no aumentó el índice de recanalización (Figura 18E).

De nuevo, la administración crónica de aspirina no produjo ningún cambio significativo en los índices de reperfusion en ninguno de los grupos estudiados y en ambos genotipos de animales estudiados (Figura 18E). El efecto del tratamiento con DNasa-I no se vio alterado por un tratamiento crónico con aspirina.



**E.**

|  |          |                    | WT           |           |               |              |           |               | TLR4 <sup>-/-</sup> plaquetario |         |               |              |           |               |
|--|----------|--------------------|--------------|-----------|---------------|--------------|-----------|---------------|---------------------------------|---------|---------------|--------------|-----------|---------------|
|  |          |                    | Vehículo     |           |               | Aspirina     |           |               | Vehículo                        |         |               | Aspirina     |           |               |
| Rep. esp./Total. Antes de tratamientos |          |                    | 5/37 (13.5%) |           |               | 4/36 (11.1%) |           |               | 4/30 (13.3%)                    |         |               | 4/28 (14.2%) |           |               |
|  |          |                    | DNase-I      | tPA       | DNase-I + tPA | DNase-I      | tPA       | DNase-I + tPA | DNase-I                         | tPA     | DNase-I + tPA | DNase-I      | tPA       | DNase-I + tPA |
| Rep. DNase-I                           | Rep. tPA | Rep. DNase-I + tPA | 0            | 3 (37.5%) | 6 (75%)       | 0            | 3 (37.5%) | 6 (75%)       | 0                               | 3 (50%) | 3 (50%)       | 0            | 4 (66.7%) | 3 (50%)       |
| Total                                  |          |                    | 8            | 8         | 8             | 8            | 8         | 8             | 6                               | 6       | 6             | 6            | 6         | 6             |

**Figura 18. Efecto del tratamiento con DNasa-I en el índice de reperfusion.**

**A-D.** Ejemplos de registros de laser Doppler medidos hasta 4 horas después de la oclusión. **E.** Porcentaje de reperfusion espontánea y reperfusion exitosa en los diferentes grupos y genotipos estudiados. Datos representados como porcentajes de reperfusion.

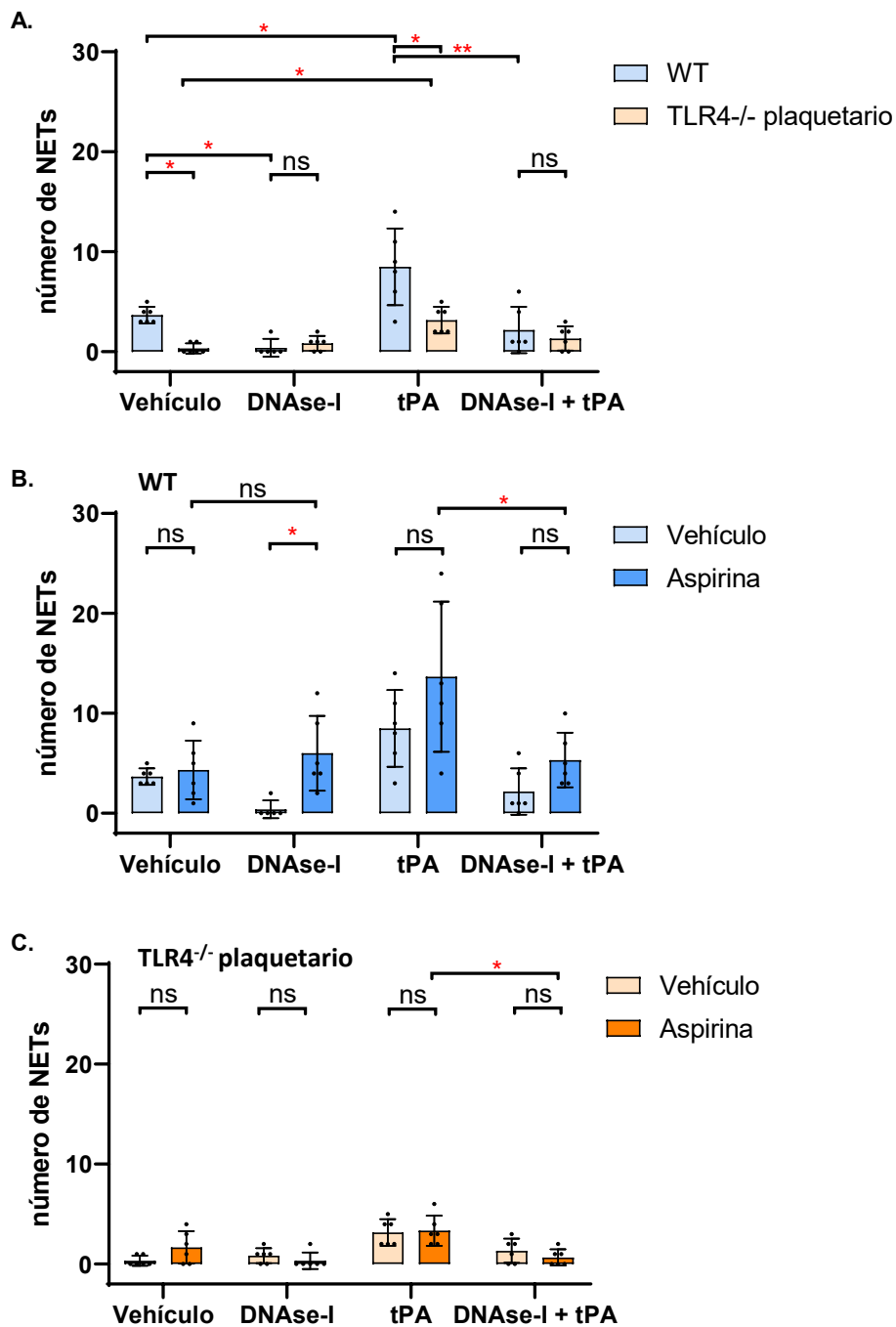
## 1.4. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en la presencia de NETs en el área infartada

Con el fin de profundizar en los mecanismos responsables del efecto protector de la DNAsa-I, exploramos la presencia de NETs en el tejido isquémico mediante estudios de inmunofluorescencia en las secciones coronales de los cerebros de los ratones. Se utilizaron diferentes anticuerpos contra los marcadores del NETs (ver métodos para más detalles).

Los resultados de la presencia de NETs en el área isquémica a las 24 horas después de la oclusión muestran que el tratamiento con DNAsa-I redujo de forma significativa la concentración de NETs cuando se compara con el grupo tratado con vehículo (DNAsa-I vs vehículo;  $0,8 \pm 0,7$  vs  $3,7 \pm 0,9$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 19A, Figura 20). Estos datos apoyan que el efecto protector de la DNAsa-I puede deberse a la disminución de la presencia de NETs. El tratamiento con tPA a las 3 horas produjo un aumento significativo de la presencia de NETs ( $3,7 \pm 0,8$  vs.  $8,5 \pm 3,8$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 19A, Figura 20), de acuerdo con resultados previos (Wang et al., 2021). Nuestros datos muestran ahora que, comparando con el grupo de tPA, la combinación de DNAsa-I con tPA reduce la concentración de NETs de forma significativa (tPA vs DNAsa-I+tPA;  $8,5 \pm 3,8$  vs.  $2,2 \pm 2,3$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 19A, Figura 20).

Los resultados que se obtuvieron cuando se usaron los animales TLR4<sup>-/-</sup> fueron los siguientes: los niveles de la presencia de NETs fueron menores en los grupos de vehículo y tPA cuando se compararon con los animales que expresan normalmente TLR4, como era de esperar (vehículo  $3,7 \pm 0,8$  vs.  $0,3 \pm 0,5$ ; tPA  $8,5 \pm 3,8$  vs.  $3,2 \pm 1,3$ ;  $p < 0,05$ ; Figura 19A). Cabe destacar que la administración de tPA en animales TLR4<sup>-/-</sup> también produjo un aumento de la presencia de NETs (vehículo vs tPA;  $0,3 \pm 0,5$  vs  $3,2 \pm 1,3$   $p < 0,01$ ; Figura 19A), lo que sugiere que otros mecanismos además del TLR4 plaquetario, como puede ser la propia degranulación de los neutrófilos inducida por el tPA, participan en la formación de NETs en este contexto experimental (Wang et al., 2021). Es importante destacar que, en estos animales, la DNAsa-I no produjo ningún cambio.

Por último, el tratamiento crónico con aspirina no produjo ningún cambio en la presencia de NETs en el tejido isquémico en los grupos estudiados excepto en el grupo de la DNAsa-I, en donde se evidencia un incremento significativo en los animales tratados con aspirina cuando se compara con el grupo sin tratamiento previo ( $0,8 \pm 0,7$  vs  $6,0 \pm 3,7$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 19B).



**Figura 19. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en la presencia de NETs del área infartada. A-C.** Número de NETs por campo visual analizado en la corteza cerebral a las 24 horas tras la oclusión. Datos representados como media  $\pm$  SEM;  $n=6$  \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

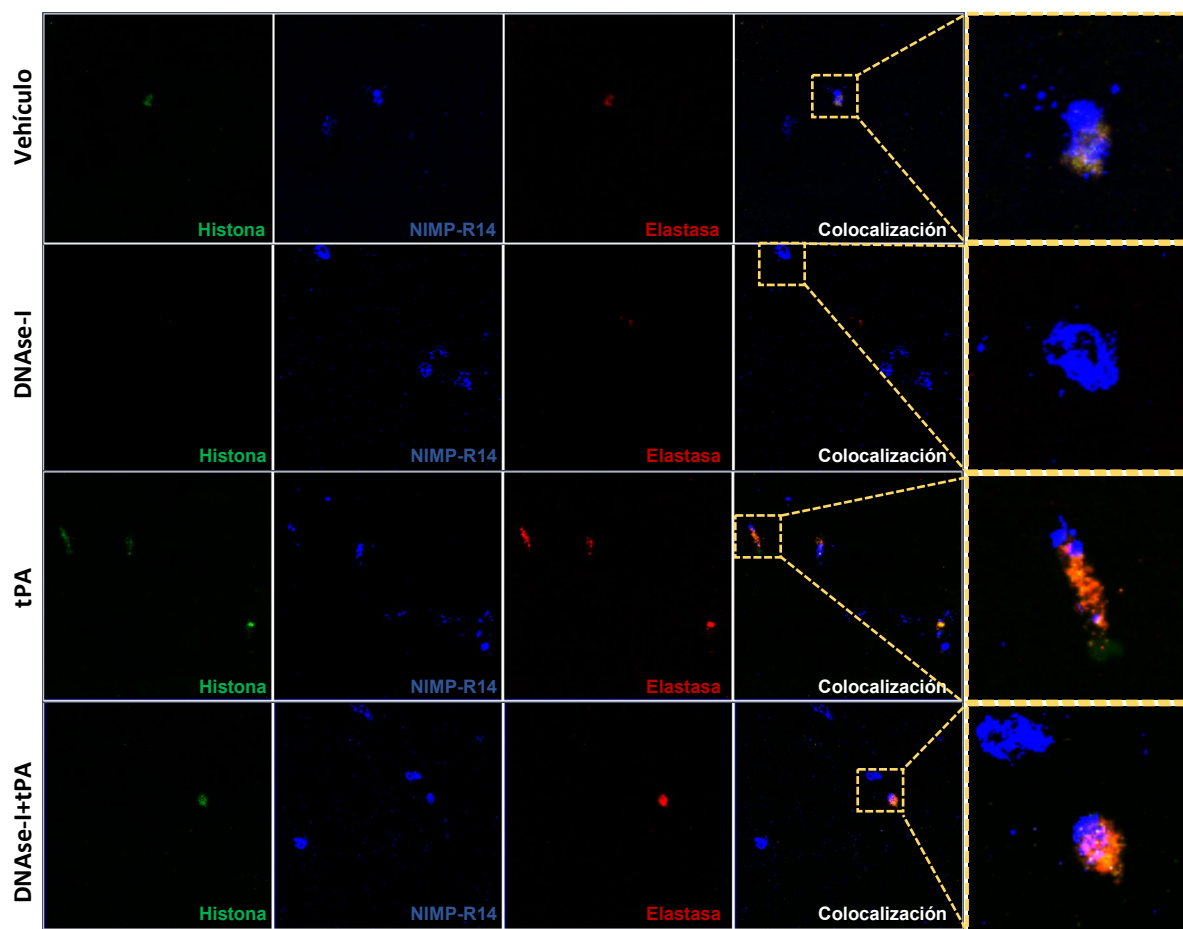


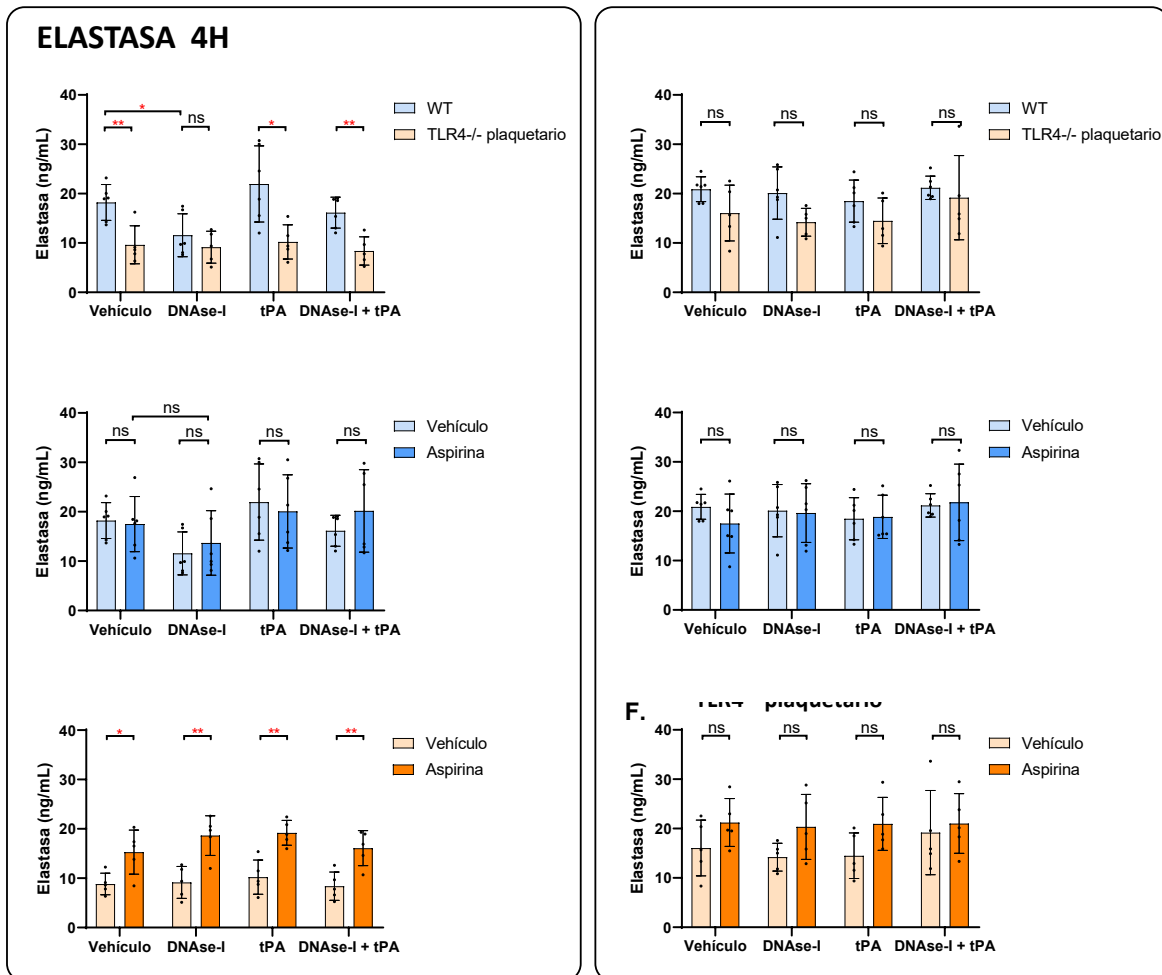
Figura 20. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en la presencia de NETs del área infartada. Triple inmunofluorescencia de NETs. neutrófilo (NIMP-R14), la elastasa del neutrófilo y la histona citrulinada-3.

### 1.5. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en los niveles plasmáticos de elastasa

Para determinar los niveles plasmáticos de elastasa como marcador de NETs llevamos a cabo dos extracciones, la primera a las 4 horas tras la oclusión en la vena yugular y la segunda a las 24 horas tras la oclusión por punción intracardiaca una vez sacrificado el animal.

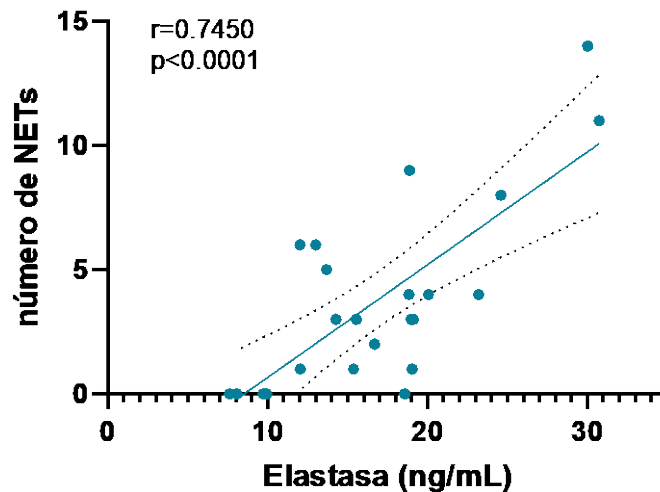
Los resultados de los niveles plasmáticos de elastasa a las 4 horas después de la oclusión muestran que, el tratamiento con DNAsa-I reduce de forma significativa sus niveles plasmáticos cuando se compara con el grupo tratado con vehículo, (DNAsa-I vs vehículo;  $11,6 \pm 4,3$  vs  $18,2 \pm 3,6$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 21A). Estos resultados sugieren que el efecto protector de la DNAsa-I se debe, al menos en parte, a la disminución de la producción de NETs. El tratamiento con tPA a las 3 horas produjo una tendencia a un aumento en la presencia de niveles plasmáticos de elastasa (vehículo vs tPA;  $18,2 \pm 3,6$  vs  $20,0 \pm 7,7$ ,  $p > 0,05$ ; Figura 21A) de

acuerdo con resultados previos (Wang et al., 2021). Además, comparando con el grupo de tPA, tras la combinación de DNAsa-I con el tPA se observó una tendencia a una reducción en los niveles plasmáticos de elastasa (tPA vs DNAsa-I+tPA; 20,0±7,7 vs. 16,1±3,1, p>0,05; Figura 21A).



**Figura 21. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en los niveles plasmáticos de elastasa. A-C.** Niveles plasmáticos de elastasa a las 4 horas tras la oclusión. **D-F.** Niveles plasmáticos de elastasa a las 24 horas tras la oclusión. Los datos se representan como la media ± SEM; n=5-6; t-test \*p<0,05, \*\*p<0,01.

Además, hemos observado una correlación positiva entre la presencia de NETs en la corteza y los niveles plasmáticos de elastasa (Figura 22).



**Figura 22. Correlación entre el número de NETs en el tejido cerebral y los niveles plasmáticos de elastasa.** La presencia de NETs en el tejido cerebral (nº de NETs) se midió a las 24 horas después de la oclusión y los niveles plasmáticos de elastasa a las 4 horas tras la oclusión.

Los resultados que se obtuvieron cuando se usaron los animales TLR4<sup>-/-</sup> son los siguientes: los niveles plasmáticos de elastasa fueron significativamente menores en los grupos de vehículo ( $18,2\pm 3,6$  vs  $9,6\pm 3,8$ ,  $p<0,01$ ), tPA ( $20,0\pm 7,7$  vs  $10,2\pm 3,4$ ,  $p<0,05$ ), DNAsa-I+tPA ( $16,1\pm 3,1$  vs  $8,4\pm 2,9$   $p<0,01$ ) cuando se comparan con los animales que expresan normalmente TLR4, como era de esperar (Figura 21A). En este caso, la administración de tPA en animales TLR4<sup>-/-</sup> no afectó los niveles plasmáticos de elastasa (Figura 21A), como sí vemos en la presencia de NETs en el tejido isquémico. Es importante destacar, que en estos animales la DNAsa-I no produjo ningún cambio en los grupos estudiados.

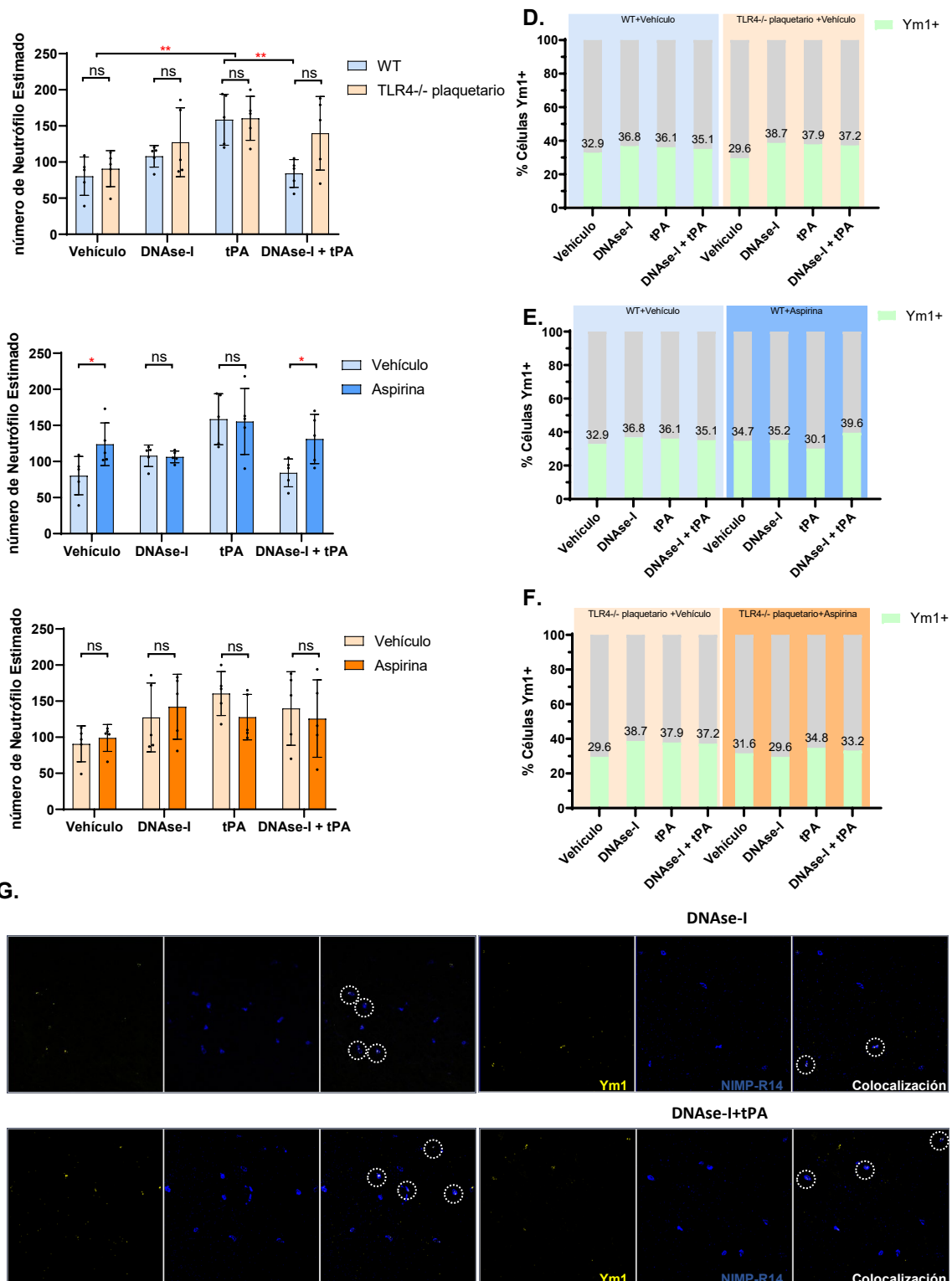
Al estudiar los niveles plasmáticos de elastasa las 24 horas tras la oclusión, se concluye que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de tratamiento, ya sea en los ratones WT o en los de TLR4<sup>-/-</sup> plaquetario (Figura 21 D-F).

Por último, el pretratamiento crónico con aspirina no produjo ninguna modificación en los niveles plasmáticos de elastasa en los animales que expresan el receptor TLR4. Sin embargo, y de forma llamativa, la aspirina sí los aumentó significativamente en los animales que no expresan el receptor TLR4 plaquetario.

## 1.6. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en la infiltración y polarización del neutrófilo

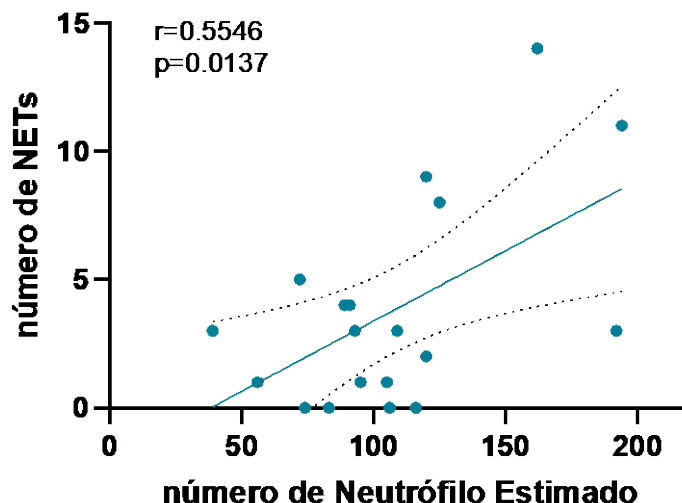
Uno de los mecanismos clásicos implicados en el daño cerebral tras un ictus es la infiltración de los neutrófilos, habiéndose descrito una correlación positiva entre neutrófilos infiltrados y daño cerebral. Además, teniendo en cuenta que nuestro grupo ha encontrado una correlación negativa entre la densidad de neutrófilos y el volumen del infarto en ratones TLR4-KO que rompe con el dogma establecido, y que se ha asociado con cambios fenotípicos que afectan la función de los propios neutrófilos (N1 y N2; García-Culebras et al., 2019), decidimos examinar el papel del tratamiento con DNAsa-I en la infiltración y polarización de los neutrófilos.

Los resultados en relación con la infiltración de neutrófilos en la corteza cerebral a las 24 horas tras la oclusión muestran que el tratamiento con DNAsa-I no reduce su infiltración cuando se compara con el grupo tratado con vehículo (DNAsa-I vs vehículo;  $108,0 \pm 14,9$  vs  $80,4 \pm 26,6$ ,  $p > 0,05$ ; Figura 23A). Estos resultados apoyan que el efecto protector de la DNAsa-I no se debe a cambios en la infiltración ni en la polarización de los neutrófilos. El tratamiento con tPA a las 3 horas sí produjo un aumento significativo de la presencia de neutrófilos a nivel cerebral (vehículo vs tPA;  $80,4 \pm 26,6$  vs.  $158,6 \pm 35,3$ ,  $p < 0,01$ ; Figura 23A), de acuerdo con resultados previos (Shi et al., 2021). Nuestros datos ahora muestran que, comparando con el grupo de tPA, la adición de DNAsa-I al tPA reduce la infiltración neutrofílica de forma significativa (tPA vs DNAsa-I+tPA;  $158,6 \pm 35,3$  vs.  $84,2 \pm 19,3$ ,  $p < 0,01$ ; Fig. 23A).



**Figura 23. Efecto del tratamiento con DNasa-I en la infiltración y polarización del neutrófilo en el área isquémica. A-C.** Números estimado de neutrófilos en la corteza cerebral estudiados a las 24 horas después de la oclusión. **D-F.** Proporción de neutrófilos Ym1+. **G.** Imágenes representativas de doble inmunofluorescencia de neutrófilo (NIMP-R14) y neutrófilos tipo 2(N2, Ym1+). Los datos se representan como la media  $\pm$  SEM; n=5-6; t-test \*p<0,05, \*\*p<0,01.

De nuevo, hemos observado que existe una correlación positiva entre la presencia de NETs en la corteza cerebral y la infiltración neutrofílica (Figura 24).



**Figura 24. Correlación entre el número de NETs y el número de neutrófilos en el tejido cerebral.** La presencia de NETs y de neutrófilos en el tejido cerebral se midió -en ambos casos- a las 24 horas después de la oclusión.

El tratamiento crónico con aspirina en los grupos vehículo y DNAsa-I+tPA en ratones de WT produjo un aumento significativo de la infiltración de neutrófilos en comparación con los grupos sin aspirina (vehículo;  $123,8 \pm 29,6$  vs.  $80,4 \pm 26,6$ ,  $p < 0,05$ ; DNAsa-I+tPA;  $131,2 \pm 34,1$  vs.  $84,2 \pm 19,3$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 23B). La ausencia del receptor TLR4 plaquetario no produjo ningún cambio en la infiltración de los neutrófilos de los diferentes grupos cuando se compara con los animales WT o sin tratamiento previo con aspirina (Figura 23A-C).

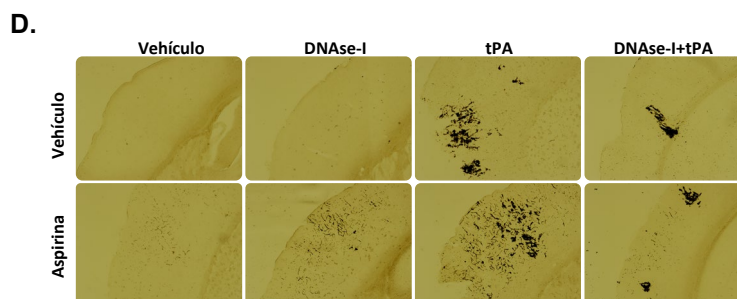
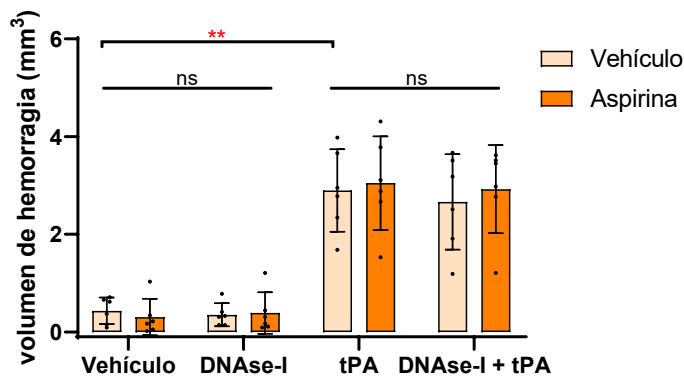
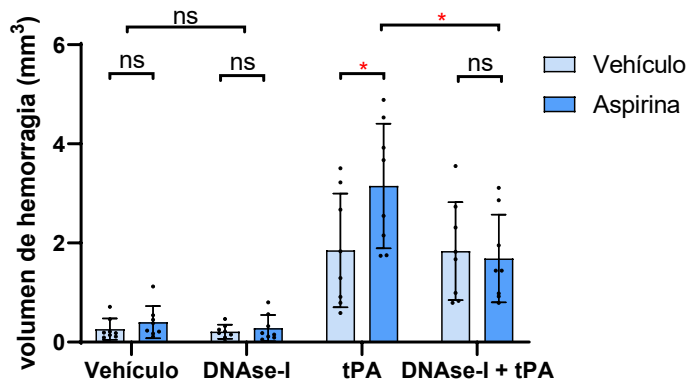
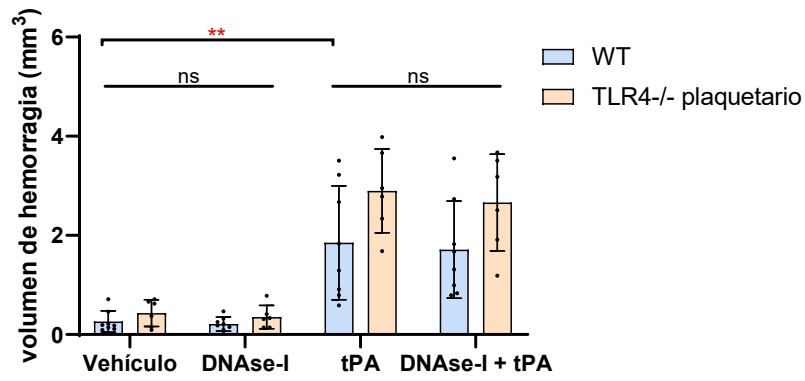
Al estudiar los diferentes fenotipos de neutrófilos, N1 -proinflamatorio- (Ym1-) y N2 -antiinflamatorio- (Ym1+), no se observaron diferencias evidentes entre los grupos estudiados tanto en los ratones de WT como en los animales TLR4-/- plaquetario (Figura 23 D-F).

## 1.7. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en la incidencia de transformación hemorrágica (TH)

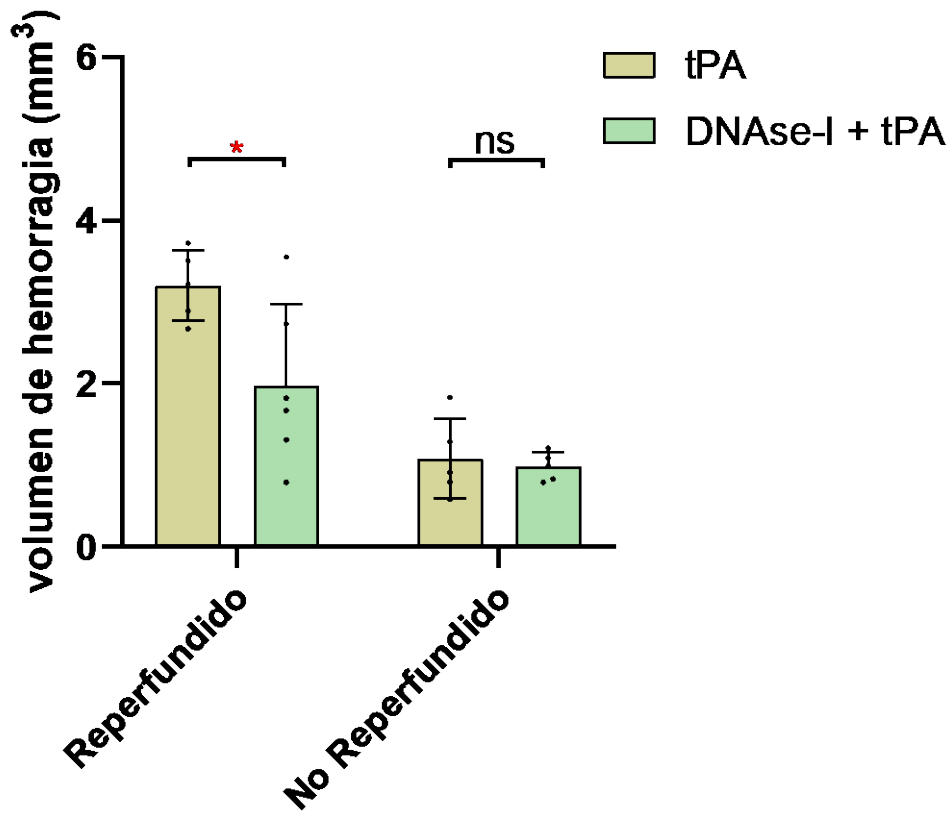
Por último, quisimos estudiar el efecto del tratamiento con DNAsa-I, a los tiempos establecidos (2h45min tras la oclusión) y en administración única o en combinación con tPA, en los procesos de transformación hemorrágica (TH). Ya hemos comentado que la TH es una grave complicación que empeora el pronóstico del ictus y que está asociada a la administración tardía de tPA.

La administración única de DNAsa-I no afecta la tasa de TH en comparación con el grupo tratado con vehículo, evidenciándose tan solo una pequeña área de sangrado 24 horas después de la MCAO (vehículo vs DNAsa-I;  $0,26 \pm 0,21 \text{mm}^3$  vs.  $0,21 \pm 0,14 \text{mm}^3$ ;  $p > 0,05$ . Figura 25A). La administración tardía de tPA (3 horas) aumentó considerablemente el volumen hemorrágico (vehículo vs tPA;  $0,26 \pm 0,21 \text{mm}^3$  vs.  $1,85 \pm 1,14 \text{mm}^3$ ;  $p < 0,01$ ; Figura 25 A y D), de acuerdo con trabajos previos de nuestro grupo en este mismo modelo experimental (García-Yébenes et al., 2011). Es importante señalar que la adición de DNAsa-I al tPA no solo no aumenta la aparición de TH sino que disminuye el volumen de hemorragia en los animales que reperfundan (Figura 26), efecto que puede tener una importante relevancia clínica ya que se podría administrar con el tPA con la seguridad de no potenciar los efectos hemorrágicos de éste. El tratamiento con DNAsa-I tampoco produjo signos de hemorragia cuando se utilizaron animales deficientes de TLR4 plaquetario.

Por último, el tratamiento crónico con aspirina no produjo ningún cambio en los efectos de la administración única de DNAsa-I aunque sí disminuyó de forma significativa la aparición de TH en el caso de co-administración de DNAsa-I+tPA ( $3,15 \pm 1,26 \text{mm}^3$  vs.  $1,69 \pm 0,89 \text{mm}^3$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 25B). Sin embargo, sí aumentó la hemorragia inducida por la administración tardía de tPA (tPA; aspirina vs vehículo;  $3,15 \pm 1,26 \text{mm}^3$  vs.  $1,85 \pm 1,14 \text{mm}^3$ .  $P < 0,05$ ; Figura 25 B y D), de acuerdo con los efectos adversos conocidos de este fármaco.



**Figura 25. Efecto del tratamiento con DNasa-I en la incidencia de transformación hemorrágica (TH). A-C.** Volumen de hemorragia determinada 24h tras la oclusión. **D.** Fotos representativas de la tinción con DAB de cada grupo experimental. Datos representados como la media  $\pm$  SEM. n=6-8; \*p< 0,05.



**Figura 26. Efecto del tratamiento con DNAsa-I en el volumen de hemorragia.** Volumen de hemorragia determinada 24h tras la oclusión en el grupo de animales tratados con tPA con/sin DNAsa-I. El estudio se ha realizado en los animales que han reperfundido en comparación con los no reperfundidos, determinado por los registros de la sonda Doppler. Datos representados como la media  $\pm$  SEM. n=6-8; \*p< 0,05.

## 2. EFECTO DE LOS RITMOS CIRCADIANOS EN EL TRATAMIENTO CON DNAsa-I EN EL ICTUS ISQUÉMICO. FUNCIÓN DE LOS NETS

### 2.1. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio del volumen de infarto

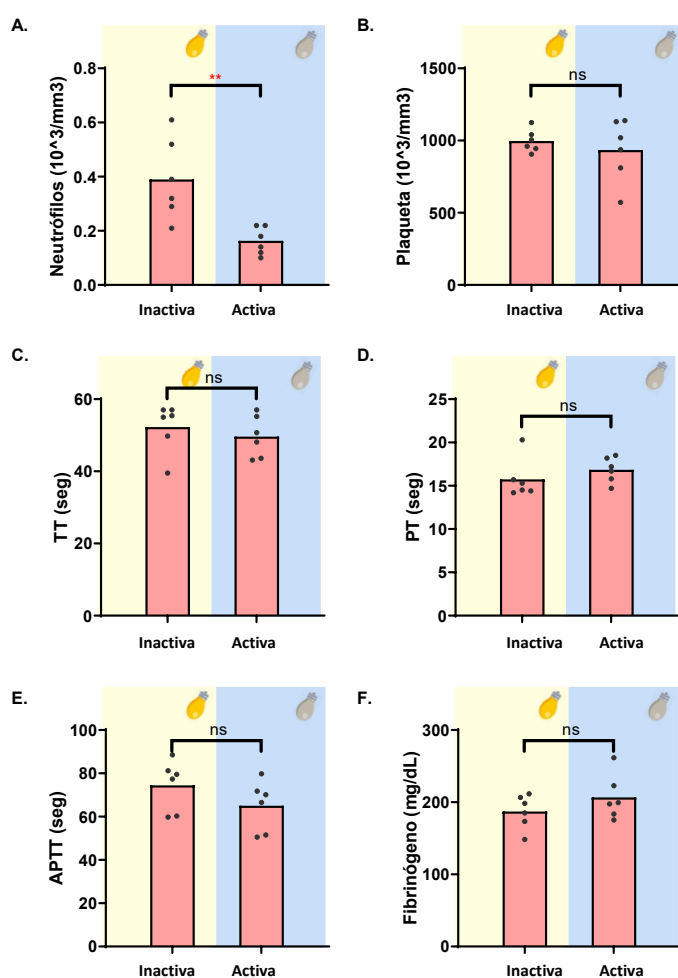
Como ya hemos comentado, los ritmos circadianos no sólo afectan la gravedad y el pronóstico del ictus, sino también la eficacia de los tratamientos como los propios antiagregantes o los antihipertensivos (Bonten et al., 2015; Bowles et al., 2018). Para estudiar cómo los ritmos circadianos influyen en el tratamiento con DNAsa-I, los animales fueron estudiados en 2 periodos ZT ("*Zeitgeber Time*"): ZT4-ZT7 que corresponde con la fase de luz que en los ratones es la fase inactiva, y ZT13-ZT16 que corresponde con la fase de oscuridad que en los ratones es la fase activa (opuesto a lo que ocurre en humanos). Cuando obtuvimos la sangre de los animales en las distintas fases (inactiva vs activa), solo se observa que durante la fase inactiva existe una neutrofilia en comparación con la fase activa ( $0,39\pm 0,15$  vs.  $0,16\pm 0,05$ ,  $p<0,01$ ; Figura 27A), de acuerdo con datos previos (Casanova-Acebes et al., 2013), sin afectarse ningún otro parámetro (nº de plaquetas y pruebas de coagulación; Figura 27B-F).

En los ratones WT, la MCAO produjo un infarto significativamente mayor en los animales durante la fase inactiva comparado con aquellos a los que se les realizó la oclusión durante la fase activa ( $18,5\pm 1,4\%$  vs.  $12,9\pm 1,7\%$   $p<0,01$ ; Figura 28A), de acuerdo con publicaciones previas (Kamat et al., 2021). Además, el tratamiento con DNAsa-I solo produjo su efecto protector durante la fase inactiva ( $18,5\pm 1,4\%$  vs  $13,4\pm 1,4\%$   $p<0,01$ ; Figura 28A), perdiéndose durante la fase activa ( $12,9\pm 1,7\%$  vs  $12,5\pm 1,4\%$   $p>0,05$ ; Figura 28A).

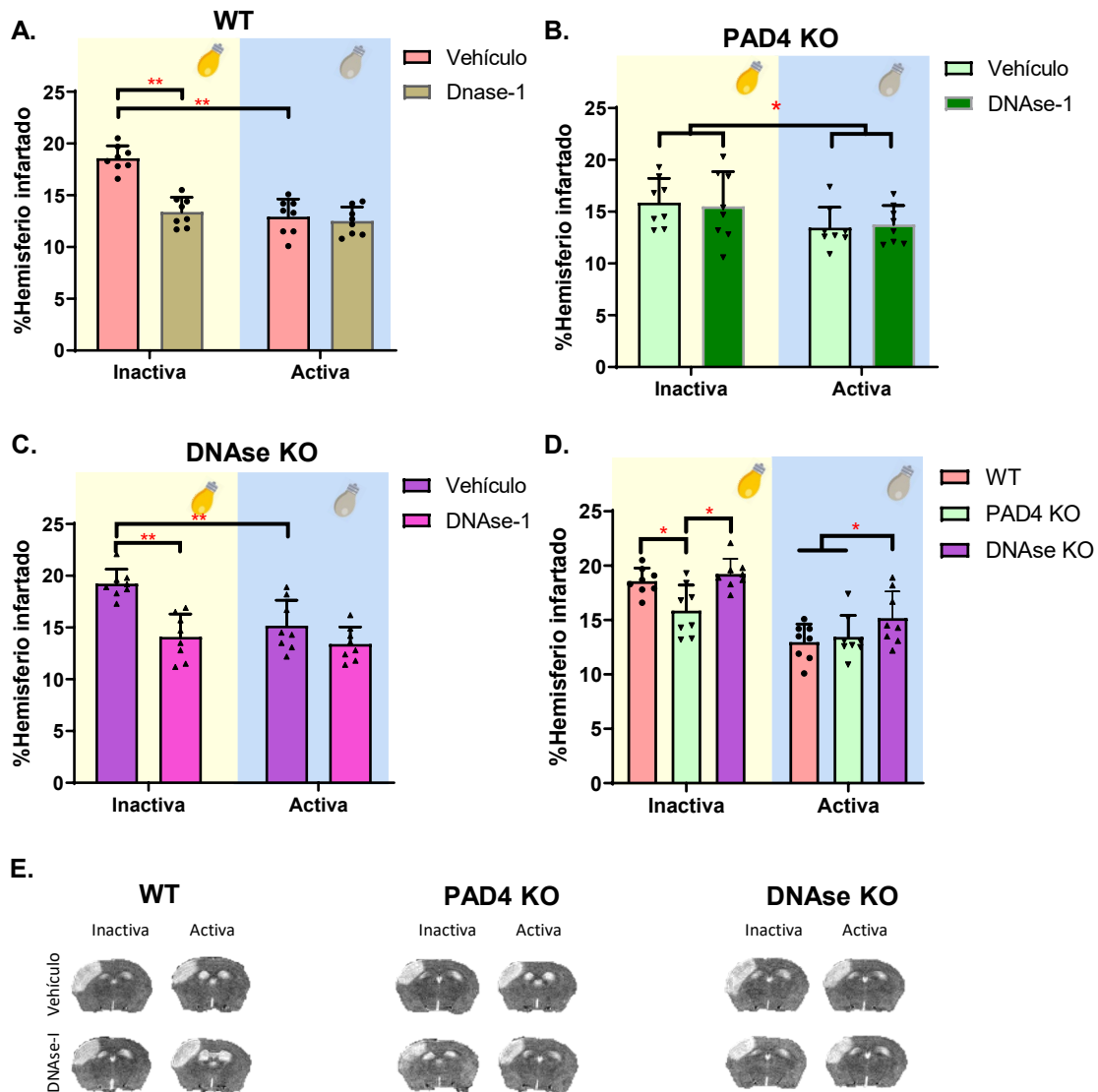
Para estudiar la implicación de los NETs en ambas fases se utilizaron dos aproximaciones genéticas: i) animales deficientes en PAD4 (PAD4 KO), enzima que está implicada, entre otros mecanismos, en la formación de NETs y en los que la formación de NETs estaría disminuida, y ii) animales deficientes en DNAsa (DNAsa1/DNAsa1I3 doble KO; DNAsa KO), enzima que degrada los NETs y en los que la formación de NETs estaría incrementada.

En los ratones PAD4 KO, los volúmenes de infarto fueron menores, en comparación con los ratones WT, sólo durante la fase inactiva (18,5±1,4 % vs 15,9±2,3 % p<0,05; Figura 28D). Este dato pone de manifiesto la implicación de los NETs en el daño isquémico al menos durante la fase inactiva. Sin embargo, existen otros mecanismos implicados en el daño, ya que la diferencia de volúmenes de infarto entre la fase inactiva y activa se mantiene también en estos animales (15,9±2,3 % vs 13,4±2,0 % p<0,05; Figura 28B). Como era de esperar, el tratamiento con DNAsa-I en los animales PAD4 KO no produjo ningún efecto protector, independientemente de la fase estudiada (Figura 28B).

En los ratones DNAsa KO, se obtuvieron resultados similares a los de los animales WT: infarto significativamente mayor durante la fase inactiva y en los que el tratamiento con DNAsa-I solo produjo su efecto protector durante la fase inactiva (Figura 28C, D).



**Figura 27. Efecto del ritmo circadiano en el hemograma y pruebas de coagulación.** A. Recuento de neutrófilos. B. Recuento de plaquetas. C-F. Pruebas de coagulación (TT tiempo de trombina, PT tiempo de protrombina, APTT tiempo de tromboplastina parcial activado, Fibrinógeno). Se representan como la media±SEM; n=6; \*p<0,05.



**Figura 28. Efecto del ritmo circadiano en el volumen de infarto.** A-D. Volúmenes de infarto, determinados 24 h tras la oclusión. E. Fotos representativas de los volúmenes de infarto, observados por resonancia magnética, de cada grupo experimental. Datos representados como la media  $\pm$  SEM, n=8, \*p<0,05, \*\*p<0,01.

## 2.2. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con

### DNAsa-I. Estudio del déficit neurológico

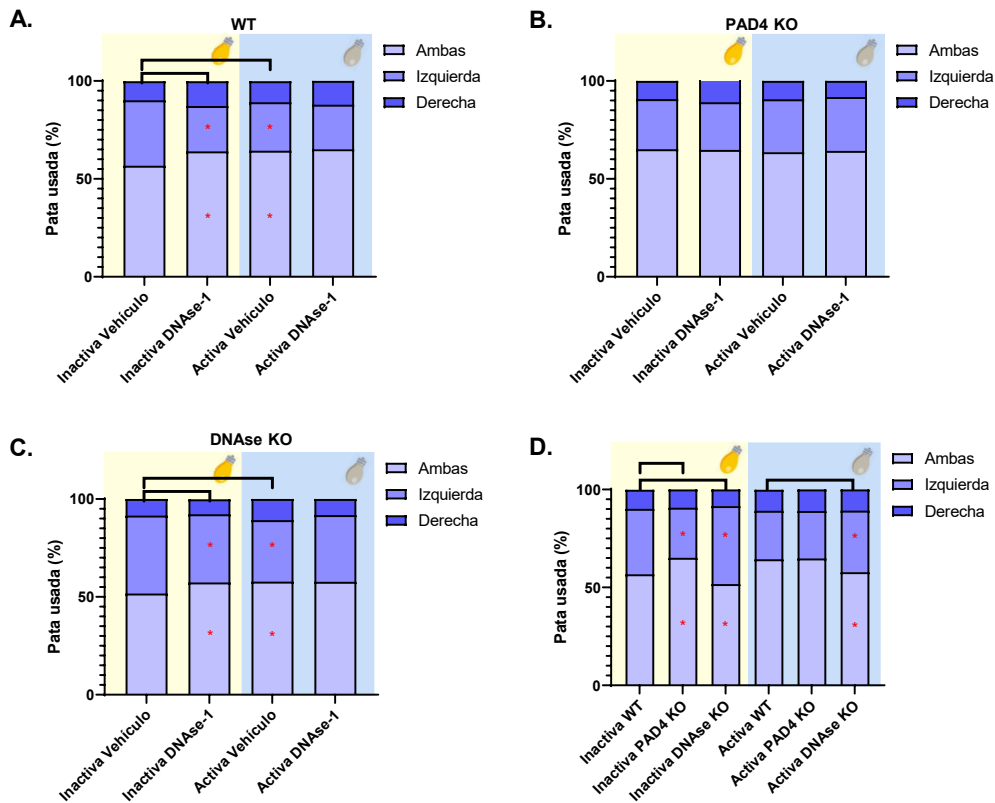
En primer lugar, en los ratones WT se observó un menor déficit neurológico durante la fase activa (Inactiva vs Activa. ambas patas  $56,7 \pm 4,3\%$  vs.  $64,4 \pm 6,3\%$ , pata izquierda  $33,4 \pm 3,7\%$  vs.  $24,7 \pm 4,0\%$ , \*p<0,05; Figura 29A) de acuerdo con el menor infarto encontrado durante la fase activa. También se observó un menor déficit neurológico tras el tratamiento con DNAsa-I

durante la fase inactiva (DNAsa-I vs Vehículo: ambas patas  $64,0 \pm 4,3\%$  vs.  $56,7 \pm 4,3\%$ , pata izquierda  $23,2 \pm 2,6\%$  vs.  $33,4 \pm 3,7\%$ , \* $p < 0,05$ ; Figura 29A).

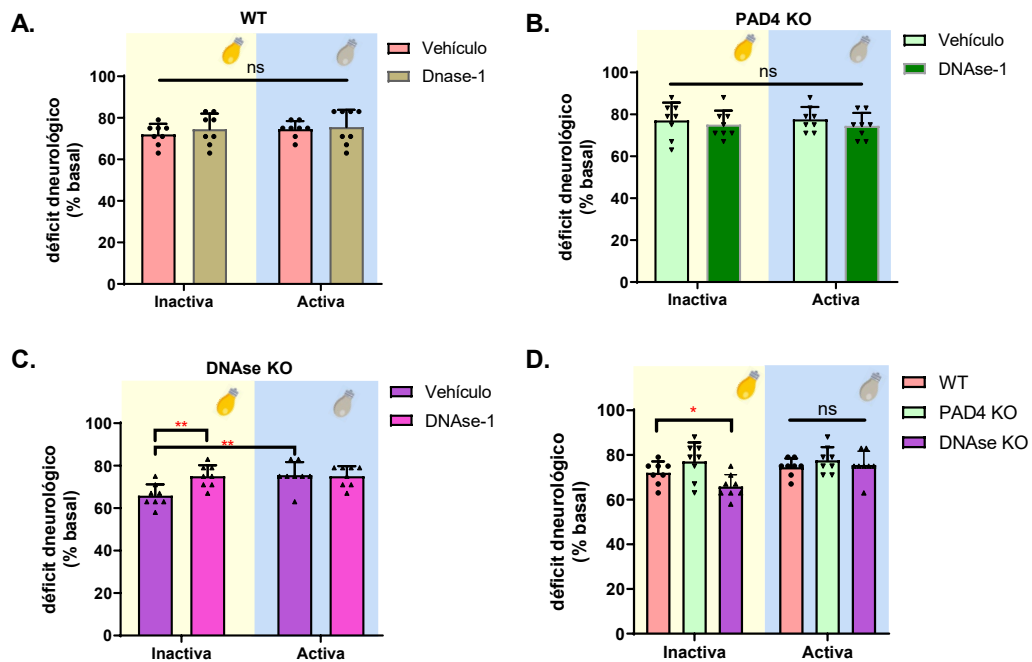
La escala de neuroseveridad, utilizada a las 24 horas después de la oclusión, mostró un mayor déficit neurológico en los ratones de DNAsa KO en comparación con los animales WT durante la fase inactiva ( $75,0 \pm 5,2\%$  vs.  $72,0 \pm 5,1\%$   $p < 0,05$ ; Figura 30D). También encontramos que el tratamiento con DNAsa-I en los ratones DNAsa KO mejora la función neurológica durante la fase inactiva cuando se compara con el grupo tratado con vehículo (DNAsa-I vs vehículo; inactiva:  $75,0 \pm 5,2\%$  vs.  $65,9 \pm 5,3\%$   $p < 0,01$ ; Figura 30C). Además, se observó una diferencia significativa en el déficit neurológico entre los animales tratados con vehículo entre la fase inactiva y la activa ( $65,9 \pm 5,3\%$  vs.  $75,5 \pm 6,2\%$ ,  $p < 0,01$ ; Figura 30C).

En los ratones PAD4 KO no se observaron cambios en el déficit neurológico (Figura 29B), lo que también está de acuerdo con la ausencia de diferencias en los volúmenes de infarto. En los ratones DNAsa-I KO encontramos los mismos resultados que en los animales WT: i) menor déficit neurológico durante la fase activa (Inactiva vs Activa: ambas patas  $51,7 \pm 4,3\%$  vs.  $57,8 \pm 3,7\%$ , pata izquierda  $39,8 \pm 3,9\%$  vs.  $31,4 \pm 4,1\%$ , \* $p < 0,05$ ; Figura 29C) y ii) menor déficit neurológico tras el tratamiento con DNAsa-I durante la fase inactiva (DNAsa-I vs Vehículo: ambas patas  $57,4 \pm 3,2\%$  vs.  $51,7 \pm 4,3\%$ , pata izquierda  $34,8 \pm 1,5\%$  vs.  $39,8 \pm 3,9\%$ . \* $p < 0,05$ ; Figura 29C), resultados que se correlacionan con los efectos encontrados en el volumen de infarto.

Por último, durante la fase inactiva y de acuerdo con las diferencias en los volúmenes de infarto, los ratones PAD4 KO presentaron una mejora neurológica frente a los ratones WT (PAD4 KO vs WT: ambas patas  $56,7 \pm 4,3\%$  vs.  $65,1 \pm 4,9\%$ , pata izquierda  $33,4 \pm 3,7\%$  vs.  $25,6 \pm 4,3\%$ . \* $p < 0,05$ ; Figura 29D). Los ratones DNAsa KO presentaron un mayor déficit neurológico en ambas fases frente a los de WT (DNAsa KO vs WT. Fase inactiva: ambas patas  $51,7 \pm 4,3\%$  vs.  $56,7 \pm 4,3\%$ , pata izquierda  $39,8 \pm 3,9\%$  vs.  $33,4 \pm 3,7\%$ . Fase activa: ambas patas  $57,8 \pm 3,7\%$  vs.  $64,4 \pm 6,3\%$ , pata izquierda  $31,4 \pm 4,1\%$  vs.  $24,7 \pm 4,0\%$ . \* $p < 0,05$ ; Figura 29D).



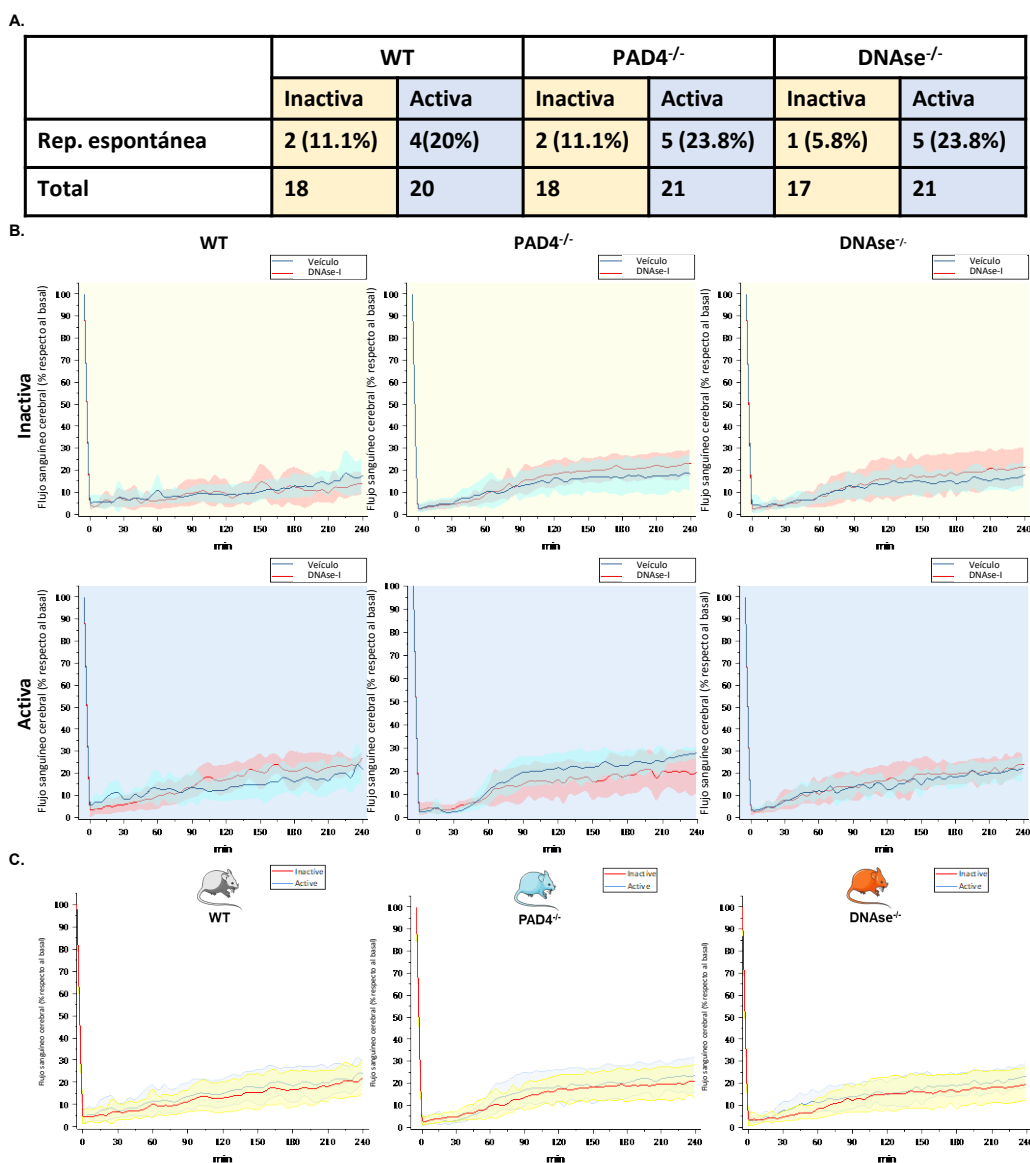
**Figura 29. Efecto del ritmo circadiano en el déficit neurológico. A-D.** Evaluación del déficit neurológico medido por la prueba de cilindro. Se representan como los porcentajes de la frecuencia de uso de la pata izquierda, la pata derecha y ambas patas. n=8; \*p<0,05.



**Figura 30. Efecto del tratamiento con DNasa-I en el déficit neurológico. A-D.** Evaluación del déficit neurológico medido por la escala de neuroseveridad. Se representan como la media ± SEM; n=8; \*p<0,05; \*\*p<0,01.

### 2.3. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de la incidencia de reperfusión

Un hallazgo de importancia es que los animales con la oclusión -MCAO- durante la fase activa, lo que se corresponde con un menor tamaño de infarto, tuvieron mayor porcentaje de reperfusiones espontáneas cuando se comparan con aquellos durante la fase inactiva (Figura 31A, C), lo que sugiere que la reperfusión también tiene una regulación circadiana. El tratamiento con DNAsa-I no produjo ningún cambio en los porcentajes de reperfusión en ambas fases estudiadas y en los grupos propuestos (Figura 31B).



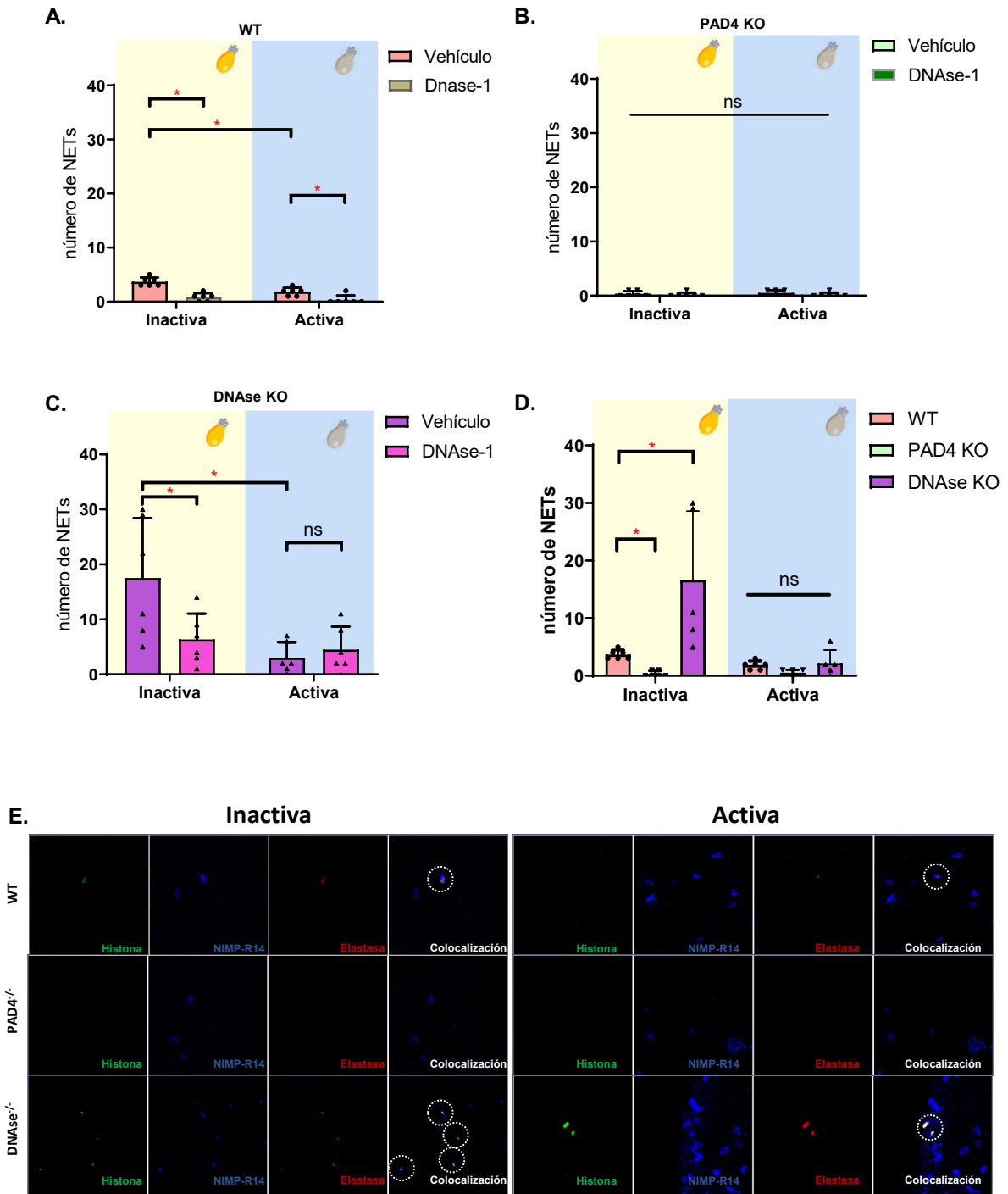
**Figura 31. Efecto del ritmo circadiano en la incidencia de reperfusión. A.** Reperfusión medida por la sonda doppler hasta 4 horas después de la oclusión. Cuadro explicativo de reperfusiones espontáneas. **B-C.** Registros de Doppler según el genotipo de los ratones y sus ritmos circadianos. Se representan como %; n=8.

## 2.4. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de la presencia de NETs en el área infartada

En los animales WT, el tratamiento con DNAsa-I reduce los niveles de NETs presentes en el área isquémica a las 24 horas después de la oclusión cuando se compara con el grupo tratado con vehículo y en ambas fases, inactiva y activa (DNAsa-I vs vehículo; inactiva:  $0,8 \pm 0,7$  vs.  $3,7 \pm 0,8$ , activa:  $0,3 \pm 0,8$  vs.  $1,8 \pm 0,7$   $p < 0,05$ ; Figura 32A). Estos datos apoyan que el efecto protector de la DNAsa-I se debe, al menos en parte, a la disminución de la presencia de NETs. Además, se observó una diferencia significativa en los niveles de NETs entre los animales tratados con vehículo entre la fase inactiva y la activa ( $0,8 \pm 0,7$  vs.  $0,3 \pm 0,8$   $p < 0,05$ ; Figura 32A), lo que se correlaciona con el volumen de infarto y pone de manifiesto de nuevo la posible participación de los NETs en el daño isquémico.

En los ratones PAD4 KO, lo primero que observamos es que los niveles de NETs son inferiores en todos los grupos a los observados en los WT y, en particular y de forma significativa, durante la fase inactiva ( $0,3 \pm 0,5$  vs.  $0,8 \pm 0,7$   $p < 0,05$ ; Figura 32D). El tratamiento con DNAsa-I en este grupo de animales no produjo ningún efecto, independientemente de la fase (Figura 32B).

En los ratones DNAsa KO, lo primero que observamos es que los niveles de NETs son superiores a de los animales WT. Además, encontramos que el tratamiento con DNAsa-I, en la fase inactiva, reduce la concentración de NETs cuando se compara con el grupo tratado con vehículo (DNAsa-I vs vehículo; inactiva:  $6,3 \pm 4,7$  vs.  $17,5 \pm 10,9$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 32C). Asimismo, se observó una diferencia significativa en los niveles de NETs entre los animales tratados con vehículo entre la fase inactiva y la activa ( $17,5 \pm 10,9$  vs.  $3,0 \pm 2,8$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 32C).



**Figura 32. Efecto del ritmo circadiano en la presencia de NETs del área infartada. A-D.** Número de NETs por el campo visual analizado en la corteza cerebral a las 24 horas tras la oclusión. **E.** Fotos representativas del triple inmunofluorescencia de NETs. Neutrófilo (NIMP-R14), la elastasa del neutrófilo y la histona citrulinada-3. Datos representados como media  $\pm$  SEM; n=5-6 \*p<0,05.

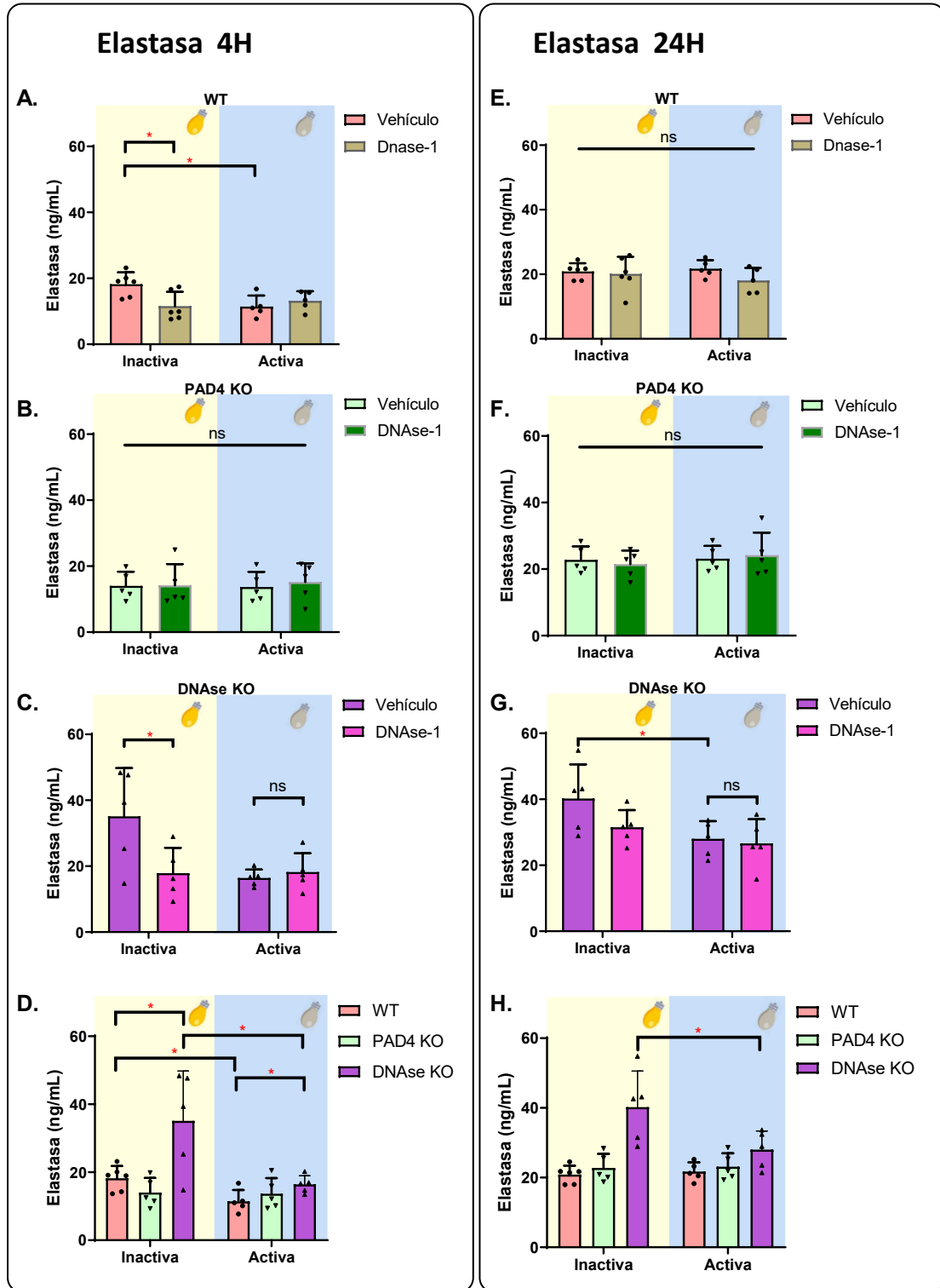
## 2.5. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de los niveles plasmáticos de elastasa

En los animales WT, los resultados de niveles plasmáticos de elastasa a las 4 horas después de la oclusión muestran que el tratamiento con DNAsa-I en la fase inactiva reduce los niveles de elastasa cuando se compara con el grupo tratado con vehículo (DNAsa-I vs vehículo; inactiva:  $11,6 \pm 4,3$  vs  $18,2 \pm 3,6$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 33A). Estos datos indican que el efecto protector de la DNAsa-I se debe, en parte, a la disminución de los niveles de NETs. Además, se observa una diferencia significativa en los niveles de elastasa entre los animales tratados con vehículo entre la fase inactiva y la activa ( $18,2 \pm 3,6$  vs.  $11,4 \pm 3,3$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 33A), lo que se correlaciona con el volumen de infarto y pone de manifiesto de nuevo la participación de los NETs en el daño isquémico.

En los ratones PAD4 KO, no observamos ningún cambio en los niveles de elastasa en ninguno de los grupos estudiados (Figura 33B).

En los ratones de DNAsa KO, como era de esperar, los niveles de elastasa fueron superiores a los observados en los animales WT. En este grupo, el tratamiento con DNAsa-I en la fase inactiva redujo la concentración de elastasa cuando se compara con el grupo tratado con vehículo (DNAsa-I vs vehículo; inactiva:  $35,1 \pm 14,6$  vs  $17,9 \pm 7,7$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 33C). Además, se observó una diferencia significativa en los niveles de elastasa entre los animales tratados con vehículo entre la fase inactiva y la activa ( $35,1 \pm 14,6$  vs.  $16,4 \pm 2,6$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 33D), de acuerdo con los datos anteriormente descritos.

En el plasma, a las 24 horas después de MCAO, solo observamos un aumento de los niveles de elastasa en los ratones DNAsa KO entre la fase inactiva y la fase activa ( $40,2 \pm 10,4$  vs.  $28,0 \pm 5,4$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 33E-H), de acuerdo con su menor degradación en este genotipo.

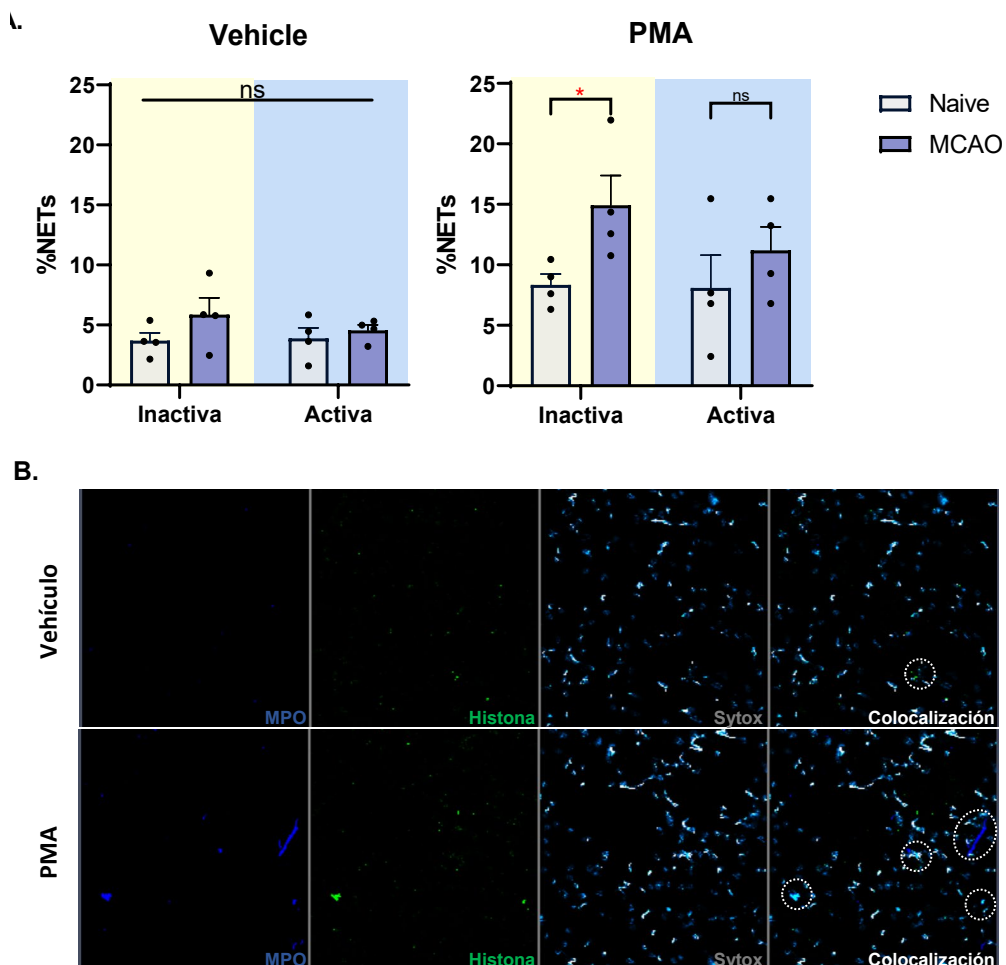


**Figura 33. Efecto del ritmo circadiano en los niveles plasmáticos de elastasa. A-D.** Niveles plasmáticos de elastasa a las 4 horas tras la oclusión. **E-H.** Niveles plasmáticos de elastasa a las 24 horas tras la oclusión. Datos representados como media  $\pm$  SEM; n=5-6 \*p<0,05.

## 2.6. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de la NETosis ex vivo

Para seguir estudiando la implicación de los NETs en el daño isquémico y en el mecanismo protector del tratamiento de la DNAsa-I, quisimos explorar la capacidad que tienen los neutrófilos de producir NETs *ex vivo*. Para ello extrajimos neutrófilos de la sangre 12 horas después de MCAO, que se cultivaron *in vitro* y se estimularon con PMA para activar la formación de NETs.

Los resultados ponen de manifiesto que los neutrófilos extraídos de ratones MCAO durante la fase inactiva tienen mayor capacidad de producir NETs que aquellos extraídos de animales naive ( $14,9 \pm 4,9$  vs.  $8,4 \pm 1,8$ ,  $p < 0,05$ ; Figura 34A). Este aumento frente a los naive no se observó en los neutrófilos tras MCAO en la fase activa.



**Figura 34. Efecto del ritmo circadiano en los niveles de NETs *ex vivo* estimulado por PMA. A.** El número estimado de los NETs en la placa ibidi. Se representan como la media  $\pm$  SEM;  $n=4$ ; t-test \*  $p < 0,05$ . **B.** Imágenes representativas de triple inmunofluorescencia de núcleo de neutrófilo (sytox green), MPO e histona.

## 2.7. Efecto del ritmo circadiano en el efecto protector del tratamiento con DNAsa-I. Estudio de la infiltración y polarización del neutrófilo

Al comparar las cortezas cerebrales a las 24h de la MCAO en los grupos WT y PAD4 KO, y durante las fases activa e inactiva, se observó en ambos grupos un mayor número de neutrófilos durante la fase activa, que además se correspondió con un mayor porcentaje de neutrófilos YM1+ (N2) (WT 185,7±53,8 vs. 94,2±25,0, p<0,01; PAD4 KO 141,9±42,7 vs. 100,4±31,0, p<0,05; Figura 35 y Figura 36A-B). Estos datos sugieren que el menor tamaño de infarto encontrado durante la fase activa se asocia a un mayor número de neutrófilos antiinflamatorios -N2-, previamente descritos por nuestro grupo (Cuartero et al., 2013; García-Culebras et al., 2019).

Por su parte, el tratamiento con DNAsa-I no afectó ni la infiltración ni la polarización de neutrófilos en los ratones WT y PAD4 KO durante ambas fases. (Figura 35 y Figura 36A-C).

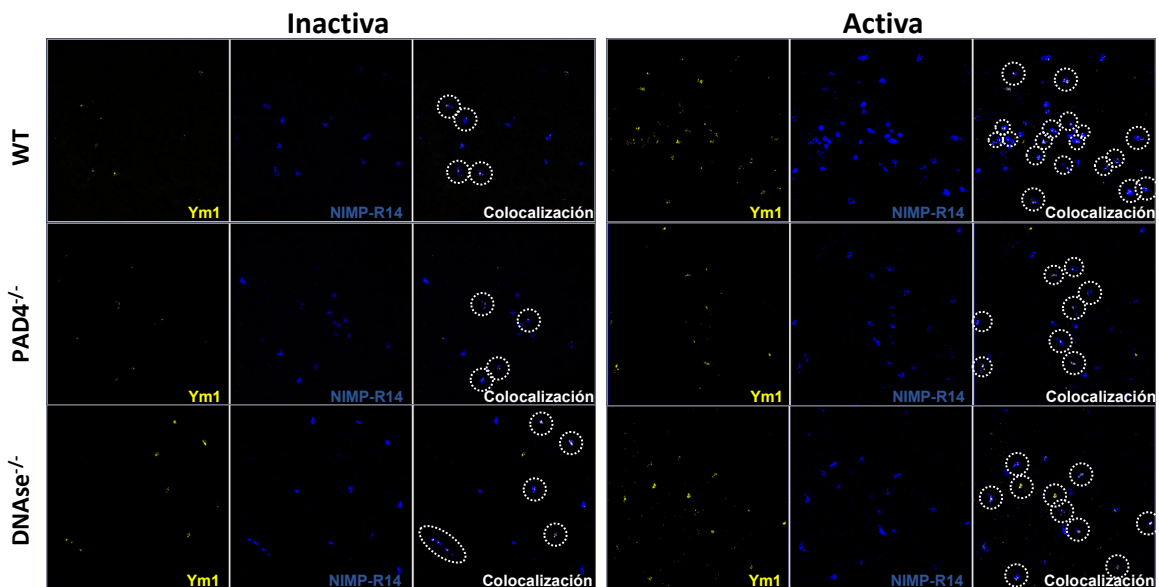
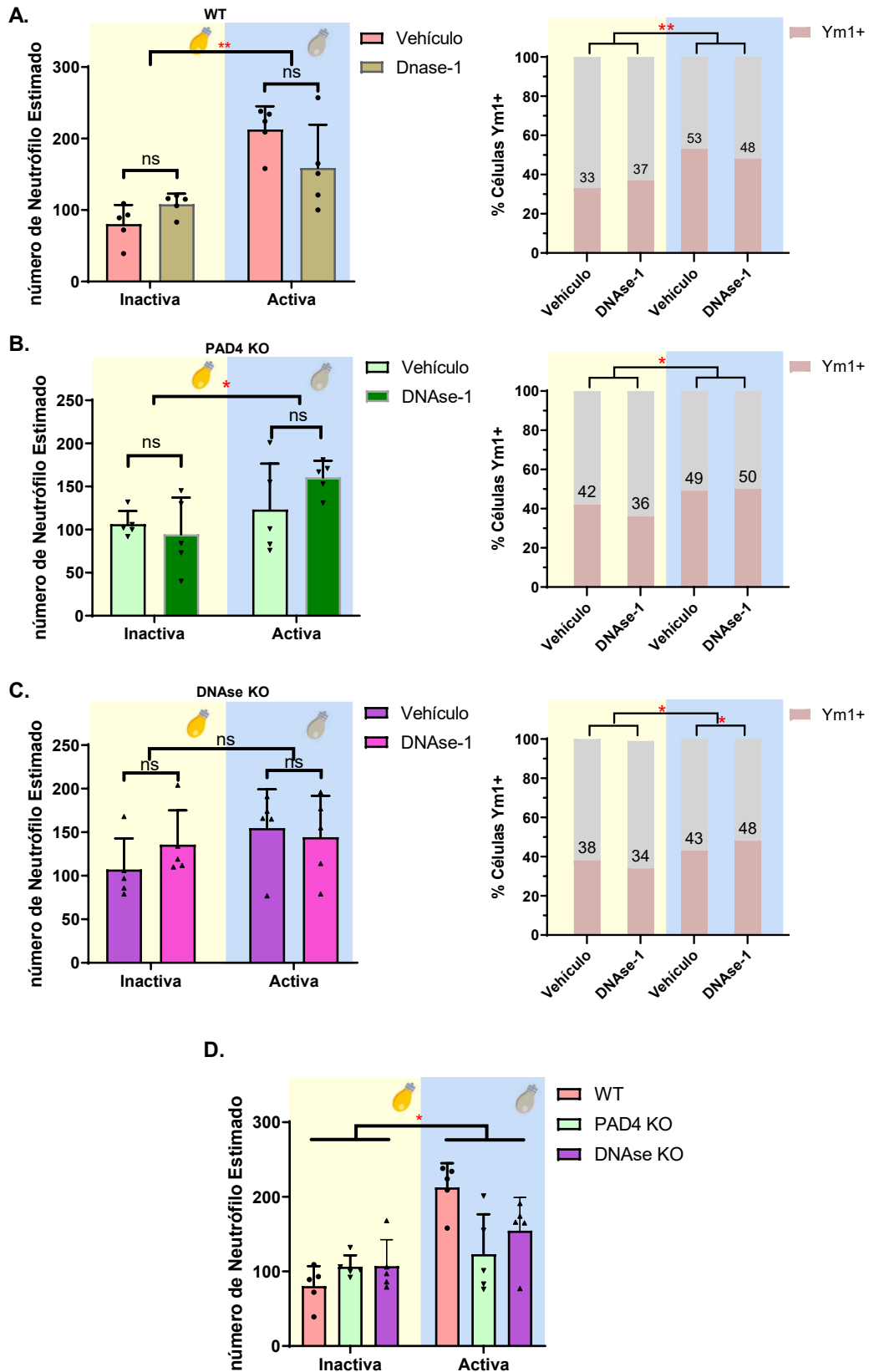


Figura 35. Imágenes representativas de doble inmunofluorescencia. neutrófilo (NIMP-R14) y neutrófilos tipo 2 (N2, Ym1+).



**Figura 36. Efecto del ritmo circadiano en la infiltración y polarización del neutrófilo en el área isquémica. A-D.** Números estimado de neutrófilos en la corteza cerebral estudiados a las 24 horas después de la oclusión y proporción de neutrófilos Ym1+. Se representan como la media  $\pm$  SEM; n=5; t-test \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .



## **DISCUSIÓN**



El ictus, una enfermedad cerebrovascular provocada por la formación de trombos, se asocia con tasas elevadas de morbilidad y mortalidad. Los neutrófilos son los primeros en ser reclutados en el cerebro tras un ictus, agravando la lesión cerebral a través de diversos mecanismos. Los NETs, como un novedoso mecanismo de regulación de los neutrófilos, pueden atrapar bacterias y secretar moléculas antimicrobianas, descomponiendo así factores patogénicos y eliminando bacterias. Sin embargo, también pueden exacerbar enfermedades no infecciosas al activar respuestas autoinmunes o inflamatorias. En los últimos años, se ha descrito que los NETs desempeñan un papel crucial en el proceso patológico del ictus. Participan en él a través de varios mecanismos, como la promoción de la coagulación y su interacción con las plaquetas, induciendo trombosis. El activador tPA induce la degranulación de los neutrófilos, formando NETs y provocando TH y resistencia trombolítica. La regulación de los NETs en el contexto del ictus, su potencial como biomarcadores y las terapias dirigidas a los NETs son temas cruciales. La creciente evidencia sugiere que los NETs pueden ser un objetivo terapéutico en el tratamiento del ictus.

Esta tesis doctoral profundiza en el papel de los NETs en el infarto cerebral, a través del efecto que produce la DNAsa-I, como fármaco que produce la degradación de los NETs y su interacción con los fármacos antiplaquetarios, el receptor plaquetario TLR4 y los ritmos circadianos en el ictus.

## **1. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON DNAsa-I EN EL ICTUS ISQUÉMICO.**

### **FUNCIÓN DE LOS NETs Y DEL RECEPTOR TLR4 PLAQUETARIO**

Es conocido que la eficacia de la trombólisis intravenosa se ve influenciada por la composición de los trombos; específicamente, se sabe que los coágulos ricos en fibrina se asocian con resultados clínicos menos favorables (Jolugbo y Ariëns, 2021), de ahí la importancia de usar modelos animales de ictus con trombos ricos en fibrina para aumentar la traslación a la clínica de los resultados experimentales.

El modelo “tromboembólico in situ” por inyección de trombina que produce trombos ricos en fibrina, se desarrolló en 2007 (Orset et al., 2007) y fue nuestro laboratorio quien describió que la administración tardía de tPA producía transformación hemorrágica -TH- (García-Yébenes et al., 2011, 2014). Las principales ventajas de este modelo radican en su semejanza con la clínica y su baja tasa de mortalidad, ya que induce un infarto cortical. Para mantener la estabilidad del trombo durante un período de 3h, durante el cual se registra el flujo sanguíneo, se utiliza una micropipeta. Dicha micropipeta permite administrar la trombina de forma precisa en la parte proximal de la arteria cerebral media, atravesando la bifurcación arterial, lo que determina un control preciso del tiempo de liberación de la trombina para aumentar la estabilidad del trombo. Este enfoque también reduce el riesgo de sangrado relacionado con procedimientos quirúrgicos, ya que minimiza el daño arterial causado por la micropipeta, lo que a su vez mejora significativamente la tasa de éxito del modelo. Usando este modelo conseguimos unos porcentajes de oclusiones estables del 88%, similar a lo publicado en el trabajo original (Orset et al., 2007). Elegimos un período de tratamiento de 3h para la administración de tPA para el estudio de la TH, basándonos en nuestro estudio previo (García-Yébenes et al., 2011, 2014). El metabolismo acelerado de los roedores conlleva una mayor susceptibilidad isquémica, y un tratamiento a las 3h se considera tardío. De esta manera, podemos evaluar la eficacia de la DNAsa-I, sola o con tPA, como tratamiento en fase tardía.

## **DNAsa-I**

Nuestros nuevos datos demuestran que la administración tardía de **DNAsa-I tiene un efecto protector** en un modelo de ictus con trombos ricos en fibrina. Dicho efecto se manifiesta por una reducción del infarto y por una mejora neurológica. Estos datos son de gran importancia ya que el efecto protector de la DNAsa-I no sólo se restringe a ictus producidos por trombos ricos en plaquetas, como habíamos demostrado (Peña-Martínez et al., 2019), sino que se amplía a otros tipos de ictus. El efecto protector de la DNAsa-I se puede deber a varios mecanismos: i) a un efecto protector directo; ii) a un efecto en la reperusión del gran vaso; iii) a una disminución de los fenómenos microtrombóticos “no-reflujo” (no-reflow) dependientes de NETs y iv) a cambios en la infiltración y/o polarización de los neutrófilos entre otros.

La **DNAsa-I**, al favorecer la degradación de NETs, podría tener propiedades protectoras directas, ya que los NETs han sido implicadas en el daño cerebral. Concretamente, los neutrófilos, como primer grupo de células que se infiltran en el tejido cerebral dañado, producen NETosis en el parénquima cerebral y en la sangre periférica que agravan la inflamación y el posterior daño cerebral tras el ictus (Kim et al., 2019). La NETosis también se asocia a la gravedad y mortalidad en los pacientes con ictus (Vallés et al., 2017). Nuestros datos demuestran que el tratamiento con DNAsa-I produce una disminución importante de la presencia de NETs en la corteza cerebral y una disminución de la elastasa plasmática a tiempos muy tempranos -4 horas después de la oclusión- (elastasa como marcador de NETs; Huang et al., 2020). Este resultado se apoya por la correlación positiva que hemos encontrado entre la presencia de NETs en la corteza y los niveles plasmáticos de elastasa a las 4 horas. La falta de efecto en los niveles plasmáticos de elastasa a las 24 horas después de la oclusión se puede deber a la propia curva temporal de la NETosis tras un ictus de acuerdo a publicaciones previas (Cai et al., 2020) o al mismo efecto inhibitor de la segunda dosis de DNAsa-I administrada 12 horas después de la oclusión. Aunque no hemos observado que la DNAsa-I modifique la infiltración de neutrófilos, sí hemos encontrado una correlación positiva entre la presencia de NETs en la corteza cerebral con la infiltración de neutrófilos. Estos resultados demuestran que **la DNAsa-I protege a través de un mecanismo directo reduciendo los NETs**. Nuestros datos corroboran datos previos de nuestro laboratorio demostrando un efecto protector de DNAsa-I en este mismo modelo y en un modelo permanente de MCAO (Peña-Martínez et al., 2022). En este sentido es importante destacar que el tratamiento con DNAsa-I sí es capaz de disminuir el aumento de la infiltración de neutrófilos que produce la administración de tPA y también disminuye los niveles de NETs como veremos más adelante. Entre los mecanismos descritos por los que los neutrófilos producen NETosis podemos destacar HMGB1 y el receptor TLR4, JAK-STAT1 y LRP-1 (Hidalgo et al., 2022; Zhao et al., 2023). Nuestro grupo había demostrado que el TLR4 plaquetario media la formación de NETs en el modelo rico en plaquetas (Peña-Martínez et al., 2019), y ahora demostramos que también media la formación de NETs, al menos en parte, en el modelo rico en fibrina como lo sugiere por una parte el menor volumen de infarto que encontramos en los animales deficientes de TLR4 plaquetario y por otra que la propia DNAsa-I deja de proteger en estos animales y con este modelo. Esto concuerda con

datos de la literatura (Clark et al., 2007) que muestran que el TLR4 plaquetario es responsable de la activación de los neutrófilos para liberar su contenido al espacio extracelular. Curiosamente, el agonista de TLR4, HMGB1 produce NETosis en enfermedades no infecciosas (Ma et al., 2016) y en modelos de trombosis venosa profunda (Stark et al., 2016) lo que apunta que esta molécula podría inducir NETosis en nuestro sistema. Se requieren más estudios para ver la implicación de JAK-STAT1 y LRP-1 en nuestro modelo.

La **DNAsa-I no modifica los índices de reperfusión** del flujo sanguíneo en este modelo y medido hasta 4 horas después de la oclusión. Sin embargo, no podemos descartar la posible recanalización en las siguientes 20 horas previas al sacrificio, cuestión que debería explorarse en futuros estudios. Estos resultados concuerdan con resultados previos que muestran que los niveles más bajos de NETs en trombos producidos por fibrina hacen que la administración de DNAsa-I sea ineficaz (Mountford et al., 2015) y con datos preliminares publicados por nuestro grupo en este modelo de ictus (Peña-Martínez et al., 2022), También concuerda con el efecto encontrado en los modelos de trombos ricos en plaquetas -con aumento de NETs- en los que la DNAsa-I era capaz de recanalizar con éxito el vaso sanguíneo ocluido (Peña-Martínez et al., 2019). Es importante señalar que cuando los niveles de NETs están incrementados, como por ejemplo tras la administración de tPA que induce NETosis (Wang et al., 2021), la co-administración de DNAsa-I aumenta de forma significativa la reperfusión, como veremos más adelante. Además, en los animales deficientes de TLR4 plaquetario que tienen niveles más bajos de NETs, el tPA induce un índice de reperfusión superior lo que está sugiriendo que los NETs contribuyen al fenómeno de no reperfusión.

La **DNAsa-I, al prevenir la formación de microtrombosis y fenómenos de "no reflujo"**, puede tener también efectos neuroprotectores. Es bien sabido que la eliminación del coágulo y recanalización de los vasos no siempre van acompañadas de reperfusión tisular, un fenómeno denominado "no reflujo" que se produce tanto a nivel cardíaco como cerebral (Kloner et al., 2018). Sólo alrededor del 50% de los pacientes tratados con tPA tienen reperfusión exitosa. Es probable que múltiples mecanismos contribuyan al fenómeno de ausencia de flujo microvascular, entre ellos la disfunción de las células endoteliales, la

microtrombosis, la acumulación de neutrófilos y la formación de NET, entre otros (Thålin et al., 2016; El Amki et al., 2020). En este contexto, varios estudios han demostrado la existencia de oclusiones en vasos de pequeño calibre adyacentes a la zona infartada (El Amki et al., 2020). La obstrucción microvascular del 20-30% de los capilares del core y la penumbra se han asociado a neutrófilos adheridos a capilares distales; además, la eliminación de los neutrófilos circulantes mediante un anticuerpo anti-Ly6G, restaura la perfusión microvascular sin aumentar la incidencia de hemorragia (El Amki et al., 2020). Cabe destacar que se ha demostrado la implicación de los NET en los fenómenos de microtrombosis (Thålin et al., 2016), de hecho, la administración de Cl-amidina que inhibe la producción de NETs, mejora la función microcirculatoria coronaria (Wang et al., 2023). Por tanto, los NET podrían estar participando en la formación de pequeños trombos generados tras la oclusión de un vaso grande, de tal forma que la DNAsa-I (al favorecer la degradación de las NETs) podría ser beneficiosas en la resolución de los fenómenos de microtrombosis asociados al ictus, un hecho que merece ser estudiado con más detalle.

Por último, uno de los mecanismos clásicos implicados en el daño cerebral tras un ictus es la **infiltración de los neutrófilos**, habiéndose descrito una correlación positiva entre neutrófilos infiltrados y daño cerebral. Además, nuestro grupo había demostrado que la ausencia total de TLR4 se asociaba con un menor volumen de infarto y de forma sorprendente con una mayor infiltración de neutrófilos que comprobamos, eran neutrófilos de fenotipo anti-inflamatorio -N2- (García-Culebras et al., 2019). En este contexto se ha descrito que la capacidad de NETosis de los neutrófilos también depende de su fenotipo y de su edad (Hidalgo et al., 2022). Nuestros resultados muestran que el efecto protector de la **DNAsa-I no se asocia ni a cambios en la infiltración ni en la polarización de los neutrófilos**. Sin embargo, sí que hemos encontrado que el aumento de infiltración de neutrófilos que produce el tratamiento con tPA y que ya fue descrito previamente (Shi et al., 2021), está disminuido en los animales a los que se les co-administra la DNAsa-I. La DNAsa-I se ha descrito que inhibe la infiltración de neutrófilos a nivel pulmonar en un modelo animal de hemorragia subaracnoidea (Wu et al., 2022), pero no existen trabajos que lo relacionen con infiltración a nivel cerebral. Este resultado, de nuevo, merece ser estudiado con mayor profundidad.

El tratamiento con **DNAsa-I no produce sangrado**. Tras la administración de DNAsa-I sólo se evidencia una pequeña área de sangrado, tipo petequiral, 24 horas después de la MCAO, igual que encontramos en los animales WT. En este aspecto, se considera que la hemorragia petequiral puede indicar una reperfusión temprana en el tejido cerebral aún viable, lo que la convierte en un posible marcador de buen pronóstico (Molina et al., 2002). Además, la co-administración de DNAsa-I tampoco modifica la TH inducida por el tPA como comentaremos más adelante.

### Co-administración de DNAsa-I con tPA

La **adición de DNAsa-I al tratamiento con tPA** no incrementa la transformación hemorrágica (TH) inducida por la administración tardía del trombolítico. Este resultado es muy importante desde un punto de vista clínico, ya que hemos comentado que la TH se presenta en alrededor del 10% al 40% de los pacientes y está vinculada a un aumento en la morbilidad y mortalidad (Terruso et al., 2009). La gravedad de la TH puede variar desde un sangrado microscópico hasta hemorragias más extensas. En el ser humano, se ha asociado el aumento en el tiempo transcurrido desde el inicio de la isquemia hasta la reperfusión con un incremento en el riesgo de TH, en pacientes tratados como no tratados con tPA (Copin y Gasche, 2008).

Es conocido que la alteración de la BHE, las propias células periféricas y diversas moléculas como la MMP9, juegan un papel fundamental en la formación de TH durante el ictus isquémico (Arba et al., 2021). Nosotros, ahora, demostramos que la adición de DNAsa-I al tratamiento con tPA, reduce por una parte los aumentos de la presencia y niveles plasmáticos de **NETs** inducidos por el tPA y por otra el aumento de **infiltración neutrofílica** producida por el tPA.

La disminución de los niveles de NETs parece ser un papel crucial en la destrucción de la BHE. Los NETs pueden dañar el endotelio vascular y aumentar la permeabilidad vascular al producir proteasas citotóxicas, como histonas, elastasa, MPO y mediadores proinflamatorios. Los neutrófilos que producen NETs intravasculares e intraparenquimatosas alcanzan su

máximo a los 3-5 días. La sobreexpresión de PAD4 induce un aumento de la formación de NET que se acompaña de un aumento del daño de la BHE. La eliminación de neutrófilos reduce la ruptura de la BHE. Además, la eliminación de NETs por DNAsa-I y la inhibición de la formación de NET por ablación genética o inhibición farmacológica de PAD4 aumenta la reparación vascular y mejora la recuperación funcional (Kang et al., 2020). El tPA estimula directamente a los neutrófilos de ratones isquémicos para liberar NETs mediante la regulación positiva de LRP-1 y PAD4 (Wang et al., 2021) y su eliminación con DNAsa-I reduce la degradación y la alteración de la BHE, disminuyendo la hemorragia inducida por tPA (Wang et al., 2021).

Por otro lado, ya hemos comentado en la introducción la importancia de la MMP en los procesos de TH. La propia administración intravenosa de tPA puede aumentar los niveles de MMP-9 al activar los neutrófilos (Lakhan et al., 2013) y el propio tPA promueve la acumulación de neutrófilos en el cerebro isquémico (Guo et al., 2018). Los neutrófilos y el tejido cerebral son fuentes importantes de MMP-9 dentro de las primeras 24 h después del ictus (Jickling et al., 2014). Además, es importante destacar que el agotamiento de los neutrófilos previene la hemorragia cerebral inducida por el tPA (Gautier et al., 2014). Nuestros datos demostrando que la DNAsa-I reduce la infiltración neutrofílica inducida por tPA es de gran importancia para disminuir la TH.

La adición de **DNAsa-I al tratamiento con tPA** produce **un aumento del índice de recanalización arterial exitosa** que se asocia con una **disminución del volumen de hemorragia**. Ya hemos comentado que la tasa de recanalización arterial precoz tras la administración de tPA es baja (menos de la mitad de los pacientes que reciben este tratamiento). En la actualidad se desconocen las causas exactas de esta “resistencia al tPA” pero se cree que la composición del trombo desempeña un papel importante, siendo especialmente resistentes aquellos ricos en plaquetas (Jang et al., 1989). Diferentes estudios han demostrado que el contenido de NETs en el trombo se asocia con un mal pronóstico en el infarto de miocardio y el ictus, y que puede ser uno de los mecanismos responsables de la resistencia al tPA (Mangold et al., 2015; Laridan et al., 2017; Ducroux et al., 2018). Algunos autores plantean que el ADN libre de células (cfADN), principal estructura de los NET, podría ser la causa principal de la resistencia a la

fibrinólisis. Los autores demuestran que la degradación del cfADN con DNAsa-I mejora la fibrinólisis del tPA en modelos de hemorragia intraventricular en ratas (Xie et al., 2021). Ya hemos comentado que niveles bajos de NETs hacen que la administración de DNAsa-I sea ineficaz (Mountford et al., 2015) y que niveles elevados de NETs hacen que la reperfusión con DNAsa-I sea muy eficaz como nuestro grupo demostró en un modelo de trombosis rico en plaquetas y rico en NETs (Peña-Martínez et al., 2019). Ya hemos expuesto previamente la implicación de los NETs en los procesos de microtrombosis y no-reflujo. En este sentido, en un modelo de infarto de miocardio, las microtrombosis mediada por NET también puede contribuir al "no reflujo" miocárdico. Los autores demuestran que la combinación de DNAsa-I con tPA muestra un papel protector en la recuperación de la función miocárdica (Ge et al., 2015). Por tanto, el aumento de los niveles de NETs inducido por el tPA, que ya había sido descrito (Wang et al., 2021), hace que la co-administración de DNAsa-I mejore la reperfusión y disminuya el volumen de hemorragia. Es importante tener en cuenta que solo evaluamos 24 horas después de la MCAO, y no tenemos información sobre la recuperación a largo plazo. Los resultados a largo plazo podrían ser más prometedores, ya que otros estudios así lo han demostrado (Krämer et al., 2023). La influencia de factores protrombóticos (vWF) y fibrinolíticos (PAI-1) se discutirán en la segunda parte en relación con la influencia de los ritmos circadianos.

## **Pretratamiento con aspirina**

**El uso de aspirina** para la prevención de ictus está recogido en las guías de tratamiento del ictus (Powers et al., 2019). Se ha demostrado que la profilaxis con aspirina produce una reducción significativa en el riesgo de ictus isquémico, pero aumenta el riesgo de ictus hemorrágico. En los pacientes con ictus no cardioembólico, se recomienda el uso de antiagregantes plaquetarios (aspirina) en lugar de anticoagulación oral para reducir el riesgo de ictus recurrente y otros eventos cardiovasculares. Con respecto a la profilaxis con aspirina, los pacientes con ictus inmóviles sin contraindicaciones, se recomienda la compresión neumática intermitente (CNI) además de los cuidados habituales (aspirina e hidratación) por encima de los cuidados habituales para reducir el riesgo de trombosis venosa profunda (TVP).

Como tratamiento se recomienda la administración de aspirina en pacientes con ictus en las 24 a 48 horas después del inicio. Para los pacientes tratados con tPA intravenosa (iv), la administración de aspirina se debe retrasar hasta 24 horas después, pero podría considerarse en presencia de condiciones concomitantes para las que se sabe que dicho tratamiento administrado, en ausencia de tPA iv, se sabe que proporciona un beneficio sustancial. En los pacientes que presentan un ictus isquémico no cardioembólico leve (NIHSS puntuación  $\leq 3$ ) que no reciben tPA iv, el tratamiento con terapia dual antiplaquetaria (aspirina y clopidogrel) iniciado en las 24 horas siguientes al inicio de los síntomas y continuado durante 21 días es eficaz para reducir el ictus isquémico recurrente durante un periodo de hasta 90 días desde el inicio de los síntomas. Por tanto, el tratamiento con aspirina bien en la fase aguda o bien como profilaxis es muy frecuente en los pacientes con ictus. De ahí la importancia de estudiar la influencia que puede tener un pretratamiento con aspirina en los efectos de la DNAsa-I.

Hemos demostrado el tratamiento crónico con aspirina no modifica ni el efecto protector, ni la mejoría de los déficits neurológicos y tampoco los índices de reperfusión del tratamiento con DNAsa-I. Estos resultados son de gran importancia y relevancia clínica ya que supone que la DNAsa-I es un tratamiento seguro incluso en asociación con aspirina.

Sin embargo, existen algunos aspectos que son importantes destacar. El pretratamiento con aspirina si aumenta la hemorragia inducida por la administración tardía de tPA como ya hemos comentado y se ha descrito en la literatura (Zheng et al., 2019). En este punto es importante destacar, que la administración de DNAsa-I conjuntamente con tPA en animales pretratados con aspirina, la DNAsa-I mantiene su capacidad para disminuir la hemorragia inducida por el trombolítico.

El pre-tratamiento crónico con aspirina no produce ningún cambio significativo en la presencia de **NETs** en el tejido isquémico ni en la elastasa. La DNAsa-I mantiene su capacidad de disminuir los niveles de NETs en los grupos estudiados y que hemos comentado. En este aspecto, se ha descrito que la aspirina podría disminuir la formación de NETs, hallazgo que

nosotros no hemos encontrado. En un modelo experimental de lesión pulmonar aguda relacionada con transfusiones (TRALI), el control de la activación plaquetaria con aspirina redujo la formación de NETs y la lesión pulmonar. El tratamiento con DNAsa1 protegió a los ratones del daño por TRALI (Caudrillier et al.,2012). Este efecto de la aspirina también se ha descrito en diferentes neoplasias en combinación o no de DNAsa-I (Yang et al., 2020; Guy et al., 2023). Por tanto, este efecto de la aspirina requerirá una investigación adicional en el futuro. De hecho, hemos encontrado que el tratamiento con DNAsa-I en animales pretratados con aspirina, la DNAsa-I produce un incremento significativo de NETs en el tejido isquémico. No podemos explicar este efecto, pero hipotetizamos que se debe a las microhemorragias que encontramos en los animales isquémicos pre-tratados con aspirina. Hemos visto que presentan muchas hemorragias pequeñas tipo "petequias" (teñidas por la tinción DAB) y que no pueden ser cuantificadas por su tamaño. Estas microhemorragias podrían inducir un aumento de la infiltración de neutrófilos -como así hemos observado en algunos grupos de nuestros resultados- y por ende un aumento de la NETosis. Estos resultados requieren que se estudie con profundidad para determinar su implicación real.

Por último, también hemos observado que la aspirina en todos los ratones con deficiencia de TLR aumentó significativamente el contenido de elastasa en la plasma 4 horas después de MCAO. No existe en la literatura trabajos que relacionen elastasa con deficiencia de TLR4 y aspirina y de nuevo necesitamos más estudios para corroborar dichos datos y estudiar su relevancia.

## 2. EFECTO DE LOS RITMOS CIRCADIANOS EN EL TRATAMIENTO CON DNAsa-I EN EL ICTUS ISQUÉMICO. FUNCIÓN DE LOS NETS

Los relojes circadianos son programas moleculares temporales que responden a señales ambientales como la luz y la alimentación para generar ritmos circadianos en la respuesta fisiológica, en el comportamiento, en procesos patológicos etc., lo que incluye los ciclos de sueño-vigilia, la presión arterial y la secreción hormonal entre otros (Roenneberg y Mellow, 2016). A pesar de que los genes del reloj central regulan la expresión de hasta el 40% de todos los genes (Rabinovich-Nikitin et al., 2019), incluyendo aquellos involucrados en la muerte celular y en la respuesta redox neuronal, aún se desconocen los fundamentos biológicos específicos de los fenómenos observados.

En ictus, los estudios clínicos revelan que los de inicio nocturno (fase inactiva en los humanos), en comparación con los diurnos, se asocian a una mayor gravedad neurológica con volúmenes mayores, deterioro neurológico precoz más frecuentes y peores resultados funcionales a los 3 meses (Ryu et al., 2022; Reidler et al., 2023). A nivel experimental, en modelos transitorios de MCAO usando ratas, se demuestra que existe una progresión más rápida del infarto cuando se induce el ictus durante el día (fase inactiva en los roedores), en comparación con la noche (Esposito et al., 2020).

En nuestro estudio usando un modelo de MCAO con trombos ricos en fibrina, también hemos encontrado que **el volumen de infarto es mayor en la fase inactiva (diurna)**, corroborando datos previos y ampliando a otros modelos el efecto de los ritmos circadianos en el pronóstico del ictus. Existen muchos mecanismos que han sido implicados en la influencia de los ritmos circadianos en el ictus y que hemos revisado en la parte de la introducción (Lo et al., 2021). Discutiremos aquellas que están más implicadas en nuestros resultados.

Hemos demostrado que los ratones en fase activa (nocturna) tienen una mayor incidencia de reperusión espontánea. Se han descrito diferencias circadianas en algunos de los **factores**

implicados en el proceso de trombosis y de reperfusión que se han relacionado con el pronóstico del ictus. Uno de los factores implicados son los **niveles de NETs**. En este contexto, Li y colaboradores han demostrado que el ácido lisofosfátidico, un fosfolípido bioactivo liberado por plaquetas activadas puede activar los neutrófilos para liberar NETs, en asociación con vWF, fibrinógeno y fibronectina, predisponiendo a la trombosis y promoviendo la estabilidad de los trombos. Además, en los coágulos resistentes a tPA, la mayoría de las áreas estaban densamente pobladas de NETs, y la adición de DNAsa-I acelera significativamente la lisis de los coágulos intrapulmonares humanos (Li et al., 2020). Otro estudio demuestra que la reducción de plaquetas activadas en un sistema de oxigenación por membrana extracorpórea se asocia a una disminución en la formación de NET, lo que reduce la estabilidad del coágulo (Winnersbach et al., 2022). Estos datos sugieren que los NETs podrían servir como un andamiaje para la unión de proteínas plasmáticas y dar lugar a la formación de coágulos resistentes y estables. Además, se ha demostrado que la Cl-amidina que inhibe la formación de NETs mejora la función microcirculatoria a nivel de las coronarias y la función dependiente del endotelio (Wang et al., 2023). Por tanto, los NETs puede ser un factor importante que afecta la reperfusión espontánea. Estos datos son coherentes con el efecto encontrado en los modelos de trombos ricos en plaquetas en los que la DNAsa-I es capaz de recanalizar con éxito el vaso sanguíneo ocluido (Peña-Martínez et al., 2019). Además, concuerda con lo que hemos encontrado en este segundo bloque de experimentos, ya que durante la fase activa hay menores niveles de NETs en la corteza cerebral y de elastasa plasmática lo que facilitaría la reperfusión espontánea. Es importante resaltar que la demostración de que los neutrófilos extraídos de ratones que se les induce la MCAO durante la fase inactiva, tienen mayor capacidad de producir NETosis exvivo apoya de forma robusta la implicación de los NETs en el daño y en la reperfusión.

Los resultados obtenidos con los animales DNAsa-KO refuerzan el papel de los NETs en estos procesos. En los animales DNAsa-KO hemos demostrado que los niveles de NETs, tanto a nivel cerebral como plasmáticos, son superiores a aquellos de los animales WT -validando el uso de estos animales- y que además se mantienen las diferencias de volumen de infarto y de los índices de reperfusión espontánea entre la fase inactiva y activa al igual que lo encontrado

en los animales WT. Además, los resultados usando los animales PAD4-KO ponen de manifiesto que existen otros factores -no solo los NETs- que influyen de forma relevante en este proceso. PAD4 se expresa en niveles elevados en los neutrófilos sanguíneos (Wang et al., 2009) y su inhibición reduce significativamente la citrulinación y la descondensación de las histonas, lo que a su vez suprime la formación de NETs (Lewis et al., 2015). Nuestros resultados usando los animales PAD4-KO demuestran que a pesar de que los niveles de NETs son muy pequeños, se mantienen las diferencias de volumen de infarto y de los índices de reperfusión espontánea.

Por último, existen pocos datos -y algunos de ellos contradictorios- con respecto a las variaciones circadianas de los NETs. Son muchos los factores que pueden influir en las variaciones circadianas tales como son, el propio tejido a estudiar, la edad y el fenotipo de los neutrófilos, el tiempo transcurrido desde la isquemia etc. y por tanto se requieren estudios complementarios para establecer dicha dinámica (Adrover et al., 2020; Hidalgo et al., 2020; Wang et al., 2023; Zhao et al., 2023).

Otro de los factores implicados en la influencia de los ritmos circadianos en el pronóstico del ictus es la **infiltración y polarización de neutrófilos** que ya hemos comentado. El reclutamiento de leucocitos está bajo control de los ritmos circadianos, tanto en condiciones fisiológicas como durante la inflamación. El recuento de neutrófilos alcanza su máximo durante las fases inactivas tanto en humanos (20:00-2.00 h) como en animales (12:00) (Casanova-Acebes et al., 2013; Schloss et al., 2016) que concuerda con nuestro hallazgo de mayor número de neutrófilos en sangre periférica de los ratones durante la fase inactiva, y mayor infiltración neutrofílica en el tejido cerebral dañado tras MCAO durante la fase activa. Nuestros datos demuestran que durante la fase activa -nocturna-, el menor volumen de infarto se correlaciona con una mayor infiltración de neutrófilos pero que se corresponde con un mayor porcentaje de neutrófilos antiinflamatorios YM1+ (N2), hallazgos que nuestro grupo ya había demostrado en animales con ausencia total de TLR4 (García-Culebras et al., 2019).

Se ha descrito que los neutrófilos circulantes experimentan fluctuaciones circadianas que afectan no solo su número como hemos visto, sino también su fenotipo y/o su edad (Hidalgo

et al., 2022). Este cambio espontáneo a lo largo del tiempo se conoce como envejecimiento de los neutrófilos que también experimentan oscilaciones circadianas. Se distinguen neutrófilos frescos (CD62L hi) y neutrófilos envejecidos (CXCR4 hi, CD62L lo). Los neutrófilos envejecidos están elevados durante la fase inactiva, eliminándose al final de este periodo (Casanova-Acebes et al., 2013; Adrover et al., 2020), representan un subconjunto muy activo que muestra una mayor activación de la integrina  $\alpha M\beta 2$  y formación de NETs en condiciones inflamatorias (Zhang et al., 2015). El envejecimiento de los neutrófilos está impulsado por la microbiota a través de vías de señalización mediadas por el receptor TLR y el factor 88 de diferenciación mieloide (Zhang et al., 2015; Uhl et al., 2016). Nuestros datos se corresponderían con neutrófilos envejecidos, pero no hemos determinado el fenotipo y se requerirían más estudios para su confirmación. Además, todavía no está del todo bien definido la relación entre los fenotipos N1 y N2 y los neutrófilos frescos y envejecidos ya que existen estudios contradictorios (Durán-Laforet et al., 2021). Todos estos hallazgos pueden tener relevancia traslacional ya que las oscilaciones circadianas también se encuentran en los neutrófilos humanos (Ella et al., 2016; Adrover et al., 2020).

Otro de los mecanismos que podría ser responsable de los resultados que hemos encontrado, es la ritmicidad circadiana de algunos **factores hemostáticos** implicados en el proceso de trombosis y de reperfusión. El **tPA** activo endógeno es inversamente proporcional a los niveles del inhibidor del activador del plasminógeno-1 (**PAI-1**; Angleton et al., 1989). El PAI-1 muestra una ritmicidad circadiana, alcanzando su máximo durante la mañana -fase activa- en humanos (Angleton et al., 1989; Scheer y Shea, 2014) y durante la noche -fase activa- en roedores (Ohkura et al., 2006). Estos cambios circadianos son dependientes de relojes circadianos -Cry1/Cry2- y Bmal1- (Ohkura et al., 2006; Hemmeryckx et al., 2019) y también son dependientes del tejido ya que el cerebro, por ejemplo, responde de diferente forma (Hemmeryckx et al., 2019). Se ha sugerido que los niveles de PAI-1 elevados desempeña un papel en el pico matutino de eventos cardiovasculares en humanos (Scheer y Shea, 2014).

El factor von Willebrand (**FvW**) se reconoce cada vez más como un factor importante en la patología y fisiopatología del coágulo del ictus. El FvW es la mayor glicoproteína plasmática

circulante que media en la trombosis al reclutar plaquetas a los sitios de lesión vascular. El FvW es escindido por la metaloproteasa ADAMTS13 que media en la trombólisis de oclusiones resistentes al tPA en el ictus isquémico en ratones (Denorme et al. 2016). Es importante señalar que se han descrito variaciones diurnas del factor von Willebrand, con un pico por la mañana en humanos (Timm et al., 2014). Estos estados protrombóticos e hipofibrinolíticos que parecen ocurrir durante la fase activa (Carmona et al., 2020; Liu et al., 2021) no explicarían nuestros resultados de mejor pronóstico y mayor incidencia de reperusión espontánea. En este sentido es importante destacar que no hemos determinado los niveles de estos factores hemostáticos, que no conocemos si el propio proceso de la inducción del ictus modifica de alguna forma los ritmos circadianos descritos para estas moléculas y que pueden también existir diferencias a nivel central como ya hemos comentado. Por tanto, se requieren estudios más amplios para aclarar la implicación de este mecanismo.

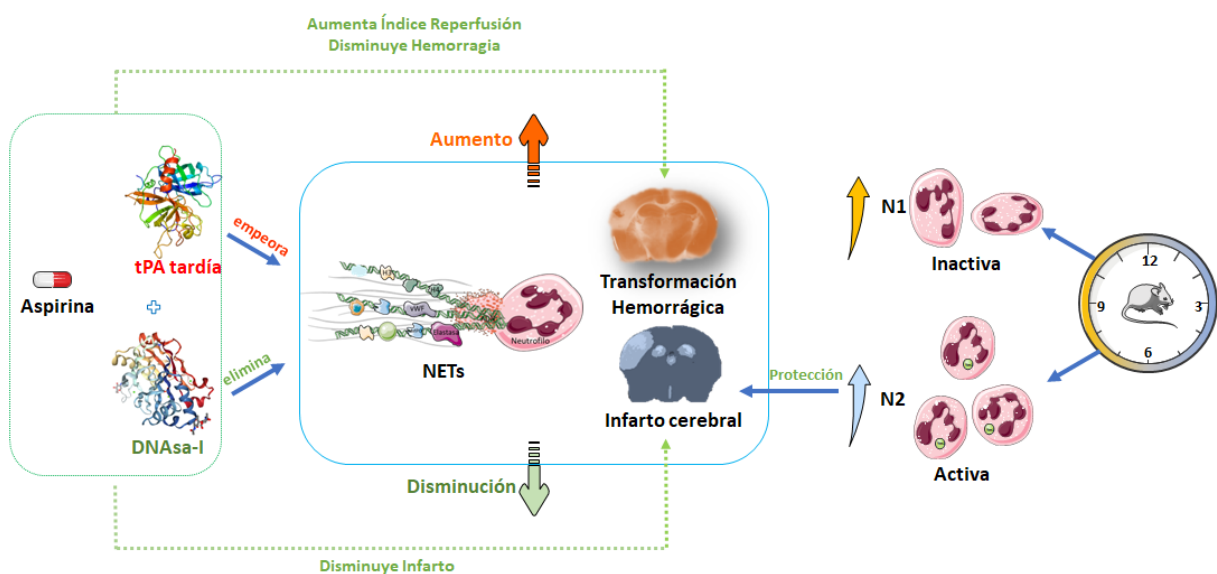
El **efecto protector de la DNAsa-I** que hemos encontrado, solo se produce cuando se administra durante la **fase inactiva**. Nuestros datos cobran especial relevancia si tenemos en cuenta que en la actualidad están en marcha dos ensayos clínicos con DNAsa-I diseñados para mejorar los índices de reperusión temprana (EXTEND-IA DNAsa; NCT05203224) o para disminuir la inflamación sistémica asociada al ictus (ReSCInD; NCT05880524). En estos casos los tratamientos se están administrando a los pacientes durante el día (fase activa).

Ya hemos comentado la importancia de los ritmos circadianos en la eficacia de diferentes tratamientos. Incluso se ha señalado como factor importante en la falta de traslacionalidad de la eficacia de los fármacos cerebroprotectores usados en modelos animales de ictus, a la ineficacia de estos fármacos en los ensayos clínicos realizados en pacientes diagnosticados de ictus (Lo et al., 2021; Tiedt et al., 2022). La administración nocturna (fase inactiva) de antihipertensivos, en comparación con la administración diurna, mejora los perfiles generales de la presión arterial durante 24 horas (Bowles et al., 2018). De igual modo, la administración nocturna de aspirina en dosis bajas, en comparación con la administración al despertar, reduce de manera más significativa la reactividad plaquetaria matutina, la cual está influida por el sistema circadiano y se lleva a cabo a través de las vías dependientes de la ciclooxigenasa

1(COX-1) (Bonten et al., 2015). Ya hemos visto anteriormente que los niveles de trombogénesis y trombólisis endógena varían según la hora del día en que se inicia el ictus. Las evidencias preliminares también sugieren que la trombólisis sistémica y la trombectomía endovascular parecen que podrían ser más eficaces si se administran durante la mañana (fase activa) (Lorenzano et al., 2014; Hajdu et al., 2021; Burbano et al., 2023). Además, los pacientes con vasos recanalizados después de la trombólisis tienen niveles más bajos de PAI-1 al ingreso que los de los pacientes en quienes el tPA no induce la recanalización (Ribo et al., 2004). Con todo, aún está por explorar si el ritmo circadiano de PAI-1 es responsable de la dependencia diurna de la eficacia del tPA. Sin embargo, otros autores destacan que el estado protrombótico e hipofibrinolítico de la mañana (fase activa) puede contribuir a que el tratamiento con tPA sea menos eficaz por la mañana (Carmona et al., 2020; Liu et al., 2021).

La eficacia de la DNAsa-I durante la fase inactiva se corresponde con los datos de mayores niveles de NETs en corteza cerebral y de elastasa plasmática que hemos encontrado durante dicha fase en comparación con la fase activa. Además, los hallazgos encontrados en los ratones PAD4-KO corroboran nuestros resultados, ya que cuando los niveles de NETs son muy bajos, la DNAsa-I deja de producir efecto protector en cualquiera de las fases estudiadas. Estos resultados son similares a los de otros experimentos en modelos de ictus y otros modelos de enfermedades (Suzuki et al., 2020; Patel et al., 2023). Los resultados con los ratones DNAsa-KO también corroboran nuestros resultados ya que cuando los niveles de NETs son muy elevados, como hemos encontrado a las 4 y 24h en plasma y sólo durante la fase inactiva, la DNAsa-I sigue mostrando su eficacia sólo durante esta fase y no durante la fase activa en la que los niveles son bajos. En este sentido, la actividad endógena de la DNAsa puede tener un papel importante en estos procesos. De hecho, se ha implicado en el desarrollo (Kenny et al., 2019) y en el pronóstico de enfermedades como el lupus (Hakkim et al., 2010; Bruschi et al., 2020) y nosotros hemos demostrado que los polimorfismos de DNAsa tienen también un papel muy importante en el ictus (Diaz-Benito et al., 2022). Por tanto, se requieren estudios sobre la actividad endógena y/o los polimorfismos de DNAsa para establecer con claridad su papel.

En resumen, nuestros resultados demuestran que la administración de DNAsa-I es un tratamiento eficaz y seguro en modelos de ictus, no sólo en modelos tromboembólicos de trombos ricos en plaquetas -como habíamos previamente demostrado- sino también en trombos ricos en fibrina. El mecanismo de acción por el que la DNAsa-I produce su efecto protector no está totalmente establecido, pero ahora hemos demostrado que la disminución de los procesos de NETosis interviene de forma muy importante en el efecto encontrado sin afectar la infiltración o polarización de los neutrófilos. Además, el tratamiento único con DNAsa-I no produce sangrado, y cuando se coadministra con tPA aumenta los índices de recanalización, disminuye la hemorragia cuando se produce reperusión y no aumenta la transformación hemorrágica inducida por la administración tardía del trombolítico. Por último, es importante destacar que la DNAsa-I es eficaz cuando se administra durante la fase inactiva y que el pre-tratamiento con antiagregantes plaquetarios (aspirina) no altera el efecto protector de dicho fármaco. Nuestros datos cobran especial relevancia si tenemos en cuenta que en la actualidad están en marcha dos ensayos clínicos con DNAsa-I diseñados para mejorar los índices de reperusión temprana (EXTEND-IA DNAsa) o para disminuir la inflamación sistémica asociada al ictus (ReSCIInd). Se requieren estudios más amplios para determinar con exactitud la eficacia de este tratamiento, los mecanismos implicados y su traslación a la clínica.





**CONCLUSIONES**



## EFFECTO DEL TRATAMIENTO CON DNAsa-I EN EL ICTUS ISQUÉMICO. FUNCIÓN DE LOS NETs Y DEL RECEPTOR TLR4 PLAQUETARIO

1. El **tratamiento con DNAsa-I** reduce de forma significativa el volumen de infarto y produce una mejora de los síntomas neurológicos.
2. El tratamiento con DNAsa-I reduce la presencia de NETs en la corteza cerebral y la concentración plasmática de elastasa.
3. El efecto protector de la DNAsa-I no se relaciona ni con cambios en los índices de reperfusión (espontánea o exitosa) ni con cambios en la infiltración o polarización de los neutrófilos. El tratamiento con DNAsa-I no produce sangrado.
4. Existe una correlación positiva entre la presencia de NETs en la corteza cerebral, los niveles plasmáticos de elastasa y la infiltración neutrofílica.
5. La **adición de DNAsa-I al tratamiento con tPA** no incrementa la transformación hemorrágica (TH) inducida por la administración tardía del trombolítico.
6. La adición de DNAsa-I al tratamiento con tPA, reduce: i) los aumentos de la presencia y niveles plasmáticos de NETs inducidos por el tPA y ii) el aumento de infiltración neutrofílica producida por el tPA
7. La adición de DNAsa-I al tratamiento con tPA produce: i) un aumento del índice de recanalización arterial exitosa; ii) una mejora significativa de los síntomas neurológicos y iii) una disminución del volumen de hemorragia en los animales que reperfundan.
8. El **pre-tratamiento crónico con aspirina**, en general, no produce ningún cambio en los efectos protectores que produce la DNAsa-I ni en la ausencia de sangrado que hemos encontrado.

## EFFECTO DE LOS RITMOS CIRCADIANOS EN EL TRATAMIENTO CON DNAsa-I EN EL ICTUS ISQUÉMICO. FUNCIÓN DE LOS NETs

1. Hemos encontrado un **infarto mayor** y un peor estado neurológico en los animales, cuando la oclusión se produce durante la **fase inactiva**. Este efecto se asocia con: i) un menor porcentaje de reperfusiones espontáneas, ii) un aumento de la presencia de NETs en el tejido cerebral, de los niveles plasmáticos de elastasa y de la capacidad de

producir NETosis ex vivo y iii) un menor número de neutrófilos que se corresponde con un menor porcentaje de neutrófilos YM1+.

2. El **efecto protector de la DNAsa-I** sólo se produce cuando se administra durante la **fase inactiva**. Además, se relaciona con una disminución de la presencia de NETs y de los niveles plasmáticos de elastasa durante la fase inactiva.
3. El efecto protector de la DNAsa-I no se relaciona ni con cambios en los porcentajes de reperfusión ni con cambios en la infiltración o polarización de neutrófilos.
4. En los **ratones PAD4 KO**, encontramos los siguientes hallazgos: i) se mantiene el efecto de los ritmos circadianos en el volumen de infarto, ii) los niveles de NETs son menores que en los animales WT y iii) el tratamiento con DNAsa-I no produce efecto protector.
5. En los **ratones DNAsa KO**, encontramos los siguientes hallazgos: i) se mantiene el efecto de los ritmos circadianos en el volumen de infarto, ii) los niveles de NETs son superiores a los vistos en los animales WT y iii) observamos los mismos hallazgos con el tratamiento con DNAsa-I que aquellos encontrados en los animales WT.

## **CONCLUSIONS**



## **EFFECT OF DNase-I TREATMENT IN ISCHEMIC STROKE: ROLE OF NETs AND THE PLATELET TLR4 RECEPTOR.**

1. DNase-I treatment significantly reduces infarct volume and produces an improvement in neurological symptoms.

2. DNase-I treatment reduces the presence of NETs in the cerebral cortex and plasma elastase concentration.

3. The protective effect of DNase-I is neither related to changes in reperfusion rates (spontaneous or successful) nor to changes in neutrophil infiltration or polarization. Treatment with DNase-I does not produce bleeding.

4. There is a positive correlation between the presence of NETs in the cerebral cortex, plasma levels of elastase and neutrophilic infiltration.

5. The addition of DNase-I to tPA treatment does not increase hemorrhagic transformation (HT) induced by late administration of the thrombolytic.

6. The addition of DNase-I to tPA treatment reduces: i) the increases in the presence and plasma levels of NETs induced by tPA and ii) the increase in neutrophilic infiltration produced by tPA.

7. The addition of DNase-I to tPA treatment produces: i) an increase in the rate of successful arterial recanalization; ii) a significant improvement in neurological symptoms and iii) a decrease in the volume of hemorrhage in reperfused animals.

8. Chronic pretreatment with aspirin, in general, does not produce any change in the protective effects produced by DNase-I nor in the absence of bleeding that we have found.

## **EFFECT OF CIRCADIAN RITZERS ON DNase-I TREATMENT IN ISCHEMIC STROKE. ROLE OF NETs.**

1. We have found a greater infarction and a worse neurological status in animals when occlusion occurs during the inactive phase. This effect is associated with: i) a lower percentage of spontaneous reperfusion, ii) an increase in the presence of NETs in brain tissue, plasma levels of elastase and the ability to produce NETosis ex vivo and iii) a lower number of neutrophils corresponding to a lower percentage of YM1+ neutrophils.

2. The protective effect of DNase-I only occurs when administered during the inactive phase. In addition, it is related to a decrease in the presence of NETs and plasma levels of

elastase during the inactive phase.

3. The protective effect of DNase-I is neither related to changes in reperfusion rates nor to changes in neutrophil infiltration or polarization.

4. In PAD4 KO mice, we found the following findings: i) the effect of circadian rhythms on infarct volume is maintained, ii) NETs levels are lower than in WT animals and iii) DNase-I treatment does not produce a protective effect.

5. In DNase KO mice, we found the following findings: i) the effect of circadian rhythms on infarct volume is maintained, ii) NETs levels are higher than those seen in WT animals and iii) we observed the same findings with DNase-I treatment as those found in WT animals.

## **BIBLIOGRAFÍA**



- Abbott, N. J., Patabendige, A. A., Dolman, D. E., Yusof, S. R., & Begley, D. J. (2010). Structure and function of the blood-brain barrier. **Neurobiology of Disease**, 37(1), 13–25.
- Abbott, N. J., Rönnbäck, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. **Nature Reviews Neuroscience**, 7(1), 41–53.
- Abdelnaseer, M. M., Elfauomy, N. M., Esmail, E. H., Kamal, M. M., & Elsayy, E. H. (2017). Matrix Metalloproteinase-9 and Recovery of Acute Ischemic Stroke. **Journal of stroke and cerebrovascular diseases**, 26(4), 733–740.
- Adams, H. P., Jr, Bendixen, B. H., Kappelle, L. J., Biller, J., Love, B. B., Gordon, D. L., & Marsh, E. E., 3rd (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(1), 35–41.
- Adams, H. P., Jr., & Biller, J. (2015). Classification of subtypes of ischemic stroke: history of the trial of org 10172 in acute stroke treatment classification. **Stroke**, 46(5), e114-117.
- Adrover, J. M., Aroca-Crevillén, A., Crainiciuc, G., Ostos, F., Rojas-Vega, Y., Rubio-Ponce, A., Cilloniz, C., Bonzón-Kulichenko, E., Calvo, E., Rico, D., Moro, M. A., Weber, C., Lizasoain, I., Torres, A., Ruiz-Cabello, J., Vázquez, J., & Hidalgo, A. (2020). Programmed 'disarming' of the neutrophil proteome reduces the magnitude of inflammation. **Nature Immunology**, 21(2), 135–144.
- Adrover, J. M., Del Fresno, C., Crainiciuc, G., Cuartero, M. I., Casanova-Acebes, M., Weiss, L. A., Huerga-Encabo, H., Silvestre-Roig, C., Rossaint, J., Cossío, I., Lechuga-Vieco, A. V., García-Prieto, J., Gómez-Parrizas, M., Quintana, J. A., Ballesteros, I., Martín-Salamanca, S., Aroca-Crevillén, A., Chong, S. Z., Evrard, M., Balabanian, K., Hidalgo, A. (2019). A Neutrophil Timer Coordinates Immune Defense and Vascular Protection. **Immunity**, 50(2), 390–402.e10.
- Aguado, O., Aleix, C., Álvarez, J., Cacho, Á., Egocheaga, I., & Garcia, J. (2009). Guía de Práctica Clínica para el Manejo de Pacientes con Ictus en Atención Primaria. Madrid: Ministerio de Sanidad y Políticas Sociales.
- Aguiar de Sousa, D., von Martial, R., Abilleira, S., Gattringer, T., Kobayashi, A., Gallofré, M., Fazekas, F., Szikora, I., Feigin, V., Caso, V., & Fischer, U. (2019). Access to and delivery of acute ischaemic stroke treatments: A survey of national scientific societies and stroke experts in 44 European countries. **European Stroke Journal**, 4(1), 13–28.
- Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., Tetzlaff, W., & Rossi, F. M. (2007). Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. **Nature Neuroscience**, 10(12), 1538–1543.

- Al-Ofi, E. A., & Al-Ghamdi, B. S. (2019). High-mobility group box 1, an endogenous ligand of toll-like receptors 2 and 4, induces astroglial inflammation via nuclear factor kappa B pathway. **Folia Morphologica**, 78(1), 10–16.
- Angleton, P., Chandler, W.L., Schmer, G. (1989). Diurnal variation of tissue-type plasminogen activator and its rapid inhibitor (PAI-1). **Circulation**. 79(1), 101-6.
- Appelros, P., Stegmayr, B., & Terént, A. (2009). Sex differences in stroke epidemiology: a systematic review. **Stroke**, 40(4), 1082–1090.
- Arba, F., Rinaldi, C., Caimano, D., Vit, F., Busto, G., & Fainardi, E. (2021). Blood-Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation in Acute Ischemic Stroke: Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Neurology**, 11, 594613.
- Arboix J, Álvarez-Sabín J, Soler L, por el comité ad hoc del Grupo de Estudio de las Enfermedades Cerebrovasculares de la Sociedad Española de Neurología. Ictus. Clasificación y criterios diagnósticos. En Díez-Tejedor E, ed. Guía para el tratamiento y prevención del ictus. **Neurologia**, 1998; 13 (Supl 3): 3-10.
- Asahi, M., Asahi, K., Jung, J. C., del Zoppo, G. J., Fini, M. E., & Lo, E. H. (2000). Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 20(12), 1681–1689.
- Bajetto, A., Bonavia, R., Barbero, S., Florio, T., & Schettini, G. (2001). Chemokines and their receptors in the central nervous system. **Frontiers in Neuroendocrinology**, 22(3), 147–184.
- Balch, M. H. H., Nimjee, S. M., Rink, C., & Hannawi, Y. (2020). Beyond the Brain: The Systemic Pathophysiological Response to Acute Ischemic Stroke. **Journal of Stroke**, 22(2), 159–172.
- Bamford, J., Sandercock, P., Dennis, M., Burn, J., & Warlow, C. (1991). Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction. **Lancet**, 337(8756), 1521–1526.
- Baskin, Y. K., Dietrich, W. D., & Green, E. J. (2003). Two effective behavioral tasks for evaluating sensorimotor dysfunction following traumatic brain injury in mice. **Journal of Neuroscience Methods**, 129(1), 87–93.
- Beker, M. C., Caglayan, B., Yalcin, E., Caglayan, A. B., Turkseven, S., Gurel, B., Kelestemur, T., Sertel, E., Sahin, Z., Kutlu, S., Kilic, U., Baykal, A. T., & Kilic, E. (2018). Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT. **Molecular Neurobiology**, 55(3), 2565–2576.

- Betz, A. L., Firth, J. A., & Goldstein, G. W. (1980). Polarity of the blood-brain barrier: distribution of enzymes between the luminal and antiluminal membranes of brain capillary endothelial cells. **Brain Research**, 192(1), 17–28.
- Blander, J. M., & Medzhitov, R. (2004). Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. **Science**, 304(5673), 1014–1018.
- Bonten, T. N., Snoep, J. D., Assendelft, W. J., Zwaginga, J. J., Eikenboom, J., Huisman, M. V., Rosendaal, F. R., & van der Bom, J. G. (2015). Time-dependent effects of aspirin on blood pressure and morning platelet reactivity: a randomized cross-over trial. **Hypertension**, 65(4), 743–750.
- Borregaard N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, 33(5), 657–670.
- Bowles, N. P., Thosar, S. S., Herzig, M. X., & Shea, S. A. (2018). Chronotherapy for Hypertension. **Current Hypertension Reports**, 20(11), 97.
- Brea, D., Blanco, M., Ramos-Cabrer, P., Moldes, O., Arias, S., Pérez-Mato, M., Leira, R., Sobrino, T., & Castillo, J. (2011). Toll-like receptors 2 and 4 in ischemic stroke: outcome and therapeutic values. **JCBFM**, 31(6), 1424–1431.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, 303(5663), 1532–1535.
- Bruschi, M., Bonanni, A., Petretto, A., Vaglio, A., Pratesi, F., Santucci, L., Migliorini, P., Bertelli, R., Galetti, M., Belletti, S., Cavagna, L., Moroni, G., Franceschini, F., Fredi, M., Pazzola, G., Allegri, L., Sinico, R. A., Pesce, G., Bagnasco, M., Manfredi, A. Ghiggeri, G. M. (2020). Neutrophil Extracellular Traps Profiles in Patients with Incident Systemic Lupus Erythematosus and Lupus Nephritis. **Journal of rheumatology**, 47(3), 377–386.
- Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D., & van Noort, J. M. (2002). Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, 61(11), 1013–1021.
- Buck, B. H., Liebeskind, D. S., Saver, J. L., Bang, O. Y., Yun, S. W., Starkman, S., Ali, L. K., Kim, D., Villablanca, J. P., Salamon, N., Razinia, T., & Ovbiagele, B. (2008). Early neutrophilia is associated with volume of ischemic tissue in acute stroke. **Stroke**, 39(2), 355–360.
- Burbano, V.G., Wölfer, T.A., Vlegels, N., Quandt, F., Zimmermann, H., Wischmann, J., Kellert, L., Liebig, T., Dimitriadis, K., Saver, J.L., Tiedt, S., GSR investigators. (2023). Association of the time of day of EVT with clinical outcomes and benefit from successful recanalization after stroke. **Ann Clin Transl Neurol**. 10(10), 1917-1923

- Cai, W., Liu, S., Hu, M., Huang, F., Zhu, Q., Qiu, W., Hu, X., Colello, J., Zheng, S. G., & Lu, Z. (2020). Functional Dynamics of Neutrophils After Ischemic Stroke. **Translational Stroke Research**, 11(1), 108–121.
- Campbell, B. C. V., Mitchell, P. J., Churilov, L., Yassi, N., Kleinig, T. J., Dowling, R. J., Yan, B., Bush, S. J., Dewey, H. M., Thijs, V., Scroop, R., Simpson, M., Brooks, M., Asadi, H., Wu, T. Y., Shah, D. G., Wijeratne, T., Ang, T., Miteff, F., Levi, C. R. EXTEND-IA TNK Investigators (2018). Tenecteplase versus Alteplase before Thrombectomy for Ischemic Stroke. **The New England Journal of Medicine**, 378(17), 1573–1582.
- Campbell, B. C., Mitchell, P. J., Churilov, L., Yassi, N., Kleinig, T. J., Yan, B., Thijs, V., Desmond, P. M., Donnan, G. A., Davis, S. M. (2020). Determining the optimal dose of tenecteplase before endovascular therapy for ischemic stroke (EXTEND-IA TNK Part 2): A multicenter, randomized, controlled study. **International Journal of Stroke**, 15(5), 567–572.
- Candelario-Jalil, E., Dijkhuizen, R. M., & Magnus, T. (2022). Neuroinflammation, Stroke, Blood-Brain Barrier Dysfunction, and Imaging Modalities. **Stroke**, 53(5), 1473–1486.
- Caplan L. R. (2011). Stroke classification: a personal view. **Stroke**, 42(1 Suppl), S3–S6.
- Caplan, L. (Ed.). (2016). *Caplan's Stroke: A Clinical Approach*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Carestia, A., Rivadeneyra, L., Romaniuk, M. A., Fondevila, C., Negrotto, S., & Schattner, M. (2013). Functional responses and molecular mechanisms involved in histone mediated platelet activation. **Thrombosis and Haemostasis**, 110(5), 1035-1045.
- Carmona, P., Mendez, N., Ili, C. G., & Brebi, P. (2020). The Role of Clock Genes in Fibrinolysis Regulation: Circadian Disturbance and Its Effect on Fibrinolytic Activity. **Frontiers in physiology**, 11, 129.
- Carter, S. J., Durrington, H. J., Gibbs, J. E., Blaikley, J., Loudon, A. S., Ray, D. W., & Sabroe, I. (2016). A matter of time: study of circadian clocks and their role in inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, 99(4), 549–560.
- Casanova-Acebes, M., Pitaval, C., Weiss, L. A., Nombela-Arrieta, C., Chèvre, R., A-González, N., Kunisaki, Y., Zhang, D., van Rooijen, N., Silberstein, L. E., Weber, C., Nagasawa, T., Frenette, P. S., Castrillo, A., & Hidalgo, A. (2013). Rhythmic modulation of the hematopoietic niche through neutrophil clearance. **Cell**, 153(5), 1025–1035.
- Caso, J. R., Pradillo, J. M., Hurtado, O., Lorenzo, P., Moro, M. A., & Lizasoain, I. (2007). Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. **Circulation**, 115(12), 1599–1608.

- Castillo, V., Bogousslavsky, J. (1997). Early Classification of Stroke. **Cerebrovascular Diseases** 7 (3): 5–11.
- Caudrillier, A., Kessenbrock, K., Gilliss, B.M., Nguyen, J.X., Marques, M.B., Monestier, M., Toy, P., Werb, Z., Looney, M.R. (2012). Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury. **Journal of Clinical Investigation**. 122(7), 2661–71.
- Cayrol, R., Wosik, K., Berard, J. L., Dodelet-Devillers, A., Ifergan, I., Kebir, H., Haqqani, A. S., Kreymborg, K., Krug, S., Moumdjian, R., Bouthillier, A., Becher, B., Arbour, N., David, S., Stanimirovic, D., & Prat, A. (2008). Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. **Nature Immunology**, 9(2), 137–145.
- Cesarman-Maus, G., & Hajjar, K. A. (2005). Molecular mechanisms of fibrinolysis. **British Journal of Haematology**, 129(3), 307–321.
- Chan, S., Brophy, M., Nishimura, N., & Schaffer, C. B. (2019). Aspirin treatment does not increase microhemorrhage size in young or aged mice. **PLoS one**, 14(1), e0204295.
- Chellappa, S. L., Vujovic, N., Williams, J. S., & Scheer, F. A. J. L. (2019). Impact of Circadian Disruption on Cardiovascular Function and Disease. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, 30(10), 767–779.
- Chen, Y., Hallenbeck, J. M., Ruetzler, C., Bol, D., Thomas, K., Berman, N. E., & Vogel, S. N. (2003). Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 23(6), 748–755.
- Cheng, T., Petraglia, A. L., Li, Z., Thiyagarajan, M., Zhong, Z., Wu, Z., Liu, D., Maggirwar, S. B., Deane, R., Fernández, J. A., LaRue, B., Griffin, J. H., Chopp, M., & Zlokovic, B. V. (2006). Activated protein C inhibits tissue plasminogen activator-induced brain hemorrhage. **Nature Medicine**, 12(11), 1278–1285.
- Clark, S. R., Ma, A. C., Tavener, S. A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M. M., Patel, K. D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G. D., Keys, E. M., Allen-Vercoe, E., Devinney, R., Doig, C. J., Green, F. H., & Kubes, P. (2007). Platelet TLR4 activates NETs to ensnare bacteria in septic blood. **Nature Medicine**, 13(4), 463–469.
- Connolly, E. S., Jr, Winfree, C. J., Prestigiacomo, C. J., Kim, S. C., Choudhri, T. F., Hoh, B. L., Naka, Y., Solomon, R. A., & Pinsky, D. J. (1997). Exacerbation of cerebral injury in mice that express the P-selectin gene: identification of P-selectin blockade as a new target for the treatment of stroke. **Circulation Research**, 81(3), 304–310.
- Coomer, B. L., & Stewart, P. A. (1985). Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. **Microvascular Research**, 30(1), 99–115.

- Copin, J. C., & Gasche, Y. (2008). Effect of the duration of middle cerebral artery occlusion on the risk of hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator injection in rats. **Brain Research**, 1243, 161–166.
- Coughlin S. R. (2005). Protease-activated receptors in hemostasis, thrombosis and vascular biology. **Journal of Thrombosis and Haemostasis: JTH**, 3(8), 1800–1814.
- Crack, P. J., & Taylor, J. M. (2005). Reactive oxygen species and the modulation of stroke. **Free Radical Biology Medicine**, 38(11), 1433–1444.
- Cuartero, M. I., Ballesteros, I., Moraga, A., Nombela, F., Vivancos, J., Hamilton, J. A., Corbí, Á. L., Lizasoain, I., & Moro, M. A. (2013). N2 neutrophils, novel players in brain inflammation after stroke: modulation by the PPAR $\gamma$  agonist rosiglitazone. **Stroke**, 44(12), 3498–3508.
- Curtis, A. M., Fagundes, C. T., Yang, G., Palsson-McDermott, E. M., Wochal, P., McGettrick, A. F., Foley, N. H., Early, J. O., Chen, L., Zhang, H., Xue, C., Geiger, S. S., Hokamp, K., Reilly, M. P., Coogan, A. N., Vigorito, E., FitzGerald, G. A., & O'Neill, L. A. (2015). Circadian control of innate immunity in macrophages by miR-155 targeting Bmal1. **Proc Nat Acad Sci USA**, 112(23), 7231–7236.
- Daneman R. (2012). The blood-brain barrier in health and disease. **Annals of Neurology**, 72(5), 648–672.
- De Meyer, S. F., Suidan, G. L., Fuchs, T. A., Monestier, M., & Wagner, D. D. (2012). Extracellular chromatin is an important mediator of ischemic stroke in mice. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 32(8), 1884-1891.
- Del Zoppo, G. J., Milner, R., Mabuchi, T., Hung, S., Wang, X., & Koziol, J. A. (2006). Vascular matrix adhesion and the blood-brain barrier. **Biochemical Society Transactions**, 34(Pt 6), 1261–1266.
- Denis, C. V., & Wagner, D. D. (2007). Platelet adhesion receptors and their ligands in mouse models of thrombosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, 27(4), 728–739.
- Denorme, F., Langhauser, F., Desender, L., Vandenbulcke, A., Rottensteiner, H., Plaimauer, B., François, O., Andersson, T., Deckmyn, H., Scheiflinger, F., Kleinschnitz, C., Vanhoorelbeke, K., De Meyer, S.F. (2016). ADAMTS13-mediated thrombolysis of t-PA-resistant occlusions in ischemic stroke in mice. **Blood**. 127(19), 2337-45
- Diaz-Benito, B., Alzamora, L., Moraga, A., García-Culebras, A., Mosquera, P., Roca, L., Calleja, P., Moro, M.A., Lizasoain, I. (2022). DNase1 polymorphism role in NETs levels and infarct volume after stroke. ESOC 2022. 8th European Stroke Organisation Conference. Lyon. France.

- Ding, N., Chen, G., Hoffman, R., Loughran, P. A., Sodhi, C. P., Hackam, D. J., Billiar, T. R., & Neal, M. D. (2014). Toll-like receptor 4 regulates platelet function and contributes to coagulation abnormality and organ injury in hemorrhagic shock and resuscitation. **Circulation Cardiovascular Genetics**, 7(5), 615–624.
- Donkor E. S. (2018). Stroke in the 21st Century: A Snapshot of the Burden, Epidemiology, and Quality of Life. **Stroke Research and Treatment**, 2018, 3238165.
- Doyle, K. P., Simon, R. P., & Stenzel-Poore, M. P. (2008). Mechanisms of ischemic brain damage. **Neuropharmacology**, 55(3), 310–318.
- Ducroux, C., Di Meglio, L., Loyau, S., Delbosc, S., Boisseau, W., Deschildre, C., Ben Maacha, M., Blanc, R., Redjem, H., Ciccio, G., Smajda, S., Fahed, R., Michel, J. B., Piotin, M., Salomon, L., Mazighi, M., Ho-Tin-Noe, B., & Desilles, J. P. (2018). Thrombus Neutrophil Extracellular Traps Content Impair tPA-Induced Thrombolysis in Acute Ischemic Stroke. **Stroke**, 49(3), 754–757.
- Durán-Laforet, V., Peña-Martínez, C., García-Culebras, A., Alzamora, L., Moro, M. A., & Lizasoain, I. (2021). Pathophysiological and pharmacological relevance of TLR4 in peripheral immune cells after stroke. **Pharmacology Therapeutics**, 228, 107933.
- El Amki, M., Glück, C., Binder, N., Middleham, W., Wyss, M. T., Weiss, T., Meister, H., Luft, A., Weller, M., Weber, B., & Wegener, S. (2020). Neutrophils Obstructing Brain Capillaries Are a Major Cause of No-Reflow in Ischemic Stroke. **Cell Reports**, 33(2), 108260.
- Ella, K., Csépanyi-Kömi, R., & Káldi, K. (2016). Circadian regulation of human peripheral neutrophils. **Brain Behavior and Immunity**, 57, 209–221.
- Engelmann, B., & Massberg, S. (2013). Thrombosis as an intravascular effector of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, 13(1), 34–45.
- Esposito, E., Li, W., T Mandeville, E., Park, J. H., Şencan, I., Guo, S., Shi, J., Lan, J., Lee, J., Hayakawa, K., Sakadžić, S., Ji, X., & Lo, E. H. (2020). Potential circadian effects on translational failure for neuroprotection. **Nature**, 582(7812), 395–398.
- Estrada-Rojo, F., Morales-Gomez, J., Coballase-Urrutia, E., Martinez-Vargas, M., & Navarro, L. (2018). Diurnal variation of NMDA receptor expression in the rat cerebral cortex is associated with traumatic brain injury damage. **BMC Res Notes**, 11(1), 150.
- Facci, L., Barbierato, M., Marinelli, C., Argentini, C., Skaper, S. D., & Giusti, P. (2014). Toll-like receptors 2,-3 and -4 prime microglia but not astrocytes across central nervous system regions for ATP-dependent interleukin-1 $\beta$  release. **Scientific Reports**, 4, 6824.

- Feng, Y., Liao, S., Wei, C., Jia, D., Wood, K., Liu, Q., Wang, X., Shi, F. D., & Jin, W. N. (2017). Infiltration and persistence of lymphocytes during late-stage cerebral ischemia in middle cerebral artery occlusion and photothrombotic stroke models. **Journal of Neuroinflammation**, 14(1), 248.
- Fernández, G., Moraga, A., Cuartero, M. I., García-Culebras, A., Peña-Martínez, C., Pradillo, J. M., Hernández-Jiménez, M., Sacristán, S., Ayuso, M. I., Gonzalo-Gobernado, R., Fernández-López, D., Martín, M. E., Moro, M. A., González, V. M., & Lizasoain, I. (2018). TLR4-Binding DNA Aptamers Show a Protective Effect against Acute Stroke in Animal Models. **Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy**, 26(8), 2047–2059.
- Fernández-Klett, F., & Priller, J. (2015). Diverse functions of pericytes in cerebral blood flow regulation and ischemia. **JCBFM**, 35(6), 883–887.
- Feske S. K. (2021). Ischemic Stroke. **American Journal of Medicine**, 134(12), 1457–1464.
- Fiorelli, M., Bastianello, S., von Kummer, R., del Zoppo, G. J., Larrue, V., Lesaffre, E., Ringleb, A. P., Lorenzano, S., Manelfe, C., & Bozzao, L. (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(11), 2280–2284.
- Fischer, U., Kaesmacher, J., S Plattner, P., Bütikofer, L., Mordasini, P., Deppeler, S., Cognard, C., Pereira, V. M., Siddiqui, A. H., Froehler, M. T., Furlan, A. J., Chapot, R., Strbian, D., Wiesmann, M., Bressan, J., Lerch, S., Liebeskind, D. S., Saver, J. L., Gralla, J., & SWIFT DIRECT study investigators (2022). SWIFT DIRECT: Solitaire™ With the Intention For Thrombectomy Plus Intravenous t-PA Versus DIRECT Solitaire™ Stent-retriever Thrombectomy in Acute Anterior Circulation Stroke: Methodology of a randomized, controlled, multicentre study. **International journal of stroke: official journal of the International Stroke Society**, 17(6), 698–705.
- Flores-Soto, M. E., Chaparro-Huerta, V., Escoto-Delgadillo, M., Vazquez-Valls, E., González-Castañeda, R. E., & Beas-Zarate, C. (2012). Estructura y función de las subunidades del receptor a glutamato tipo NMDA [Structure and function of NMDA-type glutamate receptor subunits]. **Neurologia** (Barcelona, Spain), 27(5), 301–310.
- Fonken, L. K., Frank, M. G., Kitt, M. M., Barrientos, R. M., Watkins, L. R., & Maier, S. F. (2015). Microglia inflammatory responses are controlled by an intrinsic circadian clock. **Brain Behavior and Immunity**, 45, 171–179.
- Franchi, F., Rollini, F., & Angiolillo, D. J. (2017). Antithrombotic therapy for patients with STEMI undergoing primary PCI. **Nature Reviews Cardiology**, 14(6), 361–379.

- Fraser P. A. (2011). The role of free radical generation in increasing cerebrovascular permeability. **Free Radical Biology and Medicine**, 51(5), 967–977.
- Fridlender, Z. G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G. S., & Albelda, S. M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. **Cancer cell**, 16(3), 183–194.
- Fumagalli, S., Perego, C., Ortolano, F., & De Simoni, M. G. (2013). CX3CR1 deficiency induces an early protective inflammatory environment in ischemic mice. **Glia**, 61(6), 827–842.
- Garcia, J. H., Wagner, S., Liu, K. F., & Hu, X. J. (1995). Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. **Stroke**, 26(4), 627–635.
- García-Culebras, A., Durán-Laforet, V., Peña-Martínez, C., Moraga, A., Ballesteros, I., Cuartero, M. I., de la Parra, J., Palma-Tortosa, S., Hidalgo, A., Corbí, A. L., Moro, M. A., & Lizasoain, I. (2019). Role of TLR4 (Toll-Like Receptor 4) in N1/N2 Neutrophil Programming After Stroke. **Stroke**, 50(10), 2922–2932.
- García-Yébenes, I. (2014). Transformación hemorrágica en el ictus isquémico desarrollo de un modelo experimental y efecto de la sobrecarga de hierro. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
- García-Yébenes, I., Sobrado, M., Zarruk, J. G., Castellanos, M., Pérez de la Ossa, N., Dávalos, A., Serena, J., Lizasoain, I., & Moro, M. A. (2011). A mouse model of hemorrhagic transformation by delayed tissue plasminogen activator administration after in situ thromboembolic stroke. **Stroke**, 42(1), 196–203.
- Gautier, S., Ouk, T., Tagzirt, M., Lefebvre, C., Laprais, M., Pétrault, O., Dupont, A., Leys, D., & Bordet, R. (2014). Impact of the neutrophil response to granulocyte colony-stimulating factor on the risk of hemorrhage when used in combination with tissue plasminogen activator during the acute phase of experimental stroke. **Journal of Neuroinflammation**, 11, 96.
- GBD 2019 Stroke Collaborators (2021). Global, regional, and national burden of stroke and its risk factors, 1990-2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet Neurology**, 20(10), 795–820.
- Ge, L., Zhou, X., Ji, W. J., Lu, R. Y., Zhang, Y., Zhang, Y. D., Ma, Y. Q., Zhao, J. H., & Li, Y. M. (2015). Neutrophil extracellular traps in ischemia-reperfusion injury-induced myocardial no-reflow: therapeutic potential of DNase-based reperfusion strategy. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, 308(5), H500–H509.

- Gelderblom, M., Leyppoldt, F., Steinbach, K., Behrens, D., Choe, C. U., Siler, D. A., Arumugam, T. V., Orthey, E., Gerloff, C., Tolosa, E., & Magnus, T. (2009). Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. **Stroke**, 40(5), 1849–1857.
- Geng, S., Zhang, Y., Lee, C., & Li, L. (2019). Novel reprogramming of neutrophils modulates inflammation resolution during atherosclerosis. **Science advances**, 5(2), eaav2309.
- Gerzanich, V., Kwon, M. S., Woo, S. K., Ivanov, A., & Simard, J. M. (2018). SUR1-TRPM4 channel activation and phasic secretion of MMP-9 induced by tPA in brain endothelial cells. **PLoS One**, 13(4), e0195526.
- Glezer, I., Simard, A. R., & Rivest, S. (2007). Neuroprotective role of the innate immune system by microglia. **Neuroscience**, 147(4), 867–883.
- Gonzalez, R. G., Hirsch, J. A., Koroshetz, W. J., Lev, M. H., & Schaefer, P. (2007). Acute ischemic stroke: imaging and intervention. **American Journal of Neuroradiology**, 28(8), 1622.
- Gordon, G. R., Howarth, C., & MacVicar, B. A. (2011). Bidirectional control of arteriole diameter by astrocytes. **Experimental Physiology**, 96(4), 393–399.
- Goyal, M., Menon, B. K., van Zwam, W. H., Dippel, D. W., Mitchell, P. J., Demchuk, A. M., Dávalos, A., Majoie, C. B., van der Lugt, A., de Miquel, M. A., Donnan, G. A., Roos, Y. B., Bonafe, A., Jahan, R., Diener, H. C., van den Berg, L. A., Levy, E. I., Berkhemer, O. A., Pereira, V. M., Rempel, J., Millán, M., Davis, S., Roy, D., Thornton, J., Román, L., Ribó, M., Beumer, D., Stouch, B., Brown, S., Campbell, B., Oostenbrugge, R., Saver, J., Hill, M., Jovin, T., HERMES collaborators (2016). Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. **Lancet**, 387(10029), 1723–1731.
- Gremmel, T., Frelinger, A. L., 3rd, & Michelson, A. D. (2016). Platelet Physiology. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, 42(3), 191–204.
- Gretarsdottir, S., Thorleifsson, G., Manolescu, A., Styrkarsdottir, U., Helgadóttir, A., Gschwendtner, A., Kostulas, K., Kuhlenbäumer, G., Bevan, S., Jonsdottir, T., Bjarnason, H., Saemundsdottir, J., Palsson, S., Arnar, D. O., Holm, H., Thorgeirsson, G., Valdimarsson, E. M., Sveinbjörnsdottir, S., Gieger, C., Berger, K., Stefansson, K. (2008). Risk variants for atrial fibrillation on chromosome 4q25 associate with ischemic stroke. **Annals of Neurology**, 64(4), 402–409.
- Griffin, P., Dimitry, J. M., Sheehan, P. W., Lananna, B. V., Guo, C., Robinette, M. L., Hayes, M. E., Cedeño, M. R., Nadarajah, C. J., Ezerskiy, L. A., Colonna, M., Zhang, J., Bauer, A. Q., Burris, T. P., & Musiek, E. S. (2019). Circadian clock protein Rev-erba regulates neuroinflammation. **Proc Nat Acad Sci USA**, 116(11), 5102–5107.

- Gundersen, H. J., Bagger, P., Bendtsen, T. F., Evans, S. M., Korbo, L., Marcussen, N., Møller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J. R., & Pakkenberg, B. (1988). The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, 96(10), 857–881.
- Guo, Z., Yu, S., Chen, X., Zheng, P., Hu, T., Duan, Z., Liu, X., Liu, Q., Ye, R., Zhu, W., & Liu, X. (2018). Suppression of NLRP3 attenuates hemorrhagic transformation after delayed rtPA treatment in thromboembolic stroke rats: Involvement of neutrophil recruitment. **Brain Research Bulletin**, 137, 229–240.
- Guy, A., Garcia, G., Gourdou-Latyszenok, V., Wolff-Trombini, L., Josserand, L., Kimmerlin, Q., Favre, S., Kilani, B., Marty, C., Boulaftali, Y., Labrousse-Colomer, S., Mansier, O., James, C. (2023). Platelets and neutrophils cooperate to induce increased neutrophil extracellular trap formation in JAK2V617F myeloproliferative neoplasms. **J Thrombosis and Haemostasis**. S1538-7836(23)00657-8.
- Hajdu, S. D., Kaesmacher, J., Michel, P. P., Sirimarco, G., Knebel, J. F., Bartolini, B., Kurmann, C. C., Puccinelli, F., Mosimann, P. J., Bonvin, C., Arnold, P. M., Niederhäuser, J., Eskandari, A., Mordasini, P., Gralla, P. J., Fischer, P. U., & Saliou, P. G. (2021). Association of Time of Day When Endovascular Therapy for Stroke Starts and Functional Outcome. **Neurology**, 96(8), e1124–e1136.
- Hajjar, K.A. (2003). In Nathan DG, Orkin SH, Ginsburg D, Look AT: **Hematology of Infancy and Childhood**.
- Hakkim, A., Fürnrohr, B. G., Amann, K., Laube, B., Abed, U. A., Brinkmann, V., Herrmann, M., Voll, R. E., & Zychlinsky, A. (2010). Impairment of NET degradation is associated with lupus nephritis. **Proc Nat Acad Sci USA**, 107(21), 9813–9818.
- Hall, C. N., Reynell, C., Gesslein, B., Hamilton, N. B., Mishra, A., Sutherland, B. A., O'Farrell, F. M., Buchan, A. M., Lauritzen, M., & Attwell, D. (2014). Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease. **Nature**, 508(7494), 55–60.
- Hamann, G. F., del Zoppo, G. J., & von Kummer, R. (1999). Hemorrhagic transformation of cerebral infarction--possible mechanisms. **Thrombosis and Haemostasis**, 82 Suppl 1, 92–94.
- Han, H. S., Qiao, Y., Karabiyikoglu, M., Giffard, R. G., & Yenari, M. A. (2002). Influence of mild hypothermia on inducible nitric oxide synthase expression and reactive nitrogen production in experimental stroke and inflammation. **Journal of Neuroscience**, 22(10), 3921–3928.

- Haqqani, A. S., Nestic, M., Preston, E., Baumann, E., Kelly, J., & Stanimirovic, D. (2005). Characterization of vascular protein expression patterns in cerebral ischemia/reperfusion using laser capture microdissection and ICAT-nanoLC-MS/MS. **FASEB Journal**, 19(13), 1809–1821.
- Hartwig, J., & Italiano, J., Jr (2003). The birth of the platelet. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 1(7), 1580–1586.
- Hemmerlyckx, B., Frederix, L., Lijnen, H.R. (2019). Deficiency of Bmal1 disrupts the diurnal rhythm of haemostasis. **Experimental Gerontology**. 118, 1-8.
- Henninger, D. D., Panés, J., Eppihimer, M., Russell, J., Gerritsen, M., Anderson, D. C., & Granger, D. N. (1997). Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. **Journal of Immunology**, 158(4), 1825–1832.
- Hernández-Jiménez, M., Abad-Santos, F., Cotgreave, I., Gallego, J., Jilma, B., Flores, A., Jovin, T. G., Vivancos, J., Hernández-Pérez, M., Molina, C. A., Montaner, J., Casariego, J., Dalsgaard, M., Liebeskind, D. S., Cobo, E., Castellanos, M., Portela, P. C., Masjuán, J., Moniche, F., Tembl, J. I., ... Ribo, M. (2023). Safety and Efficacy of ApTOLL in Patients With Ischemic Stroke Undergoing Endovascular Treatment: A Phase 1/2 Randomized Clinical Trial. **JAMA neurology**, 80(8), 779–788.
- Hernández-Jiménez, M., Hurtado, O., Cuartero, M. I., Ballesteros, I., Moraga, A., Pradillo, J. M., McBurney, M. W., Lizasoain, I., & Moro, M. A. (2013). Silent information regulator 1 protects the brain against cerebral ischemic damage. **Stroke**, 44(8), 2333–2337.
- Hernández-Jiménez, M., Martín-Vílchez, S., Ochoa, D., Mejía-Abril, G., Román, M., Camargo-Mamani, P., Luquero-Bueno, S., Jilma, B., Moro, M. A., Fernández, G., Piñeiro, D., Ribó, M., González, V. M., Lizasoain, I., & Abad-Santos, F. (2022). First-in-human phase I clinical trial of a TLR4-binding DNA aptamer, ApTOLL: Safety and pharmacokinetics in healthy volunteers. **Molecular therapy. Nucleic acids**, 28, 124–135.
- Hernández-Jiménez, M., Peña-Martínez, C., Godino, M. D. C., Díaz-Guzmán, J., Moro, M. Á., & Lizasoain, I. (2017). Test repositioning for functional assessment of neurological outcome after experimental stroke in mice. **PLoS one**, 12(5), e0176770.
- Hidalgo, A., Libby, P., Soehnlein, O., Aramburu, I. V., Papayannopoulos, V., & Silvestre-Roig, C. (2022). Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology. **Cardiovascular Research**, 118(13), 2737–2753.
- Hong, J. M., Kim, D. S., & Kim, M. (2021). Hemorrhagic Transformation After Ischemic Stroke: Mechanisms and Management. **Frontiers in Neurology**, 12, 703258.

- Huang, H., Zhang, H., Onuma, A. E., & Tsung, A. (2020). Neutrophil Elastase and Neutrophil Extracellular Traps in the Tumor Microenvironment. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 1263, 13–23.
- Huang, J., Hong, W., Wan, M., & Zheng, L. (2022). Molecular mechanisms and therapeutic target of NETosis in diseases. **Med Communications**, 3(3), e162.
- Huang, J., Upadhyay, U. M., & Tamargo, R. J. (2006). Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. **Surgical Neurology**, 66(3), 232–245.
- Huang, X., Moreton, F. C., Kalladka, D., Cheripelli, B. K., MacIsaac, R., Tait, R. C., & Muir, K. W. (2015). Coagulation and Fibrinolytic Activity of Tenecteplase and Alteplase in Acute Ischemic Stroke. **Stroke**, 46(12), 3543–3546.
- Hudson, L. C., Bragg, D. C., Tompkins, M. B., & Meeker, R. B. (2005). Astrocytes and microglia differentially regulate trafficking of lymphocyte subsets across brain endothelial cells. **Brain Research**, 1058(1-2), 148–160.
- Hurford, R., Sekhar, A., Hughes, T. A. T., & Muir, K. W. (2020). Diagnosis and management of acute ischaemic stroke. **Practical Neurology**, 20(4), 304–316.
- Iadecola, C., & Anrather, J. (2011). The immunology of stroke: from mechanisms to translation. **Nature Medicine**, 17(7), 796–808.
- Iadecola, C., Zhang, F., Xu, S., Casey, R., & Ross, M. E. (1995). Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 15(3), 378–384.
- Jackman, K., & Iadecola, C. (2015). Neurovascular regulation in the ischemic brain. **Antioxidants & Redox Signaling**, 22(2), 149–160.
- Jang, I.K., Gold, H.K., Ziskind, A.A., Fallon, J.T., Holt, R.E., Leinbach, R.C., May, J.W., Collen, D. (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(4), 920-928.
- Jickling, G. C., Liu, D., Stamova, B., Ander, B. P., Zhan, X., Lu, A., & Sharp, F. R. (2014). Hemorrhagic transformation after ischemic stroke in animals and humans. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 34(2), 185–199.
- Jin, R., Yang, G., & Li, G. (2010). Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. **Journal of Leukocyte Biology**, 87(5), 779–789.

- Jolugbo, P., & Ariëns, R. A. S. (2021). Thrombus Composition and Efficacy of Thrombolysis and Thrombectomy in Acute Ischemic Stroke. **Stroke**, 52(3), 1131–1142.
- Justicia, C., Panés, J., Solé, S., Cervera, A., Deulofeu, R., Chamorro, A., & Planas, A. M. (2003). Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 23(12), 1430–1440.
- Kaito, M., Araya, S., Gondo, Y., Fujita, M., Minato, N., Nakanishi, M., & Matsui, M. (2013). Relevance of distinct monocyte subsets to clinical course of ischemic stroke patients. **PLoS One**, 8(8), e69409.
- Kamat, P. K., Khan, M. B., Wood, K., Siddiqui, S., Rudic, D. R., Dhandapani, K., Waller, J., & Hess, D. C. (2021). Preclinical evaluation of circadian rhythm in ischemic stroke outcomes. **Conditioning Medicine**, 4(6), 280–284.
- Kang, L., Yu, H., Yang, X., Zhu, Y., Bai, X., Wang, R., Cao, Y., Xu, H., Luo, H., Lu, L., Shi, M. J., Tian, Y., Fan, W., & Zhao, B. Q. (2020). Neutrophil extracellular traps released by neutrophils impair revascularization and vascular remodeling after stroke. **Nature communications**, 11(1), 2488.
- Kataoka, H., Kim, S. W., & Plesnila, N. (2004). Leukocyte-endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, 24(6), 668–676.
- Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, 5, 461.
- Kenny, E. F., Raupach, B., Abu Abed, U., Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2019). Dnase1-deficient mice spontaneously develop a systemic lupus erythematosus-like disease. **European Journal of Immunology**, 49(4), 590–599.
- Kim J. S. (2019). tPA Helpers in the Treatment of Acute Ischemic Stroke: Are They Ready for Clinical Use? **Journal of Stroke**, 21(2), 160–174.
- Kim, S. W., Lee, H., Lee, H. K., Kim, I. D., & Lee, J. K. (2019). Neutrophil extracellular trap induced by HMGB1 exacerbates damages in the ischemic brain. **Acta Neuropathologica Communications**, 7(1), 94.
- Kitchen, G. B., Cunningham, P. S., Poolman, T. M., Iqbal, M., Maidstone, R., Baxter, M., Bagnall, J., Begley, N., Saer, B., Hussell, T., Matthews, L. C., Dockrell, D. H., Durrington, H. J., Gibbs, J. E., Blaikley, J. F., Loudon, A. S., & Ray, D. W. (2020). The clock gene Bmal1 inhibits macrophage motility, phagocytosis, and impairs defense against pneumonia. **Proc Nat Acad Sci USA**, 117(3), 1543–1551.

- Kloner, R. A., King, K. S., & Harrington, M. G. (2018). No-reflow phenomenon in the heart and brain. *American journal of physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 315(3), H550–H562.
- Kolev, K., & Machovich, R. (2003). Molecular and cellular modulation of fibrinolysis. *Thrombosis and Haemostasis*, 89(4), 610–621.
- Koupenova, M., Mick, E., Mikhalev, E., Benjamin, E. J., Tanriverdi, K., & Freedman, J. E. (2015). Sex differences in platelet TLR and their association with cardiovascular risk factors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 35(4), 1030–1037.
- Krämer, T. J., Pickart, F., Pöttker, B., Gölz, C., Neulen, A., Pantel, T., Goetz, H., Ritter, K., Schäfer, M. K. E., & Thal, S. C. (2023). Early DNase-I therapy delays secondary brain damage after traumatic brain injury in adult mice. *Scientific reports*, 13(1), 4348.
- Kumar, A. D., Boehme, A. K., Siegler, J. E., Gillette, M., Albright, K. C., & Martin-Schild, S. (2013). Leukocytosis in patients with neurologic deterioration after acute ischemic stroke is associated with poor outcomes. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 22(7), e111–e117.
- Lakhan, S. E., Kirchgessner, A., Tepper, D., & Leonard, A. (2013). Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke. *Frontiers in Neurology*, 4, 32.
- Lalancette-Hébert, M., Swarup, V., Beaulieu, J. M., Bohacek, I., Abdelhamid, E., Weng, Y. C., Sato, S., & Kriz, J. (2012). Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury. *Journal of Neuroscience*, 32(30), 10383–10395.
- Lambeth J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4(3), 181–189.
- Laridan, E., Denorme, F., Desender, L., François, O., Andersson, T., Deckmyn, H., Vanhoorelbeke, K., & De Meyer, S. F. (2017). Neutrophil extracellular traps in ischemic stroke thrombi. *Annals of Neurology*, 82(2), 223–232.
- Latour, L. L., Kang, D. W., Ezzeddine, M. A., Chalela, J. A., & Warach, S. (2004). Early blood-brain barrier disruption in human focal brain ischemia. *Annals of Neurology*, 56(4), 468–477.
- Lauer, A., Schlunk, F., Van Cott, E. M., Steinmetz, H., Lo, E. H., & Foerch, C. (2011). Antiplatelet pretreatment does not increase hematoma volume in experimental intracerebral hemorrhage. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 31(8), 1736–1742.

- Lees, K. R., Bluhmki, E., von Kummer, R., Brott, T. G., Toni, D., Grotta, J. C., Albers, G. W., Kaste, M., Marler, J. R., Hamilton, S. A., Tilley, B. C., Davis, S. M., Donnan, G. A., Hacke, W., ECASS, ATLANTIS, NINDS and EPITHET rt-PA Study Group, Allen, K., Mau, J., Meier, D., del Zoppo, G., De Silva, D. A., Byrnes, G. (2010). Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. **Lancet**, 375(9727), 1695–1703.
- Lefrançois, E., Mallavia, B., Zhuo, H., Calfee, C. S., & Looney, M. R. (2018). Maladaptive role of neutrophil extracellular traps in pathogen-induced lung injury. **JCI insight**, 3(3), e98178.
- Lenglet, S., Montecucco, F., Mach, F., Schaller, K., Gasche, Y., & Copin, J. C. (2014). Analysis of the expression of nine secreted matrix metalloproteinases and their endogenous inhibitors in the brain of mice subjected to ischaemic stroke. **Thrombosis and Haemostasis**, 112(2), 363–378.
- Lewis, H. D., Liddle, J., Coote, J. E., Atkinson, S. J., Barker, M. D., Bax, B. D., Bicker, K. L., Bingham, R. P., Campbell, M., Chen, Y. H., Chung, C. W., Craggs, P. D., Davis, R. P., Eberhard, D., Joberty, G., Lind, K. E., Locke, K., Maller, C., Martinod, K., Patten, C., ... Wilson, D. M. (2015). Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. **Nature Chemical Biology**, 11(3), 189–191.
- Li, S., Pan, Y., Wang, Z., Liang, Z., Chen, H., Wang, D., Sui, Y., Zhao, X., Wang, Y., Du, W., Zheng, H., & Wang, Y. (2022). Safety and efficacy of tenecteplase versus alteplase in patients with acute ischaemic stroke (TRACE): a multicentre, randomised, open label, blinded-endpoint (PROBE) controlled phase II study. **Stroke and Vascular Neurology**, 7(1), 47–53.
- Li, T., Peng, R., Wang, F., Hua, L., Liu, S., Han, Z., Pei, J., Pei, S., Zhao, Z., Jiang, X., & Chen, X. (2020). Lysophosphatidic acid promotes thrombus stability by inducing rapid formation of neutrophil extracellular traps: A new mechanism of thrombosis. **Journal of thrombosis and haemostasis**. 18(8), 1952–1964.
- Liew, P. X., & Kubes, P. (2019). The Neutrophil's Role During Health and Disease. **Physiological reviews**, 99(2), 1223–1248.
- Liu, J. A., Walton, J. C., DeVries, A. C., & Nelson, R. J. (2021). Disruptions of Circadian Rhythms and Thrombolytic Therapy During Ischemic Stroke Intervention. **Frontiers in neuroscience**, 15, 675732.
- Liu, Z., Li, Y., Cui, Y., Roberts, C., Lu, M., Wilhelmsson, U., Pekny, M., & Chopp, M. (2014). Beneficial effects of gfap/vimentin reactive astrocytes for axonal remodeling and motor behavioral recovery in mice after stroke. **Glia**, 62(12), 2022–2033.

- Lo, E. H., Albers, G. W., Dichgans, M., Donnan, G., Esposito, E., Foster, R., Howells, D. W., Huang, Y. G., Ji, X., Klerman, E. B., Lee, S., Li, W., Liebeskind, D. S., Lizasoain, I., Mandeville, E. T., Moro, M. A., Ning, M., Ray, D., Sakadžić, S., Saver, J. L., ... Buchan, A. M. (2021). Circadian Biology and Stroke. **Stroke**, 52(6), 2180–2190.
- Lorenzano, S., Ahmed, N., Tatlisumak, T., Gomis, M., Dávalos, A., Mikulik, R., Sevcik, P., Ollikainen, J., Wahlgren, N., Toni, D., & SITS Investigators (2014). Within-day and weekly variations of thrombolysis in acute ischemic stroke: results from safe implementation of treatments in stroke-international stroke thrombolysis register. **Stroke**, 45(1), 176–184.
- Ma, Y. H., Ma, T. T., Wang, C., Wang, H., Chang, D. Y., Chen, M., & Zhao, M. H. (2016). High-mobility group box 1 potentiates antineutrophil cytoplasmic antibody-inducing neutrophil extracellular traps formation. **Arthritis research and therapy**, 18, 2.
- Mackman, N. (2008). Triggers, targets and treatments for thrombosis. **Nature**, 451(7181), 914–918.
- Mangold, A., Alias, S., Scherz, T., Hofbauer, M., Jakowitsch, J., Panzenböck, A., Simon, D., Laimer, D., Bangert, C., Kammerlander, A., Mascherbauer, J., Winter, M. P., Distelmaier, K., Adlbrecht, C., Preissner, K. T., & Lang, I. M. (2015). Coronary neutrophil extracellular trap burden and deoxyribonuclease activity in ST-elevation acute coronary syndrome are predictors of ST-segment resolution and infarct size. **Circulation research**, 116(7), 1182–1192.
- Mantuano, E., Azmoon, P., Brifault, C., Banki, M. A., Gilder, A. S., Campana, W. M., & Gonias, S. L. (2017). Tissue-type plasminogen activator regulates macrophage activation and innate immunity. **Blood**, 130(11), 1364–1374.
- Martinod, K., & Wagner, D. D. (2014). Thrombosis: tangled up in NETs. **Blood**, 123(18), 2768–2776.
- Martinod, K., Demers, M., Fuchs, T. A., Wong, S. L., Brill, A., Gallant, M., Hu, J., Wang, Y., & Wagner, D. D. (2013). Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, 110(21), 8674–8679.
- Menon, B. K., Al-Ajlan, F. S., Najm, M., Puig, J., Castellanos, M., Dowlathshahi, D., Calleja, A., Sohn, S. I., Ahn, S. H., Poppe, A., Mikulik, R., Asdaghi, N., Field, T. S., Jin, A., Asil, T., Boulanger, J. M., Smith, E. E., Coutts, S. B., Barber, P. A., Bal, S., INTERRSeCT Study Investigators (2018). Association of Clinical, Imaging, and Thrombus Characteristics with Recanalization of Visible Intracranial Occlusion in Patients with Acute Ischemic Stroke. **JAMA**, 320(10), 1017–1026.
- Mestas, J., & Hughes, C. C. (2004). Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. **Journal of Immunology**, 172(5), 2731–2738.

- Molina, C.A., Alvarez-Sabín, J., Montaner, J., Abilleira, S., Arenillas, J.F., Coscojuela, P., Romero, F., Codina, A. (2002). Thrombolysis-related hemorrhagic infarction: a marker of early reperfusion, reduced infarct size, and improved outcome in patients with proximal middle cerebral artery occlusion. **Stroke**, 33(6), 1551-6.
- Montagnana, M., Salvagno, G. L., & Lippi, G. (2009). Circadian variation within hemostasis: an underrecognized link between biology and disease? **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, 35(1), 23–33.
- Montaner, J., Alvarez-Sabín, J., Molina, C., Anglés, A., Abilleira, S., Arenillas, J., González, M. A., & Monasterio, J. (2001). Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. **Stroke**, 32(8), 1759–1766.
- Morancho, A., Rosell, A., García-Bonilla, L., & Montaner, J. (2010). Metalloproteinase and stroke infarct size: role for anti-inflammatory treatment? **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1207, 123–133.
- Moser, M., Nieswandt, B., Ussar, S., Pozgajova, M., & Fässler, R. (2008). Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. **Nature Medicine**, 14(3), 325–330.
- Moskowitz, M. A., Lo, E. H., & Iadecola, C. (2010). The science of stroke: mechanisms in search of treatments. **Neuron**, 67(2), 181–198.
- Mountford, J. K., Petitjean, C., Putra, H. W., McCafferty, J. A., Setiabakti, N. M., Lee, H., Tønnesen, L. L., McFadyen, J. D., Schoenwaelder, S. M., Eckly, A., Gachet, C., Ellis, S., Voss, A. K., Dickins, R. A., Hamilton, J. R., & Jackson, S. P. (2015). The class II PI 3-kinase, PI3KC2 $\alpha$ , links platelet internal membrane structure to shear-dependent adhesive function. **Nature communications**, 6, 6535.
- Nakagomi, T., Kubo, S., Nakano-Doi, A., Sakuma, R., Lu, S., Narita, A., Kawahara, M., Taguchi, A., & Matsuyama, T. (2015). Brain vascular pericytes following ischemia have multipotential stem cell activity to differentiate into neural and vascular lineage cells. **Stem Cells**, 33(6), 1962–1974.
- Nakazato, R., Hotta, S., Yamada, D., Kou, M., Nakamura, S., Takahata, Y., Tei, H., Numano, R., Hida, A., Shimba, S., Mieda, M., Hinoi, E., Yoneda, Y., & Takarada, T. (2017a). The intrinsic microglial clock system regulates interleukin-6 expression. **Glia**, 65(1), 198–208.
- Nakazato, R., Kawabe, K., Yamada, D., Ikeno, S., Mieda, M., Shimba, S., Hinoi, E., Yoneda, Y., & Takarada, T. (2017b). Disruption of *Bmal1* Impairs Blood-Brain Barrier Integrity via Pericyte Dysfunction. **The Journal of Neuroscience**, 37(42), 10052–10062.

- Neal, M. D., Sodhi, C. P., Jia, H., Dyer, M., Egan, C. E., Yazji, I., Hackam, D. J. (2012). Toll-like receptor 4 is expressed on intestinal stem cells and regulates their proliferation and apoptosis via the p53 up-regulated modulator of apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, 287(44), 37296-37308.
- Ni, J., Wu, Z., Meng, J., Saito, T., Saido, T. C., Qing, H., & Nakanishi, H. (2019). An impaired intrinsic microglial clock system induces neuroinflammatory alterations in the early stage of amyloid precursor protein knock-in mouse brain. **Journal of Neuroinflammation**, 16(1), 173.
- NINDS (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. **The New England Journal of Medicine**, 333(24), 1581–1587.
- O'Donnell, M. J., Chin, S. L., Rangarajan, S., Xavier, D., Liu, L., Zhang, H., Rao-Melacini, P., Zhang, X., Pais, P., Agapay, S., Lopez-Jaramillo, P., Damasceno, A., Langhorne, P., McQueen, M. J., Rosengren, A., Dehghan, M., Hankey, G. J., Dans, A. L., Elsayed, A., Avezum, A., INTERSTROKE investigators (2016). Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. **Lancet**, 388(10046), 761–775.
- O'Donnell, M. J., Xavier, D., Liu, L., Zhang, H., Chin, S. L., Rao-Melacini, P., Rangarajan, S., Islam, S., Pais, P., McQueen, M. J., Mondo, C., Damasceno, A., Lopez-Jaramillo, P., Hankey, G. J., Dans, A. L., Yusuf, K., Truelsen, T., Diener, H. C., Sacco, R. L., Ryglewicz, D., INTERSTROKE investigators (2010). Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. **Lancet**, 376(9735), 112–123.
- Ohkura, N., Oishi, K., Fukushima, N., Kasamatsu, M., Atsumi, G.I., Ishida, N., Horie, S., Matsuda, J. (2006). Circadian clock molecules CLOCK and CRYs modulate fibrinolytic activity by regulating the PAI-1 gene expression. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**. 4(11), 2478-85.
- Oishi, K., Miyazaki, K., Uchida, D., Ohkura, N., Wakabayashi, M., Doi, R., Matsuda, J., & Ishida, N. (2009). PERIOD2 is a circadian negative regulator of PAI-1 gene expression in mice. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 46(4), 545–552.
- Okun, E., Griffioen, K. J., & Mattson, M. P. (2011). Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease. **Trends in Neurosciences**, 34(5), 269–281.
- Ooboshi, H., Ibayashi, S., Shichita, T., Kumai, Y., Takada, J., Ago, T., Arakawa, S., Sugimori, H., Kamouchi, M., Kitazono, T., & Iida, M. (2005). Postischemic gene transfer of interleukin-10 protects against both focal and global brain ischemia. **Circulation**, 111(7), 913–919.

- Orset, C., Macrez, R., Young, A. R., Panthou, D., Angles-Cano, E., Maubert, E., Vivien, D. (2007). Mouse model of in situ thromboembolic stroke and reperfusion. **Stroke**, 38(10), 2771–2778.
- Ouseph, M. M., Huang, Y., Banerjee, M., Joshi, S., MacDonald, L., Zhong, Y., Liu, H., Li, X., Xiang, B., Zhang, G., Komatsu, M., Yue, Z., Li, Z., Storrie, B., Whiteheart, S. W., & Wang, Q. J. (2015). Autophagy is induced upon platelet activation and is essential for hemostasis and thrombosis. **Blood**, 126(10), 1224–1233.
- Owolabi, M. O., Ugoya, S., & Platz, T. (2009). Racial disparity in stroke risk factors: the Berlin-Ibadan experience; a retrospective study. **Acta Neurologica Scandinavica**, 119(2), 81–87.
- Park, J. H., Ko, Y., Kim, W. J., Jang, M. S., Yang, M. H., Han, M. K., Oh, C. W., Park, S. H., Lee, J., Lee, J., Bae, H. J., & Gorelick, P. B. (2012). Is asymptomatic hemorrhagic transformation really innocuous? **Neurology**, 78(6), 421–426.
- Park, K. P., Rosell, A., Foerch, C., Xing, C., Kim, W. J., Lee, S., Opdenakker, G., Furie, K. L., & Lo, E. H. (2009). Plasma and brain matrix metalloproteinase-9 after acute focal cerebral ischemia in rats. **Stroke**, 40(8), 2836–2842.
- Patel, R. B., Dhanesha, N., Sutariya, B., Ghatge, M., Doddapattar, P., Barbhuyan, T., Kumskova, M., Leira, E. C., & Chauhan, A. K. (2023). Targeting Neutrophil  $\alpha 9$  Improves Functional Outcomes After Stroke in Mice with Obesity-Induced Hyperglycemia. **Stroke**, 54(9), 2409–2419.
- Peña-Martínez, C., Durán-Laforet, V., García-Culebras, A., Cuartero, M. I., Moro, M. Á., & Lizasoain, I. (2022). NETs Targeting Protects Against Ischemic Damage After Fibrin-Rich Thrombotic Stroke Despite Non-Reperfusion. **Frontiers in Immunology**, 13, 790002.
- Peña-Martínez, C., Durán-Laforet, V., García-Culebras, A., Ostos, F., Hernández-Jiménez, M., Bravo-Ferrer, I., Pérez-Ruiz, A., Ballenilla, F., Díaz-Guzmán, J., Pradillo, J. M., Lizasoain, I., & Moro, M. A. (2019). Pharmacological Modulation of Neutrophil Extracellular Traps Reverses Thrombotic Stroke tPA (Tissue-Type Plasminogen Activator) Resistance. **Stroke**, 50(11), 3228–3237.
- Ponomarev, E. D., Veremeyko, T., & Weiner, H. L. (2013). MicroRNAs are universal regulators of differentiation, activation, and polarization of microglia and macrophages in normal and diseased CNS. **Glia**, 61(1), 91–103.

- Powers, W. J., Rabinstein, A. A., Ackerson, T., Adeoye, O. M., Bambakidis, N. C., Becker, K., Biller, J., Brown, M., Demaerschalk, B. M., Hoh, B., Jauch, E. C., Kidwell, C. S., Leslie-Mazwi, T. M., Ovbiagele, B., Scott, P. A., Sheth, K. N., Southerland, A. M., Summers, D. V., & Tirschwell, D. L. (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(12), e344–e418.
- Prince, L. R., Whyte, M. K., Sabroe, I., & Parker, L. C. (2011). The role of TLRs in neutrophil activation. **Current opinion in pharmacology**, 11(4), 397–403.
- Qiu, L., Cai, Y., Geng, Y., Yao, X., Wang, L., Cao, H., Zhang, X., Wu, Q., Kong, D., Ding, D., Shi, Y., Wang, Y., & Wu, J. (2022). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles attenuate tPA-induced blood-brain barrier disruption in murine ischemic stroke models. **Acta Biomaterialia**, 154, 424–442.
- Rabinovich-Nikitin, I., Lieberman, B., Martino, T. A., & Kirshenbaum, L. A. (2019). Circadian-Regulated Cell Death in Cardiovascular Diseases. **Circulation**, 139(7), 965–980.
- Reidler, P., Brehm, A., Sporns, P. B., Burbano, V. G., Stueckelschweiger, L., Broocks, G., Liebig, T., Psychogios, M. N., Ricke, J., Dimitriadis, K., Dichgans, M., Kunz, W. G., & Tiedt, S. (2023). Circadian rhythm of ischaemic core progression in human stroke. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, 94(1), 70–73.
- Remer, K. A., Brcic, M., & Jungi, T. W. (2003). Toll-like receptor-4 is involved in eliciting an LPS-induced oxidative burst in neutrophils. **Immunology letters**, 85(1), 75–80.
- Ribo, M., Montaner, J., Molina, C. A., Arenillas, J. F., Santamarina, E., & Alvarez-Sabín, J. (2004). Admission fibrinolytic profile predicts clot lysis resistance in stroke patients treated with tissue plasminogen activator. **Thrombosis and Haemostasis**, 91(6), 1146–1151.
- Riedel, C. H., Zimmermann, P., Jensen-Kondering, U., Stingele, R., Deuschl, G., & Jansen, O. (2011). The importance of size: successful recanalization by intravenous thrombolysis in acute anterior stroke depends on thrombus length. **Stroke**, 42(6), 1775–1777.
- Rijken, D. C., Hoylaerts, M., & Collen, D. (1982). Fibrinolytic properties of one-chain and two-chain human extrinsic (tissue-type) plasminogen activator. **The Journal of biological chemistry**, 257(6), 2920–2925.
- Roenneberg, T. and Merrow, M. (2016). The Circadian Clock and Human Health. **Current biology**, 26(10), R432–R443.

- Rosamond, W., Flegal, K., Furie, K., Go, A., Greenlund, K., Haase, N. Stroke Statistics, S. (2008). Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**, 117(4), e25-146.
- Rosell, A., Cuadrado, E., Ortega-Aznar, A., Hernández-Guillamon, M., Lo, E. H., & Montaner, J. (2008). MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. **Stroke**, 39(4), 1121–1126.
- Rosenberg, G. A., Estrada, E. Y., & Dencoff, J. E. (1998). Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. **Stroke**, 29(10), 2189–2195.
- Ruhnau, J., Schulze, J., Dressel, A., & Vogelgesang, A. (2017). Thrombosis, Neuroinflammation, and Poststroke Infection: The Multifaceted Role of Neutrophils in Stroke. **Journal of Immunology Research**, 2017, 5140679.
- Ryu, W. S., Hong, K. S., Jeong, S. W., Park, J. E., Kim, B. J., Kim, J. T., Lee, K. B., Park, T. H., Park, S. S., Park, J. M., Kang, K., Cho, Y. J., Park, H. K., Lee, B. C., Yu, K. H., Oh, M. S., Lee, S. J., Kim, J. G., Cha, J. K., Kim, D. H., Kim, D. E. (2022). Association of ischemic stroke onset time with presenting severity, acute progression, and long-term outcome: A cohort study. **PLoS Medicine**, 19(2), e1003910.
- Sandoval, K. E., & Witt, K. A. (2008). Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke. **Neurobiology of Disease**, 32(2), 200–219.
- Savage, B., Almus-Jacobs, F., & Ruggeri, Z. M. (1998). Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. **Cell**, 94(5), 657–666.
- Schallert, T., Fleming, S. M., Leasure, J. L., Tillerson, J. L., & Bland, S. T. (2000). CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. **Neuropharmacology**, 39(5), 777–787.
- Scheer, F.A.J.L., Shea, S.A. (2014). Human circadian system causes a morning peak in prothrombotic plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) independent of the sleep/wake cycle. **Blood**. 123(4), 590-3.
- Schloss, M. J., Horckmans, M., Nitz, K., Duchene, J., Drechsler, M., Bidzhekov, K., Scheiermann, C., Weber, C., Soehnlein, O., & Steffens, S. (2016). The time-of-day of myocardial infarction onset affects healing through oscillations in cardiac neutrophil recruitment. **EMBO Molecular Medicine**, 8(8), 937–948.

- Sharp, C. D., Hines, I., Houghton, J., Warren, A., Jackson, T. H., 4th, Jawahar, A., Nanda, A., Elrod, J. W., Long, A., Chi, A., Minagar, A., & Alexander, J. S. (2003). Glutamate causes a loss in human cerebral endothelial barrier integrity through activation of NMDA receptor. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 285(6), H2592–H2598.
- Shattil, S. J., Kim, C., & Ginsberg, M. H. (2010). The final steps of integrin activation: the end game. *Nature reviews*. **Molecular Cell Biology**, 11(4), 288–300.
- Shaul, M. E., Levy, L., Sun, J., Mishalian, I., Singhal, S., Kapoor, V., Horng, W., Fridlender, G., Albelda, S. M., & Fridlender, Z. G. (2016). Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGF $\beta$  modulation: A transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs. **Oncoimmunology**, 5(11), e1232221.
- Shi, K., Zou, M., Jia, D. M., Shi, S., Yang, X., Liu, Q., Dong, J. F., Sheth, K. N., Wang, X., & Shi, F. D. (2021). tPA Mobilizes Immune Cells That Exacerbate Hemorrhagic Transformation in Stroke. **Circulation Research**, 128(1), 62–75.
- Shibuya, T., Kamiyama, A., Sawada, H., Kikuchi, K., Maruyama, M., Sawado, R., Ikeda, N., Asano, K., Kurotaki, D., Tamura, T., Yoneda, A., Imada, K., Satoh, T., Akira, S., Tanaka, M., & Yotsumoto, S. (2021). Immunoregulatory Monocyte Subset Promotes Metastasis Associated With Therapeutic Intervention for Primary Tumor. **Frontiers in Immunology**, 12, 663115.
- Shichita, T., Sakaguchi, R., Suzuki, M., & Yoshimura, A. (2012). Post-ischemic inflammation in the brain. **Frontiers in Immunology**, 3, 132.
- Simonsen, C. Z., Schmitz, M. L., Madsen, M. H., Mikkelsen, I. K., Chandra, R. V., Leslie-Mazwi, T., & Andersen, G. (2016). Early neurological deterioration after thrombolysis: Clinical and imaging predictors. **International Journal of Stroke**, 11(7), 776–782.
- Singhal, G., & Baune, B. T. (2017). Microglia: An Interface between the Loss of Neuroplasticity and Depression. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 11, 270.
- Soblosky, J. S., Song, J. H., & Dinh, D. H. (2001). Graded unilateral cervical spinal cord injury in the rat: evaluation of forelimb recovery and histological effects. **Behavioural Brain Research**, 119(1), 1–13.
- Special report from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Classification of cerebrovascular diseases III. (1990). **Stroke**, 21(4), 637–676.
- Sreeramkumar, V., Adrover, J. M., Ballesteros, I., Cuartero, M. I., Rossaint, J., Bilbao, I., Nacher, M., Pitaval, C., Radovanovic, I., Fukui, Y., McEver, R. P., Filippi, M. D., Lizasoain, I., Ruiz-Cabello, J., Zarbock, A., Moro, M. A., & Hidalgo, A. (2014). Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. **Science**, 346(6214), 1234–1238.

- Stamatovic, S. M., Shakui, P., Keep, R. F., Moore, B. B., Kunkel, S. L., Van Rooijen, N., & Andjelkovic, A. V. (2005). Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 25(5), 593–606.
- Stark, K., Philippi, V., Stockhausen, S., Busse, J., Antonelli, A., Miller, M., Schubert, I., Hoseinpour, P., Chandraratne, S., von Brühl, M. L., Gaertner, F., Lorenz, M., Agresti, A., Coletti, R., Antoine, D. J., Heermann, R., Jung, K., Reese, S., Laitinen, I., Schwaiger, M., Walch, A., Sperandio, M., Nawroth, P., Reinhardt, C., Jäckel, S., Bianchi, E., Massberg, S. (2016). Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice. **Blood**, 128(20), 2435–2449.
- Strbian, D., Durukan, A., Pitkonen, M., Marinkovic, I., Tatlisumak, E., Pedrono, E., Abo-Ramadan, U., & Tatlisumak, T. (2008). The blood-brain barrier is continuously open for several weeks following transient focal cerebral ischemia. **Neuroscience**, 153(1), 175–181.
- Su, E. J., Fredriksson, L., Geyer, M., Folestad, E., Cale, J., Andrae, J., Gao, Y., Pietras, K., Mann, K., Yepes, M., Strickland, D. K., Betsholtz, C., Eriksson, U., & Lawrence, D. A. (2008). Activation of PDGF-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. **Nature Medicine**, 14(7), 731–737.
- Summers, C., Rankin, S. M., Condliffe, A. M., Singh, N., Peters, A. M., & Chilvers, E. R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. **Trends in Immunology**, 31(8), 318–324.
- Sutton, C. E., Finlay, C. M., Raverdeau, M., Early, J. O., DeCoursey, J., Zaslona, Z., O'Neill, L. A. J., Mills, K. H. G., & Curtis, A. M. (2017). Loss of the molecular clock in myeloid cells exacerbates T cell-mediated CNS autoimmune disease. **Nature Communications**, 8(1), 1923.
- Suzuki, M., Ikari, J., Anazawa, R., Tanaka, N., Katsumata, Y., Shimada, A., Suzuki, E., & Tatsumi, K. (2020). PAD4 Deficiency Improves Bleomycin-induced Neutrophil Extracellular Traps and Fibrosis in Mouse Lung. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, 63(6), 806–818.
- Syková E. (2001). Glial diffusion barriers during aging and pathological states. **Progress in Brain Research**, 132, 339–363.
- Takizawa, S., Aratani, Y., Fukuyama, N., Maeda, N., Hirabayashi, H., Koyama, H., Shinohara, Y., & Nakazawa, H. (2002). Deficiency of myeloperoxidase increases infarct volume and nitrotyrosine formation in mouse brain. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 22(1), 50–54.

- Tang, Y., Xu, H., Du, X., Lit, L., Walker, W., Lu, A., Ran, R., Gregg, J. P., Reilly, M., Pancioli, A., Khoury, J. C., Sauerbeck, L. R., Carrozzella, J. A., Spilker, J., Clark, J., Wagner, K. R., Jauch, E. C., Chang, D. J., Verro, P., Broderick, J. P., ... Sharp, F. R. (2006). Gene expression in blood changes rapidly in neutrophils and monocytes after ischemic stroke in humans: a microarray study. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, 26(8), 1089–1102.
- Terruso, V., D'Amelio, M., Di Benedetto, N., Lupo, I., Saia, V., Famoso, G., Mazzola, M. A., Aridon, P., Sarno, C., Ragonese, P., & Savettieri, G. (2009). Frequency and determinants for hemorrhagic transformation of cerebral infarction. **Neuroepidemiology**, 33(3), 261–265.
- Thålin, C., Demers, M., Blomgren, B., Wong, S. L., von Arbin, M., von Heijne, A., Laska, A. C., Wallén, H., Wagner, D. D., & Aspberg, S. (2016). NETosis promotes cancer-associated arterial microthrombosis presenting as ischemic stroke with troponin elevation. **Thrombosis Research**, 139, 56–64.
- Thomalla, G., Sobesky, J., Köhrmann, M., Fiebach, J. B., Fiehler, J., Zaro Weber, O., Krutzelmann, A., Kucinski, T., Rosenkranz, M., Röther, J., & Schellinger, P. D. (2007). Two tales: hemorrhagic transformation but not parenchymal hemorrhage after thrombolysis is related to severity and duration of ischemia: MRI study of acute stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator within 6 hours. **Stroke**, 38(2), 313–318.
- Thosar, S. S., Butler, M. P., & Shea, S. A. (2018). Role of the circadian system in cardiovascular disease. **The Journal of Clinical Investigation**, 128(6), 2157–2167.
- Tiedt, S., Buchan, A. M., Dichgans, M., Lizasoain, I., Moro, M. A., & Lo, E. H. (2022). The neurovascular unit and systemic biology in stroke - implications for translation and treatment. *Nature reviews. Neurology*, 18(10), 597–612.
- Timm, A., Fahrenkrug, J., Jørgensen, H.L., Sennels, H.P., Goetze, J.P. (2014). Diurnal variation of von Willebrand factor in plasma: the Bispebjerg study of diurnal variations. **European Journal of Haematology**. 93(1), 48-53.
- Timmons, G. A., O'Siorain, J. R., Kennedy, O. D., Curtis, A. M., & Early, J. O. (2020). Innate Rhythms: Clocks at the Center of Monocyte and Macrophage Function. **Frontiers in Immunology**, 11, 1743.
- Tsivgoulis, G., Katsanos, A. H., Sandset, E. C., Turc, G., Nguyen, T. N., Bivard, A., Fischer, U., & Khatri, P. (2023). Thrombolysis for acute ischaemic stroke: current status and future perspectives. **The Lancet Neurology**, 22(5), 418–429.
- Tsuda, Y., Takahashi, H., Kobayashi, M., Hanafusa, T., Herndon, D. N., & Suzuki, F. (2004). Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Immunity**, 21(2), 215–226.

- Turner, R. J., & Sharp, F. R. (2016). Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, 10, 56.
- Uhl, B., Vadlau, Y., Zuchtriegel, G., Nekolla, K., Sharaf, K., Gaertner, F., Massberg, S., Krombach, F., & Reichel, C. A. (2016). Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. **Blood**, 128(19), 2327–2337.
- Vaibhav, K., Braun, M., Alverson, K., Khodadadi, H., Kutiyawalla, A., Ward, A., Banerjee, C., Sparks, T., Malik, A., Rashid, M. H., Khan, M. B., Waters, M. F., Hess, D. C., Arbab, A. S., Vender, J. R., Baban, B., & Dhandapani, K. M. (2020). NETs exacerbate neurological deficits after traumatic brain injury. **Science Advances**, 6(22), eaax8847.
- Vallés, J., Lago, A., Santos, M. T., Latorre, A. M., Tembl, J. I., Salom, J. B., Nieves, C., & Moscardó, A. (2017). Neutrophil extracellular traps are increased in patients with acute ischemic stroke: prognostic significance. **Thrombosis and haemostasis**, 117(10), 1919–1929.
- Van Itallie, C. M., Holmes, J., Bridges, A., Gookin, J. L., Coccaro, M. R., Proctor, W., Colegio, O. R., & Anderson, J. M. (2008). The density of small tight junction pores varies among cell types and is increased by expression of claudin-2. **Journal of cell science**, 121(Pt 3), 298–305.
- Vogelgesang, A., Becker, K. J., & Dressel, A. (2014). Immunological consequences of ischemic stroke. **Acta Neurologica Scandinavica**, 129(1), 1–12.
- Von Hundelshausen, P., & Weber, C. (2007). Platelets as immune cells: bridging inflammation and cardiovascular disease. **Circulation Research**, 100(1), 27–40.
- Vyas, M. V., Garg, A. X., Iansavichus, A. V., Costella, J., Donner, A., Laugsand, L. E., Janszky, I., Mrkobrada, M., Parraga, G., & Hackam, D. G. (2012). Shift work and vascular events: systematic review and meta-analysis. **BMJ**, 345, e4800.
- Wakisaka, Y., Chu, Y., Miller, J. D., Rosenberg, G. A., & Heistad, D. D. (2010). Spontaneous intracerebral hemorrhage during acute and chronic hypertension in mice. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 30(1), 56–69.
- Wang, L., Li, Z., Zhang, X., Wang, S., Zhu, C., Miao, J., Chen, L., Cui, L., & Qiao, H. (2014). Protective effect of shikonin in experimental ischemic stroke: attenuated TLR4, p-p38MAPK, NF-κB, TNF-α and MMP-9 expression, up-regulated claudin-5 expression, ameliorated BBB permeability. **Neurochemical research**, 39(1), 97–106.
- Wang, R., Zhu, Y., Liu, Z., Chang, L., Bai, X., Kang, L., Cao, Y., Yang, X., Yu, H., Shi, M. J., Hu, Y., Fan, W., & Zhao, B. Q. (2021). Neutrophil extracellular traps promote tPA-induced brain hemorrhage via cGAS in mice with stroke. **Blood**, 138(1), 91–103.

- Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., Li, P., Wang, D., Hayama, R., Leonelli, L., Han, H., Grigoryev, S. A., Allis, C. D., & Coonrod, S. A. (2009). Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. **The Journal of Cell Biology**, 184(2), 205–213.
- Wang, Z., Yang, F., He, Z., & Liang, C. (2023). Light-induced circadian rhythm disorder leads to microvascular dysfunction via up-regulating NETs. **Microvascular research**, 150, 104592.
- Wattananit, S., Tornero, D., Graubardt, N., Memanishvili, T., Monni, E., Tatarishvili, J., Miskinyte, G., Ge, R., Ahlenius, H., Lindvall, O., Schwartz, M., & Kokaia, Z. (2016). Monocyte-Derived Macrophages Contribute to Spontaneous Long-Term Functional Recovery after Stroke in Mice. **The Journal of Neuroscience**, 36(15), 4182–4195.
- Westergaard, E., & Brightman, M. W. (1973). Transport of proteins across normal cerebral arterioles. **The Journal of Comparative Neurology**, 152(1), 17–44.
- Winnersbach, P., Rossaint, J., Buhl, E. M., Singh, S., Lölsberg, J., Wessling, M., Rossaint, R., & Bleilevens, C. (2022). Platelet count reduction during in vitro membrane oxygenation affects platelet activation, neutrophil extracellular trap formation and clot stability, but does not prevent clotting. **Perfusion**, 37(2), 134–143.
- Wu, X., Guo, Y., Zeng, H., Chen, G. (2022). DNase-1 Treatment Exerts Protective Effects in Neurogenic Pulmonary Edema via Regulating the Neutrophil Extracellular Traps after Subarachnoid Hemorrhage in Mice. **Journal of Clinical Medicine**. 11(15), 4349.
- Xie, F., Tan, Q., Yu, A., Guo, P., Wang, L., Zeng, Z., Liang, L., Xian, J., Feng, H., & Chen, Z. (2021). The role of cell-free DNA in fibrinolysis for intraventricular hemorrhage. **Journal of neurosurgery**, 135(4), 1105–1112.
- Xie, L., & Yang, S. H. (2015). Interaction of astrocytes and T cells in physiological and pathological conditions. **Brain Research**, 1623, 63–73.
- Yang, L. Y., Luo, Q., Lu, L., Zhu, W. W., Sun, H. T., Wei, R., Lin, Z. F., Wang, X. Y., Wang, C. Q., Lu, M., Jia, H. L., Chen, J. H., Zhang, J. B., & Qin, L. X. (2020). Increased neutrophil extracellular traps promote metastasis potential of hepatocellular carcinoma via provoking tumorous inflammatory response. **Journal of hematology and oncology**, 13(1), 3.
- Yang, Q. W., Li, J. C., Lu, F. L., Wen, A. Q., Xiang, J., Zhang, L. L., Huang, Z. Y., & Wang, J. Z. (2008). Upregulated expression of toll-like receptor 4 in monocytes correlates with severity of acute cerebral infarction. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, 28(9), 1588–1596.
- Yang, Y., & Rosenberg, G. A. (2011). Blood-brain barrier breakdown in acute and chronic cerebrovascular disease. **Stroke**, 42(11), 3323–3328.

- Yang, Y., & Rosenberg, G. A. (2015). Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke. **Brain Research**, 1623, 30–38.
- Zhang, D., Chen, G., Manwani, D., Mortha, A., Xu, C., Faith, J. J., Burk, R. D., Kunisaki, Y., Jang, J. E., Scheiermann, C., Merad, M., & Frenette, P. S. (2015). Neutrophil ageing is regulated by the microbiome. **Nature**, 525(7570), 528–532.
- Zhang, R. L., Chopp, M., Chen, H., & Garcia, J. H. (1994). Temporal profile of ischemic tissue damage, neutrophil response, and vascular plugging following permanent and transient (2H) middle cerebral artery occlusion in the rat. **Journal of the Neurological Sciences**, 125(1), 3–10.
- Zhang, R., Wu, X., Hu, W., Zhao, L., Zhao, S., Zhang, J., Chu, Z., & Xu, Y. (2019). Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts hemorrhagic transformation in ischemic stroke: A meta-analysis. **Brain and Behavior**, 9(9), e01382.
- Zhao, Z., Pan, Z., Zhang, S., Ma, G., Zhang, W., Song, J., Wang, Y., Kong, L., Du, G. (2023). Neutrophil extracellular traps: A novel target for the treatment of stroke. **Pharmacology and Therapeutics**, 241, 108328.
- Zheng, Y., Lieschke, F., Schaefer, J. H., Wang, X., Foerch, C., & van Leyen, K. (2019). Dual Antiplatelet Therapy Increases Hemorrhagic Transformation Following Thrombolytic Treatment in Experimental Stroke. **Stroke**, 50(12), 3650–3653.
- Zhou, M., Wang, C. M., Yang, W. L., & Wang, P. (2013). Microglial CD14 activated by iNOS contributes to neuroinflammation in cerebral ischemia. **Brain Research**, 1506, 105–114.
- Zhu, A., Rajendram, P., Tseng, E., Coutts, S. B., & Yu, A. Y. X. (2022). Alteplase or tenecteplase for thrombolysis in ischemic stroke: An illustrated review. **Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis**, 6(6), e12795.