DAÑO EN LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA EN LA HEMORRAGIA SUBARACNOIDEA: RELEVANCIA CLÍNICA, PAPEL DE LA HIPERGLICEMIA Y EFECTO DE LA POTENCIACIÓN DE MECANISMOS ANTIOXIDANTES ENDÓGENOS. UN ESTUDIO TRASLACIONAL

Dr. Sergio Amaro Delgado
Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer, Hospital Clínic - IDIBAPS
Dr. Carles Justicia Mercader
Institut d'Investigacions Biomèdiques de Barcelona - CSIC
Dr. Pedro Ramos Cabrer
Centro de Investigación Cooperativa en Biociencias - CIC bioGune Bizkaia

1. Resumen

La hemorragia subaracnoidea espontánea aneurismática (HSA) es una enfermedad devastadora. Al inicio del sangrado se desencadenan una serie de mecanismos perjudiciales que acaban resultando en la disrupción de la barrera hematoencefálica (BHE), con un papel esencial de la hiperglucemia y del estrés oxidativo. No obstante, la relevancia clínica y los mediadores de la disrupción de la BHE no son bien conocidos.
En este contexto, como principal hipótesis de este proyecto nos planteamos que las personas afectas por una HSA presentarían una alteración precoz y difusa de la BHE y que esta alteración de la permeabilidad de la BHE podría ser identificada y cuantificada mediante técnicas de resonancia magnética cerebral de perfusión (Dynamic Contrast Enhanced Magnetic Resonance Imaging, DCE-MRI). La alteración de la permeabilidad detectada en las pruebas de neuroimagen se correlacionaría con la presencia en sangre y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de marcadores de daño de la BHE y con la severidad del daño inicial. Igualmente, el daño de la BHE estaría relacionado con condiciones de hiperglucemia i de exceso de estrés oxidativo. Finalmente, la modulación de estos mecanismos mediante la administración de fármacos antioxidantes dirigidos preferentemente a las zonas de mayor daño de la BHE podría ser beneficiosa en un modelo experimental de esta enfermedad. De acuerdo con estas hipótesis, los objetivos específicos planteados en este proyecto fueron evaluar la presencia de daño de la BHE mediante el uso de DCE-MRI, evaluar la relevancia pronóstica del daño de la BHE, definir el papel de la hiperglucemia y del estrés oxidativo en el daño de la BHE, y finalmente evaluar el efecto de la administración de fármacos antioxidantes dirigidos al daño de la BHE en un modelo experimental de HSA mediante una aproximación teranóstica en condiciones de normoglucemia y de hiperglucemia.

De acuerdo con estos objetivos, hemos llevado a cabo un estudio traslacional enfocado a definir la relación entre la hiperglucemia, el estrés oxidativo y el daño de la BHE en pacientes afectos de HSA aneurismática y en un modelo experimental de la enfermedad. En las personas afectas de HSA, la disrupción de la BHE se ha estudiado mediante el uso de técnicas avanzadas de neuroimagen (DCE-MRI) de forma longitudinal (70 casos) para definir su asociación con variables de pronóstico clínico y radiológico a corto y largo plazo,

con especial atención al papel deletéreo de la hiperglucemia y del estrés oxidativo. Igualmente, se ha caracterizado un modelo experimental de HSA en rata (perforación mecánica endoluminal de la arteria cerebral media) mediante la evaluación longitudinal de la permeabilidad de la BHE (DCE-MRI) y del estudio *in vivo* de estrés oxidativo en el cerebro (PET) en condiciones de normoglucemia y de hiperglucemia. En este modelo se planteó la modulación de estos mecanismos deletéreos mediante la administración de fármacos antioxidantes dirigidos a reducir el daño de la BHE, tales como el ácido úrico.

2. Resultados

Estudio clínico

Al final del estudio se reclutaron un total de 70 personas afectas de HSA con adquisiciones de DCE-MRI evaluables realizadas dentro de las primeras 72+/-48 h (T1) posteriores al sangrado y a los 3 meses (T90). Los mapas de permeabilidad se posprocesaron para obtener los valores de k-trans, que es un biomarcador asociado al aumento de la permeabilidad de la BHE. Los valores de k-trans se extrajeron de todo el cerebro y tras la segmentación de la sustancia gris y blanca y en diferentes territorios de irrigación arterial. El grado de recuperación clínica se evaluó mediante la escala modificada de Rankin (buena recuperación, puntuación inferior a 3). La asociación entre los valores de permeabilidad (k-trans) y las variables de pronóstico clínico se evaluó en modelos de regresión univariantes y multivariantes ajustados a variables de confusión como la edad, la afectación clínica inicial, la extensión radiológica del sangrado cerebral y el tamaño del aneurisma cerebral roto. De las 70 personas incluidas, un total de un 63% eran mujeres, el 70% tenían una HSA de grado I-III en la escala WFNS, el 61% presentaba una distribución de sangre difusa con afectación intraventricular y la mediana de edad era de 55 años. Los valores de k-trans fueron significativamente superiores en la adquisición de neuroimagen realizada en T1 en comparación con la realizada en T90, tanto en todo el cerebro como en las segmentaciones de sustancia gris/blanca y en los diferentes territorios de irrigación arterial ($p<0,005$ en todas las comparaciones). En los modelos ajustados, los valores elevados de k-trans se asociaron de forma independiente a una peor recuperación clínica a los 3 meses [OR ajustado (por cada 10% de aumento en el

valor de k-trans) = 2,16, 95% CI = 1,30-3,58, p = 0,003]. De acuerdo con estas observaciones pudimos concluir que la HSA induce una alteración difusa y precoz de la permeabilidad de la BHE que se puede detectar y seguir con técnicas de neuroimagen avanzada y que estas alteraciones se asocian a una peor recuperación neurológica. De forma global, estos hallazgos indican que la disrupción de la BHE es un mecanismo potencialmente implicado en el daño cerebral secundario en la HSA y que su modulación podría ser una diana terapéutica. En esta cohorte de personas afectas de HSA no se identificó una relación directa entre los valores de k-trans durante las primeras 72 horas posteriores al sangrado y los valores de glucosa en sangre. No obstante, en esta muestra de pacientes los valores de glucosa elevados recogidos durante los primeros 3 días de la enfermedad se asociaron de forma independiente a una peor recuperación clínica a los 3 meses y esta asociación estaba mediada (31%) por la presencia de daño neuroaxonal evaluado mediante la cuantificación de la concentración en sangre de neurofilamentos de cadena ligera y mediante el análisis del daño microestructural cerebral con técnicas de resonancia magnética con tensor de difusión. No se encontró ninguna asociación entre los valores de k-trans derivados de la adquisición de DCE-MRI y las concentraciones en sangre de otros marcadores de daño de la BHE tales como las metaloproteasas de la matriz extracelular (MMP) o marcadores de estrés oxidativo.

Estudio preclínico

La evaluación del efecto de la hiperglucemia en la HSA experimental se realizó en un modelo animal en rata basado en la perforación endoluminal mecánica de la arteria cerebral media. En los primeros experimentos se evaluaron un total de 80 animales sujetos a hiperglucemia moderada o severa (inducida mediante la administración de dextrosa 30 minutos antes de la inducción del sangrado) y con normoglucemia. Estos primeros estudios mostraron que la hiperglucemia se asociaba a una tasa de mortalidad superior a la normoglucemia dentro de las primeras 24 horas tras la inducción del sangrado en comparación con la condición de normoglucemia. Adicionalmente, la hiperglucemia severa se asoció a una menor supervivencia a los 3 días del sangrado, en comparación con la hiperglucemia moderada o la normoglucemia. Al día 1 y al día 3, la hiperglucemia (severa y moderada) se vio asociada a un aumento del volumen de lesiones isquémicas cerebrales, a un mayor efecto de masa y a una peor función neurológica en

comparación con la normoglucemia. Igualmente, los animales hiperglucémicos mostraron una mayor disrupción de la BHE en las pruebas de neuroimagen (DCE-MRI). De forma adicional, se realizaron estudios de imagen basados en PET para evaluar la expresión de las MMPs en el cerebro de los animales estudiados. La captación del radiotrazador utilizado ([18F]BR-351) fue superior en los cerebros de los animales con glucosa elevada, lo cual refleja una expresión incrementada de MMPs tanto en el hemisferio ipsilateral a la arteria perforada como en las lesiones isquémicas. Estos hallazgos de PET fueron confirmados *ex vivo* en zimografías realizadas en tejido cerebral, en las que se observó un aumento significativo de MMP-9 el día 1 y de MMP-2 el día 3 en las ratas hiperglucémicas en comparación con las normoglucémicas. De forma global, en este modelo experimental de HSA hemos podido definir la relación entre la hiperglucemia y la activación de MMPs durante los primeros días tras la inducción del sangrado. Adicionalmente, utilizamos un radiotrazador de PET sensible al estrés oxidativo ([18F]-FSPG) en condiciones de hiperglucemia y de normoglucemia a las 24 y 72 horas de la inducción del sangrado. La captación del radiotrazador de estrés oxidativo no se relacionó con el estado de hiperglucemia en este modelo. En el momento de redacción de este informe, los estudios de intervención basados en la administración del fármaco antioxidante dirigido al daño de la BHE (ácido úrico no modificado y encapsulado en liposomas) se encuentran en las fases finales de desarrollo, por lo que no hemos podido obtener todavía conclusiones definitivas de la viabilidad de esta estrategia farmacológica.

3. Relevancia y posibles implicaciones futuras

En relación con la relevancia y posible implicación clínica de los resultados obtenidos, podemos destacar diversas observaciones.

En primer lugar, hemos observado que las personas afectas de HSA presentan una alteración aguda, difusa y precoz de la BHE que se puede identificar y cuantificar con técnicas de neuroimagen avanzada (DCE-MRI). Esta alteración de la BHE aparece durante los primeros días del sangrado y se recupera en una fase más diferida. Igualmente, la magnitud de la alteración precoz de la permeabilidad de la BHE se relaciona de forma

significativa con una peor recuperación clínica a los 3 meses del sangrado cerebral. Este hallazgo es relevante desde un punto de vista clínico, porque por primera vez hemos podido identificar y cuantificar de forma reproducible este mecanismo de daño en la HSA. Así, la utilización de este biomarcador de imagen podría ser de utilidad como marcador pronóstico de la enfermedad y como marcador sucedáneo de eficacia clínica de estrategias farmacológicas y no farmacológicas enfocadas a modular el daño de la BHE en una fase precoz. Aunque no hemos podido identificar una relación directa entre la hiperglucemia y el aumento de permeabilidad de la BHE, sí que hemos podido confirmar la relevancia pronóstica de la hiperglucemia en la HSA y que esta relación negativa está mediada por la incidencia de daño neuroaxonal. Esta observación es relevante desde un punto de vista clínico, porque apoya el posible papel protector de la modulación de los niveles de glucosa o de los mecanismos desencadenados por la hiperglucemia durante los primeros días tras el sangrado y también apoya el papel de los marcadores de daño neuroaxonal (neurofilamentos en sangre o medidas de integridad microestructural en neuroimagen) en la estratificación pronóstica y en el seguimiento del efecto de tratamientos administrados en la fase aguda de la HSA.

En el modelo preclínico, hemos podido caracterizar un modelo experimental de HSA utilizando técnicas de neuroimagen similares a las utilizadas en la parte clínica del proyecto (DCE-MRI) y también basadas en PET. Hemos podido identificar que la hiperglucemia promueve el daño cerebral en este modelo de la enfermedad y que este efecto está vehiculado en parte por un mayor daño de la BHE. La caracterización de este modelo tiene un interés traslacional claro, ya que podría permitir ensayar nuevas terapias basadas en modular los niveles de glucosa o los mecanismos de daño inducidos por la hiperglucemia, tales como el daño de la BHE o el estrés oxidativo. En el momento de la redacción de esta memoria, los estudios de intervención basados en la administración de fármacos antioxidantes dirigidos a las zonas de mayor daño de la BHE se encuentran en la fase final de desarrollo y, en función de los resultados obtenidos, podrían tener un interés de traslación clínica.

4. Bibliografía científica generada

Comunicaciones

"The association between initial hyperglycemia and poor outcome in aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients is modified by the initial clinical severity". 15th International Conference on SubArachnoid Hemorrhage (ISAH 2019). 25-28 de junio de 2019, Muziekgebouw Ámsterdam. (Presentación de un póster).

"Synthetic MRI in subarachnoid hemorrhage". European Stroke Organisation and World Stroke Organization Conference (ESO-WSO 2020). 7-9 de noviembre de 2020. (Conferencia virtual. Presentación de un póster).

"Blood-brain barrier disruption in spontaneous subarachnoid hemorrhage: a dynamic contrast-enhanced MRI stuy". European Stroke Organisation and World Stroke Organization Conference (ESO-WSO 2020). 7-9 de noviembre de 2020. (Conferencia virtual. Presentación de un póster).

"Magnetic Resonance Imaging evaluation of the role of hyperglycemia in experimental subarachnoid haemorrhage". 15th European Molecular Imaging Meeting. 24-28 de agosto de 2020. (Presentación de un póster).

"Longitudinal evaluation of blood-brain barrier disruption in spontaneous subarachnoid haemorrhage: a dynamic contrast enhanced MRI study". ESOC 2021. 1-3 de septiembre de 2021. (Conferencia virtual. Comunicación oral).

"White matter injury in spontaneous subarachnoid haemorrhage: predictors and clinical relevance". ESOC 2021. 1-3 de septiembre de 2021. (Conferencia virtual. Comunicación oral).

"Multimodal imaging evaluation of the role of hyperglycemia in experimental subarachnoid haemorrhage". 17th European Molecular Imaging Meeting. 15-18 de marzo de 2022, Tesalónica. (Comunicación oral).

Publicaciones

Montejo C, Laredo C, Llull L, Martínez-Heras E, López-Rueda A, Torné R, Garrido C, Bargallo N, Llufriu S, Amaro S. *Synthetic MRI in subarachnoid haemorrhage*. Clin Radiol. 2021; 76(10):785.e17-785.e23. Epub 2021 Jun 27. doi: 10.1016/j.crad.2021.05.021.

Torné R, Hoyos J, Llull L *et al. Edema Resolution and Clinical Assessment in Poor-Grade Subarachnoid Hemorrhage: Useful Indicators to Predict Delayed Cerebral Infarctions?*. J Clin Med. 2021;10(2):321. Publicado el 17 de enero de 2021. doi:10.3390/jcm10020321.

Publicaciones en fase de redacción

"Blood-brain barrier disruption in spontaneous subarachnoid hemorrhage: a dynamic contrast-enhanced MRI study". 2022. (En preparación).

"Neuroaxonal injury mediates glucose-driven brain damage in spontaneous Subarachnoid Hemorrhage". 2022. (En preparación).

"Multimodal Imaging evaluation of the role of hyperglycemia in experimental subarachnoid haemorrhage". 2022. (En preparación).