

TESI DOCTORAL

**LES METAL-LOPROTEÏNASES DE
MATRIU EN EL PARÈNQUIMA
CEREBRAL**

**IMPLICACIÓ EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL
HUMANA**

ANNA ROSELL NOVEL

TESI DOCTORAL

**LES METAL·LOPROTEÏNASES DE MATRIU
EN EL PARÈNQUIMA CEREBRAL:**

**IMPLICACIÓ EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL
HUMANA**

ANNA ROSELL NOVEL

**Facultat de Medicina
Departament de Medicina Interna
Universitat Autònoma de Barcelona**

**Directors: Dr. Joan Montaner Villalonga
Dr. José Alvarez-Sabín**

Barcelona, Juny del 2005

Aquesta Tesi Doctoral s'ha realitzat en el Laboratori d'Investigació Neurovascular de l'Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron amb el suport de les beques FIS 02/773 i Red CIEN i de la beca pre-doctoral de l'Institut de Recerca de l'Hospital Vall d'Hebron que gaudeix l'Anna Rosell des de gener del 2003.

Laboratori d'Investigació Neurovascular
Unitat Neurovascular, Servei de Neurologia
Hospital Universitari Vall d'Hebron



Universitat Autònoma de Barcelona
Facultat de Medicina
Departament de Medicina Interna



Universitat
Autònoma
de Barcelona

*Existe un tiempo para que todas las cosas vayan delante,
y existe un tiempo para que vayan detrás;
un tiempo para respirar despacio,
y otro para hacerlo deprisa;
un tiempo para crecer en fortaleza,
y otro para declinar;
un tiempo para subir y otro para bajar.
[...]*

*Quien permanece en el lugar en el que ha encontrado su verdadera casa,
vive mucho tiempo;
y quien muere, pero no perece, goza de la auténtica longevidad.*

Lao Tse

AGRAÏMENTS

Volia ser metge, quan anava a l'institut vaig decidir que volia estudiar medicina. Però no vaig aconseguir aquelles "dècimes" que em faltaven i no em van deixar, no tenia prou "nota". Finalment vaig estudiar Biologia, on em vaig trobar a companys que també volien ser metges, veterinaris, ambientòlegs o simplement que encara no sabien què volien ser. Així som molts biòlegs quan comencem, una espècie rara que evoluciona ràpidament adaptant-se a tot tipus de feines i condicions.

Avui continuo sense ser metge però ja no m'importa. A vegades, sense adonar-te, rribes allà on volies anar però donant unes quantes voltes; jo no canviaria el meu camí amb moltes voltes per aquelles "dècimes" que em faltaven fa uns anys.

Quan vaig arribar a l'hospital, algú em va dir que havia de convertir-me en un híbrid entre un biòleg i un metge, no sé si això és possible però puc assegurar que mai no hauria imaginat que aprendria tanta neurologia des d'un laboratori. I per això, he d'agrair tantes coses:

A l'Isra, a l'Anna i a la Laura per compartir el dia a dia al laboratori, ells millor que ningú saben el que ha costat arribar fins aquí (vull recordar en especial els primers *westerns* i la sobredosi d'ELISAs del MISTIC), però també ho han fet més fàcil. És amb qui, poc a poc, hem fet que el Laboratori d'Investigació Neurovascular tingui forma i contingut.

Però sobretot al Joan Montaner per la confiança que ha dipositat en mi en tot moment, per donar-me la oportunitat de fer la feina que desitjava, per fer-nos sentir una peça imprescindible de l'equip, per confiar-nos projectes, *papers* o comunicacions a congressos que altres no tenen la oportunitat de realitzar, per deixar-me portar-li la contrària en mil discussions de les quals sempre treiem idees noves (al cap d'uns dies)...Gràcies. Les oportunitats s'han d'aprofitar però algú te les ha d'oferir.

Puc dir de l'equip de la Unitat Neurovascular, que em va a acollir de la millor manera possible i m'he sentit com una més d'un equip, que necessita dels altres per créixer i aprendre (no sé si s'imaginen tot el que he après d'ells).

Al Dr. Alvarez-Sabín, vull agrair-li l'oportunitat que em va donar en començar i la confiança que els projectes al Laboratori anirien endavant. Als adjunts, MAUs i residents, els qui considero part imprescindible en la feina que faig, he d'agrair-los la

seva col·laboració a processar mostres a altes hores de la matinada, aliquotar, demanar necros ... i els bons moments.

En especial, al Manolo que té una paciència infinita amb mi, i m'ha ensenyat TOT el que sé d'estadística.

També a l'equip de la Unitat d'Ictus, perquè sense la seva feina més enllà de l'atenció als pacients, no es podrien realitzar alguns dels estudis que estem fent.

A la Dra. Jasone Monasterio, a la Dorita, a la Pilar, a l'Enric i a la Bea que m'acollissin quan vaig arribar quan aleshores encara érem un laboratori "virtual" sense un espai físic on treballar junts. Van ser els meus primers companys de laboratori.

Per poder fer una tesi com aquesta és necessària la col·laboració de molta gent de l'hospital, a qui vull donar les gràcies: a la Dra. Arantxa Ortega per la seva entrega (a qualsevol hora) i per haver-me ensenyat tot el que sé de neuropatologia, mai no oblidaré el dia que vaig veure per primer cop un cervell humà. Al grup de neurotraumatologia del Dr. Sahuquillo (en especial a l'Anna i a la Gemma amb qui he compartit zimografies i microvials).

També a la Dra. Pilar Chacón i a la Isabel, per deixar-nos compartir aquells mesos en què vam fer ELISAs un dia sí i un altre també, i a la Dra. Carmen Domínguez i a la Pilar per la seva ajuda i per ensenyar-me a fer els primers *westerns*.

No vull oblidar la resta de gent de l'Institut de Recerca (especialment els becaris com jo) que m'han ajudat a treure la feina de cada dia amb consells, "truquillos" i pel material que m'han deixat tantes vegades (sempre demano, especialment a les meves veïnes de Pneumo).

I encara que a ells no els arribin mai aquests agraïments, vull recordar els pacients, però sobretot els seus familiars, que en moments tan difícils ens donen la oportunitat de recollir mostres per poder fer la nostra feina sense entendre molts cops de què es tracta.

I segur que avui no seria aquí sense l'ajut de "LA FAMÍLIA", amb tota la dimensió que pren aquesta paraula a casa meva, ni hauria escrit aqueta tesi en català sense les correccions del Jordi.

Finalment, vull d'agraïr l'ajut del Raül dia a dia, i el dels meus germans Roser i Oriol, per acompanyar-me fins aquí; i sobretot el dels meus pares per deixar-me fer sempre el que he cregut millor, tot i que a vegades sabien que m'equivocava. Vull recordar els que avui no poden llegir aquestes paraules, especialment a "l'Àvia Maria" (per mi besàvia) i el meu avi Antoni que estaria molt orgullós de "la Nena".

Barcelona, Juny del 2005.

ÍNDEX

AGRAÏMENTS	I
ÍNDEX	IV
1. INTRODUCCIÓ	1
1.1. L'Ictus	2
1.2. Cascada Isquèmica i Neuroinflamació	6
1.3. Les Metal·loproteïnases de Matriu	9
1.4. Metal·loproteïnases i Isquèmia Cerebral	13
1.5. Angiogènesi i Isquèmia Cerebral.....	19
2. OBJECTIUS DE L'ESTUDI	22
3. PACIENTS I MÈTODES	24
3.1. Pacients.....	25
3.1.1. Protocols d'Estudi Clínic.....	25
3.1.2. Protocols de Neuroimatge i Doppler.....	27
3.1.3. Protocols de Recollida de Material Biològic	29
3.2. Tècniques de Laboratori.....	32
3.2.1. ELISAs i <i>Protein Arrays</i>	32
3.2.2. <i>Western Blot</i>	33
3.2.3. Zimografia en Gelatina	34
3.2.4. Zimografia <i>in Situ</i>	35
3.2.5. Immunohistoquímica	36
3.3. Anàlisi Estadística	37

4. RESULTATS.....38

A Matrix Metalloproteinase Protein Array Reveals a Strong Relation between MMP-9 and MMP-13 with Diffusion-Weighted Image Lesion Increase in Human Stroke. (Stroke.2005;36) 39

In vivo Brain MMP-9 levels in Large Middle Cerebral Artery Infarctions with a Malignant Course. (Sotmès a Stroke, 2005)..... 51

Increased Brain Expression of Matrix Metalloproteinase-9 Following Ischemic and Hemorrhagic Human Stroke. (Sotmès a Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2005)..... 58

Implicación de la Angiogénesis en la Isquemia Cerebral Humana. (Revista de Neurología. 2004;38:1076-1082)..... 73

High level of an Angiogenesis Inhibitor (endostatin) is Related to Poor Outcome in Ischemic Stroke Patients Treated with t-PA. (Article en preparació, 2005)..... 81

5. DISCUSSIÓ.....94

5.1. Relació de les Metal·loproteïnes i el Creixement de l'Infart..... 95

5.2. Sobreexpressió *in Vivo* de la MMP-9 en el *Core* de l'Infart 98

5.3. Les Metal·loproteïnes com a Biomarcadors 100

5.4. Sobreexpressió de MMP-9 en el *Core* i en les Zones de Periinfart i Perihematoma. 102

5.5. MMP-9 i Barrera Hematoencefàlica 106

5.6. Perfil Temporal del Balanç Angiogènèsic-Angiostàtic 107

5.7. L'angiogènesi en la Fase Aguda de l'Ictus: ¿Beneficiosa o Perjudicial? 109

5.8. Implicacions Directes dels Resultats 112

6. CONCLUSIONS	113
7. BIBLIOGRAFIA	115
8. ANNEXOS	126
8.1. Acrònims i Abreviacions	127

1. INTRODUCCIÓ

1.1. L'ictus

L'ictus és un trastorn, transitori o permanent, en una zona del parènquima encefàlic que es produeix com a conseqüència d'una alteració aguda en el flux dels vasos sanguinis cerebrals. Com a resultat, apareixen dèficits neurològics com afàsia, hemiparèsia, pèrdua de consciència, pèrdua de visió o vertigen, entre d'altres, segons la zona de l'encèfal afectada; dèficits que poden ser transitoris o permanents, depenent de l'evolució clínica i del tipus d'oclusió.

Podem classificar els ictus en dos tipus segons si són el resultat del trencament d'un vas sanguini que produeix l'extravasació de sang cap al parènquima encefàlic (anomenats *ictus hemorràgics*) o bé si la causa és la interrupció del flux sanguini (anomenats *ictus isquèmics*).

Aquesta patologia constitueix actualment un dels problemes sanitaris més importants ja que la seva incidència anual és d'uns 200 casos per cada 100.000 habitants i és la primera causa de mort en dones i la segona en homes en l'estat espanyol, a més de la causa més important d'incapacitat i invalidesa a llarg termini a causa de les seqüeles motores i sensibles que deixa. Els principals factors de risc que s'associen a l'ictus són la hipertensió, la diabetis, el tabaquisme i la hipercolesterolèmia, i és marcadament prevalent a partir dels 65 anys.

L'ictus hemorràgic intraparenquimatós degut a la ruptura d'un vas sanguini suposa un 10% dels ictus, amb unes taxes de mortalitat molt elevades en els dies següents a l'aparició de l'hematoma. Tot i el seu dramàtic pronòstic en la majoria de casos, aquest subtipus d'ictus ha estat menys estudiat i es desconeixen els mecanismes moleculars que intervenen tant en la formació i expansió de l'hematoma inicial com en la formació posterior de l'edema perihematoma i la seva evolució.

L'ictus isquèmic suposa actualment un 80% del total d'ictus que es produeixen. És el resultat, en la major part dels casos, de l'oclusió d'una artèria de calibre mitjà o gran i pot tenir un origen cardioembòlic o aterotrombòtic. Els primers són originats per l'obstrucció d'una artèria cerebral per un coàgul

d'origen cardíac (amb especial predilecció per les bifurcacions arterials) mentre que els segons es produeixen per la formació d'èmbols o trombes locals en algunes artèries amb estenosi ateroscleròtiques (en els troncs supraaòrtics o en grans artèries intracranials).

L'ictus isquèmic d'origen cardioembòlic té un especial interès ja que acostuma a produir lesions (que anomenem infarts cerebrals) de gran extensió en la majoria de casos, produïts per l'obstrucció de l'artèria cerebral mitja per un èmbol enviat des del cor.



Figura 1. Obstrucció d'una artèria per un coàgul deixant en situació d'isquèmia la zona de perèncuima que irriga.

Com a conseqüència de la interrupció del flux sanguini es produeix una lesió tissular (*core* de l'infart) l'extensió de la qual dependrà, entre d'altres factors intrínsecs, de la durada de l'oclusió almenys durant les primeres hores. És durant aquest període de temps en què, si no es produeix la recanalització espontània, s'ha d'intentar lisar el coàgul al més aviat possible per tal d'evitar el creixement de l'infart a les zones perifèriques també hipoperfoses i metabòlicament compromeses però encara salvables (anomenada penombra isquèmica), amb un metabolisme diferent i que poden quedar incloses en poc temps dins de l'àrea infartada (Obrenovitch TP; 1995 i Sharp *et al.*; 2000).

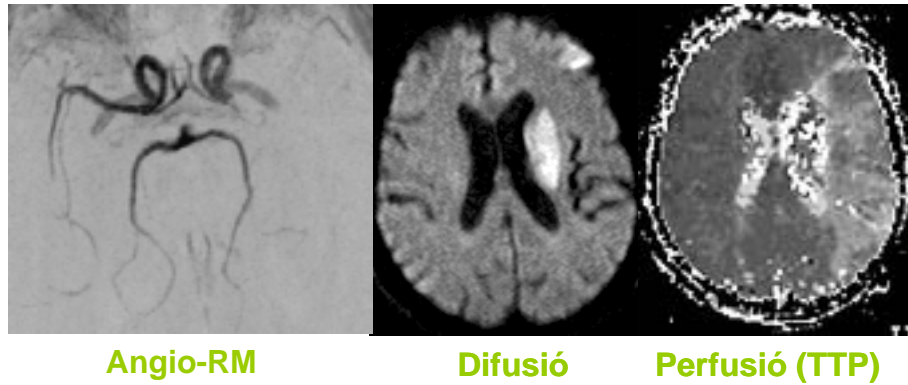


Figura 2. Imatges de RM. L'angiografia mostra una oclusió de l'ACM que produeix un infart en la zona més profunda (imatge en difusió) i gran part del territori hipoperfós (en la imatge de perfusió).

El tractament trombolític amb rt-PA constitueix actualment la millor acció terapèutica en la fase aguda de l'ictus isquèmic per intentar lisar el trombus i evitar que l'infart establert inicialment creixi i recluti parènquima de la penombra (NINDS; 1995). La principal limitació és la necessitat d'administrar-lo durant les tres primeres hores després de l'inici dels símptomes per tal de minimitzar el risc de complicacions hemorràgiques. El fibrinolític administrat, junt amb el plasminogen endogen, forma un complex que s'uneix a la fibrina parcialment degradada que forma part de l'èmbol o del trombus. Aquesta unió produeix la degradació total de la fibrina generant molècules de plasmina que també participen en la lísi i produeixen la desitjada recanalització de l'artèria. D'altra banda, també és cert que la teràpia trombolítica amb rt-PA pot ocasionar complicacions com són **les transformacions hemorràgiques** greus que apareixen en un 5-10% del malalts tractats amb aquest fàrmac i que comporten una altíssima taxa de mortalitat.

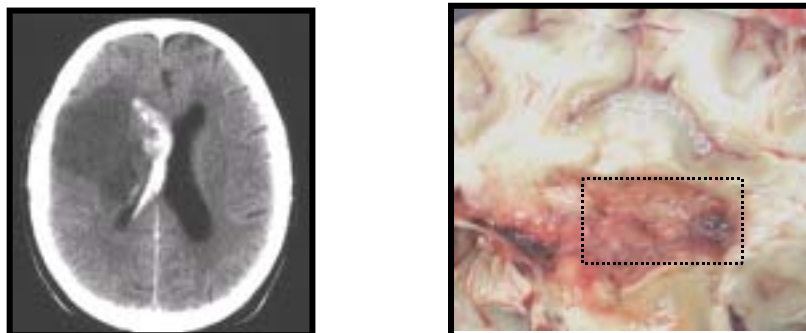


Figura 3. TAC cranial d'un infart (hipointensitat) amb una transformació hemorràgica (hiperintensitat). A l'esquerra, fase inicial d'una transformació hemorràgica en teixit fresc.

Però l'experiència mostra que no tots els pacients responen igual al tractament trombolític, tot i tenir el mateix tipus d'oclusió arterial. Per tant, és evident que hi ha d'altres factors intrínsecs a cada individu que influeixen en l'aparició de transformacions hemorràgiques, en la recanalització de l'artèria, en el creixement de l'infart o en l'evolució neurològica.

Identificar les causes d'aquesta variabilitat en la resposta al tractament de reperfusió amb rt-PA, per tal de millorar tant l'eficàcia com la seguretat de la teràpia trombolítica, és absolutament necessari i en l'actualitat és objecte de diferents àrees de recerca en isquèmia cerebral. L'estudi de les metal·loproteïnases de matriu i la seva implicació en el procés d'isquèmia cerebral és, entre d'altres, una d'aquestes línies d'investigació.

1.2. Cascada Isquèmica i Neuroinflamació

Amb l'obstrucció de l'artèria s'inicia el procés isquèmic on es produeixen una sèrie d'esdeveniments moleculars tant a nivell cel·lular com tissular que s'inicien ja en els primers minuts de la nova situació d'hipòxia i segueixen una cronologia característica en la isquèmia cerebral que s'allarga durant els dies posteriors a la isquèmia inicial. Per tant, és important entendre la resposta isquèmica com un procés dinàmic en tot moment i que, per tant, és modulable.

A causa de la deprivació de nutrients i oxigen es produeix una immediata **pèrdua energètica** (caiguda dels nivells d'ATP) en les cèl·lules, que secundàriament duu a una sèrie de canvis bioquímics a nivell molecular i, per tant, com a conseqüència immediata de la isquèmia cerebral es posen en marxa molts circuits metabòlics, alguns dels quals poden ser perjudicials per a la supervivència cel·lular.

Així doncs, com a primer canvi metabòlic a nivell cel·lular, en els minuts inicials després de la isquèmia, es produeix la **despolarització de la membrana** amb l'alliberament de potassi (K^+) cap a l'espai extracel·lular i l'entrada de sodi (Na^+), ions de clor (Cl^-) que fan descendir el pH de les cèl·lules; i també de calci (Ca^{2+}) durant els primers minuts. Com a resposta immediata a aquesta descompensació iònica neuronal s'alliberen neurotransmisors com el glutamat, amb l'activació dels seus receptors sinàptics com l'NMDA. Aquests s'acumulen en l'espai extracel·lular de la sinapsi, es produeix una entrada de calci cap a l'interior de la cèl·lula junt amb la d'aigua produint l'anomenat **edema excitotòxic** sobre les cèl·lules isquèmiques (Nishizawa Y;2001).

Una altra conseqüència metabòlica del procés d'isquèmia (però també del dany per reperfusió) és la situació d'**estrès oxidatiu** que pateix el teixit afectat i que duu a la formació de gran quantitat de radicals lliures, que són espècies químiques molt reactives i inestables: l'òxid nítric (NO), peròxid d'hidrogen (H_2O_2) o l'anió superòxid (O_2^-). De l'eliminació endògena d'aquests radicals s'encarreguen principalment diferents sistemes enzimàtics (catalases,

superòxid dismutasa o la glutation peroxidasa) però quan el sistema es troba saturat, l'acumulació d'aquests subproductes del metabolisme tan reactius produeix trencaments en l'ADN (mutacions i errors en la transcripció), desnaturalització de proteïnes o lesions en l'endoteli vascular que duen a l'alteració de la barrera hematoencefàlica i a la formació d'un **edema vasogènic** secundari a la situació d'hipòxia inicial.

La intervenció terapèutica per tal d'evitar la mort neuronal i l'establiment de l'infart en qualssevol d'aquests processos es fa molt complicada, ja que aquesta cascada de fenòmens es produeix en els minuts posteriors a l'oclusió de l'artèria, quan la possibilitat de rebre un tractament és en la majoria de casos impossible.

Ja en les primeres hores del procés isquèmic es produeix una complexa **resposta inflamatòria** que s'allarga durant els següents dies, en principi amb la intenció d'intentar aïllar i protegir el teixit afectat per la hipòxia, tot i que actualment sabem que intervé en el dany tissular i especialment en la mort neuronal i en la pèrdua de la integritat vascular (Chamorro *et al.*;2004 i Zheng *et al.*;2004).

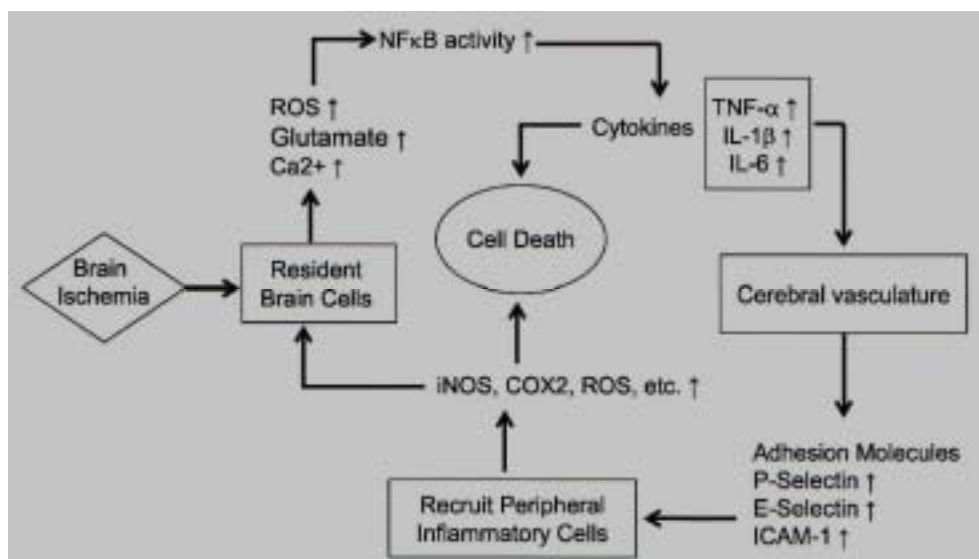


Figura 4. Esquema dels principals canvis cel·lulars i moleculars durant la resposta inflamatòria post-isquèmica.(Zheng *et al.*; 2004).

Tot i que sabem que l'edema excitotòxic i l'acumulació de radicals lliures estan relacionats amb l'activació d'aquesta reacció inflamatòria, no es coneixen en profunditat els factors que desencadenen aquesta resposta inflamatòria post-isquèmia.

Les cèl·lules microgials que es troben en el sistema nerviós, s'activen (amb canvis a nivell transcripcional) per la situació d'isquèmia i s'encarreguen d'activar la resposta inflamatòria a nivell local amb l'alliberament de **citoquines** (IL-1 β , IL-6 o TNF- α) a l'espai extracel·lular, que al mateix temps contribueixen a la producció de **quimioquines** (IL-8 o MCP-1). L'alliberació d'aquestes molècules activa complexes cascades de senyals que modifiquen l'expressió de **molècules d'adhesió** (principalment Selectines, ICAM i VCAM) sobre la superfície de les cèl·lules endotelials (Frijns *et al.*;2002).

Aquests canvis a nivell vascular (d'adhesió i migració a nivell local i augment de la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica), tenen com a conseqüència el **reclutament de leucòcits** de la sang perifèrica cap al parènquima cerebral que migren a través de les parets vasculares. Les primeres cèl·lules a ser reclutades són els neutròfils (ja en les primeres 2-4 hores post-isquèmia), seguides del monòcits, macròfags i limfòcits. Diferents estudis mostren que aquesta infiltració de cèl·lules circulants incrementa el dany tissular en la fase aguda i facilita també l'alliberament i producció de més radicals lliures i diferents proteases (entre elles les metal·loproteïnases de matriu), tant per part de les cèl·lules infiltrants com per part de cèl·lules del sistema nerviós (Akopov *et al.*;1996).

Per tant, com a conseqüència de la resposta inflamatòria post-isquèmia, es produeix l'activació d'alguns sistemes de proteolisi i remodelació de la matriu extracel·lular (Fukuda *et al.*;2004), un augment de la permeabilitat de la barrera hematoencefàlica per efecte citotòxic sobre les cèl·lules endotelials i un augment de l'edema cerebral els quals en conjunt amplifiquen el dany tissular inicial i activen també processos de mort cel·lular per apoptosi que duen a una mort neuronal secundària (Ferrer *et al.*;2003).

1.3. Les Metal·loproteïnes de Matriu

Les metal·loproteïnes de matriu, són una família de proteases (endopeptidases) Zinc-dependents que degraden diferents substrats que formen part de la matriu extracel·lular. Mereixen una especial atenció ja que, juntament amb les serin·proteases, són imprescindibles per a la remodelació de la matriu extracel·lular i de la làmina basal i, per tant, tenen un paper essencial en la remodelació tissular (Linjen *et al.*;2001 i Matrisian LM;1990)

Fins avui, s'han identificat un gran nombre de molècules membres d'aquesta família implicades en gran varietat de processos tant fisiològics (ovulació, remodelació de l'endometri i òssia,...) com patològics (la metastasi en el càncer, aterosclerosi, retinopatia diabètica o la neuroinflamació).

L'estructura de totes elles comparteix tres dominis:

- Un propèptid N-terminal
- Un domini catalític a l'interior de l'estructura quaternària (excepte la MMP-7 i la -26)
- Un domini hemopexin C-terminal

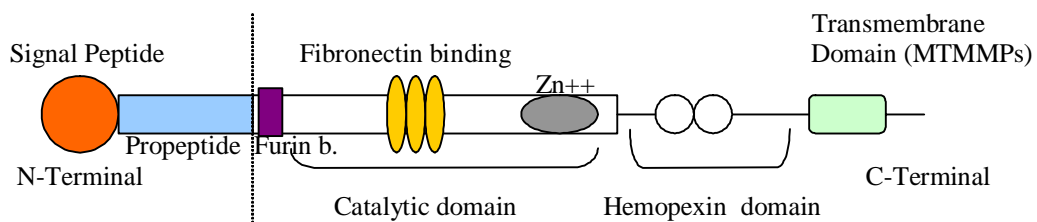


Fig 5. Estructura i dominis de les metal·loproteïnes de matriu.

A més, podem trobar altres dominis segons la MMP, com és el domini fibronectina en les dues gelatinases o un domini transmembrana en un grup de MMPs, anomenades MT-MMPs, que es troben ancorades a la membrana extracel·lular, l'acció proteolítica de les quals es localitza prop de les cèl·lules. En el domini catalític trobem un àtom de Zinc que els confereix capacitat

enzimàtica i proteolítica sobre substrats com el col·lagen, la laminina, la fibronectina, l'elastina, la gelatina, etc. (Murphy G;1995). A moltes d'elles se les coneix pel substrat principal que degraden. Així doncs, tenim a les col·lagenases (MMP-1, MMP-8 o la MMP-13), les gelatinases (MMP-2 y MMP-9), etc.

Diferents tipus cel·lulars del sistema nerviós poden produir i secretar al medi tot tipus de MMPs en cultius cel·lulars: astròcits (Gottschall *et al.*;1996 i Lee *et al.*;2003), neurones (Conant *et al.*; 2004; Wetzel *et al.*; 2004 i Backstrom *et al.*;1996), oligodendròcits (Oh *et al.*;1999), microglia (Mayer *et al.*;2001) o cèl·lules endotelials (Kolev *et al.*;2003).

Però els patrons d'expressió *in situ* en el parènquima encefàlic depenen de les característiques del procés isquèmic, la severitat o el temps d'oclusió. A més, tant la seva expressió com la seva activitat, estan estretament controlades tant a nivell transcripcional i posttranscripcional com també pels seus inhibidors endògens com són els TIMPs (Rivera *et al.*;1997, 2002 i Crocker *et al.*;2004) .

Tradicionalment s'ha considerat la plasmina (una serin proteasa) com la molècula més important en l'activació de metal·loproteïnases. Però sabem que aquesta acció no els és exclusiva i que algunes MMPs són capaces d'activar-se entre elles per mecanismes de *feed-back* positiu. Per exemple, l'acció de les MT-MMP és imprescindible per activar la MMP-2, o l'activació de la MMP-1, -7, -8 i -9 per part de la MMP-3. Estudis més recents demostren que receptors de membrana com la LRP, participen en la regulació de l'activitat extracel·lular de les metal·loproteïnases -2, -9 i -13, i així regulen l'activitat proteïnasa sobre la matriu extracel·lular i la làmina basal (Hahn-Dantona *et al.*;2001 i Wang *et al.*;2003). A més, altres mecanismes no proteolítics com la S-nitrosilació, que es produeixen en situacions d'estrès oxidatiu, modifiquen l'estructura d'algunes MMPs deixant lliure el seu centre actiu, tot conferint-los activitat proteolítica sense eliminar-ne el propèptid (Okamoto *er al.*;2001 i Gu *et al.*; 2002).

Sigui quin sigui el **mecanisme d'activació**, el que requereix és que el centre actiu amb l'àtom de Zinc (que està preservat dins de l'estructura quaternària en les formes no actives) quedi lliure i exposat al medi. Aquest procés es pot

produir per la proteolisi del domini propèptid (en el cas de l'activació per plasmina) o bé per una modificació de l'estructura per un procés químic, com es el cas de la S-nitrosilació.

Cal destacar el grup de **les gelatinases** (MMP-2: Gelatinasa A i MMP-9: Gelatinasa B), ja que tenen un paper molt important en la isquèmia cerebral (tant humana com en models experimentals). Com veurem més endavant, aquestes MMPs es sobreexpressen durant la isquèmia amb una regulació al llarg del temps i, sobretot, s'han relacionat amb la integritat de la lamina basal ja que degraden principalment el col·lagen IV, la laminina i la fibronectina que són components fonamentals de la microcirculació cerebral.

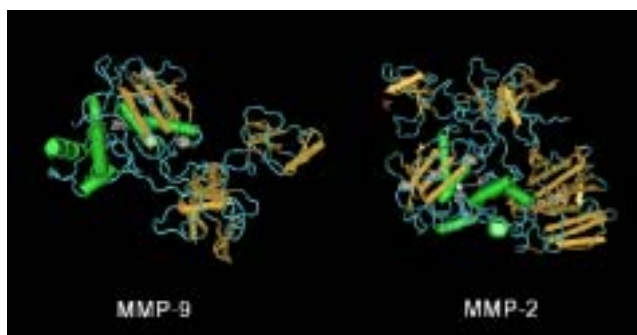


Figura 6. Representació de l'estructura quaternària de les gelatinases.

Els TIMPs són una família de 4 proteïnes (TIMP-1, -2, -3, -4) de baix pes molecular (20-29kDa) secretades per diferents tipus cel·lulars amb una elevada afinitat per les MMPs, que bloquegen la seva capacitat proteolítica (Brew *et al.*;2000). Tot i que, en general, poden inhibir diferents MMPs, hi ha algunes especificitats com la baixa afinitat del TIMP-1 per unir-se a les MT-MMPs o la unió de baixos nivells de TIMP-2 amb MT-MMP per activar MMP-2 (Visse *et al.*;2003 i Zhao *et al.*;2004).

Però l'acció dels TIMPs sembla que va més enllà, ja que estudis recents mostren que participarien de forma directa en el procés apoptòtic post-isquèmia. Així doncs, el TIMP-3 (del qual és conegut el rol pro-apoptòtic en cèl·lules cancerígenes inhibint el creixement tumoral), s'ha vist sobreexpressat en neurones després de la isquèmia on podria jugar un paper deleteri en induir l'apoptosi (Wallace *et al.*;2002).

Taula 1. Descripció de la família de les metal·loproteïnes de matriu i els seus substrats.

MMP	Enzim	Substrat
MMP-1	Interstitial collagenase (collagenase-1)	Collagens I, II, III, VII, VIII and X, gelatin, aggrecan, versican, proteoglycan link protein, casein
MMP-2	Gelatinase A	Collagens I, IV, V, VII, X, XI and XIV, gelatin, elastin, fibronectin, aggrecan, versican, proteoglycan link protein
MMP-3	Stromelysin-1	Collagens III, IV, IX and X, gelatin, aggrecan, versican, perlecan, nidogen, proteoglycan link protein, fibronectin, laminin, elastin, casein, fibrinogen
MMP-7	Matrilysin-1	Collagens IV and X, gelatin, aggrecan, proteoglycan link protein, fibronectin, laminin, entactin, elastin, casein
MMP-8	Neutrophil collagenase	Collagens I, II, III, V, VII, VIII and X, gelatin, aggrecan, α_1 -proteinase inhibitor, α_2 -antiplasmin, fibronectin
MMP-9	Gelatinase B	Collagens IV, V, VII, X and XIV, gelatin, elastin, aggrecan, versican, proteoglycan link protein, fibronectin, nidogen
MMP-10	Stromelysin-2	Collagens III, IV and V, gelatin, casein, aggrecan, elastin, proteoglycan link protein, fibronectin
MMP-11	Stromelysin-3	α_1 -proteinase inhibitor
MMP-12	Macrophage metalloelastase	Collagen IV, gelatin, elastin, α_1 -proteinase inhibitor, fibronectin, vitronectin, laminin
MMP-13	Collagenase-3	Collagens I, II, III and IV, gelatin, plasminogen activator inhibitor 2, aggrecan, perlecan, tenascin
MMP-14	MT1-MMP	Collagens I, II and III, gelatin, casein, elastin, fibronectin, laminin B chain, vitronectin, aggrecan
MMP-15	MT2-MMP	proMMP-2, gelatin, fibronectin, tenascin, nidogen, laminin
MMP-16	MT3-MMP	proMMP-2
MMP-17	MT4-MMP	Gelatina, proMMP-2
MMP-18	Xenopus collagenase	Collagen I
MMP-19	RASI	Collagen IV, gelatin, laminin, nidogen, tenascin, fibronectin, aggrecan
MMP-20	Enamelysin	Amelogenin
MMP-21	XMMP (xenopus)	unknown
MMP-22 (MMP-27)	CMMP (chicken)	Gelatin, casein
MMP-23	CA-MMP	Gelatin
MMP-24	MT5-MMP	proMMP-2, proMMP-9, gelatin
MMP-25	MT6-MMP, leukolysin	Collagen IV, gelatin, fibronectin, fibrin
MMP-26	Matrilysin-2, endometase	Collagen IV, fibronectin, fibrinogen, gelatin
MMP-28	Epilysin	Casein

1.4. Metal·loproteïnes i Isquèmia Cerebral

Sabem que després del procés isquèmic, en una fase avançada de la resposta inflamatòria post-isquèmia, es produeix la sobreexpressió d'algunes MMPs en el perènquima encefàlic: o bé per producció des de cèl·lules del sistema nerviós o bé per cèl·lules leucocitàries circulants en sang que s'infiltren (principalment neutròfils). Aquesta regulació (no controlada) del sistema proteolític de què formen part les metal·loproteïnes, té com a conseqüències finals el trencament de la barrera hematoencefàlica i la mort cel·lular (Cunningham *et al.*;2005).

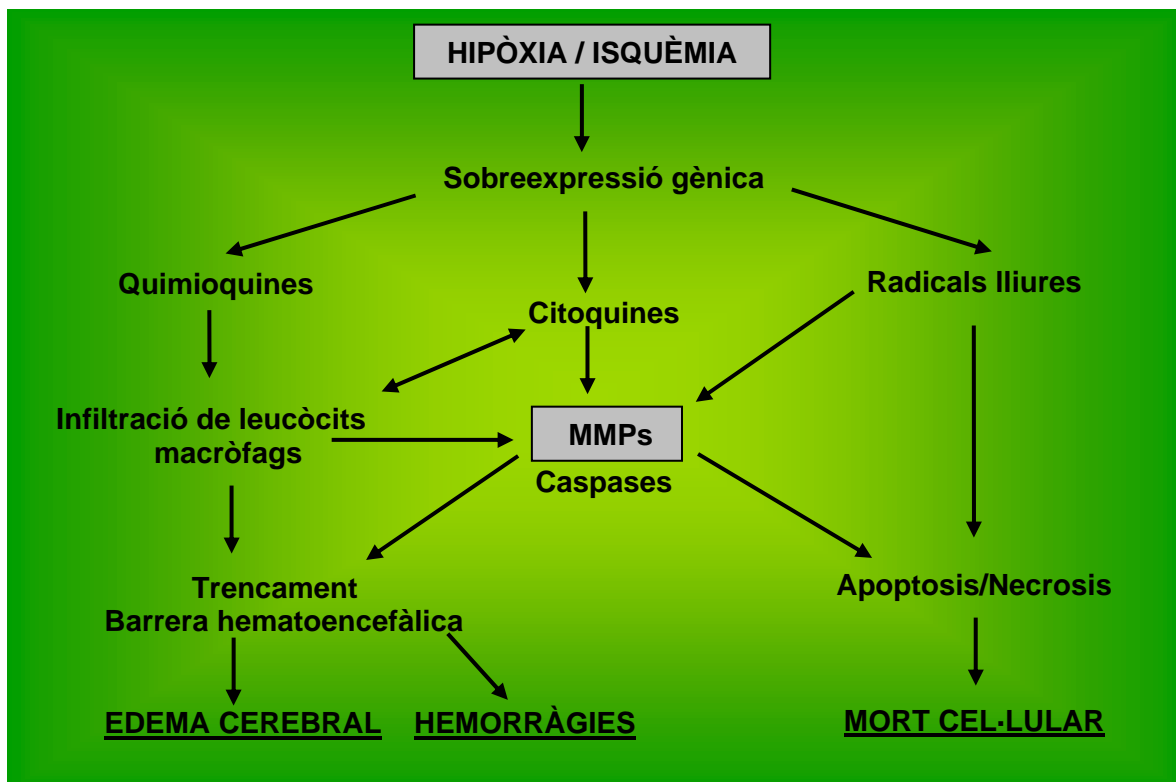


Figura 7. Esquema de la cascada d'esdeveniments que s'activen amb la isquèmia.

(Adaptat de Rosenberg *et al.*; 2002)

Els **models animals** d'isquèmia cerebral intenten reproduir, amb la màxima precisió possible, el procés isquèmic que es produeix en humans. Generalment, es generen per l'oclusió (permanent o transitòria) de l'artèria cerebral mitja (isquèmia focal) o bé per la interrupció del flux a tot l'encèfal (isquèmia global). La patofisiologia que es deriva d'aquests dos models d'isquèmia i els mecanismes que s'activen és ben diferent, ja que en el model d'isquèmia global (transitòria) es produeix un dany neuronal molt selectiu en

regions concretes com poden ser el nucli caudat o l'hipocamp. D'altra banda, el model d'isquèmia focal transitòria deixa una lesió (*core* de l'infart) on s'ha produït un dany massiu sobre neurones, cèl·lules glials i estructures capil·lars a causa de l'anomenada resposta inflamatòria post-isquèmia amb edema vasogènic i infiltració leucocitària.

Els primers estudis a identificar l'expressió anormal d'algunes d'aquestes MMPs en el cervell de ratolins (Rosenberg *et al.*;1994 i 1996) van centrar l'atenció de la recerca en aquest camp sobre les dues gelatinases: MMP-2 y MMP-9.

A partir d'ells, nombrosos estudis amb rosegadors i primats no-humans han demostrat la sobreexpressió deletèria de gelatinases en l'hemisferi ipsilateral en parènquima cerebral (Planas *et al.*; 2000, 2001 i Heo *et al.*;1999), confirmant fins i tot la seva presència *in vivo* per tècniques de microdiàlisi (Planas *et al.*;2002). Aquests models demostren la relació d'aquestes MMPs amb el dany cerebral, mostrant un augment dels nivells de MMP-9 en el parènquima cerebral a les 12-24 hores de la isquèmia, i fins al cinquè dia, relacionat amb el dany tissular, l'extensió de l'infart, l'edema cerebral i la inestabilitat de la barrera hematoencefàlica (Planas *et al.*;2001, Aoki *et al.*;2002 i Mun-Bryce *et al.*;1998). D'altra banda, l'increment de MMP-2 es produïa més tardanament, sobre el quart-cinquè dia relacionat amb la reacció astrocitària (Romanic *et al.*;1998 i Planas *et al.*;2001).

D'entre els canvis fisiopatològics que es produeixen per l'acció de les gelatinases, prenen gran importància els que afecten a l'endoteli i a la zona perivascular, ja que contribueixen al trencament de la barrera hematoencefàlica que duu a l'edema vasogènic i pot produir transformacions hemorràgiques .

En relació amb aquest conjunt de canvis tan localitzats en el conjunt que formen les cèl·lules endotelials amb les seves unions (*tight-junctions*), la làmina basal, els peus dels astrocits i les cèl·lules microgials perivasculars (Cunningham *et al.*;2005), està prenent gran importància el concepte "unitat neurovascular", que comprèn també les relacions funcionals que s'estableixen amb les neurones i el seu entorn (Lo *et al.*;2004); jugant així, un paper fonamental la matriu extracel·lular i els seus components.

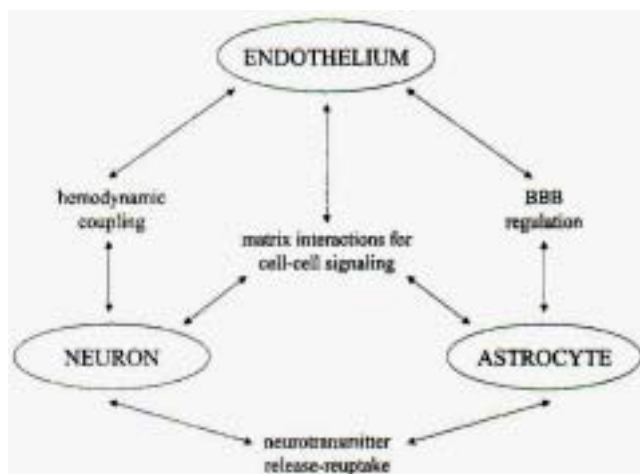


Figura 8. Esquema del concepte “unitat neurovascular” amb els seus elements i interaccions funcionals. (Lo *et al.*;2004)

Models animals demostren que durant la resposta isquèmica es produeix en aquesta zona una sobreexpressió i activació de la MMP-2 (Chang *et al.*; 2003 i Heo *et al.*; 1999), relacionada amb una desestabilització transitòria de la BHE. Fins i tot s’ha vist que l’administració intracerebral de MMP-2 produeix l’obertura d’aquesta BHE i el tractament amb el seu inhibidor endogen (el TIMP-2) inhibeix aquest efecte (Rosenberg *et al.*;1992). Més endavant, entre les 24 hores i els següents dies, com a conseqüència de la infiltració de neutròfils (Justicia *et al.*;2003) i la degradació de components de la làmina basal i la matriu extracel·lular per part de la MMP-9, es pot produir un efecte més sever i un trencament d’aquesta BHE (Gasche *et al.*;1999 i Fujimura *et al.*; 1999) que pot donar lloc a l’aparició d’hemorràgies intraparenquimatoses.

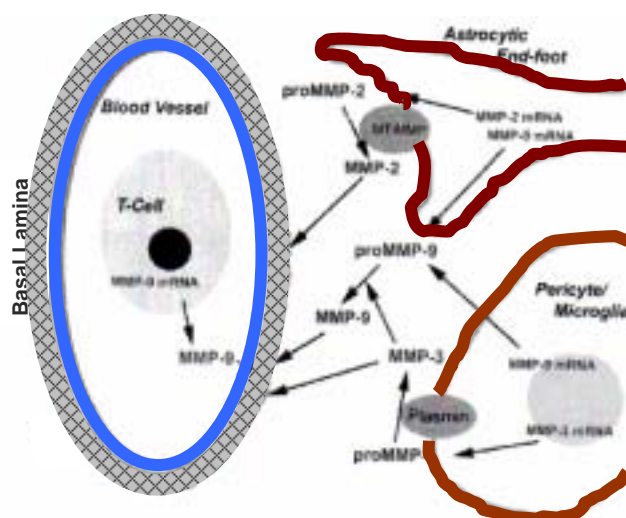


Figura 9. Representació de les vies de producció-activació de metal·loproteïnases en relació amb el trencament de la BHE. (Adaptat de Rosenberg *et al.*;2002).

En relació a la **isquèmia cerebral humana**, estudis *post-mortem* en parènquima cerebral (Anthony *et al.*;1997 i Clark *et al.*;1997) mostren també un augment tant de MMP-2 com de MMP-9 després de l'ictus amb una clara regulació espaciotemporal. En un primer estudi, mitjançant la tècnica d'immunohistoquímica, es fa una localització tissular de diferents MMPs en un grup d'ictus de menys d'una setmana d'evolució i en un grup d'ictus crònics (d'entre 9 dies i 5 anys). Els autors identifiquen una clara localització de MMP-9 en les àrees vasculars i perivasculars (endoteli i neutròfils), associada a la resposta inflamatòria en el grup d'ictus aguts, mentre que en el grup d'ictus crònics no es va detectar la infiltració de neutròfils, però es va identificar l'expressió de MMP-7 (Matrilisina) i MMP-2 dins la lesió en cèl·lules macrofàgiques. En l'estudi de Clark (1997), la valoració dels nivells de gelatinases es va realitzar per zimografia en gelatina en un grup d'ictus d'entre 2 dies i 7 anys, mostrant també un patró d'expressió temporal diferent per les dues gelatinases. Igual que en els models animals d'isquèmia cerebral, els nivells més elevats de MMP-9 es van trobar al teixit infartat en fase més aguda (de 2 a 4 dies) mentre que la MMP-2 es mantenia en els mateixos nivells que en l'hemisferi contralateral.

Vista l'extensa bibliografia en models animals sobre l'expressió, regulació i implicació de les MMPs en el teixit cerebral i l'escassa recerca que hi ha en parènquima humà, actualment és necessari aprofundir en l'estudi de les metal·loproteïnases en el parènquima humà en les diferents fases de l'ictus per tal de confirmar el que indiquen els models animals i poder obrir una nova via terapèutica en l'ictus.

En els darrers anys s'han publicat diversos estudis en humans valorant l'expressió de metal·loproteïnases en sang i el seu perfil temporal en la fase aguda de l'ictus en relació a l'evolució neurològica del pacient, el volum de l'infart, l'aparició de complicacions hemorràgiques i el tractament trombolític.

Gràcies a aquests estudis, sabem que es produeix una sobreexpressió de MMP-9 en la fase aguda de l'ictus isquèmic en comparació amb controls sans, la seva relació amb l'evolució neurològica dels pacients a curt i llarg termini com amb l'extensió de l'infart valorat per TAC (Montaner *et al.*; 2001) i una clara associació amb l'aparició de transformacions hemorràgiques (Montaner *et*

al.;2001 i Castellanos *et al.*;2003). Aquesta sobreexpressió s'ha vist recentment també després de la isquèmia per hemorràgia intracranial (Abilleira *et al.*; 2004 i Alvarez-Sabín *et al.*;2004). És més, els nivells pretractament de pacients que rebien teràpia trombolítica estan relacionats amb l'aparició de transformacions hemorràgiques i amb el grau d'extensió d'aquestes (Montaner *et al.*;2003a), cosa que dóna un valor predictiu molt important a la MMP-9.

L'ús de noves tècniques de ressonància magnètica, com les imatges en difusió, ha permès valorar amb més precisió l'extensió de la lesió establerta en cada moment (volum de l'infart). L'anàlisi de la seva relació amb els nivells de diferents molècules relacionades amb la resposta inflamatòria ens mostra la MMP-9 com a un possible biomarcador de l'extensió de l'infart en la fase aguda de l'ictus, fins i tot mesurada abans del tractament trombolític (Montaner *et al.*;2003b).

Per tant, sembla que, tot i que en general després de l'ictus hi ha una sobreexpressió anormal d'algunes MMPs (de moment és coneguda la de la MMP-9), existeixen al mateix temps certes diferències que determinen, en part, l'evolució de la patologia. Determinar les causes d'aquestes variacions, així com tractar d'inhibir aquestes MMPs, és avui en dia l'objectiu de part de la recerca en isquèmia cerebral humana.

Per tant, intentar **bloquejar algunes MMPs**, donada la rellevància que prenen aquestes proteases entre els molts processos que es regulen després de la isquèmia cerebral, sembla un possible objectiu en el tractament de l'ictus amb l'administració de fàrmacs que inhibeixin la producció o l'activitat d'aquestes MMPs. És més, estudis recents semblen indicar una possible activació de la MMP-9 amb el tractament trombolític, per acció directa del rt-PA, tant en humans com en models animals (Horstmann *et al.*;2003, Montaner *et al.*; 2004 i Sumii *et al.*;2002). Sembla, doncs, que el bloqueig d'aquesta molècula podria reduir els efectes secundaris de l'únic tractament útil del que disposem en la fase aguda de l'ictus i millorar la seva eficàcia.

En models animals ja s'ha demostrat que, tant amb la creació de rosegadors *knockout* pel gen de la MMP-9 (Asahi *et al.*; 2001), com amb l'administració de fàrmacs inhibidors de MMPs com el BR-7785 o el BB-94 (Jiang *et al.*; 2001 i Asahi *et al.*;2000) o d'inhibidors endògens com el TIMP-2 (Rosenberg *et al.*;1992), es redueix notablement l'edema cerebral, el volum de l'infart i el trencament de la barrera hematoencefàlica.

Es més, s'ha demostrat que tractaments amb inhibidors de les MMPs o amb anticossos neutralitzants, redueixen aquest trencament de la BHE i les complicacions hemorràgiques en models trombo-embòlics d'oclusió de l'ACM i amb tractament trombolític amb rt-PA (Lapchak *et al.*; 2000 i Pfefferkorn *et al.*;2003).

En relació a aquesta inhibició, sabem que el tractament hipotèrmic de l'íctus en humans per tal de reduir el metabolisme al parènquima encefàlic podria reduir els nivells de MMP-9 (Horstmann *et al.*;2003), tot i que tractaments farmacològics per intentar bloquejar de forma directa les MMPs (o inhibidors selectius per alguna d'elles) encara no s'ha utilitzat en la isquèmia cerebral humana.

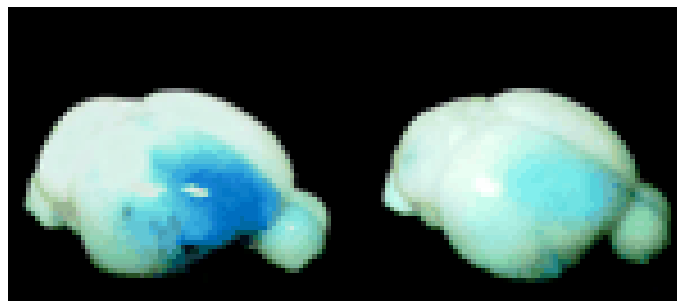


Figura 10. Cervells de rosegador d'un model *knockout* pel gen de la MMP-9 mostrant una reducció del trencament de la BHE (en blau) en aquest grup (a la dreta) respecte al grup *wild-type*. (Asahi *et al.*;2000).

1.5. Angiogènesi i Isquèmia Cerebral

Per al creixement de qualsevol teixit, sa o patològic, és absolutament necessari que hi hagi una aportació sanguínia contínua a través de l'àmplia xarxa vascular que nodreix les cèl·lules d'elements bàsics com glucosa, oxigen i altres molècules necessàries per al desenvolupament de les seves funcions. La formació d'aquests vasos es produeix en dos processos diferents: la vasculogènesi (típica de les fases embrionàries) i l'angiogènesi. En el procés d'angiogènesi es formen nous capil·lars a partir dels ja existents, per una migració i proliferació a l'espai extravascular de cèl·lules endotelials i s'han de diferenciar dues fases en el procés amb finalitats molt diferents: en la primera es comença a formar el nou vas i en la segona aquest madura i s'estabilitza (Pepper MA;1997). En aquest procés és necessària una remodelació constant, de la matriu extracel·lular i de la làmina basal, en la qual juguen un paper important les metal·loproteïnases de matriu (Pepper MS;2001 i Heissig *et al.*;2003).

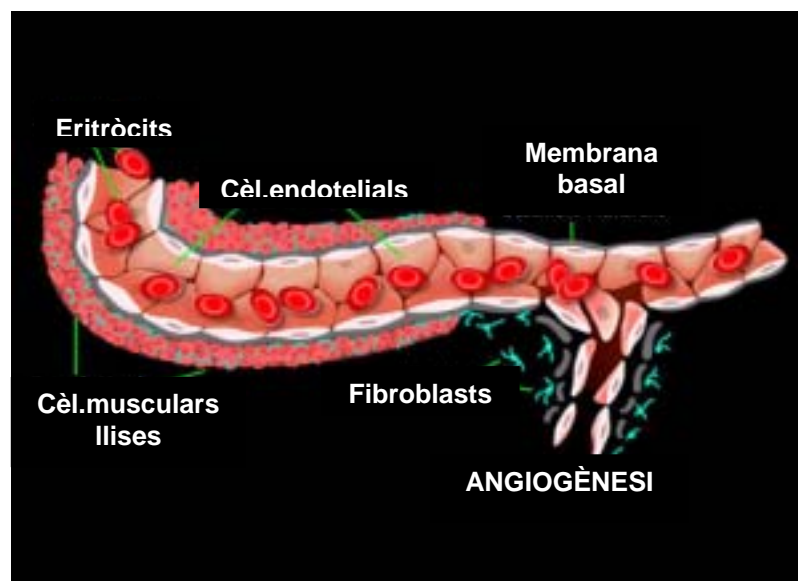


Figura 11. Formació de nous capil·lars durant el procés d'angiogènesi amb un augment de la permeabilitat vascular per modificació de la làmina basal i matriu extracel·lular, migració i proliferació de les cèl·lules endotelials.

Actualment, estan en discussió els possibles avantatges o inconvenients de la instauració fisiològica i/o farmacològica de l'angiogènesi en la fase aguda de

l'ictus. El balanç molecular després de l'ictus, l'evolució neurològica del pacient i les conseqüències de la neovascularització són actualment objecte de nombrosos estudis per poder determinar l'efecte de l'angiogènesi després de la isquèmia cerebral. Sabem que després de l'ictus es produeix una situació hipòxia que produeix una sobreexpressió de factors promotors, com el VEGF, el bFGF o el TNF- α (Krupinsky *et al.*;1994 i 1997, Slevin *et al.*;2000 i Scheufler *et al.*;2003), que afavoreixen el procés d'angiogènesi i l'augment de la circulació col·lateral en la zona de penombra. Treballs més recents, comencen a valorar també l'expressió i l'efecte d'algunes molècules inhibidores (Hayashi *et al.*;2003 i Lin *et al.*;2003). En el procés d'angiogènesi, hi ha sempre una migració i proliferació de cèl·lules endotelials de vasos que no han estat danyats per formar-ne de nous; per tant, s'ha d'obrir la barrera hematoencefàlica per a la migració cel·lular, cosa que implica el risc d'una possible hemorràgia. Així doncs, després de l'ictus, s'inicia el procés d'angiogènesi però la finalitat amb què es produeix encara no és clara, i per tant, no podem assegurar que sigui beneficiosa o perjudicial.

Tot i el petit nombre d'estudis sobre angiogènesi en pacients que han patit un ictus, sí que s'han desenvolupat diferents models a partir de l'experimentació amb animals, sobretot amb la rata i el ratolí. Aquests estudis demostren que hi ha una modulació de molècules promotores, que moltes d'elles se sobreexpressen en la fase aguda de l'ictus i que són responsables de l'augment microvascular i de la inestabilitat de la barrera hematoencefàlica durant el procés d'angiogènesi. Hi ha models animals que demostren un augment en la permeabilitat vascular d'aquesta barrera hematoencefàlica durant l'angiogènesi, immediatament després d'una isquèmia cerebral i a causa de l'administració de VEGF; la qual cosa incrementa el risc d'hemorràgies (Zhang ZG *et al.*;2000 i 2002). En canvi, passada la fase aguda, promoure l'angiogènesi millora la recuperació neurològica, estimula la neurogènesis i redueix la mida de l'infart (Sun *et al.*; 2003).

Per tant, sabem que després de l'ictus es sobreexpressen molècules promotores de l'angiogènesi, cosa que en un principi va fer a pensar que es produïa un intent de vascularitzar les zones hipoperfoses després d'un procés isquèmic i que, per tant, l'angiogènesi era beneficiosa. Però actualment aquest

concepte està canviant, ja que es reconeix que també hi ha una expressió de molècules inhibidores de l'angiogènesi, com l'endostatina, l'angiostatina o la trombospondina-1 (Hayashi *et al.*;2003 i Lin *et al.*;2003), una infiltració de macròfags associada als nous vasos (Manookitiwongsa *et al.*;2001) i una alteració de la barrera hematoencefàlica relacionada amb l'expressió de VEGF i l'activació de MMPs (Valable *et al.*;2005).

El resultat de l'acció de tots els promotors i inhibidors és un balanç molt controlat i precís que regularà l'angiogènesi en l'espai i en el temps. Al mateix temps s'ha de tenir en compte que la remodelació de la matriu extracel·lular, on participen activament les metal·loproteïnases de matriu, és el resultat d'un balanç proteolític controlat, ja que una degradació excessiva seria incompatible amb una angiogènesi normal. Per això, és necessari valorar l' angiogènesi com un procés actiu amb una expressió de promotors i inhibidors que es modifica amb la seva evolució.

L'evolució d'aquest balanç en les hores posteriors a la isquèmia cerebral és desconeguda, fins ara, en l'ésser humà.

2. OBJECTIUS DE L'ESTUDI

Els objectius principals d'aquesta tesi són:

- 1. Valorar els nivells plasmàtics de diferents metal·loproteïnases (MMP-1, -2, -3, -8, -9, -10, -13) i d'alguns dels seus inhibidors (TIMP-1 i TIMP-2) en la fase hiperaguda de l'ictus i determinar el valor predictiu com a biomarcadors d'aquestes metal·loproteïnases en relació a l'extensió i creixement de l'infart cerebral.**
- 2. Valorar *in vivo* el contingut de gelatinases en l'espai extracel·lular de l'infart i de la penombra per microdiàlisi cerebral i la seva modulació en relació a la cirurgia descompressiva i la hipotèrmia en casos d'infarts malignes de l'artèria cerebral mitja.**
- 3. Determinar i localitzar *in situ* el contingut de gelatinases (MMP-2 i MMP-9) en diferents àrees del parènquima encefàlic després de l'ictus isquèmic (infart, periinfart, i contralateral) com també de l'ictus hemorràgic (perihematoma i contralateral).**
- 4. Analitzar el coneixement actual sobre l'angiogènesi i la seva implicació en la fase aguda de l'ictus, així com la possible participació de les metal·loproteïnases en el procés d'angiogènesi.**
- 5. Determinar, a nivell plasmàtic, el balanç entre un inhibidor (endostatina) i un promotor (VEGF) de l'angiogènesi, en la fase aguda de l'ictus isquèmic i la seva relació amb l'evolució neurològica.**

3. PACIENTS I MÈTODES

3.1. Pacients

3.1.1. Protocols d'estudi clínic

En els següents estudis es van incloure pacients atesos a l'Unitat d'Ictus de l'Hospital Vall d'Hebron. Tots ells presentaven un ictus isquèmic o hemorràgic en la fase aguda/hiperaguda i es van incloure en diferents estudis segons el tractament que van rebre o la seva evolució clínica. Tots els estudis que es detallen a continuació van ser aprovats pel comitè ètic de l'Hospital Vall d'Hebron i en tots els casos es va demanar un consentiment informat als pacients o als familiars.

Grup de pacients de l'estudi Trombolisi-Difusió

El tractament trombolític es va administrar (a dosi estàndard) a tots aquells pacients que presentaven a la seva arribada a urgències un ictus de menys de tres hores d'evolució, amb oclusió de l'artèria cerebral mitja demostrada per *doppler* transcranial i en els quals la ressonància magnètica abans del tractament mostrava teixit salvable (PWI>DWI) i es descartava una hemorràgia intracranial. A tots els pacients inclosos, se'ls va fer un estudi complet de RM basal (en les tres primeres hores) a l'arribada a urgències (DWI-PWI) junt amb una extracció de sang prèvia al tractament trombolític. Per tal de poder valorar el creixement de l'infart en les primeres 24 hores (lesió en difusió), es va realitzar una segona RM, aquest cop només per obtenir seqüències de DWI.

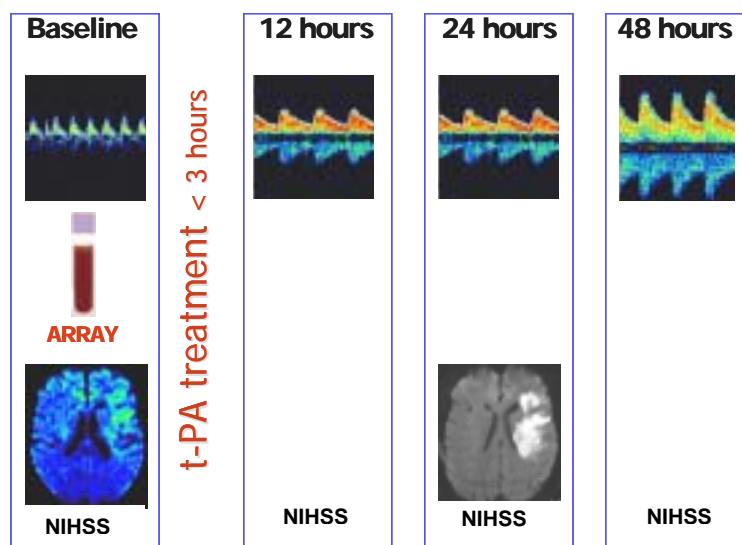


Figura 12. Esquema del protocol complet de trombolisi-Difusió.

Grup de pacients de l'estudi de necròpsies

Es van incloure aquells pacients que morien en les hores o dies següents d'haver patit un ictus per tal d'obtenir teixit cerebral per poder estudiar *in situ* l'expressió de gelatinases en diferents regions de l'encèfal (tant pel que fa als nivells com a la localització cel·lular).

Grup de pacients de l'estudi ACM Maligna-Microdiàlisi

En aquest estudi es van incloure pacients amb un infart extens del territori de l'ACM amb una progressió "maligna" que comporta el creixement de l'edema cerebral. Aquests pacients s'ingressaven a la UCI de traumatologia on, seguint el protocol d'actuació de l'hospital, es van sotmetre a hipotèrmia moderada (32°C) i/o cirurgia descompressiva quan es produïa un desplaçament de la línia mitja superior als 5 mm (valorat per TAC), per tal de disminuir el metabolisme local i reduir la pressió intracranial respectivament.

A més, es feia una monitorització de la producció a l'encèfal de metabolits, com el lactat o el piruvat, mitjançant la col·locació d'un catèter de microdiàlisi que recull líquid intercel·lular i que vam utilitzar per determinar el contingut *in vivo* de gelatinases en les zones de *core* de l'infart i periinfart (possible penombra).

Grup de pacients de l'estudi d'angiogènesi

El grup de pacients a estudiar, inclou ictus isquèmics d'origen cardioembòlic, no lacunars, amb una oclusió de l'ACM documentada per Doppler Transcranial, els quals van rebre teràpia trombolítica en les tres primeres hores de l'inici dels símptomes. De cada pacient es van obtenir mostres de sang perifèrica basals (abans de l'administració de rt-PA i també 12 i 24 hores després de l'inici dels símptomes). Aquests pacients es van incloure en un estudi anterior (Montaner *et al.*;2003a).

El TAC cranial va ser la tècnica utilitzada a l'arribada a urgències per incloure als pacients en el protocol de trombolisi i per valorar l'evolució de l'infart i la presència de transformacions hemorràgiques. Aquestes es van classificar segons els criteris de Pessin (Pessin *et al.*;1990) i l'estudi ECASS-1 (Hacke *et al.*;1995). HI-1 (infart hemorràgic de tipus 1): amb puntejat hemorràgic al voltant del marge de l'infart; HI-2 (infart hemorràgic de tipus 2): amb puntejat dins

l'infart però sense efecte de massa; PH-1 (hemorràgia parenquimatosa de tipus 1): no superior al 30% de l'àrea de l'infart i PH-2 (hemorràgia parenquimatosa de tipus 2): superior al 30% de l'àrea de l'infart amb un efecte de massa significatiu.

Per tal de valorar la situació neurològica en cada moment i la severitat de l'ictus, es van utilitzar l'escala NIHSS que, a més, permet valorar la millora o l'empitjorament en el dèficit neurològic amb el pas del temps i l'escala de Rankin modificada (mRS) que permet valorar la dependència o independència als 3 mesos de l'ictus.

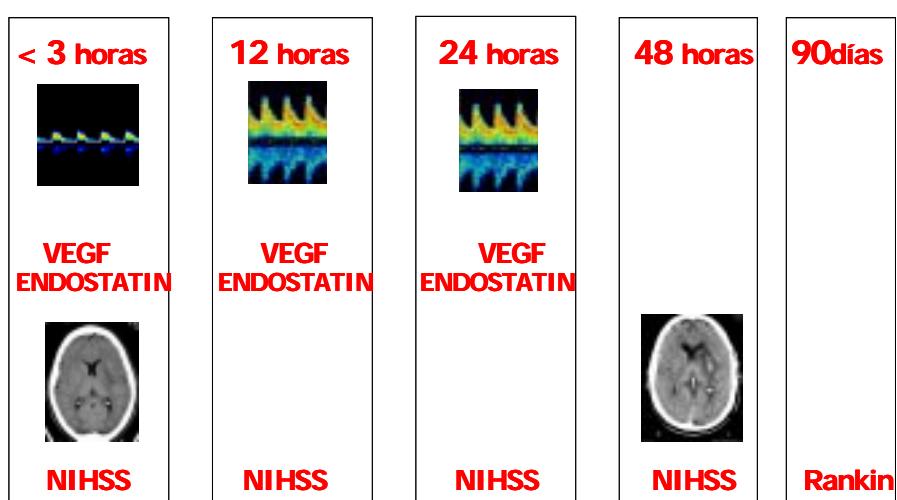


Figura 13. Esquema del protocol complet de l'estudi d'angiogènesi

3.1.2. Protocols de Neuroimatge i Doppler

Ressonància Magnètica (Difusió-Perfusió)

Les noves tècniques de ressonància magnètica permeten, en un temps curt, d'adquisició de la imatge (només pocs minuts), identificar zones del parènquima cerebral amb defectes de perfusió (disminució del flux cerebral) i també zones on ja s'ha produït un dany cel·lular i s'ha establert l'infart (hiperintensitats en les imatges en difusió).

La característica del parènquima encefàlic que permet obtenir aquestes imatges és l'increment del contingut d'aigua tissular i la disminució del seu moviment en la zona afectada.

Aquestes tècniques no invasives són actualment una eina molt sensible i específica per determinar diferents àrees d'afectació en la fase aguda de l'ictus i fer un seguiment de la seva evolució.

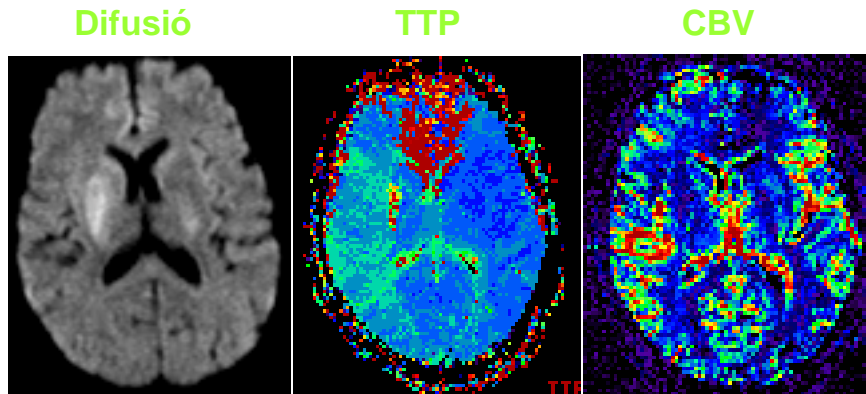


Figura 14. Imatges obtingudes de l'estudi basal de RM del protocol trombolisi-difusió per valorar l'extensió de l'infart (hiperintensitat en la difusió) i el defecte de perfusió (en TTP i CVB).

Els estudis de ressonància magnètica es van realitzar amb el mateix aparell: Magnetom Vision Plus, Siemens Medical Systems; Germany. Les **mesures planimètriques** del volum de les lesions en difusió i perfusió, les va realitzar un neuroradiòleg utilitzant tècniques manuals: es traçava el perímetre de l'àrea en cada mapa i les mesures es multiplicaven per la distància entre les imatges. Els valors estan expressats en centímetres cúbics (cc).

Doppler Transcranial

Es va dur a terme per fer un seguiment de l'oclusió de l'artèria en tot moment durant el tractament trombolíctic per tal de valorar la recanalització induïda pel rt-PA. A més, es van realitzar posteriors estudis durant les següents 48 hores per estudiar la situació del vas.

L'aparell utilitzat va ser un Multi-Dop X/TCD DWL (Elektronische Systeme GmbH) amb la sonda de 2 MHz.

3.1.3. Protocols de recollida de material biològic

Extraccions sanguínies

Les mostres de sang perifèrica per valorar els nivells de MMPs es van extreure en tubs EDTA a diferents temps. Per obtenir les mostres de plasma amb què es van realitzar les determinacions es va centrifugar la sang total a 3000 rpm durant 15 minuts a 4°C i el sobrenedant (el plasma) es va aliar i emmagatzemar a -80°C fins al moment del seu ús.

Necròpsies

Les mostres estudiades es van obtenir d'acord amb el protocol d'obtenció de teixit cerebral després d'un ictus (tant isquèmic com hemorràgic) del Laboratori d'Investigació Neurovascular i la Unitat de Neuropatologia de l'Hospital Vall d'Hebron.

En tots els casos el teixit es va obtenir en un curt període de temps, dins de les sis primeres hores després de l'èxitus, per tal de preservar tant l'expressió gènica com protèica. El teixit obtingut es va congelar ràpidament en nitrogen líquid o bé es va fixar en paraformaldehid al 4% i deshidratar en sucrosa al 30% abans de congelar-lo a -80°C pel seu emmagatzematge en el banc de teixits corresponent. Durant l'examen macroscòpic de l'encèfal es va utilitzar la neuroimatge més recent que es tenia de cada cas per tal de poder delimitar millor les diferents zones de l'hemisferi afectat. En tots els casos es realitzaven talls coronals d'un centímetre de gruix aproximadament, i sobre cada un d'ells, s'identificaven les zones desitjades i s'obtenia el teixit corresponent.



Figura 15. Imatge obtinguda del protocol de necròpsies. Talls coronals d'un hemisferi cerebral per a l'obtenció de teixit de diferents àrees.

En el cas dels ictus isquèmics, es van extreure mostres del *core* de l'infart i de la zona periinfart junt amb els corresponents contralaterals, mentre que dels ictus hemorràgics, un cop separat el coàgul de sang, s'obtenien mostres de la zona perihematoma i els corresponents contralaterals.

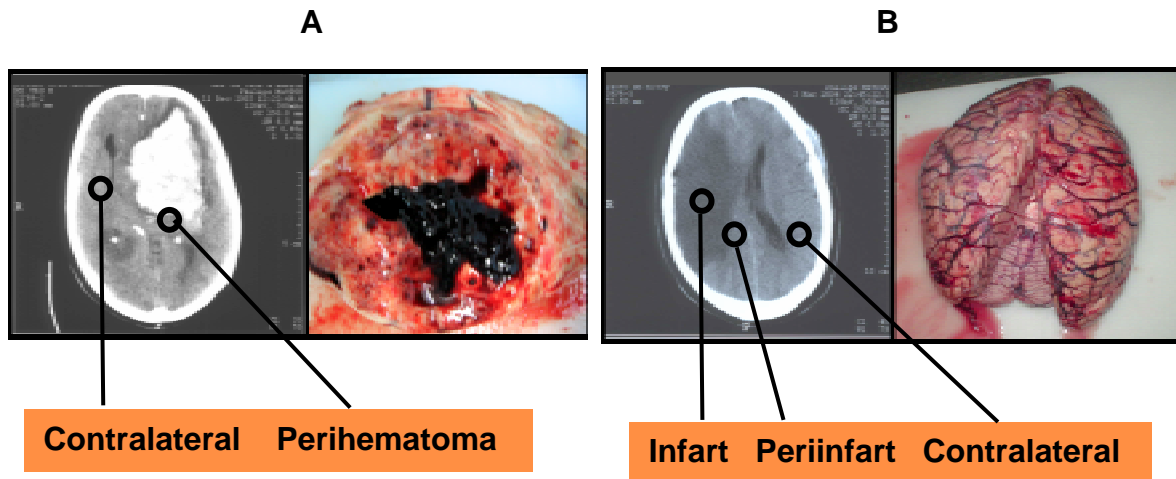


Figura 16. **A**, Imatge d'un tall coronal obtingut d'un ictus hemorràgic mostrant el gran coàgul central i l'edema perifèric. **B**, Imatge d'un encèfal amb un infart extens de l'hemisferi esquerre amb un gran edema. Als TACs corresponents s'indiquen les àrees d'extracció de teixit.

Microdiàlisi

La microdiàlisi cerebral és una tècnica que permet la monitorització dels metabolits que s'alliberen a l'espai intersticial (entre cèl·lules) del teixit cerebral. El seu principi bàsic és la introducció dins del parènquima cerebral d'un catèter que va acompanyat d'una membrana semi-permeable en el seu extrem més distal. Aquesta membrana de diàlisi permet la difusió lliure de soluts entre l'espai intersticial cerebral i una solució (líquid de perfusió) que es perfon mitjançant una microbomba de precisió a una velocitat constant de 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$.

El catèter té una petita punta d'or que permet controlar en tot moment el lloc exacte d'implantació i l'estat del parènquima més immediat a través d'un TAC cranial.

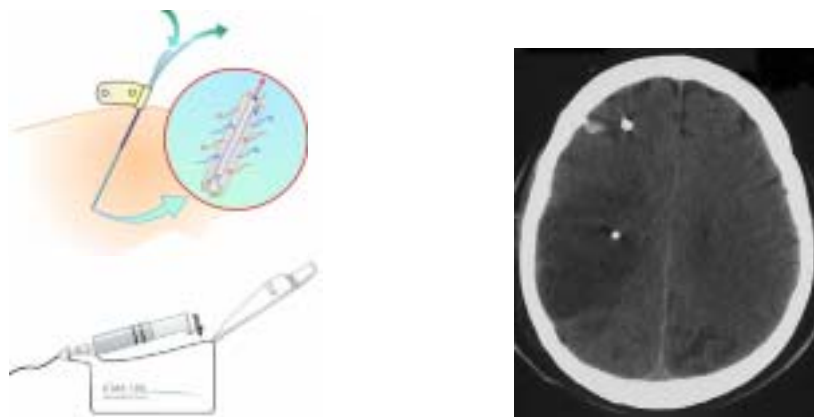


Figura 17. Bomba de microdiàlisi i esquema d'un catèter. A la dreta, TAC d'un pacient amb un infart maligne de l'ACM on es mostra la implantació de dos catèters: un al core de l'infart i l'altre a la perifèria.

Aquest sistema de microdiàlisi permet l'intercanvi de molècules en ambdues direccions. La diferència de concentració a través de la membrana és el que decideix la direcció en què es mou el gradient. Els soluts de l'espai intersticial del parènquima es van incorporant al líquid de perfusió que es va infonent i recollint periòdicament en microvials que es congelen a -80°C fins a la seva anàlisi posterior.

Per poder valorar el contingut *in vivo* de metal·loproteïnases en diferents parts del parènquima encefàlic (infart i periinfart) es van utilitzar catèters de microdiàlisi amb membranes de 100 kDa de mida del porus.

3.2. Tècniques de Laboratori

3.2.1 ELISA i *Protein Arrays*

Les tradicionals tècniques d'ELISA (que vam utilitzar per determinar els valors de VEGF i d'endostatina) permeten quantificar els nivells d'una molècula en la mostra estudiada (mitjançant la reacció antigen-anticòs i l'extrapolació de concentracions per l'elaboració d'una corba patró coneguda) han derivat actualment en una nova tecnologia emergent que ens ofereix la possibilitat de detectar els nivells de diferents molècules a la vegada, ja que cada un dels pous on es realitza la reacció estarà sembrat amb diferents anticossos.

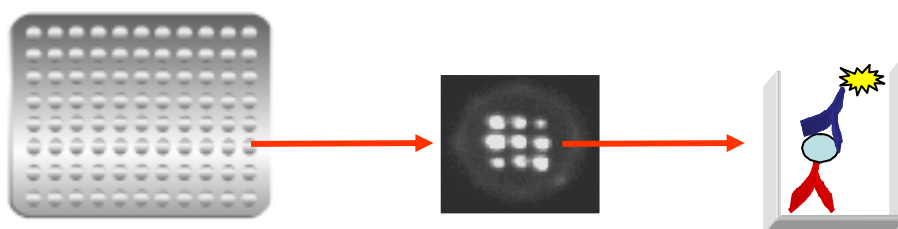


Figura 18. *Protein Arrays*. Al centre, imatge d'un pou d'una placa on es van detectar 9 molècules diferents. La imatge obtinguda per quimioluminiscència mostra diferents intensitats que corresponen a diferents quantitats d'antigen. A la dreta, un esquema de la reacció antigènica.

Una d'aquestes noves eines per realitzar arrays proteïcs és la tecnologia SearchLight[®] que ens ofereix la possibilitat de detectar i quantificar fins a 9 molècules a la vegada utilitzant una mateixa mostra. En el nostre estudi es va dur a terme el Human MMP Array 1 per determinar: gelatinases (MMP-2 i MMP-9), col·lagenases (MMP-1, MMP-8 i MMP-13), stromelisines (MMP-3 i MMP-10) i inhibidors endògens (TIMP-1 i TIMP-2).

La reacció final produeix un senyal de quimioluminiscència, diferent segons la quantitat d'antigen que tingui cada mostra, que es va detectar amb el lector corresponent. Les imatges obtingudes es van analitzar amb el *software* específic per aquest sistema (ArrayVision[™] versió 8.0) que va permetre la quantificació final de cada mostra.

Tant en els ELISAs simples com en l'Array prot, cada mostra es va determinar dues vegades per obtenir el valor mitjà i en cap cas es va considerar vàlid un coeficient de variació superior al 10-15% entre les dues determinacions.

3.2.2. Western Blot

La tècnica de *western blot* (també coneguda com *immunoblotting*) es basa també en una reacció immunològica per detectar antígens protèics específics en les mostres a estudiar reconeguts per un anticòs monoclonal o policlonal, combinat amb una prèvia electroforesi.

El contingut total de proteïnes de les mostres (i de controls positius i negatius per l'antigen diana) es separa en un gel d'acrilamida en condicions desnaturalitzants que permeten el desplegament de les proteïnes.

Un cop separades, es realitza una transferència a una membrana, que pot ser de PVDF o de Nitrocel·lulosa, on les proteïnes queden ancorades i on podrem fer la detecció per mitjà d'un anticòs primari contra l'antigen desitjat (MMP-9, MMP-2, Lipocalina, TIMP-1, Actina o Albúmina en els nostres experiments), seguit d'un secundari i d'una reacció enzimàtica final (amb peroxidasa) que finalment es revelarà.

Com a resultat obtenim una imatge amb bandes allà on s'ha produït la reacció antígen-anticòs, la intensitat i mida de la qual, depèn de la quantitat de proteïna.

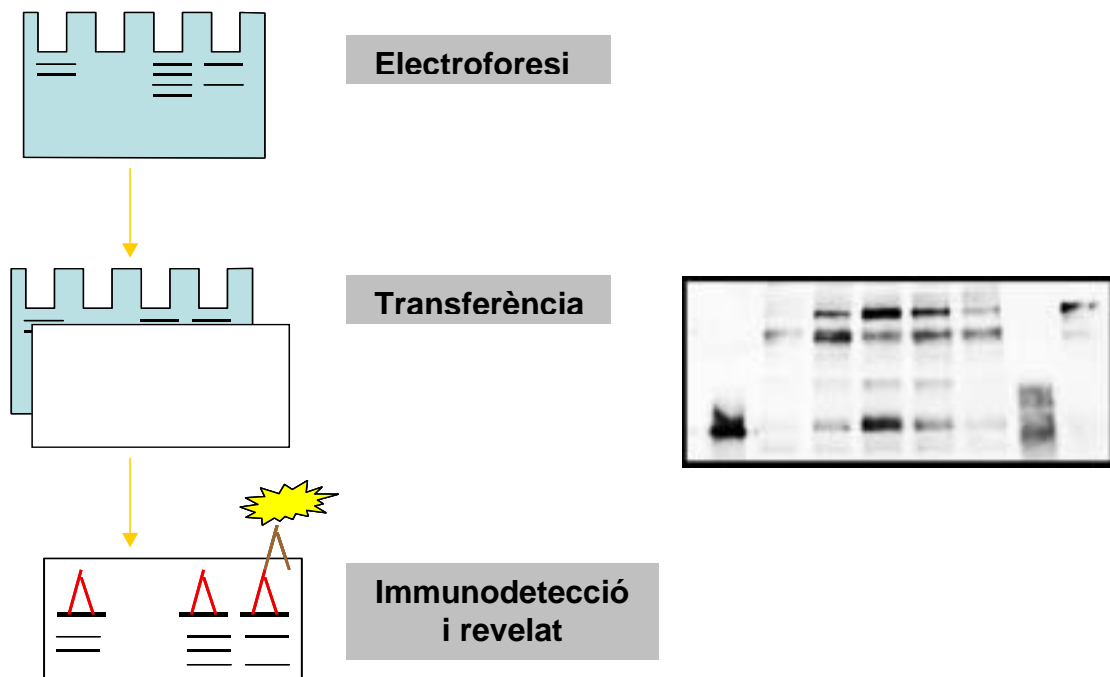


Figura 19. Esquema-resum del protocol de *western blot* i imatge d'una membrana on es va fer una detecció de MMP-9.

L'anàlisi digital de les imatges obtingudes amb un *software* específic (Quantity One, Kodak, NIH Image, etc.) ens permetrà no només determinar la presència o no d'un antigen sinó també realitzar una semiquantificació en unitats arbitràries que permet comparar diferents mostres entre elles.

3.2.3. Zimografia en gelatina

Es tracta d'una tècnica de digestió enzimàtica específica per detectar MMPs amb capacitat per degradar la gelatina (MMP-2 i MMP-9).

Es realitza una electroforesi en gels d'acrilamida, als quals abans de polimeritzar se'ls ha afegit una mica de gelatina que es distribueix uniformement en el gel. Es separen les mostres, en condicions no reductores, per pes molecular en una electroforesi normal junt amb marcadors de pes molecular i controls positius de gelatinases. Un cop separades les mostres, es fan uns rentats amb Tritó i s'incuben els gels a 37°C unes hores en un tampó que facilita la degradació de la gelatina per part de les proteïnes amb capacitat enzimàtica sobre aquest substrat.

Per tant, allà on per electroforesi s'havien situat la MMP-2 i MMP-9, es produeix una degradació, l'extensió i intensitat de la qual dependrà de la quantitat de gelatinases presents en cada mostra.

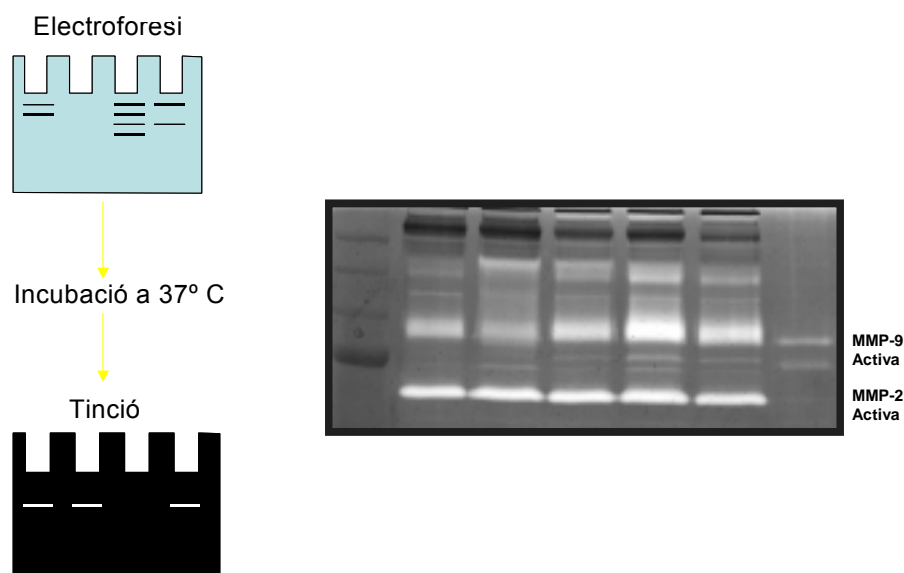


Figura 20. Esquema-resum del protocol de zimografia en gelatina i imatge d'un gel on es van analitzar unes mostres de plasma humà.

Finalment, amb una simple tinció, es tenyeix tot el gel excepte en les zones degradades, on apareixerà una banda blanca durant els rentats amb destenyidor.

Podem identificar la gelatinasa corresponent a cada banda pel pes molecular i pels controls positius. Tot i això, és important confirmar que es tracta de metal·loproteïnases realitzant una incubació amb un tampó que contingui EDTA (sobre 20mM) que inactiva l'acció de les MMPs i, per tant, no degradaran el gel.

L'anàlisi digital de les imatges obtingudes amb un *software* específic (Quantity one, Kodak, etc.) ens permetrà realitzar una semiquantificació en unitats arbitràries.

3.2.4 Zimografia *In situ*

Aquesta tècnica permet la localització de l'activitat de les gelatinases sobre una secció de teixit. És una tècnica molt útil per valorar el grau d'activitat i és complementària als *western blots*, zimografies en gelatina i immunohistoquímica. Actualment, es poden realitzar dos tipus de tècniques: una sobre un porta-objectes amb una fina capa de gelatina que s'incuba i es tenyeix per veure zones de degradació; una altra utilitzant un substrat que, quan es degrada per l'activitat gelatinasa, emet fluorescència. Ens centrarem en aquesta segona ja que és la que hem utilitzat.

Per poder realitzar aquesta tècnica és molt important no realitzar cap tipus de fixació sobre el teixit: s'ha de congelar en nitrogen líquid i conservar-lo congelat a -80°C . Sobre talls d'uns 10-20 μm de gruix tallats en un criostat, que es munten en porta-objectes d'ús comú i es cobreix tota la mostra amb una solució que conté gelatina unida a un fluorocrom FITC (Molecular Probes, USA). Es fa una incubació en una cambra humida per evitar que el teixit s'assequi entre 15-22 hores protegint les mostres de la llum.

Finalment es cobreixen les mostres amb un medi aquós que les protegeix de la pèrdua de fluorescència i que pot portar DAPI o PI que ens permetran localitzar els nuclis cel·lulars (per marcatge de l'ADN). L'anàlisi i valoració de les mostres es realitza en un microscopi de fluorescència.

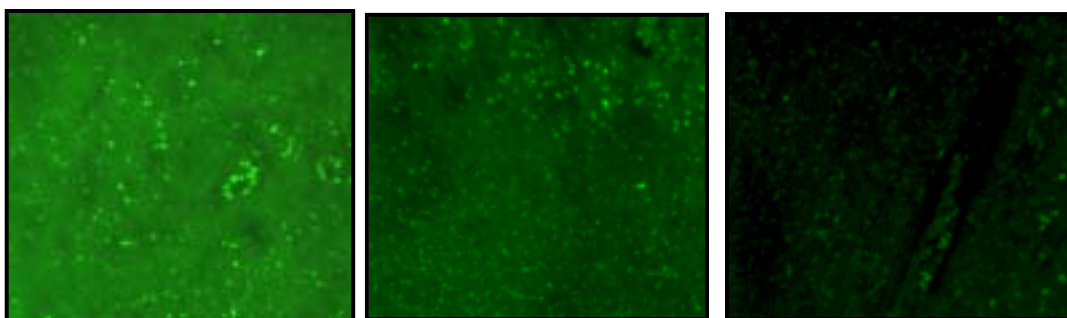


Figura 21. Imatges de zimografia *in situ* obtingudes per microscopia de fluorescència mostrant més activitat gelatinasa en la zona d'infart (a l'esquerra) que en el periinfart (al centre) i mínima a l'hemisferi contralateral (a la dreta) d'un mateix pacient. (100X).

3.2.5. Immunohistoquímica

Correspon a un tipus de tècnica d'immunotinció que permet detectar gran varietat d'antígens presents en cèl·lules o en mostres de teixit mitjançant l'utilització d'anticossos que s'uneixen als antígens-diana presents en la mostra, marcats amb un substrat enzimàtic que produeix un precipitat de color o que emet fluorescència. Les reaccions enzimàtiques permeten una localització més precisa de les reaccions, ja que la tinció és permanent, estable, pot contrastar-se i pot ser analitzada amb un microscopi de llum. Per tant, el material que s'estudia pot guardar-se durant anys sense pèrdua de senyal.

La reacció que s'utilitza amb més freqüència és la de la peroxidasa, que deixa un precipitat marró allà on s'ha produït la unió antigen-anticòs. L'ús d'anticossos monoclonals (en els nostres estudis: MMP-9 i CD-31) ha permès augmentar l'especificitat i sensibilitat de la tècnica, tot i que és possible que es donin reaccions inespecífiques que s'han de valorar amb controls negatius i positius.

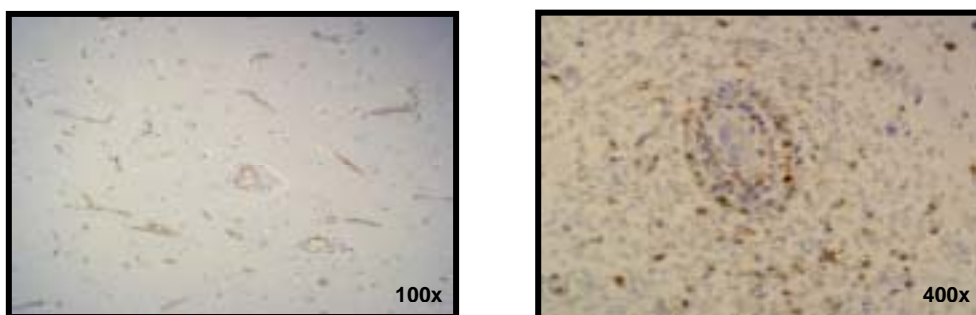


Figura 22. Imatges d'immunohistoquímica per CD-31 (esquerra) a l'hemisferi contralateral i per MMP-9 (dreta) en teixit infartat on es veuen neutròfils amb MMP-9 a la zona perivascular.

3.3. Anàlisi estadística

Per realitzar l'anàlisi estadística de totes les dades obtingudes en els diferents treballs s'ha utilitzat el paquet estadístic SPSS® 12.0. En cada un dels estudis es descriu amb precisió el tractament estadístic de les mostres i els tests aplicats en cada cas.

4. RESULTATS

ARTICLE 1

A Matrix Metalloproteinase Protein Array Reveals a Strong
Relation between MMP-9 and MMP-13 with Diffusion-Weighted
Image Lesion Increase in Human Stroke.

(Stroke.2005;36)

A Matrix Metalloproteinase Protein Array Reveals a Strong Relation between MMP-9 and MMP-13 with Diffusion-Weighted Image Lesion Increase in Human Stroke

Anna Rosell, José Alvarez-Sabín, Juan F. Arenillas, Alex Rovira, Pilar Delgado, Israel Fernández-Cadenas, Anna Penalba; Carlos A. Molina, Joan Montaner.

Neurovascular Research Laboratory, Neurovascular Unit and Neuroimaging Unit, Neurology Department, Universitat Autònoma de Barcelona, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Metalloproteinase array in hyperacute stroke

Background and Purpose: Matrix metalloproteinases (MMPs) are involved in tissue destruction produced by the neuroinflammatory response that follows ischemic stroke. In the present study we use an MMP array to investigate the blood levels of several MMPs in stroke patients and its relation with brain tissue damage and neurological outcome. **Methods:** Twenty-four patients with middle cerebral artery occlusion who received thrombolytic therapy were included. Blood samples were drawn before tissue plasminogen activator (t-PA) treatment and an MMP array (Multiplex ELISA) was performed including gelatinases (MMP-2 and MMP-9), collagenases (MMP-1, MMP-8 and MMP-13), stromelysines (MMP-3 and MMP-10) and MMP endogen inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2). To assess tissue lesion a serial multimodal MRI study was done (pre-treatment and at 24 hours). **Results:** Neither initial diffusion lesion nor hypoperfused volume was associated with metalloproteinase expression within the first 3 hours after stroke onset. Nevertheless a strong correlation was found between MMP-9 and MMP-13 with diffusion-weighted image (DWI) lesion expansion ($r=0.54$, $P=0.05$ and $r=0.60$, $P=0.017$ respectively). Baseline levels of both MMP-9 [OR 14(1.5-131); $P=0.019$] and MMP-13 [OR 73(3.9-1388); $P=0.004$] were independent predictors of final increase in brain infarct volume at 24 hours. **Conclusions:** Our results demonstrate that within the neuroinflammatory response, high levels of MMP-9 and MMP-13 are involved in DWI lesion growth in spite of thrombolytic therapy suggesting its ultra-early role in brain injury.

Ischemic stroke activates a complex cascade of events,¹ some of which occurs within the first minutes after stroke onset, such as glutamate release, and others, as leukocyte infiltration and cerebral edema, which are observed hours or days after brain vessel occlusion. Matrix metalloproteinases (MMPs) constitute a large family of zinc-dependent of extracellular matrix (ECM) components that play an important role in several steps of the molecular cascade following stroke.^{2,3}

Expression of some metalloproteinases such as MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) is up-regulated after cerebral ischemia⁴⁻⁷ and contributes to infarct extent, blood-brain barrier (BBB) breakdown, and poor neurological outcome.⁸⁻¹⁰ We have previously shown high MMP-9 level after acute ischemic stroke related to neurological outcome¹¹ and hemorrhagic transformation in patients who received thrombolytic treatment.¹² Others have demonstrated that hypothermia reduces MMP-9 expression while thrombolytic treatment activates MMP-9,¹³ suggesting clinical benefit from combination therapies targeting MMPs, as has been nicely demonstrated in animal models of cerebral ischemia.¹⁴⁻¹⁶

Regarding human stroke, a recent investigation showed that MMP-9 is a good predictor of infarct volume measured as a diffusion-weighted image (DWI) lesion when evaluated within six hours of symptom onset.¹⁷

To obtain further knowledge of mechanisms that could interfere with successful thrombolytic therapy, this study attempts to evaluate the ultra-early role of MMPs after hyperacute stroke in different areas of ischemic brain (diffusion and perfusion abnormalities) by studying new members of this family in shorter time periods. We hypothesize that some MMPs might be involved in tissue damage within the first 3 hours after stroke onset and therefore might be clinically relevant for neurological outcome following standard thrombolytic therapy.

METHODS

Study Population and Clinical Protocol

Our target was stroke patients involving the middle cerebral artery (MCA) territory who received a multimodal magnetic resonance image (MRI) study prior to thrombolytic treatment. The study included 65 consecutive patients with an acute stroke admitted to the Emergency Department that received thrombolytic therapy in a standard 0.9-mg/kg dose (10% bolus, 90% continuous infusion for 1 hour) within 3 hours of symptom onset. Five had a basilar artery occlusion, 2 a posterior cerebral artery occlusion and 58 had a MCA occlusion, all of them documented on transcranial Doppler (TCD). Within the 58 MCA occlusions, 25 underwent a MRI study within the first 3 hours of stroke onset. The remaining patients did not receive the MRI study because of the lack of availability of the technique 24 hours a day or due to any contraindication to perform a MRI study. A control DWI was repeated after 24 hours to evaluate lesion increase. All patients with a known inflammatory or malignant disease were excluded. Finally, 24 patients with a MCA occlusion received the baseline study protocol including a complete MRI study before t-PA treatment.

A detailed history of vascular risk factors was obtained from each patient. To identify potential mechanisms of cerebral infarction, all patients underwent a set of diagnostic tests (including electrocardiogram, chest radiography, carotid ultrasonography, complete blood count, leukocyte differential and blood biochemistry). Clinical examination was performed on admission and at 12, 24 and 48 hours from symptom onset. Stroke severity and neurological outcome were assessed using the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS). TCD measurements were performed by an experienced neurologist using a Multi-Dop[®] X4 (DWL Elektronische Systeme GmbH, Sipplingen, Germany) device, with a hand-held transducer in a range-gated, pulsed-wave mode at a

frequency of 2 MHz. Proximal MCA occlusion was defined as the absence of flow or the presence of minimal flow signal throughout the MCA, accompanied by flow diversion in the ipsilateral anterior cerebral artery and posterior cerebral artery. Distal MCA occlusion was defined as a diffuse dampening of the mean blood flow velocity in the affected MCA >21% compared with the contralateral MCA. This study was approved by the Ethics Committee of the hospital and all patients or relatives gave informed consent.

MRI Protocol

All MRI studies were performed with a 1.5 T whole-body imaging system with 24-mT/m gradient strength, 300-msec rise time and an echo-planar-capable receiver equipped with a gradient overdrive (Magnetom Vision Plus, Siemens Medical Systems, Germany). The images included axial T2-weighted susceptibility-based echo-planar gradient-echo sequence [0.8/29/1 (TR/TE/acquisitions); total acquisition time 2 seconds]; axial diffusion-weighted echo-planar spin-echo sequence [4000/100/2 (TR/TE/acquisitions); total acquisition time 56 seconds]; and axial perfusion-weighted echo-planar gradient-echo sequence [2000/60/40 (TR/TE/acquisitions); total acquisition time 80 seconds].

DWI was obtained with a single-shot spin-echo echo-planar pulse sequence with diffusion gradient b-values of 0, 500 and 1000 s/mm² along all three orthogonal axes over 15 axial sections, with 5-mm slice thickness (interslice gap of 1.5 mm), a field of view of 230 mm, and 96 x 128 matrix. The acquisition time for the DWI equaled 56 seconds. Perfusion-weighted image (PWI) was acquired by using a bolus of gadolinium-based contrast material (Magnevist, Schering AG, Berlin, Germany) for selected 13 to 15 section positions measured 40 times sequentially. The perfusion-weighted sequence generated a time-to-peak (TTP) map for each section position that was immediately available for interpretation at the

console with all the other images. PWI was obtained using 5-mm-thick sections, an interslice gap of 1.5 mm, a field of view of 240 mm and 128 x 128 matrix. In all patients baseline MRI study was fully completed. Only 21 patients received the second DWI exam at 24 hours, the remaining patients were severely impaired and were unable to tolerate this second examination.

Volumetric Assessment of Lesion Size

Volume measurements of the extent of tissue abnormality on DWI and on TTP maps were performed by an experienced neuroradiologist, blinded to clinical and laboratory data, using a manual tracing technique. The perimeter of the area of abnormal high-signal intensity was traced on each DWI and TTP map. All measured areas were multiplied by the slice distance to obtain the total lesion volumes for both the DWI and TTP maps (cubic centimeters, cc). The extent of ischemic penumbra was calculated as the difference between baseline PWI and DWI volumes, and the increase in DWI lesion was assessed as the difference between final DWI and initial DWI, divided per initial DWI and expressed as a percentage (%).

Multiplexed MMP array

Peripheral blood samples were drawn from each patient at study entry (prior to t-PA administration). EDTA tubes were used to collect the blood, and plasma was immediately separated by centrifugation at 3000 rpm for 15 minutes and stored at -80°C. SearchLight® Human MMP Array 1 (Pierce, Rockford, Illinois, USA) was used to measure MMPs; this assay consists of multiplexed sandwich ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) for the quantitative measurement of nine proteins in each sample: gelatinases (MMP-2 and MMP-9), collagenases (MMP-1, MMP-8 and MMP-13), stromelysines (MMP-3 and MMP-10) and endogen inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) (Figure 1 A). Each sample was assayed two times and the mean value of both measurements was

used. The mean intra-assay coefficients of variation were < 15% for all biomarkers measured.

The enzyme-substrate reaction produces a chemiluminescent signal detected with a cooled CCD camera (Pierce, Rockford, Illinois, USA). The images were analyzed by ArrayVision™ version 8.0 software (Imaging Research, Canada). Although the array standard curves are given in pg/ml units, we have converted them to ng/ml for easier interpretation.

Statistical Analyses

Descriptive and frequency statistical analyses were obtained and compared using SPSS® 12.0. Matrix metalloproteinase levels did not have a normal distribution (Kolmogorov-Smirnov and PP plot), therefore values are expressed as median (interquartile range). Statistical significance for intergroup differences was assessed by the Fisher's exact test (for categorical variables) and the Mann-Whitney U or Kruskal-Wallis tests (for continuous variables). The Spearman coefficient was used to study correlations between continuous variables. Significant p-values for multiple comparisons were adjusted using Bonferroni correction. Receiver-operator curves (ROC) were obtained for MMPs to identify the best cutoff points for predicting different DWI lesion increases. Finally, a multiple logistic regression model was performed to detect independent markers of DWI lesion increase. A P value less than .05 was considered statistically significant.

RESULTS

Patients Characteristics and MRI Study

Mean age of the study group (54% men) was 72±14 years; the main baseline characteristics, including risk factors and other clinical variables, are shown in Table 1. The planimetric measurement showed an initial DWI volume=9.8 cc (5.4-17.6), PWI volume=180.5 cc (110.1-205.5) and a calculated volume of

ischemic penumbra=153 cc (98-198). Control MRI performed 24 hours later found a DWI volume=36.4 cc (16.3-85.9) with a median percentage of increase=173% (23-684).

No correlation was found between initial DWI lesion or initial PWI volume and any of the risk factors or clinical variables shown in Table 1. Among clinical variables, only baseline NIHSS score and presence of proximal or distal occlusion were weakly related to an increase in DWI volume at 24 hours ($r=0.38$, $P=0.08$ and 277% vs. 14 % $P=0.06$ respectively). The MMP array measurements and results are shown in Figure 1 and Table 2.

Relationship between MMP Levels and Extent of Brain Lesion

All measured biomarkers were similar in terms of the presence of a proximal (75%) or distal MCA occlusion (data not shown). No correlation existed between baseline biomarkers and DWI volumes at arrival. Moreover, no correlation was found between protein levels and hypoperfused tissue volume (PWI) at baseline MRI study nor ischemic penumbra.

Among the nine metalloproteinases assessed by MMP array, only one gelatinase and one collagenase were strongly correlated with an increase in the extent of DWI lesion during the first 24 hours (Figure 2). Both MMP-9 (gelatinase B) and MMP-13 (collagenase-3) baseline levels were positively correlated with an increase in DWI lesion ($r=0.54$, $P=0.05$ and $r=0.60$, $P=0.017$ respectively). A positive correlation was also found between these two metalloproteinases ($r=0.59$, $P=0.003$).

To better explore this finding, patients were divided into two groups according to increase in DWI volumes. Half of the study patients had an increase in DWI volume above 180% at 24 hours. Multivariate analyses to assess the main factors related to large increments (>180%) in DWI lesion were performed, with no relationship found between lesion growth at 24 hours and

any risk factor or clinical variable evaluated. Regarding baseline biomarkers, we found higher plasma levels of both MMP-9 and MMP-13 among those patients with DWI volume increases >180% at follow-up (208 vs. 53 ng/ml, $P=0.034$ and 5.8 vs. 1.8 ng/ml, $P=0.008$ respectively) (Figure 3).

The ROC curves identified MMP-9 >100 ng/ml and MMP-13 >3 ng/ml as the best cutoff points to predict large DWI increases (>180%). Using these cutoffs, 77.8% of patients with MMP-9 levels over 100 ng/ml and 89% of patients with MMP-13 concentrations over 3 ng/ml had DWI increases >180% ($P=0.023$ and $P=0.001$, respectively). In fact, these cutoff points yielded 80% sensitivity and 81.8% specificity for MMP-9 and 90% sensitivity and 91% specificity for MMP-13, to predict DWI increases >180%. Furthermore, both biomarkers were independent predictors of an increase >180% of the extent of DWI lesion at 24 hours, even when other classical baseline factors such as stroke severity (assessed as NIHSS score) and the presence of a proximal occlusion (assessed by TCD) were included in the regression model. Odds ratios was 14 for MMP-9 (1.5-131; $P=0.019$) and 73 for MMP-13 (3.9-1388; $P=0.004$).

Metalloproteinases and Neurological Outcome

No MMP level was related to initial neurological state before t-PA treatment, but several significant associations with neurological outcome appeared later on at different time points.

Clinical assessment revealed that only both metalloproteinases related to lesion growth were weakly associated with poor neurological state, as reflected by MMP-9 correlation to stroke severity (NIHSS 24 hours: $r=0.52$, $P=0.04$) and with NIHSS score increase at 48 hours (MMP-9: $r=0.46$, $P=0.08$ and MMP-13: $r=0.45$, $P=0.11$). Among the remaining MMPs assessed no other correlations were found. Regarding MMP

inhibitors achieved, both TIMP-1 (NIHSS increase at 48h: $r=0.69$, $P=0.0004$) and TIMP-2 (NIHSS increase at 48h: $r=0.56$, $P=0.021$) were related to neurological outcome.

DISCUSSION

Matrix metalloproteinase-induced degradation of basal lamina surrounding microvessels after cerebral ischemia causes parenchyma destruction related to CT-scan-measured infarct volume and hemorrhagic transformation.^{11,12} New MRI techniques such as DWI and PWI make it possible to distinguish between different tissue brain areas, providing valuable information for correlation studies to recognize new potential biomarkers responsible for cell damage (DWI) or low cerebral blood flow (PWI).¹⁷⁻¹⁹ Altogether, our results reveal that patients who receive thrombolytic therapy show pre-treatment expression of MMP-9 and MMP-13 related to ulterior tissue destruction within the following 24 hours, reflected as an increase in the extent of DWI lesion.

Clear evidence from animal models has recently shown that the extent of brain infarction is partially due to MMP activity that attacks different components of ECM and specifically by MMP-9 that has been reported to be over-expressed and tissue located.^{16,18,20-22} Therapeutic assays in rodents with MMP-9 inhibitors^{15,23} and MMP-9 gene-knockouts^{15,24} have demonstrated infarct size reduction and blocking BBB disruption.

Contrary to the well-established deleterious role of MMP-9, this is the first time that collagenase-3 (MMP-13) has been shown to be involved in tissue injury after stroke. This metalloproteinase has been thoroughly studied in aggressive cancer as a biomarker of tumor progression,²⁵ in bone morphogenesis²⁶ (where it is involved in bone development and remodeling) and in abdominal aortic dilatation and rupture.²⁷ Only one earlier study has attempted to measure MMP-13 in human stroke within the first 12 hours of symptoms as compared

Table 1. Baseline characteristics of the stroke population studied. SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure; NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale.

Age	72.1±14.5
Sex (male)	13 (54.2%)
Hypertension	8 (33.3%)
Smoker	8 (33.3%)
Diabetes	4 (16.7%)
Atrial fibrillation	9 (37.5%)
Coronary disease	0
Dyslipidemia	7 (29.2%)
Previous stroke	3 (12.5%)
SBP	153.8±23.2
DBP	81.7±10.5
Glycemia	138.6±71.5
Proximal occlusion	18 (75%)
Baseline NIHSS score	14.5 (8.5-20.75)

Table 2. Matrix metalloproteinase array values. Results expressed as median (interquartile range).

Biomarker	Values (ng/ml)
MMP-1	8.55 (5.13-12)
MMP-2	200.6 (116.7-303.4)
MMP-3	4.37 (2.72-6.06)
MMP-8	0.96 (0.96-0.96)
MMP-9	92.34 (55.69-265.53)
MMP-10	0.38 (0.30-0.44)
MMP-13	3.08 (1.76-5.24)
TIMP-1	57.13 (37.71-75.04)
TIMP-2	77.77 (62.82-99.52)

Figure 1. MMP array image showing chemiluminiscent intensity from MMP signal on a single ELISA plate well. Note: M (MMP) and T (TIMP) (A). Data of two actual patients are shown (B). Arrows indicate MMP-9 signal and MRI images show DWI planimetric measurements.

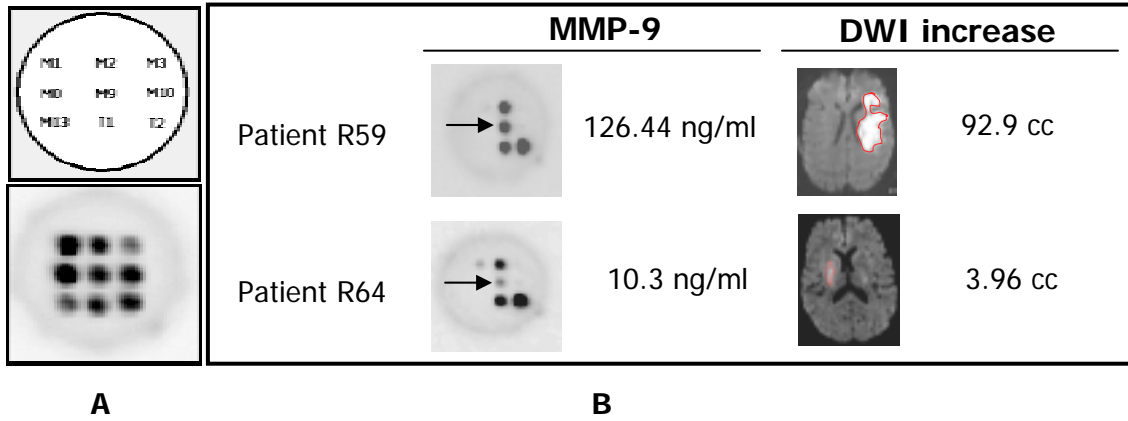


Figure 2. Extent of damaged tissue (DWI volume increase) is correlated with MMP-9 ($r=0.54$, $P=0.05$) and MMP-13 levels ($r=0.60$, $P=0.017$).

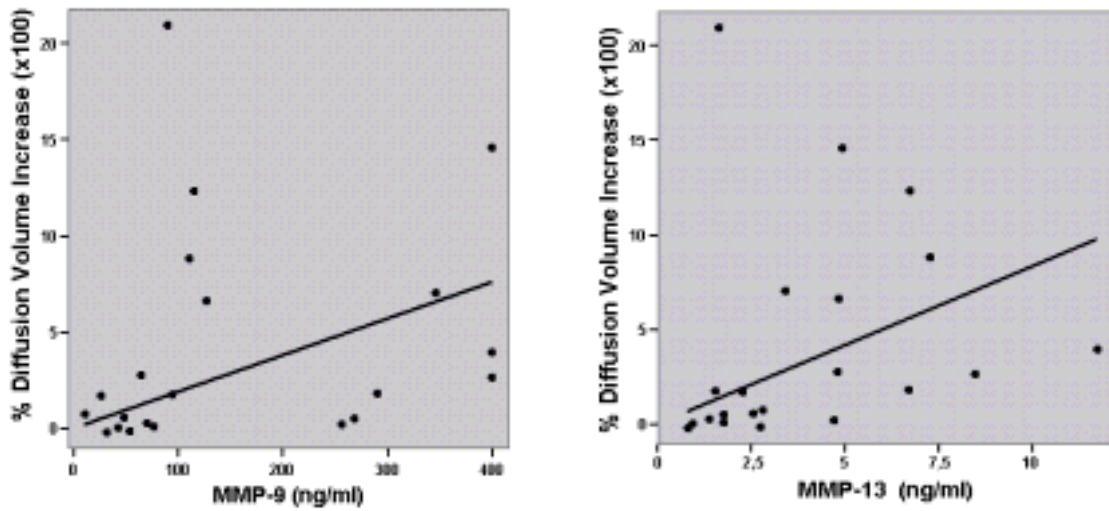
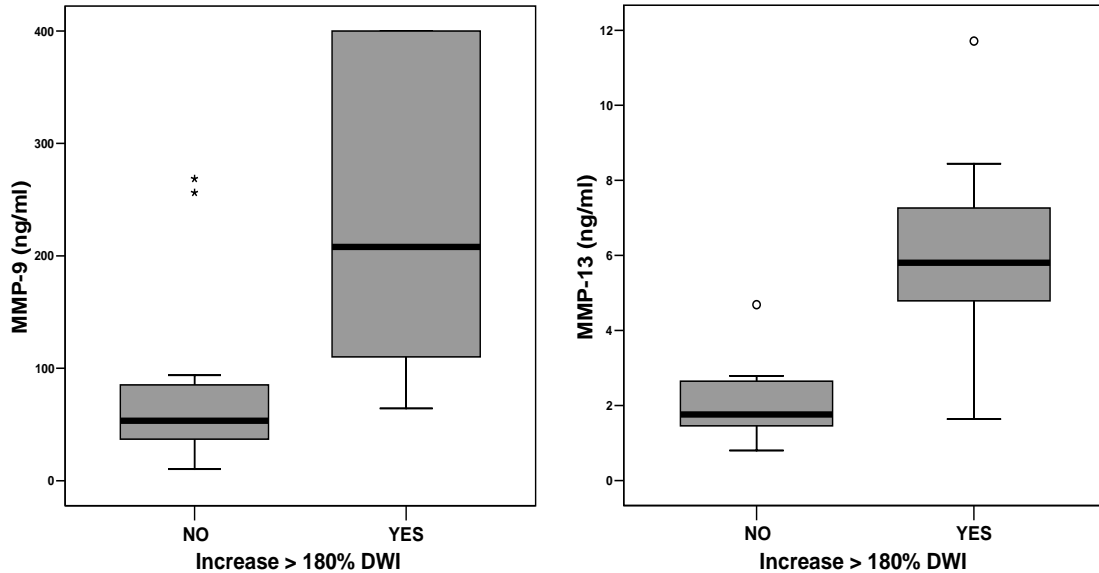


Figure 3. Largest increase of lesion extent within the first 24 hours after stroke onset (more than 180% of initial DW lesion) was found among patients with the highest MMP-9 ($P=0.034$) and MMP-13 levels ($P=0.008$).



to a healthy control group, but no difference was found.¹³

Our study provides new information about MMP-13 in a shorter time-period reporting higher protein values than others did in a wider time-range after stroke onset¹³ and also describes its relation with ischemic brain tissue. In fact, ECM degradation after cerebral ischemia might be in part due to collagen degradation by secreted enzymes like MMP-13, since type IV collagens are its specific substrates and this basal lamina component is lost following cerebral ischemia.²⁸ Cell-type source of MMP-13 after stroke remains to be investigated. Since MMP-9 and MMP-13 were correlated in our stroke population, activation pathways between both MMPs are possible.²⁹

No correlation was found between baseline DWI lesion and any metalloproteinase within first three hours after stroke symptoms, ruling out a simplistic acute-phase-reactant explanation. Interestingly, correlations with DWI lesion increase one day later would suggest that

endogen expression of some MMPs is implicated in brain tissue destruction.

Similarly, we found no correlation between any MMP and baseline NIHSS scores, but neurological outcome was later positively related with MMP-9. We hypothesize that initial metalloproteinase expression is not due to stroke severity, but that baseline expression of some MMPs is in part responsible for neurological impairment, as reported by other studies.¹¹ In fact, baseline inter-individual differences in plasmatic levels of this metalloproteinases after ischemic injury imply a different response in the increase of DWI lesion extent and in neurological evolution in spite of thrombolytic therapy. Some reports regarding genetic background due to presence of functional polymorphisms, which could influence MMPs level, might partially explain these differences.^{30,31}

Finally, TIMP findings are somewhat intriguing, since we expected a protective role for these MMPs inhibitors; however, the antibody used may recognize both free and complexed MMP-

TIMP forms, making it difficult to give an explanation for our results.

Therefore, our results support the fact that biochemical data may add information to the modern neuroimaging techniques, and altogether might help to better guide stroke thrombolysis in the future. Since we focused our research on identifying baseline biomarkers (pre-treatment) of tissue damage, we did not consider other factors occurring at later time points (eg, MCA recanalization) that are well-known factors of infarct extension.

The main limitation of the present study is the small size of our study group and we have to be cautious about the predictive role of both biomarkers; however, strict criteria were used to select cardioembolic strokes with MCA occlusions that received t-PA and complete MRI study within the first three hours after stroke onset. Moreover, the assessment of changes in lesion size could be biased, since three severe patients in whom the second MRI was not performed might have a different profile of lesion size change than those who were well enough at 24 hours for the control MRI. However, biomarkers prediction of DWI lesion increase could have improved if we could have studied those patients with severe strokes in which an infarct increase was expected since they also had high MMP-9 and MMP-13 levels. Furthermore, a control group of healthy patients and repeated measurement of the studied biomarkers might improve the quality of a future study, since it would provide valuable information on the degree of expression of the MMPs studied in normal plasma and of the effect of tPA on the levels of those biomarkers.

In conclusion, we have demonstrated that in the hyperacute phase of stroke, MMP-9 and MMP-13 expression is related to an increase in DWI lesion within the first 24 hours. Our results also suggest that both metalloproteinases are involved in tissue injury and cell death,

counteracting the benefits of thrombolytic therapy.

Acknowledgements

Anna Rosell is the recipient of a pre-doctoral grant from the Institut de Recerca, Hospital Vall d'Hebron. We are grateful to Manolo Quintana for statistical advice and to Toni Lozano and Ineabel Carrillo for their technical assistance.

REFERENCES

1. Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16:360-366.
2. Rosenberg GA, Mun-Bryce S. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Ernst Schering Res Found Workshop.* 2004;47:1-16.
3. Mun-Bryce S, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:1163-1172.
4. Clark AW, Krekoski CA, Bou SS, Chapman KR, Edwards DR. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett.* 1997;238:53-56.
5. Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:624-633.
6. Fukuda S, Fini CA, Mabuchi T, Koziol JA, Eggleston LL Jr, del Zoppo GJ. Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. *Stroke.* 2004;35:998-1004.
7. Planas AM, Sole S, Justicia C. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis.* 2001;8:834-846.
8. Fujimura M, Gasche Y, Morita-Fujimura Y, Massengale J, Kawase M, Chan PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier

- disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res.* 1999;842:92-100.
9. Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin JC, Kawase M, Massengale J, Chan PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19(9):1020-1028.
 10. Aoki T, Sumii T, Mori T, Wang X, Lo EH. Blood-brain barrier disruption and matrix metalloproteinase-9 expression during reperfusion injury: mechanical versus embolic focal ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke.* 2002;33:2711-2717.
 11. Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina C, Angles A, Abilleira S, Arenillas J, Gonzalez MA, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke.* 2001;32:1759-1766.
 12. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribo M, Quintana M, Alvarez-Sabin J. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation.* 2003;107:598-603.
 13. Horstmann S, Kalb P, Koziol J, Gardner H, Wagner S. Profiles of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and laminin in stroke patients: influence of different therapies. *Stroke.* 2003;34:2165-2170.
 14. Pfefferkorn T, Rosenberg GA. Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rtPA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke.* 2003;34:2025-2030.
 15. Asahi M, Asahi K, Jung JC, del Zoppo GJ, Fini ME, Lo EH. Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20:1681-1689.
 16. Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke.* 1998;29:1020-1030.
 17. Montaner J, Rovira A, Molina CA, Arenillas JF, Ribo M, Chacon P, Monasterio J, Alvarez-Sabin J. Plasmatic level of neuroinflammatory markers predict the extent of diffusion-weighted image lesions in hyperacute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23:1403-1407.
 18. Wagner S, Nagel S, Kluge B, Schwab S, Heiland S, Koziol J, Gardner H, Hacke W. Topographically graded postischemic presence of metalloproteinases is inhibited by hypothermia. *Brain Res.* 2003;984:63-75.
 19. Sharp FR, Lu A, Tang Y, Millhorn DE. Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000;20:1011-1032.
 20. Lee SR, Tsuji K, Lee SR, Lo EH. Role of matrix metalloproteinases in delayed neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *J Neurosci.* 2004;24:671-678.
 21. Planas AM, Sole S, Justicia C, Farre ER. Estimation of gelatinase content in rat brain: effect of focal ischemia. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;278:803-807.
 22. Sole S, Petegnief V, Gorina R, Chamorro A, Planas AM. Activation of matrix metalloproteinase-3 and agrin cleavage in cerebral ischemia/reperfusion. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004;63:338-349.
 23. Jiang X, Namura S, Nagata I. Matrix metalloproteinase inhibitor KB-R7785 attenuates brain damage resulting from permanent focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett.* 2001;305:41-44.
 24. Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white

- matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci.* 2001;21:7724-7732.
25. Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res.* 2000;6:4823-4830.
26. Stickens D, Behonick DJ, Ortega N, Heyer B, Hartenstein B, Yu Y, Fosang AJ, Schorpp-Kistner M, Angel P, Werb Z. Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development.* 2004;131:5883-5895.
27. Tromp G, Gatalica Z, Skunca M, Berguer R, Siegel T, Kline RA, Kuivaniemi H. Elevated expression of matrix metalloproteinase-13 in abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg.* 2004;18:414-420.
28. Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo GJ. Microvascular Basal Lamina Antigens Disappear During Cerebral Ischemia and Reperfusion. *Stroke.* 1995;26:2120-2126.
29. Dreier R, Grassel S, Fuchs S, Schaumburger J, Bruckner P. Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade. *Exp Cell Res.* 2004;297:303-312.
30. Montaner J, Fernandez-Cadenas I, Molina CA, Monasterio J, Arenillas JF, Ribo M, Quintana M, Chacon P, Andreu AL, Alvarez-Sabin J. Safety profile of tissue plasminogen activator treatment among stroke patients carrying a common polymorphism (C-1562T) in the promoter region of the matrix metalloproteinase-9 gene. *Stroke.* 2003;34:2851-2855.
31. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Poirier O, Bickel C, Smieja M, Hafner G, Meyer J, Cambien F, Tiret L; AtheroGene Investigators. Plasma concentrations and genetic variation of matrix metalloproteinase 9 and prognosis of patients with cardiovascular disease. *Circulation.* 2003;107:1579-85.

ARTICLE 2

In vivo Brain MMP-9 levels in Large Middle Cerebral Artery
Infarctions with a Malignant Course.

(Sotmès a Stroke, 2005)

***In vivo* Brain MMP-9 levels in Large Middle Cerebral Artery Infarctions with a Malignant Course**

Anna Rosell¹, Juan Sahuquillo², José Alvarez-Sabín¹, Anna Vilalta², Juan F. Arenillas¹, Pilar Delgado¹, Carlos A. Molina¹, Joan Montaner¹ .

¹ Neurovascular Research Laboratory, Neurovascular Unit and ² Department of Neurosurgery and Neurotraumatology Research Unit. Department of Neurology of Vall d'Hebron University Hospital. Department of Internal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

MMP-9 in malignant MCA infarction

Background and Purpose: Matrix metalloproteinases (MMP) are involved in the pathogenesis of brain injury after ischemia and are related to poor neurological outcome. We aimed to investigate brain MMP-9 and MMP-2 levels in patients with middle cerebral artery (MCA) infarcts with a malignant course. **Methods:** All samples were obtained from 3 patients with large MCA infarcts who underwent decompressive craniectomy (DC) or hypothermia. Peripheral blood and *in vivo* extracellular brain microdialysates from different areas of ischemic hemisphere were processed. Gelatinase levels were assessed by means of gelatin zymography. **Results:** The dynamics of MMP-9 varied according to treatment and to the infarct progression. MMP-9 levels from brain dialysates were found higher in the infarcted core than in infarct boundary and both gelatinases were transiently up-regulated after DC and down-regulated by hypothermia. **Conclusions:** Our results demonstrate an early *in situ* over-expression of MMP-9 in patients with an MCA infarction and a malignant clinical course suggesting an active role of locally expressed MMP-9 in ischemic brain damage.

Space-occupying brain edema is a life-threatening complication in large middle cerebral artery (MCA) infarcts with poor functional outcome and high mortality. Aggressive therapies such as hypothermia or decompressive craniectomy (DC) have shown encouraging results, improving survival rates and neurological outcome (1,2). To identify molecular mechanisms underlying malignant

progression could aid in early identification of these patients and provide new strategies for neuroprotection therapies.

Matrix metalloproteinases (MMP) are zinc-dependent proteases that degrade basal lamina and extracellular matrix components and an abnormal expression of some MMPs is involved in brain injury after stroke. In the blood stream of stroke patients MMP-9 is up-regulated and

related to infarct volume and neurological outcome (3,4). In animal models of cerebral ischemia, blocking MMP-9 by hypothermia or pharmacological inhibition reduces infarct size and blood brain barrier (BBB) leakage (5,6).

New microdialysis probes with high cut-off membranes (100 kDa) give us a new method to study *in vivo* production of these proteases. In this study we investigated brain gelatinase levels through high-resolution microdialysis in human ischemic brain and its relation to peripheral blood levels.

METHODS

Patients and Samples

All patients had MCA occlusions with a malignant course and required treatment with DC or hypothermia. In patient 1, two microdialysis probes were implanted during DC four days after stroke in the infarct core and infarct boundary. Dialysates were collected hourly during the following days together with daily arterial blood samples. In patient 2, probes were inserted in the same areas one day after stroke, before DC and after moderate hypothermia induction (32°C), and were collecting until surgery. In patient 3, arterial blood samples were drawn daily before and after DC. All blood samples were collected in EDTA tubes, centrifuged and stored at -80°C with dialysate samples. This study was approved by the Ethics Committee of the hospital and informed consent was acquired from patients' relatives.

Microdialysis and Gelatin Zymography

Microdialysis catheters (CMA-71, CMA Microdialysis Stockholm, Sweden) with a 100 kDa cut off membrane were inserted in brain parenchyma. Mock CSF was perfused at 0.30 µl/minute by using a CMA-106 pump. Samples obtained in the first 2 hours after implantation were discarded. The position of the catheter was checked by computed tomography (CT).

Plasma samples were adjusted to equal protein content and for microdialysates, 10 µl were separated in SDS-PAGE containing 0.1% gelatin. Gels were washed in 2.5% Triton X-100, incubated at 37°C, stained with amido black 0.1% and destained. Gelatinase activities were ensured incubating with EDTA. Gels were read by using an Epson GT 9600 scanner and were analysed by Quantity One analysis software (Bio-Rad; USA).

RESULTS

Extracellular gelatinase levels could be detected by high-resolution microdialysis and zymography. In brain dialysates MMP-9 levels were higher in infarcted areas than in periinfarct tissue (Figures 1A and 2A). The temporal profiles of both gelatinases from patient 1 are described in Figure 1B showing initial increased MMP-9 levels both in the infarct core and boundary. Hemorrhagic transformation (HT) after DC around one probe might have contributed to the increase gelatinase levels (Figure 1A). At the same time an MMP-9 peak was detected after DC in both catheters, which was mirrored in peripheral blood levels (Figure 1C). In patient 2, MMP-9 levels initially increased, decreased within the first hours after hypothermia induction and then were up-regulated again together with an increase in lesion size (Figure 2B). When comparing microdialysis in both patients, higher levels of MMP-9 including increased activity were detected in patient 2 who had worse neurological outcome during the following days. Regarding MMP-2, dialysate levels in patient 2 increased slightly within the first few hours after stroke, were lower during hypothermia and increased again related to lesion growth (Figure 2B).

In peripheral blood a transient peak in gelatinase band intensities was detected after DC (Figures 1C and 3). No clear bands appeared with EDTA incubation.

Figure 1. Patient 1. **A:** CT scan after catheter implantation (black arrow in infarct and white arrow in the periinfarct brain) and zymograms from microdialysis. **B:** Temporal profile of MMP-9 (dots) and MMP-2 (crosses) shows over-expression of MMP-9 in the infarct core. **C:** zymograms showing synchrony between MMP-9 levels in the microdialysate and peripheral blood.

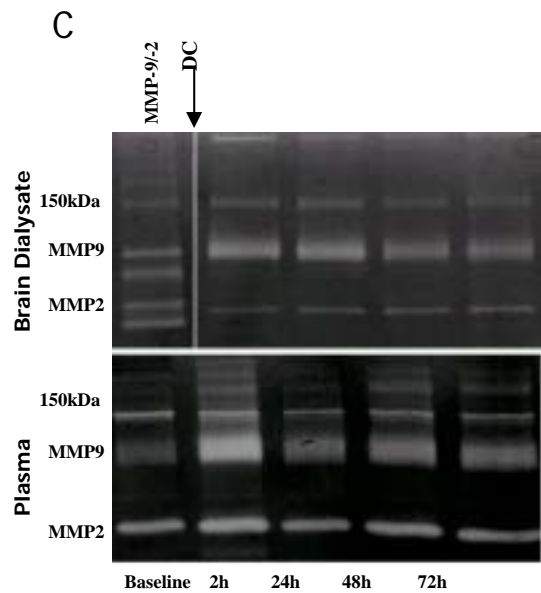
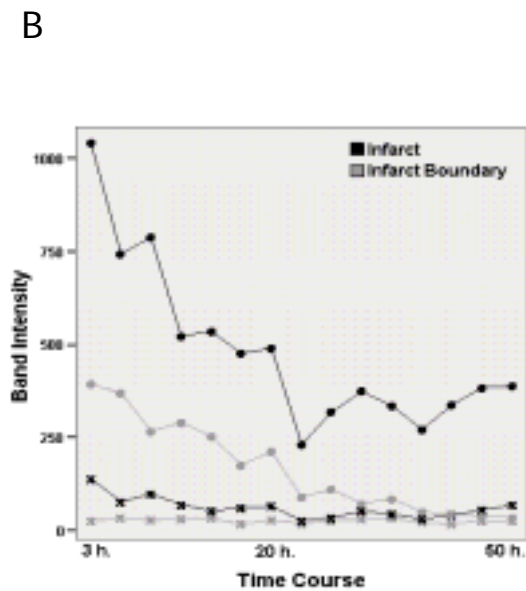
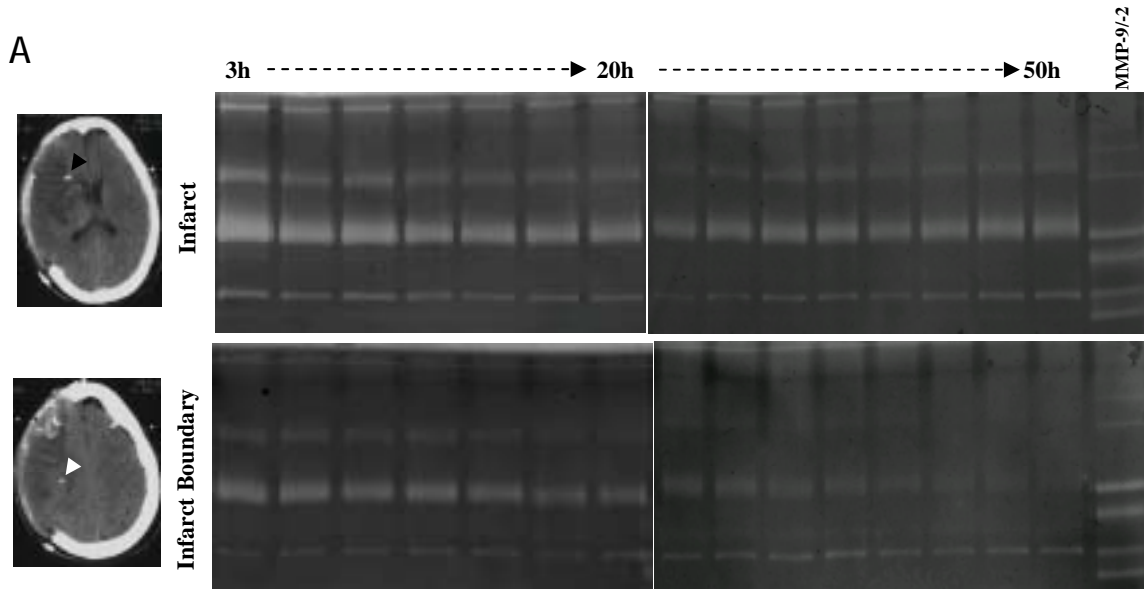


Figure 2. Patient 2. **A:** Maximal MMP-9 intensities and active bands in infarct core are down-regulated along time following hypothermia. **B:** Time course of gelatinase levels related to a growth of infarct size assessed by CT scan in the ischemic boundary during the rewarming phase.

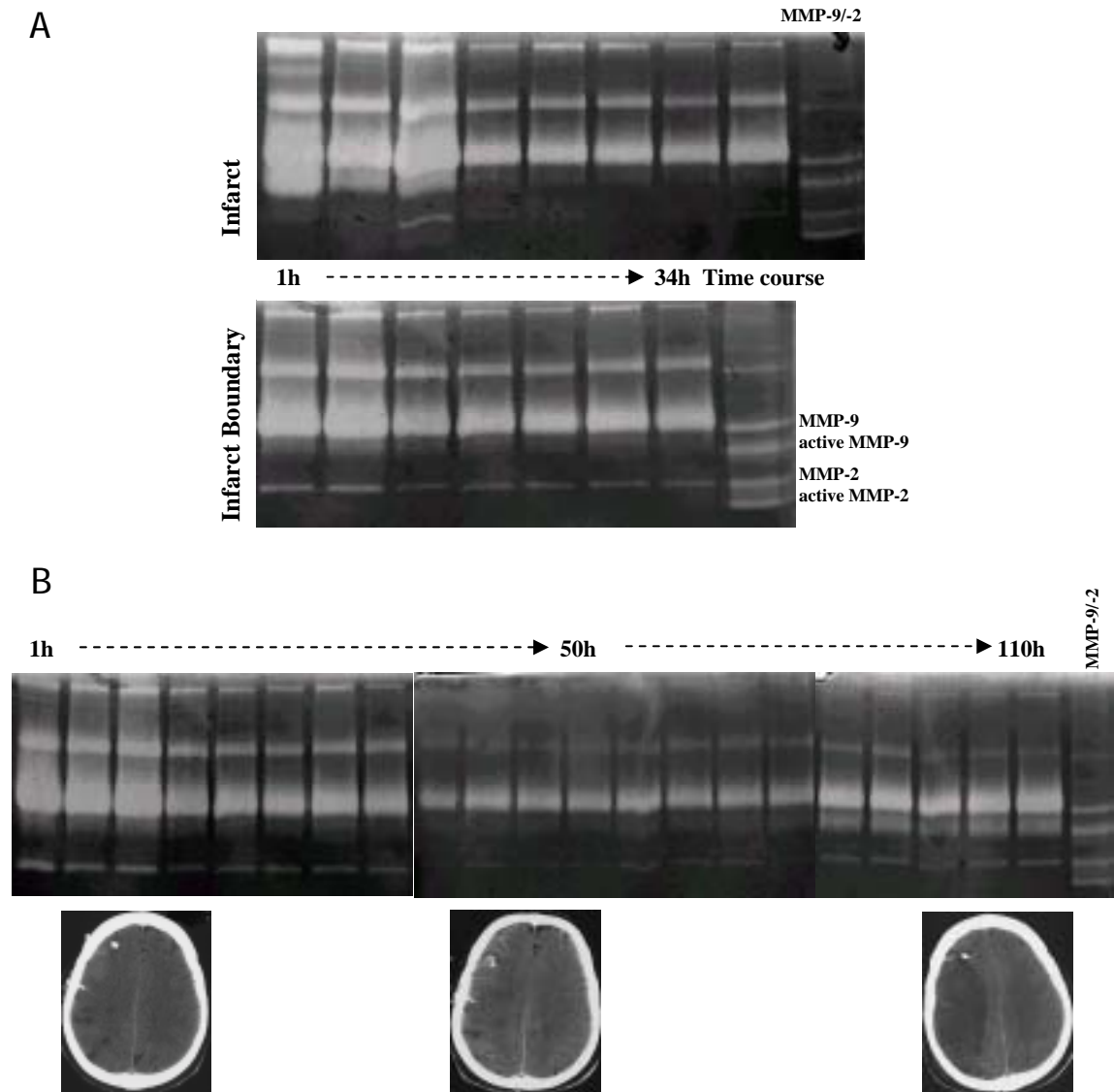
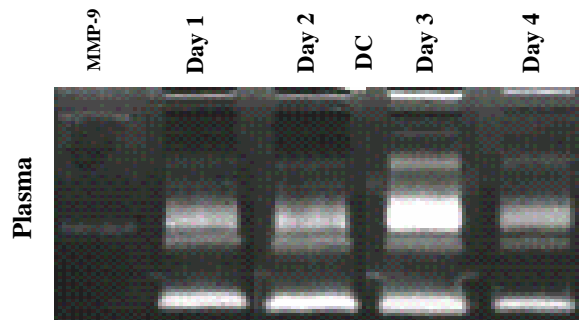


Figure 3. Zymograms from patient 3 showing increased MMP-9 levels following DC.



DISCUSSION

Our study provides new data about *in situ* MMP-9 production in the brain after malignant MCA infarcts related to peripheral blood levels.

Diffusion-weighted and perfusion-weighted imaging parameters are good predictors of malignant clinical course and *in vivo* brain microdialysis is a highly reliable method for understanding the molecular mechanisms underlying pathophysiology of brain ischemia. In fact, recent data have demonstrated increased levels of cellular metabolites such as glutamate or lactate in patients with malignant course (7). Using microdialysis, a rodent model of MCA occlusion has shown that MMP-9 increases in the infarct core (8) although, as our knowledge, gelatinases have never been studied by microdialysis in humans. Only two reports have investigated brain gelatinases after human stroke reporting increased MMP-9 levels in the infarct core (9,10).

Our results show an *in situ* production of MMP-9 in the brain to the extracellular space just one day after stroke, which continued throughout the study period and this was mirrored in MMP-9 levels in peripheral blood. Moreover, a different pattern of MMP-9 expression was detected between the infarct core and ischemic boundary. Others have reported in rodent brain parenchyma that hypothermia reduces MMP abundance (5). Our results are in agree with this finding because during hypothermic treatment, MMP-9 is down-regulated in both areas but when the lesion size increased, a peak of both gelatinases, including MMP-9 active forms, was detected coincident with the beginning of the rewarming phase. Although our data suggest a close association between tissue injury and brain MMP-9 production we cannot demonstrate that tissue damage follows MMP-9 increase.

Even if DC or catheter implantation may contribute, in part, to the increased gelatinase levels, we think that this would be a transient phenomenon affecting both areas in the same

way. Others have suggested a similar contribution when neutrophils accumulation around catheter probe was detected even in the non-ischemic group (8). This could explain in part increased MMP-9 levels around HT due to neutrophil infiltration through BBB leakage.

Although our preliminary data were obtained from a reduced number of patients, this is the first report showing an increase in brain *in vivo* gelatinase levels in human stroke providing new information about MMP-9 implication in tissue damage. This study also opens the field of evaluating new biomarkers for stroke monitoring using high-resolution microdialysis. Future investigations with a larger number of patients need to be performed to confirm these results and to gain greater insight into the role of gelatinases in post-ischemic brain injury to determine whether their temporal profile could be modulated by DC or hypothermia, thus improving outcome in stroke patients with massive brain edema.

Acknowledgements

Anna Rosell is the recipient of a pre-doctoral grant from the Institut de Recerca, Vall d'Hebron University Hospital. This study was supported in part by grants from the Spanish neurological diseases network (RED CIEN), FIS 02/773 and the Fifth European Framework of the European Commission (SMILE project, QLK1-CT-2002-02583). We are grateful to the staff of the Neurosurgery Department and the Intensive Care Unit for their help to perform this study.

REFERENCES

1. Schwab S, Schwarz S, Spranger M, Keller E, Bertram M, Hacke W. Moderate hypothermia in the treatment of patients with severe middle cerebral artery infarction. *Stroke*. 1998;29:2461-2466.
2. Schwab S, Steiner T, Aschoff A, Schwarz S, Steiner HH, Jansen O, Hacke W. Early hemicraniectomy in patients with complete

middle cerebral artery infarction. *Stroke*. 1998;29:1888-1893.

3. Montaner J, Rovira A, Molina CA, Arenillas JF, Ribo M, Chacon P, Monasterio J, Alvarez-Sabin J. Plasma level of neuroinflammatory markers predict the extent of diffusion-weighted image lesions in hyperacute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23:1403-1407.

4. Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina C, Angles A, Abilleira S, Arenillas J, Gonzalez MA, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke*. 2001;32:1759-1766.

5. Wagner S, Nagel S, Kluge B, Schwab S, Heiland S, Koziol J, Gardner H, Hacke W. Topographically graded postischemic presence of metalloproteinases is inhibited by hypothermia. *Brain Res*. 2003;984:63-75.

6. Asahi M, Asahi K, Jung JC, del Zoppo GJ, Fini ME, Lo EH. Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme

inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20:1681-1689.

7. Schneweis S, Grond M, Staub F, Brinker G, Neveling M, Dohmen C, Graf R, Heiss WD. Predictive value of neurochemical monitoring in large middle cerebral artery infarction. *Stroke*. 2001;32:1863-1867.

8. Planas AM, Justicia C, Sole S, Friguls B, Cervera A, Adell A, Chamorro A. Certain forms of matrix metalloproteinase-9 accumulate in the extracellular space after microdialysis probe implantation and middle cerebral artery occlusion/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22:918-925.

9. Clark AW, Krekoski CA, Bou SS, Chapman KR, Edwards DR. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett*. 1997;238:53-56.

10. Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miller KM, Esiri MM, Perry VH. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1997;23:406-415.

ARTICLE 3

Increased Brain Expression of Matrix Metalloproteinase-9
Following Ischemic and Hemorrhagic Human Stroke.

(Sotmès a Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2005)

Increased Brain Expression of Matrix Metalloproteinase-9 Following Ischemic and Hemorrhagic Human Stroke

Anna Rosell¹, Arantxa Ortega², José Alvarez-Sabín¹, Israel Fernandez-Cadenas¹, Marc Ribó¹, Carlos A. Molina¹, Eng H. Lo³, Joan Montaner¹.

¹ Neurovascular Research Laboratory, Neurovascular Unit. Department of Neurology of Vall d'Hebron University Hospital. Department of Internal Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

² Neuropathology Unit, Department of Pathology; Vall d'Hebron University Hospital.

³ Neuroprotection Research Laboratory, Departments of Neurology and Radiology, Massachusetts General Hospital, and Program in Neuroscience, Harvard Medical School.

Human Brain gelatinases after stroke

Abnormal expression of some matrix metalloproteinases (MMP) has shown to play a deleterious role in brain injury in experimental models of cerebral ischemia. To investigate gelatinase expression and localization in brain parenchyma, post-mortem fresh brain tissue from 3 ischemic and 5 hemorrhagic acute stroke patients was obtained within the first six hours after death. Parenchyma from different brain areas (infarct, periinfarct, perihematoma and contralateral hemisphere) was studied. To assess protein expression we performed gelatin zymograms and western blot analysis, to localize MMP source immunohistochemistry, and to measure gelatinase activity *in situ* zymography was carried out on brain sections. Among ischemic cases, gelatin zymography showed an increased MMP-9 expression in infarct core although periinfarct tissue presented also higher levels than contralateral hemisphere ($p < 0.0001$ and $p = 0.15$, respectively). Within infarct core, MMP-9 was mainly located around blood vessels, associated to neutrophil infiltration and activated microglial cells. In periinfarct areas the major source of MMP-9 were microglial cells. Tissue around intracranial hemorrhage also displayed higher MMP-9 levels than contralateral hemisphere ($p = 0.008$) in close relationship with microglial cells. A 145 kDa MMP-9/TIMP-1 heterodimer was identified both in ischemic and hemorrhagic strokes strongly correlated with MMP-9 expression ($r = 0.915$, $p < 0.0001$). MMP-2 was constitutively expressed and remained invariable in different brain areas. Our results demonstrate an early and *in situ* contribution of MMP-9 to ischemic brain injury and perihematoma edema, suggesting a potential therapeutic role of its inhibition after acute human stroke.

INTRODUCTION

Stroke is a pathological event that leads within minutes to a brain damage and cellular death as a result of an ischemic or hemorrhagic event. Ischemic stroke may also involve a hypoperfused periinfarct area called ischemic penumbra where cells are still viable although a cascade of apoptotic mechanisms has been activated (Sharp et al., 2000). Less knowledge exists regarding molecular mechanisms underlying brain hematoma formation and secondary injury after the initial bleeding stops. Since most of the stroke research has been conducted on animal models, anatomopathologic studies evaluating *in situ* ischemic and hemorrhagic molecular mechanisms in human cerebral ischemia and hemorrhage are scarce. These types of studies are relevant to show coincident results among species in order to target pathways to improve stroke therapy. This is the case of matrix metalloproteases (MMP), a family of zinc-dependant proteases involved in the degradation of basal lamina and extracellular matrix (ECM) components.

An abnormal and uncontrolled expression of some MMPs such as MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) appears after cerebral ischemia (Clark et al., 1997; Heo et al., 1999; Planas et al., 2001; Rosenberg et al., 1996) and contributes to infarct extent and blood-brain barrier (BBB) breakdown (Fujimura et al., 1999; Gasche et al., 1999; Romanic et al., 1998). Animal models of cerebral ischemia have reported that MMPs are produced within cerebral ischemic tissue by many different type cells like astrocytes, neutrophils, neurons,

microglia and endothelial cells, and that there is differentially time dependent expression of these two gelatinases (Justicia et al., 2003; Magnoni et al., 2004; Planas et al., 2002; Rivera et al., 2002).

Regarding humans, investigations with peripheral blood samples have shown high

MMP-9 levels among patients with ischemic stroke (Montaner et al., 2001) and intracranial hemorrhage (Abilleira et al., 2003). Moreover and more importantly, MMP-9 levels are related to poor neurological outcome, suggesting a role in human brain injury (Montaner et al., 2001).

The only two reports that have studied gelatinases in human brain after stroke (Anthony et al., 1997; Clark et al., 1997) included several days old strokes uncovering the hyperacute phase. Those interesting reports showed gelatinases over-expression but did not distinguish among different areas within the infarction (core and penumbra). Moreover, gelatinases have never been studied in human brain tissue after hemorrhagic stroke.

Therefore, the following study attempts to contribute to further understanding of the role of gelatinases and better characterization of their expression in the different areas of injured tissue in the acute phase of stroke. With this purpose we have studied both MMP-2 and MMP-9 by means of gelatin zymography and immunoblotting and to localize gelatinase expression both *in situ* zymography and immunohistochemistry studies were performed.

MATERIALS AND METHODS

Brain tissue samples

Eight patients who had had a stroke within the previous 4 days were included in the study, five of them were hemorrhagic and three ischemic. On autopsy and during macroscopic exam, last available neuroimages were used to guide in brain tissue obtention from ischemic ipsilateral hemisphere (infarct, periinfarct) or from contralateral hemisphere. In hemorrhagic strokes blood mass was removed and adjacent parenchyma was obtained as perihematoma together with contralateral tissue. Sampling was done within the first six hours after death to avoid tissue degradation. All cases and tissue samples collected are summarized in table 1. Brain tissue samples from two patients that died due to another non-inflammatory pathology were

also used as a control. All brain parenchyma was snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. This study was approved by the Ethics Committee of the hospital and informed consent was acquired from all relatives prior to the autopsy.

All frozen samples were homogenated for gelatin zymography and western blot as follows. Each brain tissue (0.2 gr) was mixed with 0.7ml of cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl_2 , 0.05% Brij-35, 0.02% NaN_3 and 1% Triton X-100) containing protease inhibitors (1 mM PMSF and 7 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin) and centrifuged at 12,000g for 10 minutes. Total protein determinations were determined by BCA assay (Pierce, USA).

Hematoxylin-Eosin staining was used to identify morphologically ischemic neuronal damage on 12 μm cryosections.

Gelatin Zymography

Substrate-specific zymography for determination of gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9 was performed. Samples were adjusted to equal protein content (10 μg) and were mixed 1:1 with loading buffer [80 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromphenol blue]. Proteins were separated by electrophoresis in a SDS-PAGE gels (10%) containing 0.1% gelatin at 100 V constant current at room temperature. Prestained molecular weight standard (Bio-Rad, USA) and MMP-9 (Oncogene; USA) or gelatinase recombinant proteins (Chemicon, USA) were also run with samples. Following electrophoresis, gels were washed to remove SDS with 2.5% Triton X-100 for 1 hour and incubated 18 hours at 37°C with incubation buffer containing [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM CaCl_2 , 0.02% NaN_3]. Enzymatic bands were visualized after staining for 1 hour with amido black 0.1% and destained for 20 minutes with a solution of 30% (v/v) methanol and 10% (v/v) glacial acetic acid. Enzymatic activities were ensured by incubating identical zymograms in incubation buffer with the addition of 20 mM

EDTA, a MMP inhibitor. No clear bands appeared in these zymograms (not shown).

To measure the gelatinase activities, gels were read using an Epson GT 9600 scanner and the intensity of the bands was expressed as arbitrary units using Quantity One analysis software (Bio-Rad, USA).

Immunoblotting

To verify zymograms findings, MMP-9 expression was detected by western blot. Briefly, equal amounts of total protein (20 μg) were loaded with SDS-PAGE (10%) under non-reducing conditions at 100v previously heated in loading laemmli buffer. Separated proteins were transferred to a PVDF membrane in blotting buffer (20% methanol, 192 mM glycine, 25 mM Tris) using a Transblot Cell (Bio-Rad, USA) during one hour at 100v. Non-specific bindings were blocked one hour before membranes were incubated for two hours at room temperature with mouse anti-human antibody MMP-9 (Chemicon, USA) at 1:300 and TIMP-1 (R&D Systems, USA) at 8 $\mu\text{g/ml}$ in TTBS. Secondary biotininated antibody (Calbiochem; USA) was diluted 1:1000 and incubated overnight at 4°C and last incubation with Streptavidin-HRP (1:1000) was done at room temperature for one hour. Before and after membrane incubations 3 washes (10 min each) in TTBS were done. The substrate reaction was developed with chemiluminescent reagent ECL PLUS (Amersham, UK) and visualized with a luminescent image analyzer (Las-3000, FujiFilm; USA). Detection of human actin (Sigma, Germany) was also done to verify that equal amounts of total protein were loaded for each sample (not shown).

Immunohistochemistry

Frozen tissues were carefully embedded in OCT on a cryostat holder and 12 μm sections were placed on pre-coated poly-lysine slides and stored at -80°C until immunohistochemistry was performed.

Sections were air-dried for 20 minutes, fixed by immersing in cold acetone for 15 minutes and re-hydrated with TBS for 5 minutes. Normal goat serum was applied 1:10 and incubated at RT for 30 minutes. Incubation with primary antibody, mouse anti-human MMP-9 1:50 (Chemicon, USA) was carried out for two hours. Secondary antibody (goat anti-mouse biotin conjugate, 1:500) was applied during one hour at room temperature. Afterwards, endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H₂O₂ in TBS for 30 minutes and subsequent incubation with streptavidin-HRP diluted 1:1000 for 1 hour. Immunoreactive sites were developed with DAB solution applied on sections for 15 minutes. Finally, sections were counterstained with Mayer's Hematoxylin, dehydrated in ethanol and mounted in DPX. As negative controls, primary antibody omission was performed in some cryosections to detect non-specific immunoreactivity.

***In situ* Zymography**

In situ zymography was carried out to detect and localize enzyme activity on brain tissue but does not distinguish between MMP-9 and MMP-2. Sections (12 µm) were cut on a cryostat and incubated at room temperature overnight protected from light in 0.05 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 5 mM CaCl₂, and 0.2 mM NaN₃ at pH 7.6, containing 20µg/ml of FITC-labeled gelatin (Molecular Probes, USA). Several sections were incubated with a metalloproteinase inhibitor (10mM 1-10-phenanthroline) as controls of gelatinase activity and negative controls including omission of DQ-gelatin were also performed. All sections were coverslipped with VECTASHIELD® (Vector laboratories, USA) mounting media with DAPI to preserve fluorescence and counterstain DNA. The gelatin with a fluorescent tag remains caged (no fluorescence) until the gelatin is cleaved by gelatinase activity from brain and reaction products were examined with fluorescence microscope (ZEISS, Germany).

Statistical Analyses

Statistical analyses was performed by use of the SPSS 12.0 package. Statistical significance for intergroup was assessed by Student's t-test or ANOVA followed by Bonferroni tests for intergroup comparisons. The Spearman coefficient was used to study correlations between continuous variables. P<0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Histopathological findings

Microscopic appearance of the ischemic infarcts showed clear evidence of acute ischemic damage. In gray matter shrunken cell bodies, neuronal eosinophilia, pyknosis and nucleoli were lost and these findings were associated with widespread vacuolation of the adjacent neuropil. In some areas cellularity was sparse, necrotic neurons appeared as eosinophilic ghost cells and neutrophilic infiltration began specially in those infarcts with an ante-mortem interval of 2-4 days together with early microglial activation. In subcortical white matter, degenerating oligodendrocytes appearance was the most important finding. Perinfarct zones and brain parenchyma around hematomas did not show any significant morphological change.

Gelatinase expression

Zymograms from tissue homogenates showed a great variability on MMP-9 intensity levels, whereas no alteration on MMP-2 was detected. A third gelatinase band around 145 kDa appeared strongly related with MMP-9 variations in all samples.

Among samples from ischemic strokes, MMP-9 was found highly expressed in infarcted tissue as compared with the periinfarct (p=0.009) and contralateral hemisphere (p<0.0001). Moreover, periinfarct samples tended to show higher MMP-9 level than contralateral hemispheres (p=0.15) (Figure 1A-B). Also a diffuse 75kDa band suggestive of a cleaved or active MMP-9 form appeared in infarcted samples (Figure 1A).

On hemorrhagic strokes, increased levels of MMP-9 were found in perihematoma tissue as compared with the contralateral hemisphere ($p=0.008$) as shown in figure 1C-D.

No differences were found between MMP-2 levels neither in ischemic stroke nor in hemorrhagic cases (Figure 1B-D).

The correlation study between MMP-9 and the 145 kDa band demonstrated a strong relation between these two gelatinase forms ($r=0.915$, $p<0.0001$) (figure 2A). Western blot was carried out to confirm MMP-9 expression in brain homogenates and to identify the 145 kDa band. Our findings confirmed MMP-9 patterns previously identified in zymograms. Moreover, the 145kDa band was positive for MMP-9 (Figure 1A).

Immunoblotting for TIMP-1 was also positive for the upper band over 145 kDa (Figure 2B) while no 29kDa free form was detected. When immunoblotting was performed under reducing conditions (adding β -mercaptoethanol to loading buffer) the upper band disappeared and a new intense band over 29kDa was detected for TIMP-1 (Figure 2B). Altogether these results confirmed that we were in front of an MMP-9/TIMP-1 heterodimer.

MMP-9 tissue localization

Immunohistochemistry performed to localize MMP-9 expression detected on gelatin zymogram, showed different expression patterns depending on the studied region (Figure 3).

In samples from infarcted cores, MMP-9 was mainly located around blood vessels (endothelial cell/peri-endothelial layer) together with the presence of perivascular immunoreactive neutrophils. A reduced cellular localization was found within the necrotic parenchyma probably due to the presence of disintegrated cell bodies and sparse cellularity. In that area, major MMP-9 positive cells were activated microglia. Moreover, a scattered signal was detected within the extracellular space as a granular pattern. On periinfarct samples, MMP-9 immunoreactivity was predominantly located in several parenchymal cell types such as activated microglial cells and neutrophils while the abundance and intensity of positive vascular structures decreased in comparison to the infarcted tissue.

Table 1. Studied patients and case material. Note: PH (perihematoma), C (contralateral), IC (infarcted core) and PI (periinfarct).

CASE	Age/Sex	Stroke subtype	Time (hours) stroke-exitus	Time (hours) exitus-autopsy	Tissue Samples
Nº 1	77 / male	Hemorrhagic	16	5	PH/C
Nº 2	91 / female	Ischemic	66	6	IC/PI/C
Nº 3	59 / male	Ischemic	16	2	IC/PI/C
Nº4	74 / male	Hemorrhagic	2	6	PH/C
Nº5	60 / male	Ischemic	98	4	IC/PI/C
Nº6	88 / male	Hemorrhagic	17	3	PH/C
Nº7	74 / female	Hemorrhagic	15	6	PH/C
Nº8	84 / male	Hemorrhagic	9	5	PH/C

Figure 1. A: Zymography from brain homogenates corresponding to a representative ischemic case; Western Blot for MMP-9 confirmed increased signal in infarct cores and weakly in periinfarct samples. **C:** Representative hemorrhagic case. PH (perihematoma), C (contralateral), IC (infarcted core), PI (periinfarct) and C2 (control case 2). **B** and **D:** Quantitative increases of MMP-9 and MMP-2 on band intensities in ischemic and hemorrhagic strokes. Control cases level is also shown. * $p < 0.05$, ** $p < 0.15$.

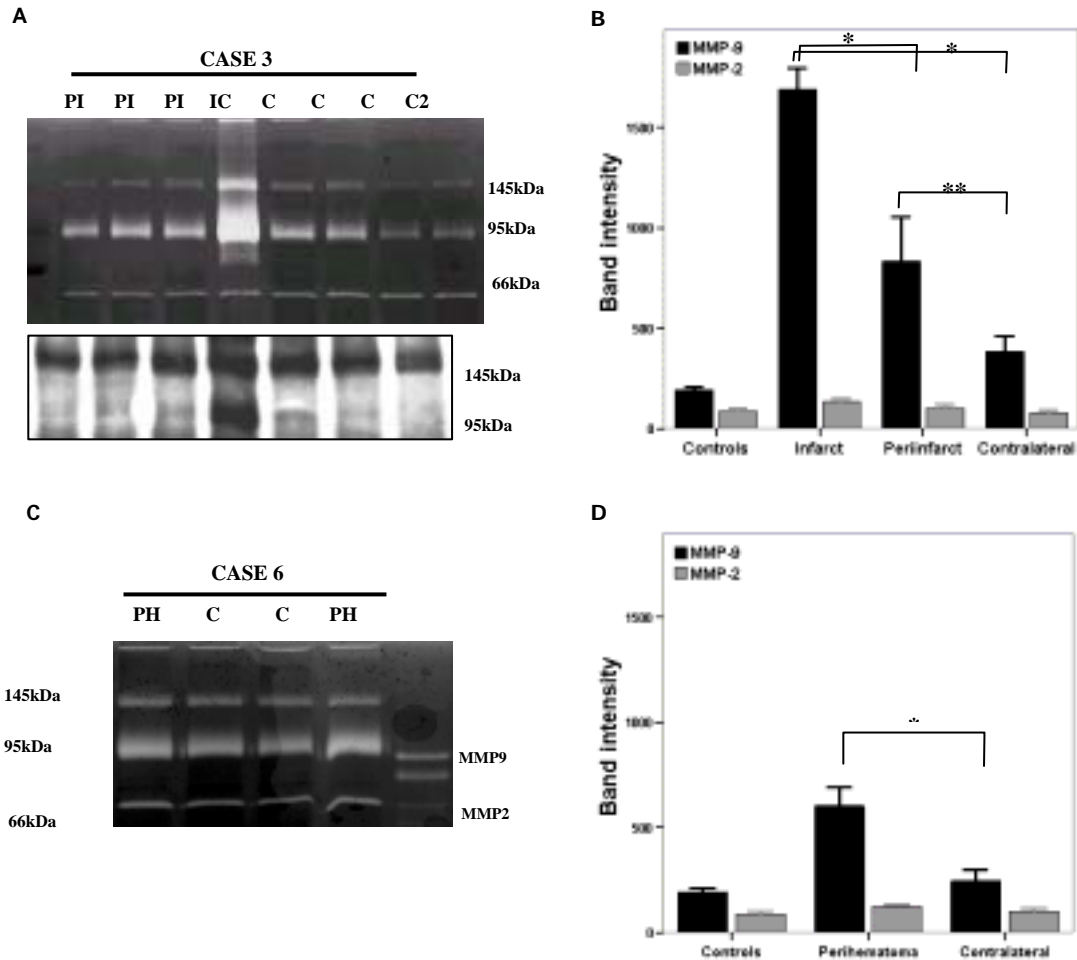
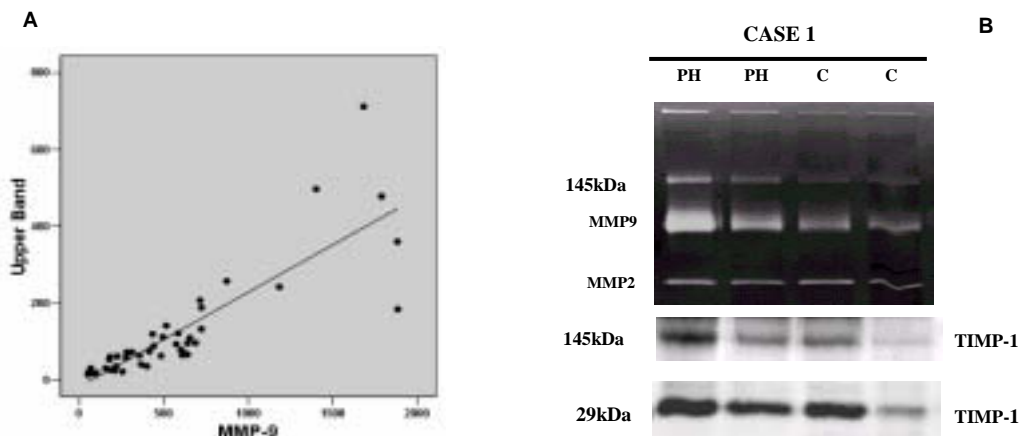


Figure 2. Immunoblotting also revealed that the 145 kDa gelatinase band is a MMP-9 heterodimer also recognized by TIMP-1 antibody. This complex disappears under reducing conditions leading a new band over 29 kDa (free TIMP-1) (A). A strong correlation was found ($r=0.915$, $p < 0.0001$) between MMP-9 and 145 kDa bands (B). PH (perihematoma) and C (contralateral).



In all ischemic samples isolated neuronal MMP-9 reactivity was detected together with some immunoreactive macrophages. No MMP-9 positive vessels were detected both in contralateral and control samples, moreover a diminished cellular immunoreactivity appeared in those locations.

On hemorrhagic stroke sections, perihematoma tissue presented intense MMP-9 immunoreactivity from microglial cells and also a diffuse extracellular staining. Negative controls including omission of primary antibody did not present positive signal.

***In situ* gelatinase activity**

In situ zymography showed abundant gelatinase activity (green fluorescence) around blood vessels (Figure 5A-B), at cellular level and a diffuse extracellular signal in infarcted and periinfarct tissue. A weak signal was detected both in contralateral and control tissue where only a minimal cellular fluorescence remained (Figure 4c-e-f-i). The most marked increase of intensity in cells appeared within infarcted tissue as shown in Figure 4a.

In hemorrhagic strokes perihematoma sections presented again increased fluorescence signal as compared with their contralateral sections or control samples (Figure 4d-e-f).

Samples counterstained with DAPI (blue signal) revealed the presence of DNA and the abundance of cell bodies (Figure 4h-j) and gelatinase activity from cellular bodies could be identified where a merge signal between green fluorescence and blue fluorescence appeared. Incubation with an MMP inhibitor such as 1-10-phenanthroline largely abolished fluorescence signal, confirming that the most gelatinase activity was due to MMPs (Figure 5 B).

DISCUSSION

This study demonstrates an immediate *in situ* brain expression and activity of MMP-9 after human stroke. This over-expression is differentially induced in a cell- and region-

dependent manner and in close relation to brain injury. Contrary, MMP-2 remains invariable within the first four days after stroke.

Animal models of cerebral ischemia have previously demonstrated that MMP-9 is immediately up-regulated in injured tissue suggesting a detrimental role and its involvement in BBB breakdown, neuronal death and brain damage (Fujimura et al., 1999; Heo et al., 1999). A second wave of expression of MMP-2 has been reported from the fourth day after ischemia by infiltrating inflammatory cells such as microglia and macrophages (Planas et al., 2001). Similarly, immediate increases of MMP-9 followed by MMP-2 up-regulation in postmortem human brain tissue have been reported from 2 days to several years after stroke (Clark et al., 1997).

Our results are in accordance with these findings since gelatin zymograms show high MMP-9 levels in infarcted and in perihematoma areas and MMP-2 levels remained invariable both in ischemic and hemorrhagic strokes less than 4 days old. MMP-9 positive endothelial cells and also peripheral neutrophils crossing the vessel wall. Degradation of the vascular basal lamina allows the blood vessels to become permissive to neutrophil extravasation into the brain tissue. In addition, as neutrophils migrate from the circulation into the tissue, it has been reported that they employ MMP-9 for their invasion (Weiss et al., 1986).

Since disruption of the basal lamina has been postulated to be the primary cause of microvascular hemorrhage after an ischemic event and several components of basal lamina are gelatinase B substrates, such as laminin, fibronectin or collagen IV, a very close relationship between BBB leakage and MMP-9 expression exists in cerebral ischemia as shown before in animal models (Gasche et al., 1999; Fujimura et al., 1999).

New MRI techniques such as Diffusion-Weighted Image (DWI) lead us a topographic assessment of tissue injury by which others have

Figure 3. MMP-9 immunohistochemistry in ischemic hemisphere (**a-f**), contralateral hemisphere (**g, h**) and control brain (**i**). Brown immunoreactivity in infarcted tissue (**a** and **b**) surrounding the endothelial/periendothelial layer associated to neutrophils infiltration (arrowheads in **b** and **c**). Detail of a capilar vessel (**c**) displaying endothelial immunoreactivity (thin arrow) and neutrophil infiltration from peripheral blood containing MMP-9. MMP-9 cytoplasmatic stains (arrows) in neurons (**d**), activated microglial cells (**e**), and reactive macrophages (**f**). Sparse cellular immunoreactivity was detected in contralateral samples (**g**) while blood vessels (**v**) remained unreactive for MMP-9 both in contralateral hemisphere (**h**) and control brain (**i**).

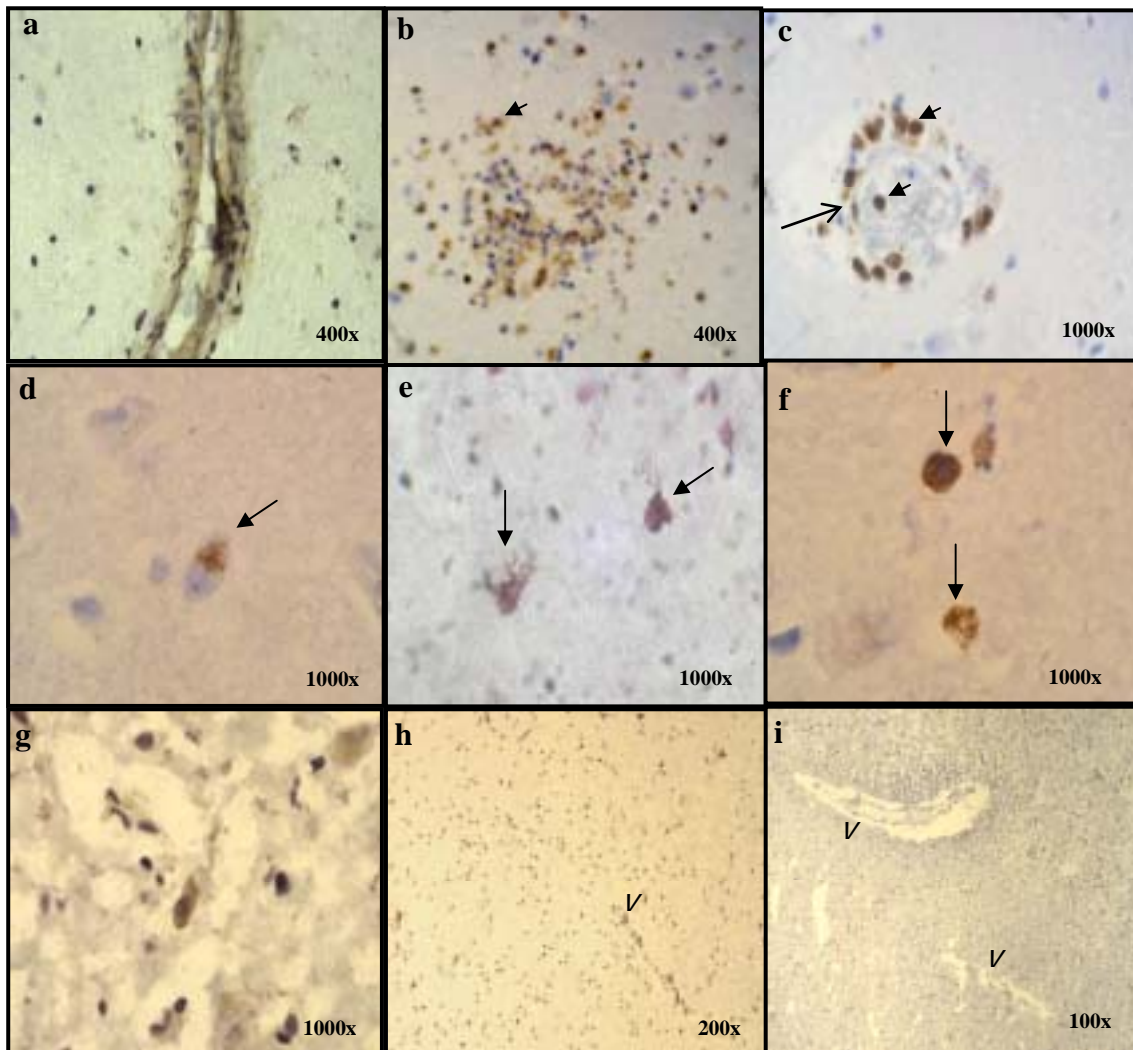


Figure 4. In situ Zymographies. **a-c** Representative zymograms from an ischemic stroke (**a**: infarct; **b**: periinfarct; **c**: ischemic contralateral); **d** and **e**: representative zymograms from a hemorrhagic stroke (**d**: perihematoma and **e**: hemorrhagic contralateral); **f**: control. Magnification 100x. **g** to **j**: Higher magnifications (400x) from a representative ischemic case showing gelatinase activity sourcing from cell bodies counterstained with DAPI in blue (**g-h**: infarct and **i-j**: contralateral).

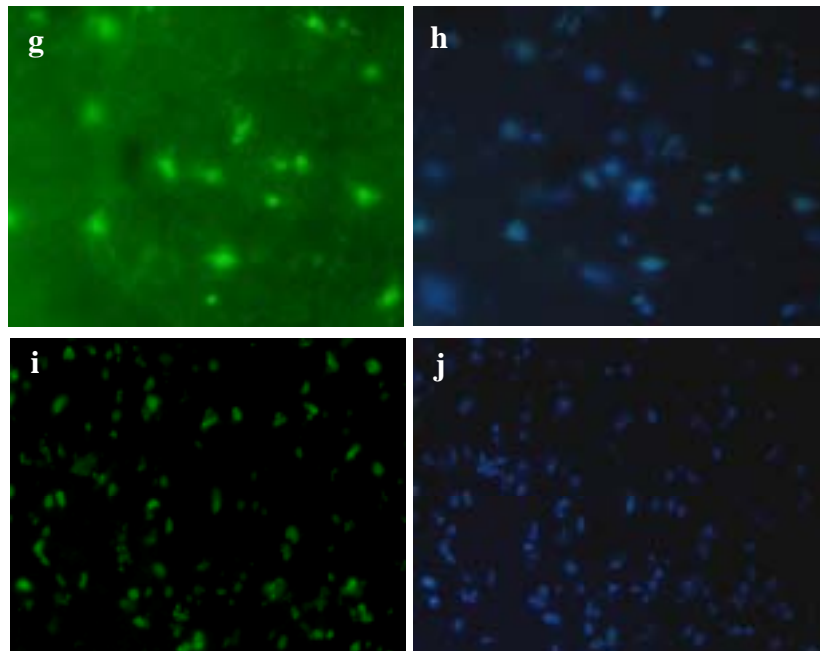
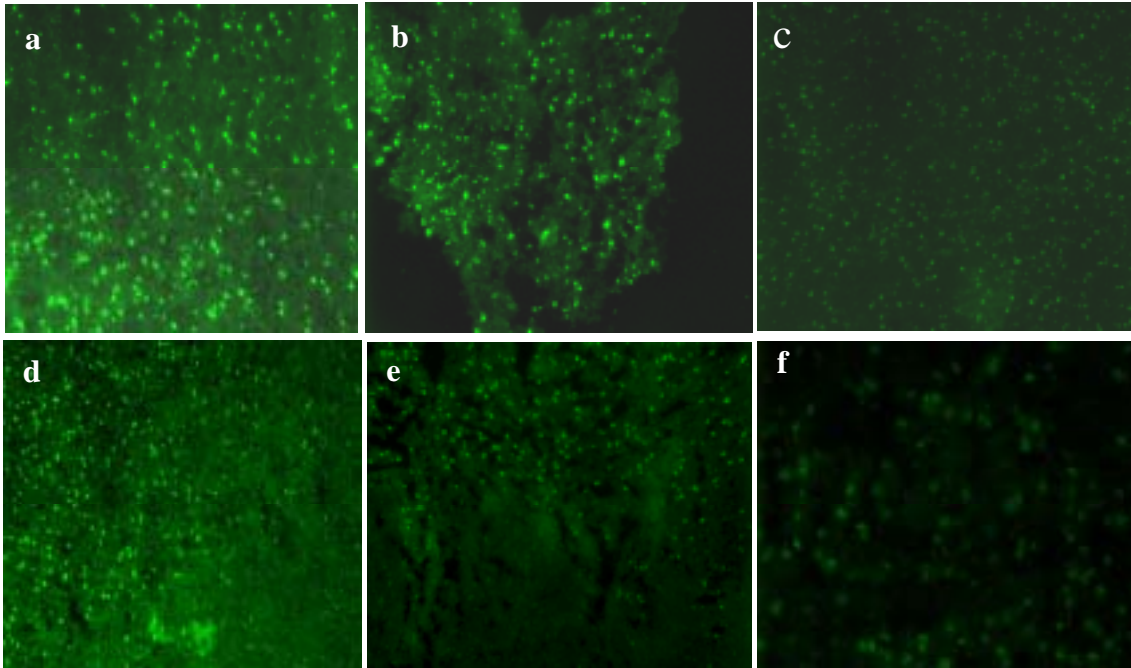
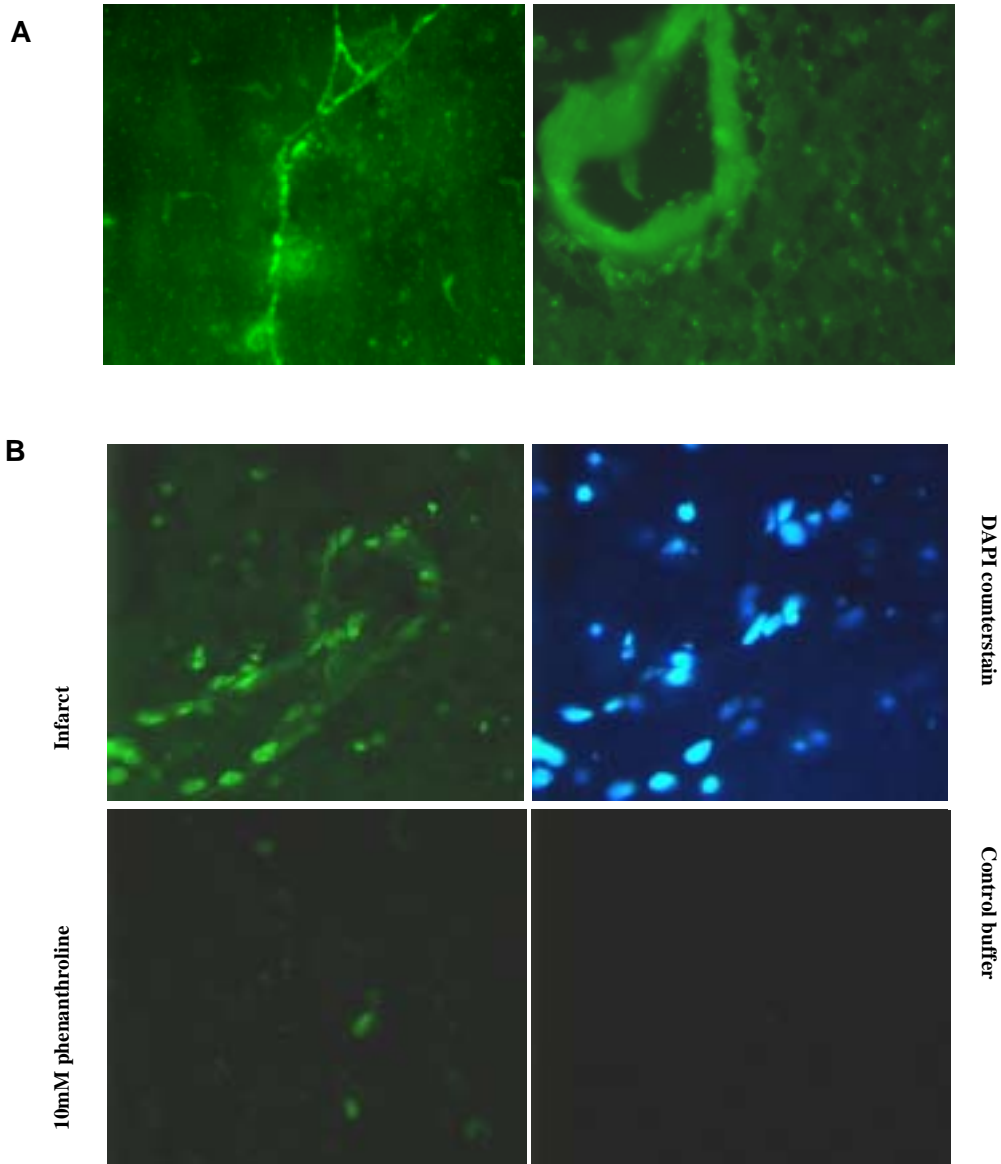


Figure 5. A: In situ zymography details from blood vessels in ischemic tissue. **B:** Case 3 showing inhibitor's effect on a criosection containing a blood vessel (magnification 400x).



demonstrated that exists a different pattern of molecular mechanisms in infarcted core than in periinfarct tissue (Wagner et al., 2003). Moreover, we have recently reported that baseline plasma MMP-9 level is strongly correlated to DWI measured lesion extent in stroke patients suggesting its ultra-early role as a predictor of brain damage (Montaner et al., 2003). Although in our study periinfarct areas

could not be definitively associated with ischemic penumbra because neuroimages were obtained several hours before patient's death, we have identified distinctive biochemical signatures of those areas. Taking together both histopathological findings and MMP-9 expression assessed by gelatin zymography and western blot, we were able to describe surrounding areas around infarcted tissue where

necrosis has not started but MMP-9 is over-expressed both in cells and to a lesser extent around capillar blood vessels. These findings show an MMP-9 expression previous to a possible cell death within ischemic parenchyma, supporting its participation on tissue injury that could lead into an increase on infarct extent and induce ongoing brain injury. This fact reinforces the possible therapeutic role of inhibiting this protease as an attempt to protect surrounding salvageable ischemic tissue. Besides this, MMP-9 inhibition might interfere with BBB leakage, and therefore it could improve current thrombolytic therapy in ischemic stroke patients overcoming the risk of hemorrhagic transformations.

Regarding hemorrhagic strokes, this is the first report describing perihematoma gelatinase brain content. We found that in this injured area MMP-9 was over-expressed and may contribute to both hematoma extent and brain edema following the initial hemorrhagic event. This deleterious effect of MMP-9 would take place in the secondary injury after initial bleeding and would be integrated in a complex cascade involving inflammatory processes. In fact, a collagenase-induced intracranial hemorrhage model has demonstrated up-regulation and close implication of other MMPs such as MMP-12 in inflammatory mechanisms surrounding parenchyma hematomas (Power et al., 2003). Complementary to gelatin zymograms and immunohistochemistry detection, *in situ* zymography reveal a great source of gelatinase activity on brain cells and blood vessels together with an extracellular activity both in infarcted and periinfarct samples. Immunohistochemistry failed to detect the same amount of cellular MMP-9 in parenchymal cells such as neurons maybe due to different sensitivities of *in situ* zymography versus immunohistochemistry. Similar differences between these two techniques have been shown previously for hippocampal remodeling after kainate lesions (Szkłarczyk et

al., 2002). On gelatin zymograms a MMP-9 activity band was observed only in infarcted samples while *in situ* zymography showed activity in other areas. This discrepancy previously reported by other authors in animal models (Gasche et al., 2001) could be explained by other non-proteolytic cleavage mechanisms of pro-MMP activation. Among those, MMP activation mechanisms related to oxidative stress such as peroxynitrite-dependent pro-MMP activation (Okamoto et al., 2001) have to be seriously considered in future research. Another fact that could explain this issue is that other metalloproteinases such as MMP-1, MMP-3, MMP-7 or MMP-13 could also digest gelatin substrates (Sang and Douglas, 1996) contributing to gelatinase activity detected in our samples. In fact, the MMP inhibitor 1-10-phenanthroline could not completely abolish *in situ* activity.

Interestingly, a strong correlation was found between MMP-9 and another band over 145 kDa identified by immunoblotting as a heterodimer between MMP-9 and TIMP-1. Although this complex is known to be present in nervous system (Crocker et al., 2004) and other authors have demonstrated its potential role inhibiting excitotoxic cell death in neurons (Tan et al., 2003) it has never been well characterized in brain parenchyma. Mono- and bi-dimensional electrophoresis studies on tumor extract have reported a great variability of this complexes participating in enzyme activity (Pucci-Minafra et al., 2001). This finding suggests an endogen response as an attempt to block MMP-9 over-expression within the neuroinflammatory process. The source and kinetic of this complex in brain tissue is still unknown and needs further investigation.

A low expression of both gelatinases was found in contralateral samples and in control tissue. We think that this finding could be in part due to the effect of global cerebral ischemia that may occur within the first hours after death until the

tissue is removed and stored, leading to a minimal MMP-9 expression as others have described (Lee et al., 2004).

Although the small sample size of our study is a limitation, we want to emphasize on the very short time permitted in the study to obtain brain parenchyma (within the first six hours after death) and on the short time passed from stroke to death offering powerful information about hyperacute human stroke in a time-period that has never been studied before. At the same time better definition of the cell populations of the MMP-9 immunopositive cells identified in brain samples remains to be elucidated in a future study, it is very likely that double immunostaining of MMP-9 and cell markers would be useful to clarify this issue. A final limitation is the lack of information about the arterial permeability at death moment. This fact might influence the results, since some model of ischemia-reperfusion have identified higher level of MMP-9 in the cortex several hours after reperfusion (Fujimura et al. 1999).

In conclusion our investigation reveals for the first time in human acute stroke, a real *in situ* MMP-9 over-expression in infarcted parenchyma mainly located around blood vessels and around injured area, both in ischemic and hemorrhagic strokes. These results confirm MMP-9 as a therapeutical target to reduce brain cell death and protect surrounding tissue damage in an attempt to improve neurological outcome after stroke.

Acknowledgements

Anna Rosell is the recipient of a pre-doctoral grant from the Institut de Recerca, Hospital Vall d'Hebron. We are grateful to Manolo Quintana for statistical advice and to all neurologists and residents from the Neurovascular Unit and technical staff from the Neuropathology department who helped in performing this study. This study was supported in part by the Spanish

neurological diseases network (RED CIEN) and by FIS 02/773.

REFERENCES

- Abilleira S, Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Castillo J, Alvarez-Sabin J (2003) Matrix metalloproteinase-9 concentration after spontaneous intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg* 99:65-70.
- Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miller KM, Esiri MM, Perry VH (1997) Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23:406-415.
- Clark AW, Krekoski CA, Bou SS, Chapman KR, Edwards DR (1997) Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett* 238:53-56.
- Crocker SJ, Pagenstecher A, Campbell IL (2004) The TIMPs tango with MMPs and more in the central nervous system. *J Neurosci Res* 75:1-11.
- Fujimura M, Gasche Y, Morita-Fujimura Y, Massengale J, Kawase M, Chan PH (1999) Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res* 842:92-100.
- Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin JC, Kawase M, Massengale J, Chan PH (1999) Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:1020-1028.
- Gasche Y, Copin JC, Sugawara T, Fujimura M, Chan PH (2001) Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *Cereb Blood Flow Metab* 21:1393-1400.
- Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ (1999) Matrix metalloproteinases increase very early during

experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:624-633.

Justicia C, Panes J, Sole S, Cervera A, Deulofeu R, Chamorro A, Planas AM (2003) Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1430-1440.

Lee SR, Tsuji K, Lee SR, Lo EH (2004) Role of matrix metalloproteinases in delayed neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *J Neurosci* 24:671-678.

Magnoni S, Baker A, George SJ, Duncan WC, Kerr LE, McCulloch J, Horsburgh K (2004) Differential alterations in the expression and activity of matrix metalloproteinases 2 and 9 after transient cerebral ischemia in mice. *Neurobiol Dis* 17:188-197.

Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina C, Angles A, Abilleira S, Arenillas J, Gonzalez MA, Monasterio J (2001) Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* 32:1759-1766.

Montaner J, Rovira A, Molina CA, Arenillas JF, Ribo M, Chacon P, Monasterio J, Alvarez-Sabin J (2003) Plasmatic level of neuroinflammatory markers predict the extent of diffusion-weighted image lesions in hyperacute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1403-1407.

Okamoto T, Akaike T, Sawa T, Miyamoto Y, van der Vliet A, Maeda H (2001) Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathion via disulfide S-oxide formation. *J Biol Chem* 276:29596-29602.

Planas AM, Justicia C, Sole S, Friguls B, Cervera A, Adell A, Chamorro A (2002) Certain forms of matrix metalloproteinase-9 accumulate in the extracellular space after microdialysis probe implantation and middle cerebral artery occlusion/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:918-925.

Planas AM, Sole S, Justicia C (2001) Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 8:834-846.

Pucci-Minafra I, Minafra S, La Rocca G, Barranca M, Fontana S, Alaimo G, Okada Y (2001) Zymographic analysis of circulating and tissue forms of colon carcinoma gelatinase A (MMP-2) and B (MMP-9) separated by mono- and two-dimensional electrophoresis. *Matrix Biol* 20:419-427.

Power C, Henry S, Del Bigio MR, Larsen PH, Corbett D, Imai Y, Yong VW, Peeling J (2003) Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases. *Ann Neurol* 53:731-742.

Rivera S, Ogier C, Jourquin J, Timsit S, Szklarczyk AW, Miller K, Gearing AJ, Kaczmarek L, Khrestchatsky M (2002) Gelatinase B and TIMP-1 are regulated in a cell- and time-dependent manner in association with neuronal death and glial reactivity after global forebrain ischemia. *Eur J Neurosci* 15:19-32.

Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC (1998) Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 29:1020-1030.

Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G (1996) Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:360-366.

Sang QA, Douglas AD (1996) Computational sequence analysis of matrix metalloproteinases. *J Protein Chem* 15:137-160.

Sharp FR, Lu A, Tang Y, Millhorn DE (2000) Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1011-1032.

Szklarczyk A, Lapinska J, Rylski M, McKay RD, Kaczmarek L (2002) Matrix metalloproteinase-9 undergoes expression and

activation during dendritic remodeling in adult hippocampus. *J Neurosci* 22:920-930

Tan HK, Heywood D, Ralph GS, Bienemann A, Baker AH, Uney JB (2003) Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 inhibits excitotoxic cell death in neurons. *Mol Cell Neurosci* 22:98-106.

Wagner S, Nagel S, Kluge B, Schwab S, Heiland S, Koziol J, Gardner H, Hacke W (2003) Topographically graded postischemic presence of metalloproteinases is inhibited by hypothermia. *Brain Res* 984:63-75.

Weiss SJ, Peppin GJ (1986) Collagenolytic metalloenzymes of the human neutrophil. Characteristics, regulation and potential function in vivo. *Biochem Pharmacol* 35:3189-3197.

ARTICLE 4

Implicación de la Angiogénesis en la Isquémia Cerebral Humana.

(Revista de Neurología. 2004;38:1076-1082)

Implicación de la angiogénesis en la isquemia cerebral humana

A. Rosell-Novel, J. Montaner, J. Álvarez-Sabín

ANGIOGENESIS IN HUMAN CEREBRAL ISCHEMIA

Summary. Objective. We aimed to review current knowledge about angiogenesis processes following stroke and possible benefit of future therapeutic angiogenic-related treatments. Development. Angiogenesis is a physiopathologic process where new vessels arise from pre-existing ones within different phases: sprouting and maturation. To modulate angiogenesis there is a balance between several promoters like VEGF, bFGF, MMPs, etc. but also with inhibitors or angiostatic molecules such as angiostatin, endostatin, etc. In human pathologies angiogenesis has a dual effect: useful in wound healing, tissue remodelling or ischemic heart disease but harmful in cancer, rheumatoid arthritis or atherosclerosis plaque instability and rupture. Angiogenesis is involved in some cerebrovascular diseases. Following ischemic stroke there is an overexpression of several molecules related with this process, although its finality remains largely unknown. Conclusion. Angiogenesis is activated after stroke modifying capillary network. To obtain advantages from angiogenesis, it will be essential to achieve the temporal profile of these molecules in humans, and to investigate if its effects are different in acute or chronic stroke phases. In the future, angiogenesis modulation could take part of a combined stroke therapy. [REV NEUROL 2004; 38: 1076-82].

Key words. Angiogenesis. Capillar. Cerebral ischemia. Endothelial cell. Molecular balance. Stroke.

INTRODUCCIÓN

El ictus es un trastorno en una zona del parénquima encefálico que ocurre como consecuencia de una alteración aguda en el flujo de los vasos sanguíneos cerebrales. Esta patología constituye actualmente uno de los problemas sanitarios más importantes. Recientemente, hemos asistido al fracaso de múltiples tratamientos que parecían ser útiles en modelos de isquemia cerebral (IC) en animales, pero actualmente surgen nuevos fármacos, algunos de ellos relacionados con el bloqueo de las metaloproteasas y con los mecanismos reguladores de angiogénesis.

Sabemos que después del ictus se producen grandes cantidades de moléculas promotoras de la angiogénesis, lo que en un principio llevó a pensar que se trataba de un intento de vascularizar las zonas hipoperfundidas tras un proceso isquémico y que, por tanto, era beneficiosa. Pero, actualmente, este concepto está cambiando ya que se reconoce que también hay una expresión de moléculas inhibitorias de la angiogénesis, una infiltración de macrófagos asociada a los nuevos vasos y una alteración de la barrera hematoencefálica (BHE). Todo esto ha llevado a plantear nuevas hipótesis sobre la finalidad de la angiogénesis y sus efectos en la patología del ictus.

EL PROCESO DE LA ANGIOGÉNESIS

Para el crecimiento de cualquier tejido, sano o patológico, es absolutamente necesario que haya un aporte sanguíneo continuo a través de la amplia red vascular, que nutra a las células de elementos básicos como glucosa, oxígeno y otras moléculas necesarias para el desarrollo de sus funciones. La formación de estos vasos se da en dos procesos diferentes: la vasculogénesis y

la angiogénesis [1-3]. La vasculogénesis se produce en la fase embrionaria, a partir de las primeras células mesenquimales progenitoras (angioblastos), que se diferencian en células endoteliales encargadas de formar los primeros vasos sanguíneos. En el proceso de angiogénesis se forman nuevos capilares a partir de los ya existentes por una migración y proliferación al espacio extravascular de células endoteliales (Fig. 1). A diferencia de la vasculogénesis, la formación de nuevos vasos a partir de los ya existentes se da tanto en la fase embrionaria como durante el desarrollo y en la vida adulta [1-3].

Hay que diferenciar dos fases en el proceso con finalidades muy distintas: en la primera se empieza a formar el nuevo vaso y en la segunda éste madura y se estabiliza. En la fase inicial de activación o *sprouting* se produce una vasodilatación y un incremento de la permeabilidad vascular de los vasos preexistentes, la desestabilización de la pared del vaso, la degradación transitoria de la lámina basal que rodea a las células endoteliales y una modificación de la matriz extracelular. Al mismo tiempo, se necesita que las células endoteliales proliferen y que se acumule fibrina extravascular que dirija su migración por la nueva matriz. En la fase de maduración se proporciona estabilidad al nuevo capilar. Se detiene la migración y la proliferación, empieza a formarse la nueva lámina basal, a la vez que se reconstruye la del vaso "madre" modificado previamente y se establecen los mecanismos de adhesión celular (célula-célula y célula-matriz). Finalmente, se reclutan pericitos y células musculares lisas y se establece el flujo sanguíneo (Fig. 1).

La angiogénesis ya se conoce en un amplio abanico de condiciones fisiológicas y patológicas, lo que lleva a reconocer dos vertientes de la misma: una beneficiosa, en procesos de cicatrización de heridas, ovulación, remodelación del esqueleto o tisular, en úlceras crónicas, en isquemia miocárdica, etc. En estas situaciones, una terapia angiogénica puede favorecer la recuperación del paciente o frenar el desarrollo de la patología [3,4]; y otra perjudicial, en el crecimiento tumoral, la artritis reumatoide o la retinopatía diabética, situaciones en las que la angiogénesis permite el desarrollo de la enfermedad. En estos casos, se valoran terapias antiangiogénicas para detener la evolución de dichas patologías [1,5]. En el crecimiento de la placa de ateroma encontramos un ejemplo del doble papel que puede desempeñar

Recibido: 08.03.04. Aceptado tras revisión externa sin modificaciones: 13.04.04.

Laboratorio de Investigación Neurovascular. Unidad Neurovascular. Servicio de Neurología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona, España.

Correspondencia: Dra. Anna Rosell. Laboratorio de Investigación Neurovascular. Institut de Recerca. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Passeig Vall d'Hebron, 119-129. E-08035 Barcelona. Fax: +34 934 894 032. E-mail: arosell@hebron.net.

© 2004, REVISTA DE NEUROLOGÍA

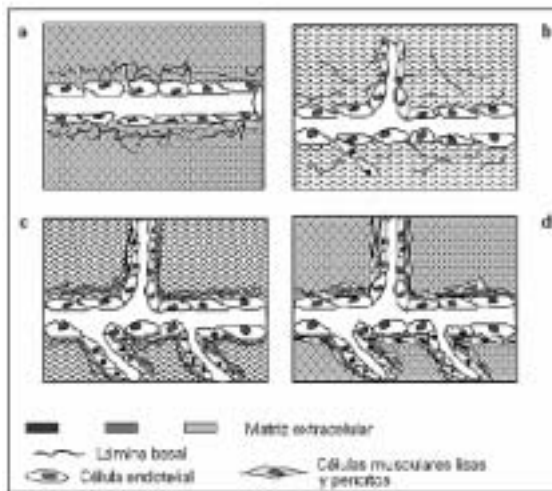


Figura 1. Fases de la angiogénesis: a y b, sprouting; c y d, maduración. a) Aumento de la permeabilidad vascular, modificación de la lámina basal y de la matriz extracelular; b) Migración y proliferación de las células endoteliales; c) Reestructuración de la lámina basal y la matriz extracelular; d) Reclutamiento de células musculares lisas y pericitos.

la angiogénesis: deletéreo en el interior de la placa, ya que la hace menos estable y puede generar émbolos que podrían ser causa de patología cerebrovascular [6,7], pero beneficioso en la formación de colaterales que actuarían en forma de puentes. Indudablemente, donde mejor se conoce la implicación de la angiogénesis es en el campo de la Oncología, ya que el crecimiento tumoral está limitado por su necesidad de vascularización. Para seguir creciendo, las células tumorales liberan estímulos angiogénicos hacia los vasos cercanos y promueven la angiogénesis; entonces, el tumor entra en una fase vascular caracterizada por un crecimiento exponencial, que permite la expansión a otros tejidos por metástasis.

En el ictus, todavía no se conoce bien el proceso de angiogénesis, ni si es beneficioso o perjudicial para el tejido dañado y sometido a una situación de hipoxia. Actualmente, se discuten las posibles ventajas o inconvenientes de la angiogénesis en esta patología, con diferentes hipótesis sobre sus efectos en el tejido isquémico [8,9]. Valorar el equilibrio molecular después del ictus, la evolución neurológica del paciente y las consecuencias de la neovascularización son actualmente objeto de numerosos estudios, para poder determinar el efecto de la angiogénesis después de la IC [10-16].

MOLÉCULAS REGULADORAS

Hay un gran número de moléculas que pueden promover o inhibir el proceso de angiogénesis; actúan sobre diferentes procesos, pero principalmente intervienen en el remodelado de la matriz extracelular o en la migración y proliferación de las células endoteliales. Aunque se han descrito muchas moléculas que intervienen en la angiogénesis, algunos de los promotores más importantes son factores de crecimiento que actúan sobre las células endoteliales VEGF, PDGF, TGF α y β , TNF α , etc. (del inglés vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, transforming growth factor y tumor necrosis factor).

También hay otras moléculas como la angiopoyetina (ANG1), el HIF1 (del inglés hypoxia inducible factor), el t-PA (del inglés tissue-plasminogen activador) o ciertas MMP (del inglés matrix metalloproteinase) que intervienen en otras fases. Sobre los inhibidores del proceso sabemos menos, ya que los estudios realizados hasta el momento se han centrado básicamente en valorar a los factores promotores. Pero moléculas angiostáticas como la angiostatina, el inhibidor de la metaloproteinasas tisular (TIMP), la endostatina y la trombospodina (TSP) 1 y 2 son determinantes en el equilibrio que modulará el proceso de angiogénesis.

Principales promotores endógenos

Son factores de crecimiento necesarios en condiciones fisiológicas, pero cuando se sobreexpresan actúan sobre las células endoteliales, tanto del vaso preexistente como del neovaso, estimulando la angiogénesis [17]. Son imprescindibles para la supervivencia celular, ya que, en su ausencia, las células entran en apoptosis; sólo tras la unión a sus receptores celulares producen la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas (survivina, A1, XIAP, Bcl-2) o de proteincinasas también antiapoptóticas [12,18-20].

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es una glicoproteína homodimérica clave en la regulación de la angiogénesis; probablemente, es el agente mitogénico endógeno más potente: induce la proliferación y migración de las células endoteliales, además de aumentar la permeabilidad vascular y permitir el paso de moléculas circulantes a la matriz celular [1,17-20]. En la fase de promoción de un proceso angiogénico se produce una sobreexpresión de VEGF y sus receptores celulares con actividad tirosinacina VEGF-R1 (Flt-1) y VEGF-R2 (KDR). Su unión ejerce un efecto antiapoptótico, ya que induce la sobreexpresión de proteínas como la Bcl-2, survivina, A1 o XIAP, que inhiben la muerte celular programada de las células endoteliales [18,19], además de activar proteincinasas que actúan promoviendo la supervivencia de las células endoteliales.

La ANG-1 es otro factor de crecimiento de las células endoteliales, con un peso molecular de 55 kDa. Cuando la ANG-1 se une al receptor Tie-2, ejerce un efecto antiapoptótico, ya que, al igual que otros promotores, activa a cinasas que participan en la supervivencia celular y a proteínas antiapoptóticas como la survivina [3,18]. También induce la migración celular y, sobre todo, participa en la estabilización del vaso en la fase de maduración y en el reclutamiento de pericitos [21]. No tiene un efecto mitogénico sobre las células endoteliales.

Una tercera molécula con un importante efecto promotor de la angiogénesis, aunque en menor grado que el VEGF, es el bFGF (del inglés basic fibroblast growth factor), ya que promueve la migración, aunque no la proliferación, de las células endoteliales. Para poder desarrollar su actividad es necesario que se una al receptor celular FGF-R. El efecto antiapoptótico que causa sobre las células endoteliales se debe a que, al igual que otros promotores, induce la sobreexpresión de proteínas como la Bcl-2 o la survivina [18].

Principales inhibidores endógenos

Actúan principalmente estimulando la apoptosis de las células endoteliales, siempre de forma controlada, ya que, si no, se produciría la muerte del tejido, un efecto inverso al que producen los factores de crecimiento.

Para el proceso de angiogénesis la sobreexpresión de promotores no es suficiente, ya que también es imprescindible que

haya una regulación de las moléculas inhibitoras. El mecanismo de acción de algunos de estos inhibidores que actúan sobre las células endoteliales todavía no se conoce bien, aunque sabemos que la regulación de la apoptosis y de las moléculas de unión intercelular o de las células con la matriz son dos funciones sobre las que actúan estos inhibidores [1,18].

Entre ellos, destaca la angiostatina como un potente inhibidor derivado del plasminógeno. Se trata de una proteína de 38-45 kDa, según la isoforma, que se forma por la lisis del plasminógeno y deja un fragmento compuesto por los tres o cuatro primeros dominios *Kringle*. Estos productos de degradación, y no el plasminógeno, tienen actividad angiostática [18,22]. A pesar de la gran cantidad de productos de degradación del plasminógeno, sólo los dominios K1-3 y K1-4 resultan ser potentes inhibidores [23,24]. Esta molécula inhibe la proliferación de las células endoteliales y es capaz de modular el proceso de angiogénesis. En roedores *knockout* para el plasminógeno se ha observado que no se bloquea la angiogénesis, y en modelos de animales con tumores a los que se les administra angiostatina exógena se observa una inactividad del tumor relacionada con la apoptosis, ya que activa diferentes proteínas como la RhoA o la ceramida. De esta forma, las células endoteliales no pueden mantener la tasa de proliferación necesaria para la angiogénesis. Con la misma finalidad, la angiostatina bloquea la ATP sintetasa de la membrana celular e impide la proliferación de la célula endotelial. Su efecto angiostático se limita a las células endoteliales y no es capaz de inhibir el crecimiento de otras líneas celulares.

La endostatina, de 20 kDa de peso molecular, se ha identificado como un fragmento C-terminal del colágeno XVIII [25,26] y también es necesaria una activación proteolítica previa de su precursor para que la molécula adquiera actividad antiangiogénica. Los dos mecanismos principales de inhibición de la angiogénesis los ejerce sobre la migración de las células endoteliales y por su efecto sobre la apoptosis celular, tanto génico como postranscripcional [25,27,28]. Induce la defosforilación de la eNOS (del inglés *endothelial nitric oxide synthase*), con lo que se inhibe la liberación de óxido de nitrógeno que estimula la acción del VEGF [29]. Además, afecta a la unión de la célula endotelial con las integrinas e impide su unión a la matriz que guía a las células endoteliales en su migración por la matriz extracelular. Otro mecanismo de acción de la endostatina es la inducción de la apoptosis de las células endoteliales [18,25,27], ya que altera la producción de proteínas antiapoptóticas como la Bcl-2 o la Bcl-XL, que se sobreexpresan con la acción de promotores angiogénicos como el VEGF, el bFGF o la ANG-1. También actúa en el núcleo produciendo la fragmentación del ADN de estas células e incrementa el porcentaje de células TUNEL positivas que entran en apoptosis [25,27].

Finalmente, también nombrar a la TSP-1 como una glicoproteína de 450 kDa con múltiples dominios, que se secreta al espacio extracelular y que participa en la comunicación entre células y entre éstas y la matriz extracelular [30-34]. *In vivo*, esta molécula es secretada por células endoteliales activadas, fibroblastos y macrófagos. Forma parte de una familia de cinco moléculas que se dividen en dos grupos: el de los trímeros (TSP-1 y TSP-2) y el de los pentámeros (TSP-3, TSP-4, TSP-5/COMP), con una estructura y función distinta. Aunque los mecanismos de acción de estos inhibidores todavía no se han aclarado, una de las funciones principales del TSP-1 es la inhibición de la angiogénesis, y su efecto se produce únicamente sobre las célu-

las endoteliales activadas, mientras que la TSP-2 podría ser importante en la fase de maduración de los nuevos vasos ya formados, mediante la inhibición de la migración y la proliferación. La TSP-1 sería determinante en las fases iniciales del proceso, ya que se une al receptor CD36, que activa una cascada de reacciones que lleva al reclutamiento de proteínas apoptóticas como la p59, p38MAPK, o la caspasa-3 [14,18,30-32].

La angiogénesis como un equilibrio molecular

El resultado de la acción de todos los promotores e inhibidores es un equilibrio muy controlado y preciso que modulará la angiogénesis espacial y temporalmente. Al mismo tiempo, hay que tener en cuenta que la remodelación que se produce de la matriz extracelular también es el resultado de un equilibrio proteolítico controlado, ya que una degradación excesiva sería incompatible con una angiogénesis normal. Por lo tanto, para valorar un proceso de angiogénesis en un tejido determinado, así como su evolución y sus efectos, se necesita hacer un balance de las principales moléculas implicadas. Hasta el momento, sólo las moléculas promotoras de la angiogénesis (VEGF, bFGF, HIF-1, TGF, etc.) se han considerado indicadoras del estado del proceso de angiogénesis [1,3,5,10,18,35]; pero, es evidente que las moléculas inhibitoras, como la angiostatina o la endostatina, entre otras, desempeñan un papel igualmente relevante [12, 18,25,27,31]. Por ello, hay que valorar la angiogénesis como un proceso activo, con una expresión de promotores e inhibidores que varía espacial y temporalmente.

El papel de las metaloproteasas

Estas proteasas se sintetizan como proenzimas, y sólo cuando se activan adquieren capacidad proteolítica sobre sustratos como el colágeno, la laminina, la fibronectina, la elastina, la gelatina, etc. Merecen una especial atención, ya que son imprescindibles para la remodelación de la matriz extracelular y de la lámina basal junto con las serinoproteasas, y desempeñan un papel esencial en la remodelación tisular [6,36-41].

Hasta hoy conocemos más de 25 MMP diferentes; todas ellas tienen una estructura que comprende un dominio catalítico con un átomo de zinc que les confiere capacidad enzimática. Otro dominio que aparece siempre en todas las proenzimas es el del péptido señal y el propéptido, que se eliminan con su activación. Luego, según la metaloproteasa, podemos encontrar dominios específicos. Hay un grupo, las MT-MMP (en inglés, *membrane-type matrix metalloproteinase*), que presentan en el extremo C-terminal un dominio transmembrana por el cual se anclan en la membrana celular. Esto las hace ser un grupo peculiar, ya que su activación es intracelular y su acción proteolítica se localiza alrededor de las células; nunca están libres en el torrente sanguíneo o en la matriz extracelular. En general, su actividad se regula de forma endógena en diferentes etapas: por transcripción génica, por la unión a inhibidores como los TIMP [42-44] o la α_2 -macroglobulina (poco específica para las diferentes MMP) y por la acción de sus activadores. Tradicionalmente, se ha considerado a la plasmina la molécula más importante en la activación de las MMP, pero sabemos que esta acción no es exclusiva y que algunas MMP son capaces de activarse entre ellas por mecanismos de retroalimentación positiva; así, por ejemplo, la acción de las MT-MMP es imprescindible para activar a MMP2. Estudios más recientes muestran que receptores de membrana como la LRP (en inglés *low density lipoprotein receptor-related protein*) participan en la regulación de la actividad extracelular de las

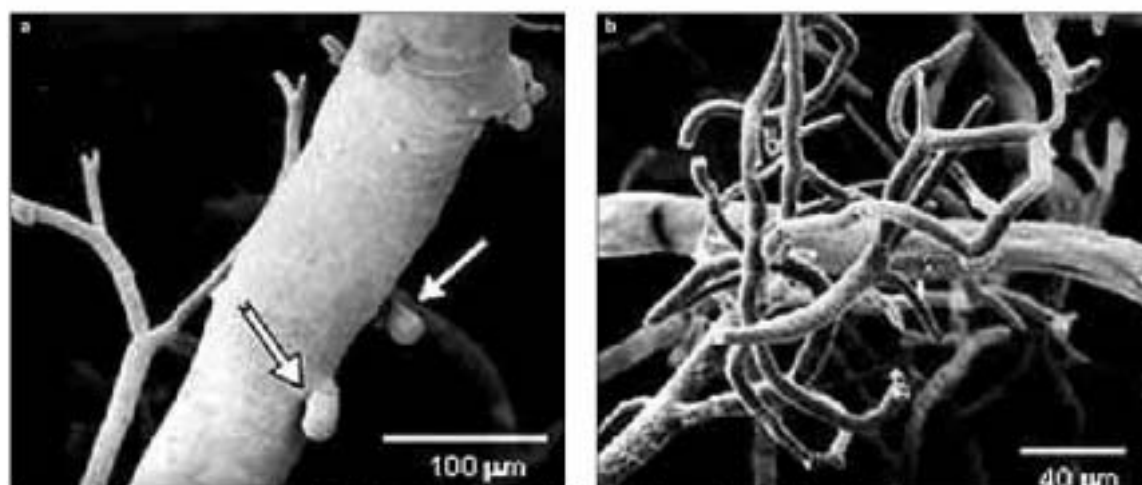


Figura 2. Capilares en angiogénesis. a) Proliferación de las células endoteliales hacia la matriz extracelular en forma de pequeñas verrugas; b) nueva red microvascular alrededor de un capilar. Tejido nervioso de ratas sometidas a una oclusión de la arteria cerebral media. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido, cedidas por el Dr. Kupinski [61].

metaloproteasas 2, 9 y 13, y modulan así la actividad proteolítica sobre la matriz extracelular y la lámina basal [45,46].

En estudios *in vitro* realizados con matrices artificiales de colágeno y fibrina se ha demostrado la implicación de esta familia (MMP, MT-MMP y TIMP) en la formación de estructuras tubulares, análogas a pequeños vasos sanguíneos, a partir de cultivos con diferentes tipos de células endoteliales [47-49]. Por todo ello, se identifican diferentes MMP relacionadas con patologías que se acompañan de fenómenos de angiogénesis y, por tanto, son posibles dianas terapéuticas: por ejemplo, ya se administran inhibidores de las metaloproteasas de síntesis química para interferir en el proceso de angiogénesis necesario para el desarrollo y crecimiento del tumor [50,51].

ISQUEMIA CEREBRAL Y ANGIOGÉNESIS

En el ictus, cuando una zona del encéfalo se ve privada de flujo sanguíneo de forma total o parcial, se produce una situación de hipoxia o anoxia del parénquima que estimula y activa la angiogénesis. Actualmente, la ventana terapéutica en la fase aguda del ictus se limita a las primeras horas tras el inicio de los síntomas, cuando se puede intentar lizar el coágulo mediante trombólisis con rt-PA [52]. El rt-PA administrado y el plasminógeno forman un complejo que se une a la fibrina parcialmente degradada que forma parte del émbolo o del trombo, lo que produce su total degradación con la producción de plasmina, se lisa el coágulo y se produce la recanalización de la arteria. También es cierto que la terapia trombolítica con rt-PA puede ocasionar complicaciones. Es evidente que hay otros factores que participan en la aparición de transformaciones hemorrágicas en ciertos pacientes, mientras que otros, con el mismo tratamiento trombolítico, no sufren complicación alguna. Esto lleva a preguntarnos si estos mismos factores pueden influir en el tamaño del infarto o la evolución neurológica del paciente, ya que, si así fuera, su modulación terapéutica podría ser muy beneficiosa.

Estudios recientes demuestran que hay una sobreexpresión de MMP-9 circulante en sangre en la fase aguda del ictus [53] que

se relaciona con el déficit neurológico del paciente, la oclusión de la arteria y el volumen final del infarto. Respecto al riesgo de complicaciones hemorrágicas, también se ha observado una relación con la MMP-9 [54,55], lo que sugiere un valor predictivo de la concentración basal de esta proteasa [56,57] o la combinación de terapias con inhibidores de las metaloproteasas [58], que mejorarían la terapia trombolítica con rt-PA.

Modulación de la angiogénesis en el ictus

Numerosos estudios muestran que después del ictus, debido a la hipoxia que sufre el tejido afectado, hay una sobreexpresión de factores promotores, como el VEGF, el bFGF o el TNF- α [10, 12,13,16,17,20], que favorecen el proceso de angiogénesis y el aumento de la circulación colateral en la zona de penumbra. Trabajos más recientes empiezan a valorar también la expresión y el efecto de algunas moléculas inhibitorias [12,14].

Es importante diferenciar entre circulación colateral o angiogénesis, ya que se producen en sitios distintos y las consecuencias de su modulación pueden ser distintas. Entendemos por circulación colateral o arteriogénesis la dilatación y alargamiento de arteriolas preexistentes, pero nunca la formación de nuevos vasos [59,60]. Este proceso se activa en la fase aguda del ictus y se produce en la zona de penumbra, donde el aporte de vasos de los territorios vecinos no afectados produce un efecto beneficioso, ya que aumenta el flujo en zonas de tejido dañado pero aún viable. En cambio, en el proceso de angiogénesis hay siempre una migración y proliferación de células endoteliales de vasos que no se han dañado para formar nuevos vasos en el tejido afectado (Fig. 2). Esto implica que, transitoriamente, se tiene que romper la BHE para la migración celular, lo que implica el riesgo de una posible hemorragia, con un efecto quizás diferente en la penumbra que en el núcleo del infarto. Por tanto, después del ictus se inicia el proceso de angiogénesis, pero la finalidad por la que se produce todavía no está clara y, en consecuencia, no podemos asegurar que sea beneficiosa o perjudicial. En torno a esta idea aparecen dos hipótesis, que intentan dar respuesta al porqué se inicia un proceso de angiogénesis. La que

podríamos llamar de regeneración del tejido dañado, definiría la angiogénesis como un mecanismo que se produce para generar nuevos vasos que revascularicen la zona afectada por la isquemia y así minimizar al máximo el daño tisular [9,10]. Pero hay otra hipótesis que postula que la formación de nuevos vasos se produce para facilitar la infiltración de macrófagos, ya que hay un tejido que está muerto, necrótico, y debe eliminarse [8,11].

Aunque hay pocos estudios sobre angiogénesis en pacientes que han sufrido un ictus [9,10,16], sí que se han desarrollado diferentes modelos animales [11-15,61], sobre todo con ratas y ratones (Fig. 2). Se han diseñado estudios para conocer la modulación de la angiogénesis, la expresión de moléculas promotoras e inhibitoras y el balance de éstas, y la relación con el déficit neurológico. Estos estudios intentan comprender la finalidad del proceso de angiogénesis tras la isquemia cerebral y el beneficio que puede aportar o el daño que puede causar en el tejido isquémico. Muchos de estos trabajos se han centrado en valorar la sobreexpresión de moléculas que estimulan la angiogénesis, como el VEGF, TGF, bFGF, PDGF, ANG-1, NO o HIF-1, en respuesta a una situación de hipoxia tanto en pacientes que han sufrido un ictus [10,16,19,62] como en modelos animales [13,17,63,64]. Por ellos, sabemos que hay una modulación de moléculas promotoras, que muchas de ellas se sobreexpresan en la fase aguda del ictus y que son responsables del aumento microvascular y de la inestabilidad de la BHE durante el proceso de angiogénesis. La compleja red de microvasos que conforman la BHE permite una correcta hemostasis en el parénquima cerebral, impide el paso de moléculas no deseadas procedentes del torrente sanguíneo y proporcionan al sistema nervioso central un alto grado de protección. Hay modelos animales que demuestran un aumento en la permeabilidad vascular de esta BHE durante la angiogénesis, inmediatamente después de una IC, debido a la acción de moléculas como el VEGF aumentan el riesgo de hemorragias [13,65]. En cambio, pasada la fase aguda, promover la angiogénesis mejora la recuperación neurológica, estimula la neurogénesis y reduce el tamaño del infarto [65,66]. Estudios recientes sugieren modular la angiogénesis como una posible terapia en la IC mediante la sobreexpresión génica de algunos factores angiogénicos como el HGF (del inglés *hepatocyte growth factor*) o el VEGF [67,68]. En estos modelos animales, la transferencia génica de HGF o VEGF mediante un vector vírico reduce el tamaño del infarto, disminuye el déficit neurológico y aumenta la supervivencia mediante la estimulación de la angiogénesis. En ellos, también se demuestra que estimulando la angiogénesis de forma preventiva se minimizan las complicaciones hemorrágicas, la rotura de la BHE y el edema cerebral.

Pero, ¿qué ocurre con las moléculas angiostáticas o inhibitoras? La idea de que la angiogénesis es la respuesta a un equilibrio molecular hace tiempo que se valora, sobre todo en el campo de la oncología; pero, en el cerebro, la función que pueden desempeñar los inhibidores se ha estudiado muy poco, quizás porque al principio se creyó que la angiogénesis tras un ictus era siempre beneficiosa. Como consecuencia, hay muy pocos estudios que valoren la expresión, modulación y efectos de este grupo de moléculas, así como del balance angiogénico. Recientemente, se han publicado estudios que valoran algunos de estos inhibidores, siempre a partir de un modelo animal. En uno de ellos se determina la expresión espaciotemporal de la TSP-1 y 2 en un modelo de rata, con una oclusión de la arteria cerebral media (ACM) y posterior reperflusión [14]. Concluyen que estas moléculas se sobreexpresan en diferentes momentos después de

la IC. La TSP-1 se sobreexpresa primero en dos picos y participa en la fase de *sprouting*, mientras que la TSP-2 lo hace de forma más tardía y modula la maduración de los nuevos capilares. En el otro, se hace un perfil temporal de la expresión de los genes relacionados con la angiogénesis en un modelo de ratón, también con una oclusión transitoria de la ACM, en el que se incluyen 96 moléculas angiogénicas [12]. En él se demuestra la inmediata sobreexpresión génica de más de 40% de las moléculas estudiadas, tanto angiogénicas como angiostáticas, una hora después de la IC, y su posterior regulación y modulación tres semanas más tarde. Estos estudios demuestran la importancia de este grupo de moléculas y que el proceso de angiogénesis es un equilibrio muy bien modulado de forma endógena. Hasta el momento, no hay ningún trabajo en el que se haya determinado la expresión o el efecto de las moléculas inhibitoras de la angiogénesis en pacientes que han sufrido un ictus.

A pesar de la luz que aportan esos trabajos, hay algunas cuestiones que todavía están por responder: ¿Hay una sola hipótesis cierta? ¿Es posible que se activen los dos mecanismos a la vez? ¿Los efectos son diferentes en la penumbra y en el núcleo? ¿Terapéuticamente, sería beneficioso promover o inhibir la angiogénesis?

CONCLUSIONES

La angiogénesis es un proceso que puede acompañar a diferentes tipos de patologías y causar efectos beneficiosos o perjudiciales. En el cerebro, tras una situación de isquemia, no se conocen bien los efectos de la angiogénesis y parece ser un proceso complejo, quizá por las características del sistema nervioso.

Los trabajos que se han realizado hasta ahora sobre angiogénesis después del ictus, incluidos los modelos animales, demuestran que este proceso se activa inmediatamente después del evento y que se puede prolongar varias semanas. También sabemos que se liberan gran cantidad de moléculas que regulan la formación de nuevos vasos de forma muy precisa. La finalidad con la que se produce la angiogénesis seguramente sea la de revascularizar una zona dañada y, al mismo tiempo, eliminar el tejido necrótico, con la infiltración de macrófagos para facilitar la formación de nuevos vasos y la regeneración del tejido. Esta respuesta se puede producir en cualquier situación de isquemia; pero, en el cerebro no hay una regeneración de tejido donde se ha producido una muerte neuronal de forma masiva. Además, la sobreexpresión de promotores de la angiogénesis facilita la rotura de la BHE y, por tanto, incrementa el riesgo de que se produzca una hemorragia cerebral. En la zona isquémica, después de la oclusión de una arteria cerebral podemos diferenciar dos zonas con características muy diferentes en las que la angiogénesis actuará de forma distinta. En la zona inicialmente infartada (núcleo) se produce una muerte neuronal masiva y el tejido es irrecuperable, mientras que rodeando a este núcleo puede aparecer una zona de penumbra que corresponde a un tejido dañado, pero potencialmente recuperable si se produce una recanalización de la arteria ocluida y no hay hemorragia. Por lo tanto, un proceso angiogénico en la zona de penumbra isquémica podría tener efectos muy beneficiosos, mientras que en el core estos beneficios no existirían, pero sí el riesgo de hemorragias.

En consecuencia, parece que la modulación espacial puede ser uno de los objetivos para conseguir beneficios de una terapia angiogénica; pero, ¿debemos pensar también en una modulación temporal?

Hemos visto que la secuencia temporal de la angiogénesis empieza con la sobreexpresión génica de muchas de las moléculas implicadas en el proceso minutos después de la oclusión; pero, también sabemos que el séptimo día hay un incremento máximo de nuevos vasos y que el proceso se extiende hasta varias semanas después del evento. Teniendo en cuenta que en la fase hiperaguda del ictus hay un aumento de metaloproteasas de matriz y que la terapia trombolítica que se administra en esta fase puede incrementar el riesgo de hemorragias, ¿es beneficiosa la sobreexpresión de moléculas como el VEGF, que incrementan la permeabilidad vascular? Otro problema que se nos plantea en esta fase aguda es qué ocurre si en el momento de la reperusión hay muchos vasos en la fase de *sprouting*; ¿puede aumentar el riesgo de sufrir una hemorragia?

Por lo tanto, los trabajos sobre angiogénesis después del ictus deben seguir investigando el equilibrio molecular y la modulación endógena que implica. Pero también deben centrarse en determinar cuál es el mejor momento y lugar para promover la formación de nuevos vasos, así como cuándo y dónde es necesario inhibir el proceso para obtener unos efectos beneficiosos.

Finalmente, esto nos lleva a la conclusión de que conseguir modular el proceso local y temporalmente en el parénquima cerebral, de forma que podamos obtener sus efectos beneficiosos y evitar los riesgos nocivos, puede ser una buena opción terapéutica para el ictus. En el futuro esta estrategia podría formar parte de una terapia combinada en fase aguda y subaguda o en prevención secundaria.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pepper MS. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 605-19.
2. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 73-91.
3. Mann HM, Risau W. Angiogenesis in ischemic disease. *Thromb Haemost* 1999; 82 (Suppl 1): 44-52.
4. Henry TD, Antek BH, McKendall GR, Azria MA, López JJ, Giordano FJ, et al. The VIVA trial: Vascular Endothelial Growth Factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 2003; 107: 1359-65.
5. Pavlakovic H, Havers W, Seweiger L. Multiple angiogenesis stimulators in a single malignancy: implications for anti-angiogenic tumor therapy. *Angiogenesis* 2001; 4: 259-62.
6. Galis ZS, Klagsbrun J. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis. The good, the bad and the ugly. *Circ Res* 2002; 90: 251-62.
7. Mofidi R, Crotty TB, McCarty P, Sheehan SJ, Melugin D, Keaverty TV. Association between plaque instability, angiogenesis and symptomatic carotid occlusive disease. *Br J Surg* 2001; 88: 945-50.
8. Muroorkitwongsa PS, Jackson-Friedman C, Millan PJ, Schultz RL, Lyden PD. Angiogenesis after stroke is correlated with increased numbers of macrophages: the clean-up hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 1223-31.
9. Krupinski J, Kaliza J, Kumar P, Kumar S, Wang JM. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* 1994; 25: 1794-8.
10. Slevin M, Krupinski J, Slowik A. Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β 1 in serum of patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 2000; 31: 1865-70.
11. Kitagawa K, Mitsuura M, Kawabata K, Ohtsuki T, Hori M. Delayed, but marked, expression of apolipoprotein E is involved in tissue clearance after cerebral infarction. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 1199-207.
12. Hayashi T, Nishita N, Sagawara T, Chan PH. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 166-80.
13. Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, Soltanian-Zadeh H, Morris D, Zhang R, et al. Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 379-92.
14. Lin TN, Kim GM, Chen JJ, Cheung WM, He YY, Hsu CY. Differential regulation of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 after focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke* 2003; 34: 177-86.
15. Lin TN, Sun SW, Cheung WM, Li F, Cheng C. Dynamic changes in cerebral blood flow and angiogenesis after transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2002; 33: 2985-91.
16. Scheufler KM, Drevs J, Van Velthoven V, Rausch P, Klich J, Augustin HG, et al. Implications of vascular endothelial growth factor, sFlt-1, and sTie-2 in plasma, serum and cerebrospinal fluid during cerebral ischemia in man. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 99-110.
17. Zhang ZG, Chopp M. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischemia. *Trends Cardiovasc Med* 2002; 12: 62-6.
18. Charakis E, Dimmeler S. Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 887-93.
19. Issa R, Krupinski J, Bajaj T, Kumar S, Kaliza J, Kumar P. Vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, in human brain tissue after ischemic stroke. *Lab Invest* 1999; 79: 417-25.
20. Jik YJ, Lien WH, Tsi WC, Yang GW, Li C, Wu LW. Distinct regulation of genes by bFGF and VEGF-A in endothelial cells. *Angiogenesis* 2001; 4: 313-21.
21. Hayes AJ, Huang WQ, Mallah J, Yang D, Lippman ME, Li LY. Angiopoietin-1, and its receptor Tie-2 participate in the regulation of capillary-like tubule formation and survival of endothelial cells. *Microvasc Res* 1999; 58: 224-37.
22. Soff GA. Angiostatin and angiostatin-related proteins. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 97-107.
23. Cao Y, Ji RW, Davidson D, Schaller J, Mari D, Shtudel S, et al. Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J Biol Chem* 1990; 271: 29461-7.
24. Hatzigeorgidis M, Katsoris P, Papadimitriou E. Different inhibitors of plasmin differentially affect angiostatin production and angiogenesis. *Eur J Pharmacol* 2003; 460: 1-8.
25. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, et al. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 1997; 88: 277-85.
26. Susaki T, Fukui N, Mann K, Golberg W, Olsen BR, Tirupul R. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J* 1998; 17: 4249-56.
27. Bharadwaj M, Rameshwar R, Watemaa M, Lu H, Kaselmann B, Segal M, et al. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* 1999; 274: 11721-6.
28. Shickiri M, Hirata Y. Antiangiogenesis signals by endostatin. *FASEB J* 2001; 15: 1044-53.
29. Urbich C, Reissner A, Charakis E, Demback E, Haendeler J, Fleming I, et al. Dephosphorylation of endothelial nitric oxide synthase contributes to the anti-angiogenic effects of endostatin. *FASEB J* 2002; 16: 706-8.
30. Adams JC. Thrombospondins, multifunctional regulators of cell interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 25-51.
31. De Fraipont F, Nicholson AC, Feige JJ, Van Meir EG. Thrombospondins and tumor angiogenesis. *Trends Mol Med* 2001; 7: 401-7.
32. Qian X, Wang TN, Rothman VL, Nicolson RF, Tuszynski GP. Thrombospondin-1 modulates angiogenesis in vitro by up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in endothelial cells. *Exp Cell Res* 1997; 235: 405-12.
33. Volpert OV. Modulation of endothelial cell survival by an inhibitor of angiogenesis thrombospondin-1: a dynamic balance. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 87-92.
34. Lawler J. The functions of thrombospondin-1 and -2. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12: 634-40.
35. Semenza GL. HIF1: using two hands to flip the angiogenic switch. *Cancer Metastasis Rev* 2000; 19: 59-65.
36. Lijnen HR. Plasmin and metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost* 2001; 86: 324-33.
37. Pepper MS. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1104-17.
38. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 960-70.
39. John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res* 2001; 7: 14-23.
40. Hetsing B, Harton K, Friedrich M, Rafii S, Werb Z. Angiogenesis: vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases. *Curr Opin Hematol* 2003; 10: 136-41.

41. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274: 21491-4.
42. Min-Bryce S, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 1163-72.
43. Kagler A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Anticancer Res* 1999; 19: 1589-92.
44. Brew K, Dinakarpandian D, Nagase HU. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477: 267-83.
45. Hahn-Dantona E, Riez JF, Borstein P, Strickland DK. The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *J Biol Chem* 2001; 276: 15498-505.
46. Herz J. LRP: a bright beacon at the blood-brain barrier. *J Clin Invest* 2003; 112: 1483-5.
47. Collet A, Hansmaijer R, Lupa F, Quax PH, van Laet N, Grünbergen J, et al. Membrane-type matrix metalloproteinase-mediated angiogenesis in a fibrin-collagen matrix. *Blood* 2003; 101: 1810-7.
48. Reed MJ, Koike T, Sadoun E. Inhibition of TIMP1 enhances angiogenesis in vivo and cell migration in vitro. *Microvasc Res* 2003; 65: 9-17.
49. Laffleur MA, Handley MM, Knauper V, Murphy G, Edwards DR. Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs). *J Cell Sci* 2002; 115: 3427-38.
50. Lockhart AC, Braun RD, Yu D, Ross JR, Dewhirst MW, Humphrey JS, et al. Reduction of tumor angiogenesis in patients treated with BMS-275291, a broad spectrum matrix metalloproteinase inhibitor. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 586-93.
51. Parcell WT, Rudak MA, Hidalgo M. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002; 16: 1189-227.
52. National Institutes of Neurological Disorders, and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 1995; 333: 1581-7.
53. Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina CA, Anglés A, Abilleira S, Arenillas JF, et al. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke. Temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* 2001; 32: 1759-66.
54. Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina CA, Anglés A, Abilleira S, Arenillas JF, et al. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke* 2001; 32: 2762-7.
55. Sami T, Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* 2002; 33: 831-6.
56. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribó M, et al. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* 2003; 107: 598-605.
57. Castellanos M, Leira R, Senra J, Pumar JM, Lizasoain I, Castillo J, et al. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke* 2003; 34: 40-6.
58. Lapchuk PA, Chapman DF, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke* 2000; 31: 3034-40.
59. Wei L, Erkinjuntti JP, Rovinsky CM, Woolsey TA. Collateral growth and angiogenesis around cortical stroke. *Stroke* 2001; 32: 2179-84.
60. Schaper W, Scholz D. Factors regulating arteriogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 1143-51.
61. Krupinski J, Stroemer P, Slevin M, Marti E, Kumar P, Rubio F. Three-dimensional structure and survival of newly formed blood vessels after focal cerebral ischemia. *Neuroreport* 2003; 14: 1171-6.
62. Krupinski J, Issa R, Bujry T, Slevin M, Kumar P, Kumar S, et al. A putative role for platelet-derived growth factor in angiogenesis and neuroprotection after ischemic stroke in humans. *Stroke* 1997; 28: 564-73.
63. Zhang R, Wang L, Zhang L, Chen J, Zhu Z, Zhang Z, et al. Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and eGMP after stroke in the rat. *Circulation Res* 2003; 92: 308-13.
64. Bernaudin M, Nedelec AS, Divoux D, MacKenzie ET, Petit E, Schumacher P. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 393-403.
65. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C, et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* 2000; 106: 829-38.
66. Sun Y, Ju K, Xie L, Childs J, Mao XO, Lovatov A, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest* 2003; 111: 1843-51.
67. Shimamura M, Sato N, Oshima K, Aoki M, Kurama H, Woguri S, et al. Novel therapeutic strategy to treat brain ischemia: overexpression of hepatocyte growth factor gene reduced ischemic injury without cerebral edema in rat model. *Circulation* 2004; 109: 424-31.
68. Bellomo M, Adams EB, Desdats B, Catania MA, Mannucci C, Marini H, et al. Enhancement of expression of vascular endothelial growth factor after adeno-associated virus gene transfer is associated with improvement of brain ischemia injury in the gerbil. *Pharmacol Res* 2003; 48: 309-17.

IMPLICACIÓN DE LA ANGIOGENÉNESIS EN LA ISQUEMIA CEREBRAL HUMANA

Resumen. *Objetivo.* *Analizar la implicación del proceso de angiogénesis en el ictus y sus posibles aplicaciones terapéuticas. Desarrollo.* *La angiogénesis es un proceso fisiopatológico en el que se forman nuevos vasos a partir de otros ya existentes, que se divide en dos fases: sprouting y maduración. La modulación de la angiogénesis es el resultado de un equilibrio molecular entre un gran número de factores promotores o estimuladores (VEGF, bFGF, MMP, etc.), pero también de inhibidores o factores angiostáticos (angiotatina, endostatina, etc.). En patología humana tiene un efecto dual: beneficiosa en la cicatrización de heridas, la remodelación tisular o la isquemia coronaria, pero perjudicial en el cáncer, la artritis reumatoide o la inestabilidad de la placa de ateroma. El proceso de angiogénesis se da en algunas patologías cerebrovasculares; concretamente, tras un ictus sabemos que se sobreexpresan moléculas que regulan este proceso, pero desconocemos la finalidad con la que se produce. Conclusiones.* *La angiogénesis se activa después del ictus y modifica transitoriamente la red capilar. Para obtener un efecto ventajoso de este proceso será necesario conocer el perfil de expresión de las moléculas reguladoras en el ser humano y conocer si sus efectos son diferentes en la fase aguda y en la subaguda. Modular la angiogénesis podría formar parte de una terapia combinada en el futuro. [REV NEUROL 2004; 38: 1076-82]*

Palabras clave. *Angiogénesis. Capilar. Célula endotelial. Equilibrio molecular. Ictus. Isquemia cerebral.*

ENVOLVIMENTO DA ANGIOGÊNESE NA ISQUEMIA CEREBRAL HUMANA

Resumo. *Objetivo.* *Analizar o envolvimento do processo de angiogénesis no AVC e suas possíveis aplicações terapêuticas. Desenvolvimento.* *A angiogénesis é um processo fisiopatológico em que se formam novos vasos a partir de outros já existentes, que se divide em duas fases: sprouting e maturação. A modulação da angiogénesis é o resultado de um equilíbrio molecular entre um grande número de fatores promotores ou estimuladores (VEGF, bFGF, MMP, etc.), mas também de inibidores ou fatores angiostáticos (angiotatina, endostatina, etc.). Em patologia humana tem um duplo efeito: é benéfica na cicatrização de feridas, na remodelação tecidual e na isquemia coronária, mas é prejudicial no câncer, na artrite reumatoide ou na inestabilidade da placa de ateroma. O processo de angiogénesis desenvolve-se em algumas patologias cerebrovasculares; concretamente, sabemos que após um AVC aumenta a expressão das moléculas que regulam este processo, mas desconhecemos a finalidade com que se produz. Conclusões.* *A angiogénesis activa-se após o AVC modificando transitoriamente a rede capilar. Para se obter um efeito vantajoso deste processo, será necessário conhecer o perfil de expressão das moléculas reguladoras no ser humano e saber se os seus efeitos são diferentes na fase aguda e na subaguda. Modular a angiogénesis poderia fazer parte de uma terapia combinada no futuro. [REV NEUROL 2004; 38: 1076-82]*

Palavras chave. *Angiogénesis. AVC. Capilar. Célula endotelial. Equilíbrio molecular. Isquemia cerebral.*

ARTICLE 5

High level of an Angiogenesis Inhibitor (endostatin) is Related to Poor Outcome in Ischemic Stroke Patients Treated with t-PA

(Article en preparació, 2005)

High level of an Angiogenesis Inhibitor (endostatin) is Related to Poor Outcome in Ischemic Stroke Patients Treated with t-PA

Joan Montaner¹, Anna Rosell¹, Carlos A. Molina¹, Juan F. Arenillas, Marc Ribó, Jasone Monasterio², José Alvarez-Sabín¹.

¹ Neurovascular Research Laboratory and Stroke Unit and ² Vascular Biology and Hemostasis Laboratory of the Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona, Spain. Universitat Autònoma de Barcelona.

Angiogenesis stimulators and inhibitors following stroke

Angiogenesis follows cerebral ischemia in an attempt to develop neovascularization into the hypoperfused area. Although angiogenic factors (i.e., vascular endothelial growth factor, or VEGF) have been shown to be up-regulated soon after cerebral ischemia, angiostatic factors (i.e., endostatin) have not been studied in stroke patients. This study investigated angiogenic-angiostatic balance and its correlation with neurological outcome in t-PA treated stroke patients. **Methods-** Serial VEGF and endostatin were determined by ELISA at baseline (pretreatment), 12h and 24h in 41 strokes involving the middle cerebral artery territory who received t-PA (<3h). NIHSS scores were obtained at several time points and functional outcome was evaluated (modified Rankin Scale -mRS- after three months). Both VEGF and endostatin level peaked within 3h from stroke onset [VEGF=75.7 pg/ml (48.3-166.0); endostatin=119.8 ng/ml (96.9-160.7)] and were higher than normal range for healthy controls (<27.4 pg/ml for VEGF and 8.4-58.9 ng/ml for endostatin) at any time point ($p<0.00001$). A positive correlation exists between baseline endostatin/VEGF balance and higher NIHSS scores at later time points ($r=0.458$, $p=0.008$ at 12h; $r=0.339$, $p=0.029$ at 24h and $r=0.397$, $p=0.033$ at 48h). Moreover, patients who improved during the study period had lower baseline endostatin level (111.5 versus 150.1 ng/ml, $p=0.037$). The deleterious effect of endostatin was still evident three months after stroke, as shown in the positive correlation between mRS and baseline endostatin level ($r=0.375$, $p=0.035$) or endostatin/VEGF balance ($r=0.391$, $p=0.020$). VEGF and endostatin are over-expressed after stroke. An endogenous shift through angiogenesis inhibition is related to poor neurological outcome.

Following cerebral ischemia, angiogenic signals represent an attempt to compensate hypoxia effects through new vessel growth to avoid neuronal death.¹ Angiogenesis begins by a sprouting phase in which the basal lamina from pre-existing vessels is momentarily broken to allow endothelial cell (EC) migration. In a second phase, new vessels acquire maturation and stability with smooth cell and pericyte recruitment.^{2,3} Many factors are involved in the angiogenesis process following stroke and can be mainly classified as angiogenic molecules that activate the sprouting phase and angiostatic molecules that promote the stability phase or inhibit angiogenesis.⁴ As a result of this interplay, there is a complex balance that modulates angiogenesis direction at each time point after ischemia.⁵

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a strong angiogenic factor that increases vascular permeability and promotes EC migration and proliferation. Previous studies in stroke patients have reported that an increase in VEGF is related to angiogenesis extent and patient survival.^{6,9} This beneficial effect of VEGF may be counterbalanced by the capacity of angiogenic molecules to promote blood brain barrier (BBB) disruption, which would be particularly harmful in the context of thrombolysis.¹⁰

In contrast to the extensive information on angiogenic factors, there has been little research on the role of angiostatic factors.¹¹ One of these inhibitors, endostatin, is a collagen XVIII C-terminal fragment^{12,13} that has not been previously studied in cerebral ischemia.

In the present study, we investigated the temporal profile of angiogenic-angiostatic balance during the acute phase of ischemic stroke and its correlation with neurological outcome in t-PA treated stroke patients.

METHODS

Study Population

The present prospective study assessed 146 consecutive patients with acute ischemic stroke admitted to the Emergency Room of a teaching hospital within 3 hours after symptom onset who had a non-lacunar stroke involving the vascular territory of the middle cerebral artery (MCA). Of these, 138 (94.5%) underwent emergency carotid ultrasound and transcranial Doppler (TCD) examinations. Ninety-eight (71%) patients had a documented MCA occlusion on TCD. Of these, 45 (45.9%) patients with a cardioembolic stroke received t-PA in a standard 0.9 mg/kg dose (10% bolus, 90% continuous infusion during 1 hour) <3 hours after symptom onset. All patients with a known inflammatory or malignant disease were excluded. The final analysis included 41 patients who had had an acute cardioembolic stroke in the MCA territory and received t-PA at <3 hours after symptom onset. These patients have been included in a previous study.¹⁴

Clinical Protocol

A detailed history of vascular risk factors was obtained from each patient. To identify a potential mechanism of cerebral infarction, electrocardiogram, chest X-ray, carotid ultrasonography, complete blood count and leukocyte differential and blood biochemistry were performed in all patients. When indicated, special coagulation tests, transthoracic ecocardiography and Holter monitoring were also done.

On admission, all patients underwent a computed tomography (CT) within the first 3 hours of stroke onset, which was repeated after 48 hours (or earlier when rapid neurological deterioration occurred) to evaluate the presence of hemorrhagic transformations (HT). Presence and type of HT were defined according to previously published criteria.^{15,16} Hemorrhagic infarction (HI) was defined as a petechial hemorrhagic infarction

without space-occupying effect, and parenchymal hematoma (PH) was defined as hemorrhage with mass effect. Subtypes of HI and PH were defined as: HI-1, small petechiae along the margins of the infarct; HI-2, more confluent petechiae within the infarct area; PH-1, hematoma involving $\leq 30\%$ of the infarct area with some slight space-occupying effect; and PH-2, when hematoma involved $>30\%$ of the infarct area with substantial mass effect, or clot remote to the infarct area).

This information was used to classify patients according to previously defined etiologic subgroups.¹⁷ Most subjects (85%) had a cardioembolic stroke due to atrial fibrillation. Clinical examination was performed on admission and at 12, 24 and 48 hours from symptom onset. Stroke severity was assessed by the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS). We defined neurological improvement as a ≥ 4 -point decrease in stroke score and neurological deterioration as death or ≥ 4 -point increase in the score at 48 hours.¹⁸ The Modified Rankin Scale (mRS) was used to assess functional outcome three months after stroke.

Intravenous heparin was not administered during the study period. The study was approved by the Ethics Committee of the hospital and all patients or relatives gave informed consent.

VEGF and Endostatin immunoassays

Peripheral blood samples were drawn from each patient at study entry (before t-PA administration) and at 12 and 24 hours from stroke onset. EDTA tubes were used to collect the blood; plasma was immediately separated by centrifugation at 3000 rpm for 15 minutes and stored at -80°C . Total VEGF (Quantikine® R&D Systems, USA) and endostatin (Chemikine™ Chemicon, USA) levels were determined in duplicate by commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the mean value of both

determinations was used. All ELISAs were performed according to the manufacturer's instructions. Our laboratory reference values for healthy controls are: 12.47 ± 14.96 pg/ml for VEGF (n=68, 70% women, mean age 43 years, normal range <27.43 pg/ml) and 33.68 ± 25.254 ng/ml for endostatin (n=74, 89% women, mean age 44 years, normal range 8.43-58.94 ng/ml). The mean intra-assay coefficients of variation were $<10\%$ and minimum detectable VEGF concentration was 9 pg/ml.

Statistical Analyses

Descriptive and frequency statistical analyses were obtained and compared using SPSS® 9.0. VEGF and endostatin concentrations did not have a normal distribution (Kolmogorov-Smirnov and P-P plot); values are expressed as median (interquartile range). The Mann-Whitney U test was used to assess differences between patients and healthy controls and when comparing neurological outcome between stroke patients. The Wilcoxon signed-rank test was used to study changes in both VEGF and endostatin levels over time. Finally, the Kruskal Wallis test was applied to test differences in biomarker levels according to HT subtype, and Spearman's rank correlation test was used to test all correlations. A p value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Following assessment, 41 t-PA treated patients with an acute cardioembolic stroke in the MCA territory were included in the study. TCD performed at admission documented a MCA occlusion in all patients. Main baseline characteristics of the included patients are shown in Table 1.

Angiogenesis balance

The VEGF and endostatin levels measured in plasma at any time point were higher in the study

patients than a healthy control population ($p < 0.00001$). The temporal profiles of both molecules during the study period are shown in Figure 1. Peak values for both VEGF and endostatin were found at baseline [VEGF=75.73 pg/ml (48.33-166.02); endostatin=119.77 ng/ml (96.91-160.74)]. A progressive wane was then observed in both temporal profiles. This downward tendency only reached significance ($p = 0.017$) for VEGF levels at 24h as compared with baseline (see Figure 1). The overall angiogenesis balance (endostatin/VEGF) was quite stable during the study period (baseline=1.4, 12h=1.6 and 24h=1.7). No relationship was found between the VEGF or endostatin level and any vascular risk factor, except for higher level of endostatin among patients with dyslipidemia (159.63 versus 111.69 ng/ml, $p = 0.050$). A negative correlation between age and baseline endostatin/VEGF ratio ($r = -0.401$, $p = 0.023$) was found.

Angiogenesis relation to neurological outcome

Angiogenesis expression was not dependent on stroke severity, as no correlation was found between VEGF or endostatin levels and NIHSS score at baseline. Moreover, baseline VEGF and endostatin levels were similar regarding the presence of a distal or proximal MCA occlusion (data not shown).

Conversely, baseline endostatin level might have some influence on the neurological evolution of patients because it was significantly correlated with the NIHSS scores at later time points (i.e., baseline endostatin and 24h NIHSS score correlation: $r = 0.422$, $p = 0.020$). When considering the baseline endostatin/VEGF balance we obtained even better correlations predicting the neurological status (i.e., baseline endostatin/VEGF and 12h NIHSS score correlation: $r = 0.458$, $p = 0.008$, see Figure 2). All these correlations are summarized in Table 2.

Clinical assessment revealed that 7 (17%) patients worsened, 25 (61%) improved, and 9 (22%) remained stable during the first 48 hours after admission (Figure 3). Patients who improved during the first 48 hours had lower baseline endostatin level than patients who did not improve [111.51 ng/ml (79.70-137.79) versus 150.08 ng/ml (102.72-170.69), $p = 0.037$].

A positive correlation between mRS and baseline endostatin level ($r = 0.375$, $p = 0.035$) or baseline endostatin/VEGF balance ($r = 0.391$, $p = 0.020$) was found. Furthermore, we found very low VEGF baseline levels among patients who died (36.94 versus 78.88 pg/ml, $p = 0.065$) during the study period.

VEGF and Hemorrhagic Transformation

HT was present in 15 (36.5%) patients [10 (24.4%) HI and 5 (12.1%) PH]. Of the 10 patients with a HI, 3 were HI-1 and 7 were HI-2. Among the 5 PH patients, 2 were PH-1 and 3 were PH-2.

No significant differences in VEGF or endostatin baseline levels were found among patients with or without HT (VEGF: 61 versus 85 pg/ml $p = 0.13$ and endostatin: 119.7 versus 122.9 $p = 0.37$). However, patients with high VEGF concentrations prior to t-PA administration later had more extensive bleeding, (HI-1=48.33 pg/ml, HI-2=69.94 pg/ml, PH-1=81.38 pg/ml and PH-2=154.17 pg/ml) (Figure 4). This finding was not observed in the case of endostatin or endostatin/VEGF ratio.

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study showing that one angiostatic factor (plasma endostatin) is over-expressed after acute human cardioembolic stroke, together with angiogenic factors such as VEGF. Our results also show that baseline angiogenesis balance predicts neurological improvement during the acute phase of ischemic stroke. Angiostatic shift seems deleterious,

whereas angiogenic predominance is related to neurological improvement. However, we should not rule out the possibility that the opening of the BBB necessary for the angiogenesis process facilitates brain bleeding induced by t-PA.

Profile of angiogenic and angiostatic factors expression

Several studies in animal models of cerebral ischemia have shown an over-expression of molecules such as VEGF, basic FGF, PDGF, angiopoietin-1, etc.,¹⁹⁻²¹ that stimulate angiogenesis and arteriogenesis to increase cerebral blood flow into the ischemic area.²² Moreover, a protein over-expression of angiostatic factors that participate in angiogenesis modulation have also been demonstrated.¹¹ Our results confirm the existence of an immediate response to ischemia where both VEGF and endostatin are over-expressed. Previous studies in

stroke patients have explored later time points,⁸ therefore we may add new temporal information because the angiogenesis response starts very early (within 3 hours after ischemia). In consonance with our temporal data, a study using gene array technology demonstrated that 1h post-ischemia, more than 40 angiogenesis-related genes are up-regulated. Interestingly, angiostatic factors (thrombospondins) were up-regulated in addition to angiogenic factors.⁵ Another study in rats evaluated angiostatic factor expression,¹¹ finding a thrombospondin-1 peak within the first 4 hours of focal ischemia-reperfusion, followed by subsequent thrombospondin-2 expression that probably contributes to the spontaneous resolution of post-ischemic angiogenesis. In our study the angiogenic-angiostatic response still continues 24 hours after stroke onset. From 24h onward, another study has shown that VEGF concentration peaked 7 days after stroke and was still elevated

Table 1. Main baseline characteristics of stroke patients. Values are n (%), mean \pm SD or median (interquartile range). NIHSS: National Institutes of Health Stroke Score; CT: computed tomography; SBP: systolic blood pressure; DBP: diastolic blood pressure

Variable	Value
Age, years	70.05 \pm 10.63
Sex, male	16 (39.0%)
Hypertension	26 (68.4%)
Diabetes mellitus	9 (23.7%)
Dyslipidemia	10 (24.4%)
Previous stroke	4 (11.4%)
NIHSS score	17 (13-19)
Proximal occlusion	27 (65.9%)
Early signs on CT	23 (57.5%)
SBP, mmHg	154.8 \pm 21.7
DBP, mmHg	82.9 \pm 12.9

Table 2. Correlation study between angiogenesis biomarkers and neurological scales at different time points. The ratio indicates endostatin/VEGF balance. Significant correlations are shown in bold

	Baseline NIHSS	NIHSS 12 h.	NIHSS 24 h.	NIHSS 48 h.	Rankin
Baseline VEGF	r= -0.219 p= 0.213	r= -0.327 p= 0.068	r= -0.205 p= 0.277	r= -0.202 p= 0.294	r= -0.265 p= 0.123
VEGF 12 h.	r= 0.226 p= 0.186	r= -0.014 p= 0.937	r= 0.149 p= 0.400	r= 0.171 p= 0.343	r= -0.031 p= 0.859
VEGF 24 h.	r= -0.164 p= 0.363	r= 0.074 p= 0.681	r= 0.178 p= 0.338	r= 0.187 p= 0.322	r= 0.088 p= 0.627
Baseline Endostatin	r= -0.039 p= 0.826	r= 0.245 p= 0.177	r= 0.422 p= 0.020	r= 0.398 p= 0.032	r= 0.357 p= 0.035
Endostatin 12 h.	r= 0.096 p= 0.577	r= 0.348 p= 0.037	r= 0.426 p= 0.012	r= 0.421 p= 0.015	r= 0.232 p= 0.172
Endostatin 24 h.	r= 0.063 p= 0.729	r= 0.192 p= 0.283	r= 0.204 p= 0.270	r= 0.218 p= 0.246	r= 0.09 p= 0.585
Baseline Ratio	r= 0.167 p= 0.344	r= 0.458 p= 0.008	r= 0.399 p= 0.029	r= 0.397 p= 0.033	r= 0.391 p= 0.020
Ratio 12 h.	r= -0.187 p= 0.276	r= 0.088 p= 0.609	r= -0.004 p= 0.981	r= -0.028 p= 0.875	r= 0.087 p= 0.612
Ratio 24 h.	r= 0.245 p= 0.169	r= 0.041 p= 0.821	r= -0.063 p= 0.736	r= -0.04 p= 0.799	r= 0.018 p= 0.923

after 14 days.⁸ Increases in the expression of VEGF and VEGF receptors at the infarct border between 2 to 28 days after ischemia coincide with the time and distribution of neovascularization in ischemic brain, suggesting that these angiogenic growth factors are temporally and spatially correlated with angiogenesis.¹⁰

Post-stroke angiogenesis profiles may also vary, depending on the cellular response to ischemia, because other studies have shown that macrophages, neurons, glial and endothelial cells chronologically expressed VEGF immunoreactivity in a different fashion.²³

Post-stroke angiogenesis balance: beneficial or harmful?

Along with this initial over-expression of both angiogenic and angiostatic factors, we found that the extent of both endostatin and VEGF expression might be related to stroke outcome. Patients with neurological improvement after stroke had the lowest baseline endostatin levels, and patients who survived during the study tended to have higher baseline VEGF than those who died. Therefore, neutralization of baseline endostatin might be as important as increasing VEGF if angiogenesis needs to be therapeutically up-regulated.^{24,25}

Figure 1. VEGF and endostatin temporal profiles during the acute phase of stroke. The discontinuous line indicates the highest normal range for healthy controls (<27.4 pg/ml for VEGF and 8.4-58.9 ng/ml for endostatin). (*) indicates a significant decrease between baseline and 24h VEGF level ($p=0.017$).

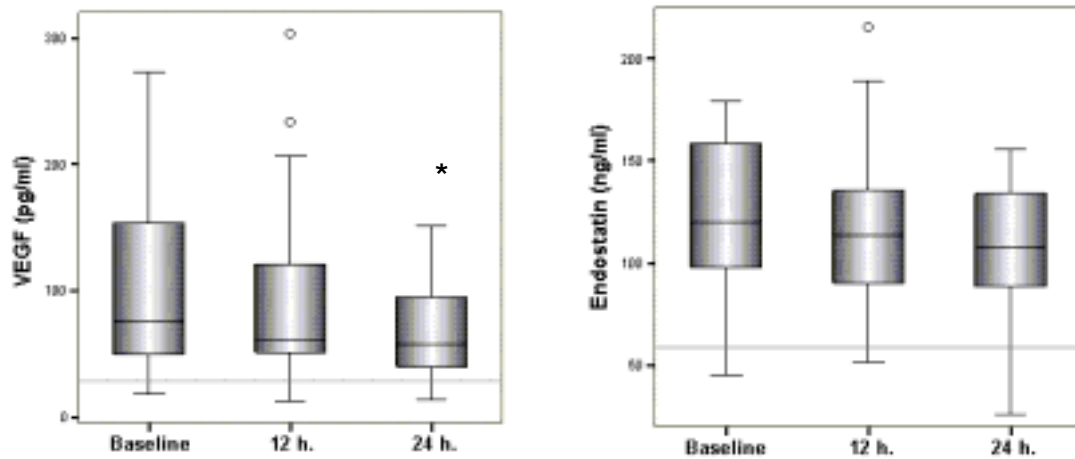


Figure 2. Correlation between angiogenesis balance ratio (endostatin/VEGF) and the NIHSS score obtained at 12h after stroke onset.

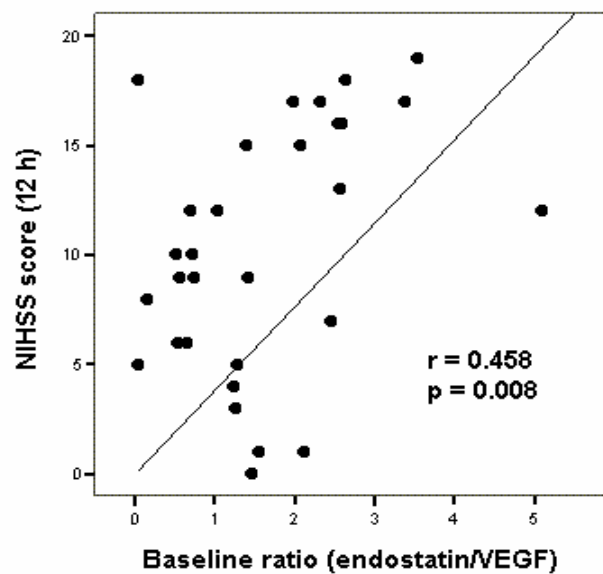


Figure 3. Differences in endostatin level according to neurological outcome. White bars represent patients who improve and black bars those who did not improve during the first 48h following stroke onset (baseline $p=0.037$, 12h $p=0.019$ and 24h $p=0.46$).

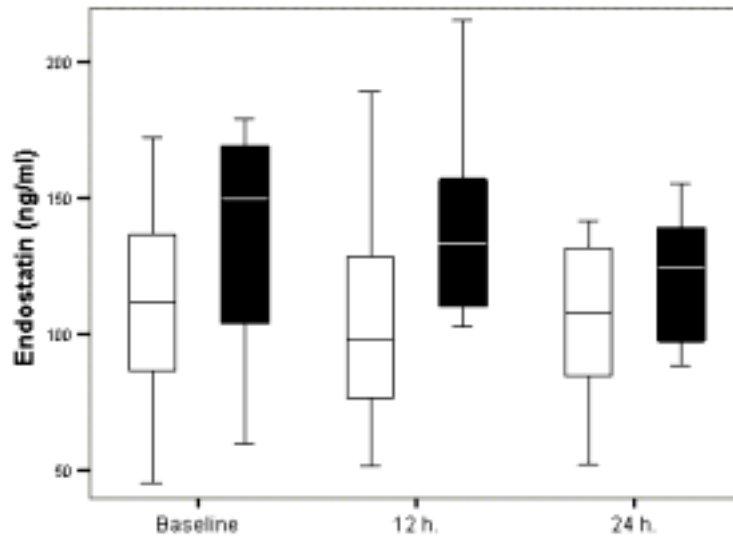
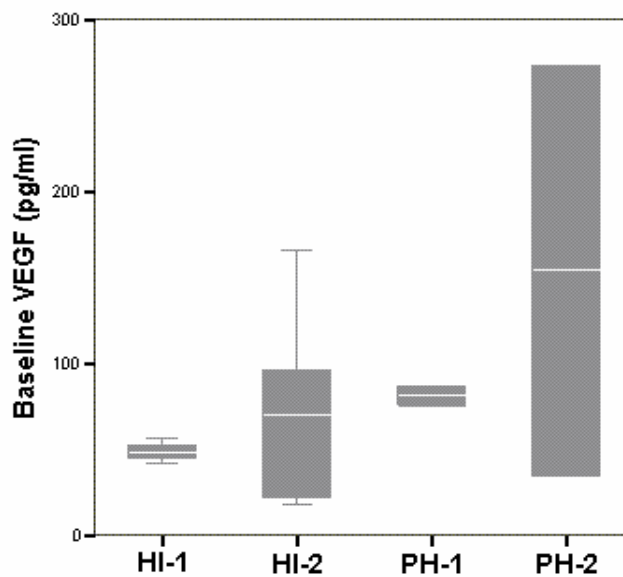


Figure 4. Correlation of baseline VEGF with CT-based HT subtypes. A graded response was observed between larger bleeding volumes and an increase in VEGF levels.



Apart from inhibiting EC migration, endostatin induces apoptosis by antiapoptotic protein down-regulation,^{4,26} a mechanism that could contribute not only to inhibiting angiogenesis, but also to a direct deleterious effect caused by an increase in neuronal apoptosis in some areas.

The idea that angiogenesis occurs as a result of a molecular balance seems to be confirmed by our results, as the ratio between endostatin and VEGF is a better reflection than either molecule alone of the neurological situation of stroke patients.

An important point yet to be resolved is the usefulness of new vessel formation immediately after an acute ischemic stroke. The classical hypotheses assume that angiogenesis is a mechanism activated to regenerate brain tissue damage and that new vessel formation is necessary to increase blood flow in injured areas. However, an alternative hypothesis, which proposes that synthesized microvessels are needed for macrophage infiltration for the destruction and removal of necrotic tissue, has been recently proposed.²⁷

This two-fold effect of angiogenesis has also been suggested for VEGF. During the sprouting phase, vessels increase their permeability²⁸ and BBB is momentarily disrupted to allow EC migration, a situation that involves a bleeding risk.¹⁰ In fact, we found very high VEGF levels in patients who later developed extensive HT. Others, by introducing VEGF-overexpressing glioblastoma cells into the brain, have established a reproducible and predictable *in vivo* model of tumor-associated intracerebral hemorrhage.²⁹ Side effects of VEGF have also been suggested through pharmacological blocking, because VEGF antagonism reduces ischemia/reperfusion-related brain edema.³⁰

In angiogenesis, both sprouting and maturation require extracellular matrix remodeling, which

involves matrix metalloproteinases.^{31,32} We recently found a strong correlation between MMP-9 levels and intracranial hemorrhagic complications,¹⁴ and others have shown clear correlations between VEGF and MMP-9 levels.³³ Therefore a collateral side effect of the angiogenesis process may be the risk of HT, particularly if t-PA is given. The question of whether or not treatments aimed at stimulating angiogenesis should be given several hours after thrombolytics remains to be answered. Current data indicate that delayed, but not early, post-ischemic administration of VEGF improved neurological recovery after stroke.¹⁰

Therefore, we may hypothesize that angiogenesis-induced benefits might depend on temporal and topographic expression patterns. In ischemic areas of penumbra where tissue can be recovered, angiogenesis should be beneficial,^{3,22,24} whereas vascular leakage in tissues where no regeneration can occur might increase damage. Future combination studies to assess angiogenesis biomarkers through multimodal magnetic resonance imaging may address these issues.

Study limitations

Our target time period consisted of the hyperacute stroke phase around t-PA treatment, and therefore we did not explore later time points where angiostatic factors have never been studied. In addition to endostatin, other inhibitors such as angiostatin –a plasminogen fraction that could play a pivotal role in therapeutic thrombolysis– might provide insight into angiogenesis modulation.³⁴ The small sample size may limit the analysis of HT subtypes. This fact precludes to demonstrate that VEGF is really involved in the BBB opening possibly responsible for t-PA induced brain bleeding.

CONCLUSION

VEGF and endostatin are over-expressed immediately after stroke, and an endogenous shift through angiogenesis inhibition is related to poor neurological outcome. We suggest that pharmacological modulation of angiogenesis balance within a carefully chosen time window could possibly be used in combined stroke therapy in the future.

Acknowledgments

Dr. Montaner is the recipient of a grant from the Instituto de Salud Carlos III for medical research training. This study was supported by a grant from the Spanish Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 02/0773) awarded by the Ministry of Health and Welfare. We would like to thank Pilar Bermudez, Dorita Quiroga and Anna Penalba for their technical assistance.

REFERENCES

- 1.- Marti H, Risau W. Angiogenesis in ischemic disease. *Thromb Haemost.* 1999;82:44-52.
- 2.- Pepper MS. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:605-619.
- 3.- Wei L, Erinjeri JP, Rovainen CM, Woolsey TA. Collateral growth and angiogenesis around cortical stroke. *Stroke.* 2001;32:2179-2184.
- 4.- Chavakis E, Dimmeler S. Regulation of endothelial cell survival and apoptosis during angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:887-893.
- 5.- Hayashi T, Noshita N, Sugawara T, Chan PH. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23:166-180.
- 6.- Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S, Wang JM. Role of angiogenesis in patients With cerebral ischemic stroke. *Stroke.* 1994; 25:1794-1798.
- 7.- Issa R, Krupinski J, Bujny T, Kumar S, Kaluza J, Kumar P. Vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, in human brain tissue after ischemic stroke. *Lab Invest.* 1999;79:417-425.
- 8.- Slevin M, Krupinski J, Slowik A, Kumar P, Szczudlik A, Gaffney J. Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β 1 in serum of patients with acute ischemic stroke. *Stroke.* 2000;31:1863-1870.
- 9.- Scheufler KM, Dreves J, van Velthoven V, Reusch P, Klisch J, Augustin HG, Zentner J, Marme D. Implications of vascular endothelial growth factor, sFlt-1, and sTie-2 in plasma, serum and cerebrospinal fluid during cerebral ischemia in man. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23:99-110.
- 10.- Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, Soltanian-Zadeh H, Morris D, Zhang R, Goussev A, Powers C, Yeich T, Chopp M.. Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22:379-392.
- 11.- Lin TN, Kim GM, Chen JJ, Cheung WM, He YY, Hsu CY. Differential regulation of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 after focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke.* 2003;34:177-186.
- 12.- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* 1997;88:277-285.
- 13.- Sasaki T, Fukai N, Mann K, Gohring W, Olsen BR, Timpl R. Structure, function and tissue forms of the C-terminal globular domain of collagen XVIII containing the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J.* 1998;17:4249-4256.

- 14.- Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribó M, Quintana M, Álvarez-Sabín J. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation*. 2003;107:598-603.
- 15.- Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Hoxter G, Mahagne MH, et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke: the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA*. 1995;274:1017-1025.
- 16.- Pessin M, del Zoppo G, Estol C. Thrombolytic agents in the treatment of stroke. *Clin Neuropharmacol*. 1990;13:271-289.
- 17.- Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd. Classification of subtype of acute ischemic stroke: definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*. 1993;24: 35-41.
- 18.- Brott TG, Haley EC, Levy DE, Barsan W, Broderick J, Sheppard GL, Spilker J, Kongable GL, Massey S, Reed R, et al. Urgent therapy for stroke, part I: pilot study of tissue plasminogen activator administered within 90 minutes. *Stroke*. 1992;23:632-640.
- 19.- Zhang ZG, Chopp M. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in focal cerebral ischemia. *Trends Cardiovasc Med*. 2002;12:62-66.
- 20.- Lin TN, Te J, Lee M, Sun GY, Hsu CY. Induction of basic fibroblast growth factor (bFGF) expression following focal cerebral ischemia. *Brain Res Mol Brain Res*. 1997;49:255-265.
- 21.- Krupinski J, Issa R, Bujny T, Slevin M, Kumar P, Kumar S, Kaluza J. A putative role for platelet-derived growth factor in angiogenesis and neuroprotection after ischemic stroke in humans. *Stroke*. 1997;28:564-573.
- 22.- Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, Risau W. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol*. 2000;156:965-976.
- 23.- Kovacs Z, Ikezaki K, Samoto K, Inamura T, Fukui M. VEGF and flt. Expression time kinetics in rat brain infarct. *Stroke*. 1996;27:1865-1872.
- 24.- Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest*. 2003;111:1843-1851.
- 25.- Yoshimura S, Morishita R, Hayashi K, Nakamura T, Ogihara T, Sakai N, Kaneda Y. Gene transfer of hepatocyte growth factor to subarachnoid space in cerebral hypoperfusion model. *Hypertension*. 2002;39:1028-1034.
- 26.- Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman M, Lu H, Knebelmann B, Segal M, Sukhatme V. Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem*. 1999; 274:11721-11726.
- 27.- Manoonkitiwongsa PS, Jackson-Friedman C, McMillan PJ, Schultz RL, Lyden PD. Angiogenesis after stroke is correlated with increased numbers of macrophages: the clean-up hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21:1223-1231.
- 28.- Schoch HJ, Fischer S, Marti HH. Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression causes vascular leakage in the brain. *Brain*. 2002;125:2549-2557.
- 29.- Cheng SY, Nagane M, Huang HS, Cavenee WK. Intracerebral tumor-associated hemorrhage caused by overexpression of the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF121 and VEGF165 but not VEGF189. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:12081-12087.
- 30.- van Bruggen N, Thibodeaux H, Palmer JT, Lee WP, Fu L, Cairns B, Tumas D, Gerlai R, Williams SP, van Lookeren Campagne M, Ferrara N. VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion

injury in the mouse brain. *J Clin Invest.* 1999;104:1613-1620.

31.- Pepper MS. Role of matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1104-1117.

32.- Heissig B, Hattori K, Friedrich M, Rafii S, Werb Z. Angiogenesis: vascular remodelling of the extracellular matrix involves metalloproteinases. *Curr Opin Hematol.* 2003;10:136-141.

33.- Munaut C, Noel A, Hougrand O, Foidart JM, Boniver J, Deprez M. Vascular endothelial growth factor expression correlates with matrix metalloproteinases MT1-MMP, MMP-2 and MMP-9 in human glioblastomas. *Int J Cancer.* 2003;106:848-855

34.- Matsunaga T, Weihrauch DW, Moniz MC, Tessmer J, Wartier DC, Chilian WM. Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide. *Circulation.* 2002;105:2185-2191.

5. DISCUSSIÓ DELS RESULTATS

5.1. Relació de les metal·loproteïnases i el creixement de l'infart.

El primer estudi, on es van valorar els nivells basals (pretractament) de diferents metal·loproteïnases i de dos dels seus inhibidors es demostra l'estreta relació entre dues d'elles, la MMP-9 (una gelatinasa) i la MMP-13 (una col·lagenasa), i el creixement de la lesió en difusió durant la fase aguda en pacients que van rebre tractament trombolític.

En un estudi previ es suggeria que la MMP-9 era un bon predictor de l'extensió de l'infart, tot i que la ressonància i l'extracció de sang es feien en les 6 primeres hores després de l'ictus (Montaner *et al.* 2003b). Dels models animals, sabem que la sobreexpressió que es produeix de MMP-9 després de la isquèmia està relacionada amb la degradació de components de la làmina basal i la matriu extracel·lular i en última instància amb l'extensió de l'infart (Planas *et al.*; 2001, Fukuda *et al.*;2004 i Wagner *et al.*; 2003).

Aquests resultats semblen indicar que els nivells tant de MMP-9 com de MMP-13 poden intervenir en el dany tissular post-isquèmia que fa incrementar l'extensió de la lesió inicial. Però això cal discutir-ho, ja que en aquest tipus d'estudis hi ha algunes associacions que podrien ser una simple conseqüència a la hipòxia i es fa difícil valorar el seu efecte directe sobre el dany tissular.

En relació amb aquest punt, és important recalcar que cap de les dues MMPs estaven relacionades amb la lesió inicial (volum en DWI), ni amb la severitat de l'ictus (valorat per la puntuació en l'escala NIHSS). A més, en analitzar les característiques basals (factors de risc i variables clíniques) que podrien associar-se a l'increment de la lesió, només el fet de tenir nivells elevats de MMP-9 i/o de MMP-13 estava clarament relacionat amb les lesions que creixien més.

Aquests resultats, i el fet que les mostres van ser obtingudes en la fase hiperaguda de l'ictus (dins de les primeres tres hores), ens fan pensar que, tot i que l'increment general d'aquestes MMPs s'indueixi pel procés d'isquèmia, hi ha certes diferències entre individus prou importants com perquè en les primeres hores puguin determinar de forma fatídica un creixement de l'infart en les hores següents, tot i rebre tractament trombolític.

Els resultats que fan referència a la MMP-9 són coincidents amb les investigacions prèvies que estableixen un rol deleteri de la MMP-9 en els models d'isquèmia (Mun-Bryce *et al.*;1998, Fujimura *et al.*;1999, Wagner *et al.*; 2003, Aoki *et al.*;2002 i Zalewska *et al.*;2002). I estudis més recents mostren la implicació d'altres metal·loproteïnases, com la MMP-3, en la degradació d'altres substrats com l'agrina en un model d'isquèmia/reperfusió (Solé *et al.*;2004).

Per tant, sembla que hi ha d'altres MMPs que podrien participar en el dany tissular, com suggereixen els resultats respecte la MMP-13. Aquest estudi és el primer en què es relaciona aquesta metal·loproteïnasa amb un efecte deleteri després de la isquèmia cerebral. El paper de la MMP-13 està ben establert en processos patològics com el càncer, on està considerada un bon marcador de progressió tumoral (Brinckerhoff *et al.*; 2000), o en la remodelació constant del teixit ossi que es dona en condicions fisiològiques (Stickens *et al.*;2004). En canvi, en l'actualitat no hi ha estudis en models animals d'isquèmia que valorin aquesta MMP.

Només un estudi previ havia intentat comparar els nivells de MMP-13 després de l'ictus amb un grup control, sense èxit, probablement a causa del rang de 12 hores en què s'obtenien les mostres de sang (Horstmann *et al.*; 2003).

En qualsevol cas, tot i que els resultats del present estudi indiquen una estreta relació amb el dany tissular, és necessari aprofundir en l'estudi d'aquesta metal·loproteïnasa en relació a la isquèmia cerebral: valorar la seva expressió en parènquima cerebral, analitzar el seu perfil temporal en la fase aguda i subaguda de l'ictus i, fins i tot, considerar possibles mecanismes d'activació de la MMP-9 mediat per la MMP-13 (Dreier *et al.*;2004).

Aquest estudi per si sol no ens permet determinar si els alts nivells en sang perifèrica d'aquestes dues MMP-9 són un reflex del que està passant en el parènquima encefàlic o bé participen activament en el dany tissular produint un increment en l'extensió de l'infart. En aquest segon cas, seria necessària una comunicació directa amb un intercanvi a través de la xarxa capil·lar entre les MMPs en sang perifèrica i el teixit cerebral d'aquestes proteases; però només la

combinació d'estudis *in vivo* amb l'obtenció de sang perifèrica, en un estudi més ampli, podrà aclarir-ho.

Sigui quina sigui la contribució de MMPs al teixit infartat i provingui d'on provingui, sembla que, tenint en compte tota la bibliografia publicada en relació als nivells en sang perifèrica de MMP-9, i d'acord amb els nostres resultats, aquesta molècula és un bon marcador del que està passant al parènquima cerebral.

5.2. Sobreexpressió *in vivo* de la MMP-9 en el core de l'infart.

El segon estudi ha aconseguit per primer cop valorar l'expressió, *in vivo*, de MMP-2 i MMP-9 en el parènquima cerebral en pacients amb un infart extens de l'ACM.

Fins ara, l'estudi del contingut de MMPs en el parènquima isquèmic i/o infartat s'havia realitzat sempre en teixit obtingut *post-mortem*, tant en models animals com en els dos estudis que han estat publicats en humans (Anthony *et al.*;1997 i Clark *et al.*;1997). Per tant, l'expressió *in vivo* de metal·loproteïnases i la seva regulació temporal en relació a l'evolució clínica d'un mateix individu, no s'havia realitzat mai. La implantació de catèters de microdialisi en l'hemisferi afectat ens va oferir l'oportunitat de valorar *in vivo* el contingut de diferents proteïnes i la seva evolució al llarg del temps.

L'únic estudi previ que ha utilitzat aquesta tècnica per determinar els nivells de gelatinases en rosegadors demostra un augment de la proforma de la MMP-9 en l'hemisferi ipsilateral en relació al contralateral (Planas *et al.*;2002).

En aquest treball, hem pogut estudiar dos casos que ens mostren un augment dels nivells de MMP-9 ja en el primer dia de l'ictus, que continua, tot i que decreixent, en els dies posteriors. És més, hem anat més enllà diferenciant entre zones immerses en el core de l'infart i zones situades a la perifèria, on hem trobat diferències en els nivells d'expressió: les mostres obtingudes del core presenten nivells més elevats de MMP-9.

El mal pronòstic d'aquests infarts, amb una evolució "maligna" i una alta taxa de mortalitat, fa que en aquests casos hàgim d'aplicar teràpies més agressives, com la cirurgia descompressiva (hemicraniectomia), per tal de reduir la pressió intracranial a causa del gran edema cerebral; o també la inducció d'hipotèrmia moderada, reduint la temperatura corporal a 32°C (Shwab *et al.*; 1998a i 1998b).

L'efecte d'aquestes teràpies en humans, sobre els nivells *in vivo* de les metal·loproteïnases en el parénquima cerebral, era desconegut fins ara.

En el present estudi, l'evolució clínica d'un dels pacients ens ha permès observar com el tractament hipotèrmic redueix els nivells de les dues gelatinases mentre que, quan s'inicia la fase de recalentament es produeix una immediata sobreexpressió que inclou formes actives de MMP-9 associada a un creixement de l'infart. Quin dels dos fenòmens succeeix primer, i si un és conseqüència de l'altre, són qüestions que s'hauran d'analitzar en futurs estudis que hauran d'aclarir si l'increment de MMP-9 en el teixit és la causa, en part, del creixement de la lesió o bé una conseqüència de la resposta inflamatòria.

Tot i que probablement els dos fenòmens s'activen i coincideixen en algun moment, la coincidència en el temps de l'increment de gelatinases amb el creixement de la lesió indica el paper deleteri i actiu que pot estar jugant la MMP-9, ja que la resposta inflamatòria es retarda unes hores després de la isquèmia.

En relació als nivells de MMP-2 i MMP-9 en sang perifèrica, els resultats mostren un clar augment transitori de les dues gelatinases després de la cirurgia descompressiva (en sincronia amb un augment també en el microdialitzat). Aquest fet demostra una relació estreta entre l'expressió *in situ* de MMPs i el reflex i/o contribució que es produeix en sang perifèrica.

Tot i que aquests resultats demostren per primer cop la producció i modulació *in vivo* dels nivells de MMP-2 i MMP-9 en teixit cerebral humà, és necessari realitzar estudis amb un nombre més gran d'individus que ens mostrin el perfil temporal i la modulació d'aquestes MMPs.

5.3. Les metal·loproteïnases com a biomarcadors.

Tant els resultats del primer com els del segon estudi, deixen entreoberta la possibilitat d'utilitzar algunes d'aquestes metal·loproteïnases com a biomarcadors en diferents fases de l'evolució de l'ictus, no només per a l'estudi de fenòmens fisiopatològics, sinó també com a eina de treball en la pràctica clínica.

En el primer estudi, tant la MMP-9 com la MMP-13 han resultat ser bons predictors de grans increments en el volum de l'infart a l'arribada a urgències del pacient abans de rebre cap tractament. En un estudi recent ja havíem suggerit el valor predictiu de la MMP-9 en relació a l'extensió de l'infart, tant en pacients tractats com en pacients no tractats amb rt-PA (Montaner *et al.*;2003b).

Tot i els demostrats beneficis de la teràpia trombolítica, sembla que hi ha certa variabilitat interindividual en els nivells de MMP-9 (però potser també d'altres MMPs com la MMP-13) que podrien estar determinant en les primeres hores d'isquèmia, al menys en part, el destí i evolució de la lesió de l'infart. És més, alguns estudis demostren que amb l'administració de rt-PA s'incrementen els nivells plasmàtics d'MMP-9 i de formes actives (Horstmann *et al.*;2003), i els nivells d'MMP-9 en el parènquima cerebral de models animals (Sumii *et al.*;2002 i Pfefferkorn *et al.*;2003); i que participarien activament en l'increment del dany tissular i el creixement de la lesió.

Sembla, doncs, que els beneficis de la teràpia trombolítica podrien estar contrarestats en alguns pacients pels efectes d'algunes MMPs sobre el dany tissular abans de rebre el tractament o posteriorment amb un augment de la seva activitat. Identificar aquests pacients i buscar nous tractaments per inhibir aquestes MMPs podria millorar l'eficàcia i la seguretat dels tractaments trombolítics actuals.

En el segon estudi, es mostra la possibilitat de valorar els nivells de MMP-2 i MMP-9 *in vivo*, combinant les tècniques de microdiàlisi cerebral i zimografia en gelatina. Tot i que es necessari realitzar més estudis *in vivo*, s'ha de contemplar la possibilitat d'utilitzar aquestes tècniques per valorar en cada moment l'evolució de

la lesió i les possibles complicacions que puguin esdevenir en funció dels nivells de MMPs en el mateix teixit afectat.

Tot i que les tècniques actuals de detecció de MMPs (zimografia, ELISAs o Protein Arrays) són molt sensibles i relativament ràpides i senzilles de fer, no són encara prou ràpides com per ser utilitzades en la pràctica clínica diària. Per tant, per poder utilitzar les MMPs com a biomarcadors, encara és necessària una tècnica que ens permeti avaluar en pocs minuts el contingut en una mostra (ja sigui de sang o de microdialitzat).

5.4. Sobreexpressió de MMP-9 en el core i en les zones de periinfart i perihematoma.

L'estudi de les diferents àrees de parènquima cerebral mostra una clara sobreexpressió de MMP-9 en el core de l'infart, tant de proformes com de formes actives, comparat amb els nivells de les zones periinfart i contralaterals.

A més, en les zones perifèriques de l'infart o de l'hematoma també hi ha un augment de MMP-9 comparat amb els nivells de l'hemisferi contralateral.

En tots els casos els nivells de MMP-2 van mantenir-se invariables, cosa que ens fa pensar que la possible contribució des de la sang perifèrica (a través de la barrera hematoencefàlica o per l'extravassació que produeix l'hematoma) no és significativa, ja que, en aquest cas, també s'haurien d'haver incrementat els nivells de MMP-2.

L'obtenció de teixit de dos controls que no havien patit cap malaltia neurològica ni inflamatòria va permetre comparar els nivells normals de les gelatinases amb els del grup de malalts que havien patit un ictus. Els resultats mostren que, tant en l'hemisferi contralateral dels ictus (en isquèmics i hemorràgics) com en el teixit control, hi ha una expressió basal tant de MMP-2 com de MMP-9 que és similar en els dos grups. Alguns treballs amb rosegadors també han mostrat aquesta mínima expressió de MMP-9 (Lee *et al.*; 2004), però en general, els models animals d'isquèmia cerebral només detecten com a gelatinasa constitutiva del teixit cerebral la MMP-2.

L'expressió basal de MMP-9 del nostre estudi pot estar originada per un efecte d'isquèmia cerebral global que es produeix inevitablement entre el moment de la mort i l'obtenció del teixit. Aquesta falta de perfusió, durant unes hores, pot ser la causa d'un petit increment en els nivells de MMP-9. En els models animals, no passa aquest període de temps ja que l'obtenció de teixit és immediata al moment del sacrifici de l'animal. Per tal d'aclarir aquest punt, seran necessaris estudis *in vivo* com els de microdiàlisi cerebral en l'hemisferi contralateral.

Aquests resultats, es van confirmar amb l'estudi per zimografia *in situ*, que ens va permetre valorar i localitzar al mateix temps l'activitat gelatinasa. Les mostres d'infart tenien més capacitat de degradar la gelatina i mostraven, doncs, un pic de fluorescència i intensitat, en l'anàlisi al microscopi, comparat amb les altres àrees. Estudis prèvis amb zimografia *in situ* en models animals, també havien demostrat un augment de l'activitat metal·loproteïnasa en l'hemisferi ipsilateral (Loy *et al.*; 2002 i Justicia *et al.*;2003).

La localització d'aquest senyal era clarament cel·lular (coincident en la contrastació amb DAPI), mentre que en les mostres d'infart també hi havia un clar senyal vascular tant en arterioles com en petits capil·lars (aquesta localització disminuïa en el periinfart i desapareixia en els contralaterals i controls). La contrastació amb DAPI també va demostrar la pèrdua de cel·lularitat en les àrees infartades i la presència en totes les àrees de cèl·lules que no expressaven activitat gelatinasa.

La limitació d'aquesta tècnica és que no ens permet determinar quina gelatinasa és responsable de la degradació del substrat amb gelatina. Sabem, però, que la major part del senyal és causada per una MMP, ja que inhibint l'activitat de les MMPs amb *1-10-phenanthroline* aconseguim minimitzar el senyal de fluorescència en totes les àrees. Però, tot i així, no podem concretar quina MMPs és responsable del senyal en cada cas.

La immunohistoquímica, en canvi, ens va permetre determinar, en cada una de les àrees, on es localitzava la MMP-9 que havíem vist sobreexpressada per zimografia.

Els resultats mostren una forta immunoreactivitat al voltant dels capil·lars en el teixit infartat associada a una infiltració de neutròfils perivasculars i, en menys quantitat, en les àrees de periinfart.

Tot i la poca cel·lularitat que presentava el parènquima infartat per la mort neuronal i al procés necròtic, diferents tipus cel·lulars eren immunoreactius per MMP-9, principalment les cèl·lules microgials activades i els neutròfils perivasculars, però també, encara que amb menys quantitat, neurones i alguns macròfags.

En les zones periinfart i perihematoma, la positivitat cel·lular microgial es mantenia mentre que la presència de MMP-9 vascular i perivascular es reduïa i es feia nul·la en les mostres de l'hemisferi contralateral i en el teixit control.

Les zones de periinfart estudiades no poden associar-se de forma definitiva a l'àrea de penombra, ja que no tenim dades radiològiques en el moment de l'èxitus que ens permetin assegurar-ho. Tot i això, és evident pels resultats obtinguts que en la perifèria de l'infart i de l'hematoma s'estan produint canvis moleculars associats al procés isquèmic i al dany tissular tot i que el procés necròtic encara no ha començat; això suggeriria que probablement la sobreexpressió de MMP-9 és prèvia a la mort cel·lular i que aquesta gelatinasa pot estar participant activament en l'expansió de l'infart durant les hores/dies següents a l'ictus.

En relació a l'increment de MMP-9 que hem trobat en el teixit perihematoma, un estudi recent en que s'indueix l'hemorràgia intracerebral per injecció directa de col·lagenasa en rosegadors, mostra també una sobreexpressió protèica, però també gènica, d'algunes metal·loproteïnases (entre elles la MMP-2, -9 i -12) en el teixit afectat (Power *et al.*;2003).

En l'estudi per zimografia, a part de les típiques bandes de MMP-2 i MMP-9, s'ha identificat una tercera banda de major pes molecular que seguia el patró d'expressió de la MMP-9. L'estudi de correlacions va confirmar aquesta relació, i per *western blot* es va identificar aquesta banda com un heterodímer de MMP-9 i TIMP-1 mentre que no apareixien formes lliures d'aquest inhibidor.

La formació d'aquest complex ha estat descrita en el sistema nerviós i en sang perifèrica (Crocker *et al.*;2004 i Pucci-Minafra *et al.*;2001), però, ni en treballs en parènquima humana (Clark *et al.*;1997), ni en estudis en models animals, on es realitzen les mateixes tècniques, no s'ha descrit fins ara.

La finalitat amb què es formen aquests heretodímers en el parènquima cerebral durant el procés isquèmic és encara desconeguda. Tot i això, els resultats obtinguts poden estar suggerint una resposta del sistema endogen d'inhibició de metal·loproteïnases paral·lel a la sobreexpressió d'aquestes. Si futurs estudis ho confirmen, es podria obrir una nova via de bloqueig de les MMPs des de la pròpia resposta a la isquèmia que podria donar lloc a plantejar noves teràpies. És més,

alguns estudis recents mostren el potencial teràpèutic del TIMP-1 ja que és capaç d'inhibir la mort neuronal per excitotoxicitat (Tan *et al.*;2003).

Respecte als models animals, tot i que intenten ajustar-se al model humà, poden, en alguns casos, no reconèixer mecanismes que poden ser característics d'altres espècies. Pel que fa a al treball en parènquima humà, cal dir que simplement no es menciona la presència de cap altra banda. Possiblement, en el moment en què es van realitzar aquests estudis, les tècniques no eren tan sensibles com ara; o bé podria ser que no se'ls donés el valor que poden tenir avui dia quan sabem la importància que pot tenir en l'evolució de la lesió tissular el fet d'inhibir les metal·loproteïnases.

5.5. MMP-9 i barrera hematoencefàlica

Com hem vist, el trencament de la barrera hematoencefàlica per degradació dels components de la làmina basal i l'augment de la permeabilitat amb infiltració de leucòcits i macròfags, és probablement un dels processos més importants en la resposta isquèmica (Hamann *et al.*;1995), que té com a conseqüències l'increment de l'edema vasogènic i els fenòmens hemorràgics derivats. Per tant, mantenir la seva integritat, almenys durant la fase hiperaguda/aguda, pot ser determinant en la millora del tractament de l'ictus.

En el cas dels malalts que reben tractament trombolític, protegir la integritat de la BHE requereix encara més esforços, ja que sabem que el rt-PA contribueix a debilitar-la, entre d'altres mecanismes per l'activació de MMPs (com la MMP-9) amb la formació de plasmina durant la lísi del coàgul.

Estudis en models animals demostren un augment de la permeabilitat vascular i un trencament de la BHE en els grups de animals tractats amb rt-PA associat a un augment de MMP-9 (Pfefferkorn *et al.*;2003 i Sumii *et al.*;2002) i que, inhibint aquesta MMP es manté la integritat de la BHE i es redueix el risc d'hemorràgies intracranials. També sabem que nivells més elevats de MMP-9, tant en pacients tractats amb rt-PA com en pacients no tractats amb rt-PA, es relacionen amb majors taxes de complicacions hemorràgiques i amb una major extensió d'aquestes (Montaner *et al.*;2001 i Montaner *et al.*;2003a).

L'estudi que s'ha realitzat en diferents àrees del parènquima cerebral de malalts que van morir durant la fase aguda ens demostra una clara immunoreactivitat de la MMP-9 i de l'activitat gelatinasa al voltant dels vasos/capil·lars sanguinis en les zones infartades, associada a una infiltració de neutròfils carregats de MMP-9.

Tot i això, són necessaris més estudis en humans en relació a quins substrats s'estan degradant i en quina mesura, i sobre la integritat directa de la BHE, que permetin valorar una teràpia dirigida a inhibir aquesta metal·loproteïnasa tal i com han demostrat ja alguns models animals en què es reduïa l'extensió de l'infart i el trencament de la BHE (Asahi *et al.*;2000 i Jiang *et al.*; 2001).

5.6. Perfil temporal del balanç angiogenèsic-angiostàtic

En aquest estudi, demostrem que tant el VEGF com l'endostatina estan sobreexpressats ja en la fase hiperaguda de l'ictus isquèmic, i que un balanç endogen cap a la inhibició de l'angiogènesi, es relaciona amb una mala evolució neurològica a curt i llarg termini.

Els resultats obtinguts mostren que el balanç angiogenèsic basal prediu l'evolució neurològica durant la fase aguda de l'ictus i també la funcionalitat a llarg termini: un balanç angiostàtic sembla deleteri, mentre que un balanç a favor de angiogènesi es relaciona amb una millor evolució neurològica. D'altra banda, podria ser que l'augment de permeabilitat de la barrera hematoencefàlica necessària per l'angiogènesi pogués relacionar-se amb les transformacions hemorràgiques induïdes pel rt-PA.

Els nostres resultats, confirmen la immediata resposta que es produeix després de la isquèmia, amb una sobreexpressió protèica tant del VEGF com de l'endostatina a nivell plasmàtic. Fins al moment actual, els estudis realitzats en pacients havien explorat la resposta angiogenèsica en temps més tardans (Krupinski *et al.*;1994 i 1997, Slevin *et al.*;2000 i Scheufler *et al.*;2003). Per tant, aquest estudi aporta nova informació temporal i demostra que la resposta angiogenèsica a la isquèmia cerebral comença dins de les tres primeres hores de l'ictus tot i que pateix una posterior regulació.

D'acord amb els nostres resultats del perfil temporal dels 2 biomarcadors, un estudi utilitzant un model animal de ratolí i un *array* d'expressió gènica demostra que, només 1 hora post-isquèmia, més de 40 gens relacionats amb l'angiogènesi ja estan sobreexpressats (Hayashi *et al.*; 2003), tot i que es produeix una regulació posterior. Concretament, factors angiostàtics com la trombospondina-1 estaven sobreexpressats a més de molts d'altres factors promotors. Un altre estudi amb un model d'isquèmia en rata demostra que la trombospondina-1 fa un pic d'expressió gènica i protèica en les primeres 4 hores post-reperfusió, seguit d'un pic de trombospondina-2 que contribuiria a la maduració del procés angiogenèsic (Lin T *et al.*; 2003). Recentment, s'ha vist que en un grup de

pacients amb estenosis intracranials, els què presentaven nivells més elevats d'endostatina, en relació al VEGF, presentaven un major nombre d'estenosis i tenien un risc més elevat de recurrència en la aterosclerosi intracranial simptomàtica (Arenillas *et al.*; 2005)

En el nostre grup de pacients, la modulació angiogenèsica-angiostàtica continua 24 hores després de l'inici dels símptomes. Altres estudis, demostren que la modulació temporal d'angiogènesi continua, i que, al voltant de la setmana, es produeix un pic en la concentració de VEGF que es manté elevada als 15 dies (Slevin *et al.*; 2000). I d'altres, han demostrat també increments en l'expressió tant de VEGF com dels seus receptors, en la zona límit de l'infart entre 2 i 28 dies després de la isquèmia, coincidint amb un increment de la neovascularització a la zona i suggerint un altre cop una regulació espacial i temporal que es correlaciona amb l'angiogènesi (Zhang *et al.*; 2002).

5.7. L'angiogènesi en la fase aguda de l'ictus: ¿ beneficiosa o perjudicial?

En relació amb aquesta sobreexpressió inicial de les dues molècules, vam trobar una correlació entre els nivells de VEGF i endostatina i l'evolució neurològica després de l'ictus. Els pacients que tenien una bona evolució i milloraven, eren els que tenien nivells més baixos d'endostatina i els pacients que sobreviuen, durant el període d'estudi, eren els que presentaven uns nivells basals de VEGF més elevats. Per tant, sembla que neutralitzar o inhibir l'increment inicial d'endostatina podria ser tant o més important que augmentar els nivells de VEGF en el cas que una possible teràpia angiogènica estigués indicada. Així doncs, hem de tenir en compte una possible teràpia angiogènica ha de valorar també dianes terapèutiques angiostàtiques.

Un punt important, encara per resoldre, relacionat amb els efectes beneficiosos o no de l'angiogènesi, és la formació de nous vasos sanguinis, immadurs i inestables, en la fase aguda de l'ictus isquèmic. La hipòtesis més clàssica postula que l'angiogènesi és un mecanisme que s'activa amb la hipòxia per regenerar el teixit cerebral malmès. En aquesta situació és necessària la formació de nous vasos sanguinis que incrementin el flux sanguini en la zona afectada per tal d'aportar nutrients i oxigen. D'altra banda, hi ha hipòtesis alternatives més recents que suggereixen que la síntesi de nous vasos es produeix per facilitar l'entrada de macròfags, necessària per a la destrucció i eliminació del teixit necròtic (Manookitiwongsa *et al.*;2001).

En qualsevol cas, un possible efecte advers de l'angiogènesi, per l'efecte del VEGF, és l'aparició de transformacions hemorràgiques. Durant la fase d'*sprouting* els vasos incrementen la seva permeabilitat vascular i la barrera hematoencefàlica es troba momentàniament oberta per permetre la migració de les cèl·lules endotelials, situació que implica un risc d'extravassació del contingut hemàtic i per tant d'hemorràgia (Zhang *et al.*;2000 i Valable *et al.*;2005). La qual cosa suggereix bloquejar farmacològicament el VEGF per tal de reduir l'edema cerebral relacionat amb la reperfusió post-isquèmia. En relació amb això, en aquest estudi hem

observat que els pacients amb transformacions hemorràgiques més extenses presentaven una nivells basals més elevats de VEGF tot i que el reduït nombre de pacients amb complicacions hemorràgiques no ens permet establir una relació.

Unes altres molècules relacionades amb el risc de transformacions hemorràgiques són les metal·loproteïnases. Tant en la fase d'*sprouting* com en la de maduració, és necessària una remodelació de la matriu extracel·lular on aquestes proteases prenen gran protagonisme (Pepper MS;1997 i Heissig *et al.*;2003). Hem vist que, els nivells de MMP-9, tant en sang perifèrica com en teixit cerebral, es relacionen amb l'aparició de complicacions hemorràgiques intracranials (Montaner *et al.*;2001 i Laphack *et al.*;2000) i, recentment, s'entan demostrant importants correlacions entre els nivells de VEGF i MMP-9 relacionat amb el trencament de la barrera hematoencefàlica (Valable *et al.*;2005)

Per tant, un efecte col·lateral important en el procés d'angiogènesi post-isquèmia és el risc d'hemorràgies intracranials, que pren més importància en l'administració de rt-PA en la fase hiperaguda. Així doncs, respecte a la possible teràpia angiogenèsica després de l'ictus amb VEGF i amb l'administració de trombolítics com d'rt-PA, els nostres resultats indiquen que seria una teràpia passada la fase hiperaguda la que ajudaria a una millor recuperació neurològica després de l'ictus, mentre que en les primeres hores inhibir l'angiogènesi podria protegir el trencament de la barrera hematoencefàlica i reduir els fenòmens hemorràgics.

Tenint en compte que hem observat que els nivells elevats de VEGF es relacionen amb l'aparició de transformacions hemorràgiques més extenses, i que en la fase hiperaguda de l'ictus sabem que hi ha un augment de metal·loproteïnases de matriu relacionades també amb l'aparició de transformacions hemorràgiques, creiem aquesta és una altra raó de pes per regular l'expressió d'aquestes MMPs en la fase hiperaguda de l'ictus; especialment si el malalt ha de rebre un tractament trombolíctic.

Finalment, tot això ens duu a la conclusió que una modulació temporal adequada del procés, i d'algunes de les molècules implicades a nivell local, pot oferir noves

perspectives terapèutiques molt beneficioses, que en un futur podrien formar part d'una teràpia combinada en fase aguda de l'ictus isquèmic.

Tot i això, són necessaris futurs estudis on es valorin balanços angiogenèsics més complets, així com també valorar l'expressió de biomarcadors d'angiogènesi amb imatges de ressonància magnètica que ens mostrin l'estat en què es troba el teixit.

5.8. Implicacions directes dels resultats

Dels resultats obtinguts en aquests estudis, se'n deriven diferents implicacions :

- Consolidació de l'ús de la MMP-9 com a biomarcador i predictor de l'extensió de la lesió, de l'evolució neurològica, del creixement de l'infart o de l'aparició de complicacions hemorràgiques.
- Tal i com mostraven estudis en sang perifèrica, la microdiàlisi *in vivo* demostra una ràpida sobreexpressió de MMP-9 en el teixit infartat que es podria regular mitjançant tractaments com la hipotèrmia.
- La inhibició de la MMP-9 en la fase hiperaguda de l'ictus pot formar part d'una teràpia combinada per aturar el creixement tant de l'infart com de l'hematoma, però també per millorar l'eficàcia del tractament trombolíctic.
- S'ha de valorar l'activació de l'angiogènesi, sobretot en relació amb la sobreexpressió de metal·loproteïnases ja que, en la fase aguda, pot contribuir a augmentar les complicacions hemorràgiques secundàries al tractament trombolíctic.

6. CONCLUSIONS

1. En la fase hiperaguda de l'ictus isquèmic, els nivells plasmàtics d'MMP-9 i també d'MMP-13 es relacionen amb un increment de la lesió en difusió ja en les primeres 24 hores, essent predictors independents del creixement de l'infart en pacients que posteriorment es tracten amb rt-PA.
2. Els nivells tissulars de MMP-2 i MMP-9 monitoritzats *in vivo* per tècniques de microdiàlisi cerebral des de la fase hiperaguda de l'ictus, mostren que el contingut de MMP-9 és màxim en la fase més aguda i que és més elevat en el core que en l'àrea periinfart, decreixent amb el temps en les dues zones. La inducció de la hipotèrmia redueix els nivells tissulars de les dues gelatinases, mentre que, amb el recalentament, l'expansió de l'infart i la craniotomia descompressiva augmenten.
3. En el teixit cerebral, hi ha una sobreexpressió màxima de MMP-9 en el core de l'infart però també en les zones periinfart en relació a l'hemisferi contralateral. La producció de MMP-9 es localitza principalment a la zona vascular/perivascular associada a la infiltració de neutròfils carregats de MMP-9 i també en cèl·lules del teixit nerviós com la microglia, neurones i alguns macròfags. El teixit cerebral més immediat a l'hematoma intraparenquimatós (zona perihematoma) presenta també alts nivells de MMP-9.
4. La complexa modulació de l'angiogènesi, en el temps i en l'espai, és clau en la fase hiperaguda/aguda per tal de mantenir estable la barrera hematoencefàlica durant la resposta neuroinflamatòria i millorar la perfusió cerebral a mig-llarg termini. Promotors, inhibidors i diferents MMPs participen en el procés d'angiogènesi.
5. La producció de molècules pro- i anti-angiogenèsiques està incrementada en la fase hiperaguda de l'ictus. Nivells elevats d'endostatina es relacionen amb una pitjor evolució neurològica, mentre que nivells elevats de VEGF poden associar-se a l'aparició i extensió de complicacions hemorràgiques.

7. BIBLIOGRAFIA

A

Abilleira S, Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Castillo J, Alvarez-Sabin J (2003) Matrix metalloproteinase-9 concentration after spontaneous intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg* 99:65-70.

Akopov SE, Simonian NA, Gregorian GS. Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. *Stroke*.1996.;27:1739-17-43.

Alvarez-Sabín J, Delgado P, Abilleira S, Molina CA, Arenillas J, Ribó M, Santamarina E, Quintana M, Monasterio J, Montaner J.: Temporal Profile of Matrix Metalloproteinases and their inhibitors after Spontaneous Intracerebral Hemorrhage. Relationship to Clinical and Radiological Outcome. *Stroke*. 2004;35: 1316-22.

Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miller KM, Esiri MM, Perry VH. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1997;23:406-415.

Aoki T, Sumii T, Mori T, Wang X, Lo EH. Blood-brain barrier disruption and matrix metalloproteinase-9 expression during reperfusion injury: mechanical versus embolic focal ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke*. 2002;33:2711–2717.

Arenillas JF, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Rosell A, Molina CA, Rovira A, Ribo M, Sanchez E, Quintana M. Angiogenesis in symptomatic intracranial atherosclerosis: predominance of the inhibitor endostatin is related to a greater extent and risk of recurrence. *Stroke*. 2005;36:92-97.

Asahi M, Asahi K, Jung JC, del Zoppo GJ, Fini ME, Lo EH. Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20:1681-1689.

Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J neurosci*. 2001;21:7724 –7732.

B

Backstrom JR, Lim GP, Cullen MJ, Tokes ZA. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1–40). *J Neurosci*. 1996; 16:7910–7919.

Brew K, Dinakarpanthian D, Nagase HU. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochem Biophys Acta*. 2000;1477:267-283.

Brinckerhoff CE, Rutter JL, Benbow U. Interstitial collagenases as markers of tumor progression. *Clin Cancer Res*. 2000;6:4823–4830.

C

Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain I, Castillo J, Davalos A. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2003;34:40-46.

Chamorro A, Planas AM. Inflammation-mediated damage as a potential therapeutic target in acute ischemic stroke. *Ernst Schering Res Found Workshop*. 2004;47:185-204.

Chang DI, Hosomi N, Lucero J, Heo JH, Abumaiya T, Mazar AP, del Zoppo GJ. Activation systems for latent matrix metalloproteinase-2 are upregulated immediately after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003;23:1408-1419.

Clark AW, Krekoski CA, Bou SS, Chapman KR, Edwards DR. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett*. 1997;238:53-56.

Conant K, Haughey N, Nath A, St. Hillaire C, Gary DS, Pardo CA, Wahl LM, Bilak M, Milward E, Mattson MP. 2002. Matrix metalloproteinase-1 activates a pertussis toxin-sensitive signaling pathway that stimulates the release of matrix metalloproteinase-9. *J Neurochem* 82:885–893.

Crocker SJ, Pagenstecher A, Campbell IL. The TIMPs tango with MMPs and more in the central nervous system. 2004. *J Neurosci Res*;75:1-11.

Cunningham LA, Wetzel M, Rosenberg GA. Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia*. 2005;50:329-339.

D

Dreier R, Grassel S, Fuchs S, Schaumburger J, Bruckner P. Pro-MMP-9 is a specific macrophage product and is activated by osteoarthritic chondrocytes via MMP-3 or a MT1-MMP/MMP-13 cascade. *Exp Cell Res*. 2004;297:303–312.

F

Ferrer I, Fríguls B, Dalfó E, Justicia C, Planas AM. Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2003;29:472-481.

Frijns CJ, Kappelle LJ. Inflammatory cell adhesion molecules in ischemic cerebrovascular disease. *Stroke.* 2002;33:2115-22.

Fujimura M, Gasche Y, Morita-Fujimura Y, Massengale J, Kawase M, Chan PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res.* 1999;842:92–100.

Fukuda S, Fini CA, Mabuchi T, Koziol JA, Eggleston LL Jr., del Zoppo GJ. Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. *Stroke.* 2004;35:998 –1004.

G

Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin JC, Kawase M, Massengale J, Chan PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19: 1020–1028.

Gasche Y, Copin JC, Sugawara T, Fujimura M, Chan PH (2001) Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *Cereb Blood Flow Metab* 21:1393-1400.

Gottschall PE, Deb S. Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons. *Neuroimmunomodulation.* 1996;3:69–75.

Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science.* 2002;297:1186-90.

H

Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Hoxter G, Mahagne MH, et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke: the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA.* 1995;274:1017-1025.

Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo GJ. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke.* 1995;26:2120 –2126.

Hahn-Dantona E, Ruiz JF, Bornstein P, Strickland DK. The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *J Biol Chem.* 2001; 276:15498-15503.

Hayashi T., Noshita N., Sugawara. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23:166-180.

Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:624–633.

Heissig B, Hattori K, Friedrich M, Rafii S, Werb Z. Angiogenesis: vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases. *Curr Opin Hematol* 2003;10: 136-141.

Horstmann S, Kalb P, Koziol J, Gardner H, Wagner S. Profiles of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and laminin in stroke patients: influence of different therapies. *Stroke.* 2003;34:2165–2170.

J

Jiang X, Namura S, Nagata I. Matrix metalloproteinase inhibitor B-R7785 attenuates brain damage resulting from permanent focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett.* 2001;305:41– 44.

Justicia C, Panes J, Sole S, Cervera A, Deulofeu R, Chamorro A, Planas AM. Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23:1430-1440.

K

Kolev K, Skopal J, Simon L, Csonka E, Machovich R, Nagy Z. Matrix metalloproteinase-9 expression in post-hypoxic human brain capillary endothelial cells: H₂O₂ as a trigger and NfκB as a signal transducer. *Thromb Haemost.* 2003; 90:528–537.

Krupinski J., Kaluza J., Kumar S Wang JM. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke.* 1994; 25:1794-8.

Krupinski J, Issa R, Bujny T, Slevin M, Kumar P, Kumar S et al. A Putative role for platelet-derived growth factor in angiogenesis and neuroprotection after ischemic stroke in humans. *Stroke.* 1997;28:564-573.

L

Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke*. 2000;1:3034-40.

Lee WJ, Shin CY, Yoo BK, Ryu JR, Choi EY, Cheong JH, Ryu JH, Ko KH. Induction of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in lipopolysaccharide-stimulated primary astrocytes is mediated by extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (Erk1/2). *Glia*. 2003;41:15–24.

Lee SR, Tsuji K, Lee SR, Lo EH. Role of matrix metalloproteinases in delayed neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *J Neurosci*. 2004;24:671– 678.

Lin T, Kim GM, Chen JJ, Cheung WM, He YY, Hsu CY. Differential regulation of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 after focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke*. 2003;34: 177-186.

Linjen HR. Plasmin and metalloproteinases in vascular remodeling. *Thromb Haemost*. 2001;86:324-33.

Lo EH, Broderick JP, Moskowitz MA. tPA and proteolysis in the neurovascular unit. *Stroke*. 2004;35:354-6.

Loy M, Burggraf D, Martens KH, Liebetrau M, Wunderlich N, Bultemeier G, Nemori R, Hamann GF. A gelatin in situ-overlay technique localizes brain matrix metalloproteinase activity in experimental focal cerebral ischemia. *J Neurosci Methods*. 2002;116:125-33.

M

Manoonkitiwongsa PS., Jackson-Friedman C., Millan PJ., Schultz RL., Lyden PD. Angiogenesis after stroke is correlated with increased numbers of macrophages: the clean-up hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21:1223-1231.

Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodelling. *Trends Genet*;6:121-125.

Mayer AM, Hall M, Fay MJ, Lamar P, Pearson C, Prozialeck WC, Lehmann VK, Jacobson PB, Romanic AM, Uz T, Manev H. Effect of a short-term in vitro exposure to the marine toxin domoic acid on viability, tumor necrosis factor-alpha, matrix metalloproteinase-9 and superoxide anion release by rat neonatal microglia. *BMC Pharmacol*. 2001;1:7.

Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina C, Angles A, Abilleira S, Arenillas J, Gonzalez MA, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke*. 2001a;32:1759-1766.

Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina CA, Angles A, Abilleira S, Arenillas JF, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke*. 2001b;32(12):2762-7.

Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribo M, Quintana M, Alvarez-Sabin J. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation*. 2003a;107:598–603.

Montaner J, Rovira A, Molina CA, Arenillas JF, Ribo M, Chacon P, Monasterio J, Alvarez-Sabin J. Plasmatic level of neuroinflammatory markers predict the extent of diffusion-weighted image lesions in hyperacute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003b;23:1403–1407.

Montaner J, Molina CA, Arenillas JF, Ribó M, Huertas R, Fernández-Cadenas I, Rosell A, Penalba A, Monasterio J, Alvarez-Sabín J. Proteolytic modifications on the metalloproteinase system (MMP-9-Laminin-TIMP-1) induced by t-PA treatment for acute cerebral ischemia in humans. *Stroke* 2004;35:339.

Mun-Bryce S, Rosenberg GA. Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. *Am J Physiol*. 1998;274:1203-11.

Murphy G. Matrix Metalloproteinases and their inhibitors. *Acta Orthop Escand*;66 (suppl 256):55-60.

N

The National Institutes of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 1995;333:1581-1587.

Nishizawa Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. *Life Sci*. 2001;69:369-81.

O

Obrenovitch TP. The ischemic penumbra: twenty years on. *Cerebrovascular and Brain Metabolism Reviews*. 1995:267-323.

Oh LY, Larsen PH, Krekoski CA, Edwards DR, Donovan F, Werb Z, Yong VW. Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is required for process outgrowth by oligodendrocytes. *J Neurosci*. 1999;19:8464–8475.

Okamoto T, Akaike T, Sawa T, Miyamoto Y, van der Vliet A, Maeda H (2001) Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathion via disulfide S-oxide formation. *J Biol Chem* 276:29596-29602.

P

Pepper MS. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler Throm Vasc Biol*. 1997; 17: 605-619.

Pepper MS. Role of matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Throm Vasc Biol*. 2001;21:1104-1117.

Pessin M, del Zoppo G, Estol C. Thrombolytic agents in the treatment of stroke. *Clin Neuropharmacol*. 1990;13:271-289.

Pfefferkorn T, Rosenberg GA. Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rtPA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke*. 2003;34:2025–2030.

Planas AM, Sole S, Justicia C, Farre ER. Estimation of gelatinase content in rat brain: effect of focal ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;278:803– 807.

Planas AM, Sole S, Justicia C. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis*. 2001;8:834–846.

Planas AM, Justicia C, Sole S, Friguls B, Cervera A, Adell A, Chamorro A. Certain forms of matrix metalloproteinase-9 accumulate in the extracellular space after microdialysis probe implantation and middle cerebral artery occlusion/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22:918-925.

Power C, Henry S, Del Bigio MR, Larsen PH, Corbett D, Imai Y, Yong VW, Peeling J. Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases. *Ann Neurol* 2003;53:731-742.

Pucci-Minafra I, Minafra S, La Rocca G, Barranca M, Fontana S, Alaimo G, Okada Y (2001) Zymographic analysis of circulating and tissue forms of colon carcinoma gelatinase A

(MMP-2) and B (MMP-9) separated by mono- and two-dimensional electrophoresis. *Matrix Biol* 20:419-427.

R

Rivera S, Tremblay E, Timsit S, Canals O, Ben-Ari Y, Khrestchatisky M. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) is differentially induced in neurons and astrocytes after seizures: evidence for developmental, immediate early gene, and lesion response. *J Neurosci*. 1997;17:4223-35.

Rivera S, Ogier C, Jourquin J, Timsit S, Szklarczyk AW, Miller K, Gearing AJ, Kaczmarek L, Khrestchatisky M. Gelatinase B and TIMP-1 are regulated in a cell- and time-dependent manner in association with neuronal death and glial reactivity after global forebrain ischemia. *Eur J Neurosci*. 2002; 15:19-32.

Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke*. 1998;29:1020 –1030.

Rosenberg GA, Kornfeld M, Estrada E, Kelley RO, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain barrier by type IV collagenase. *Brain Res*. 1992;576:203-207.

Rosenberg GA, Dencoff JE, Mc Guire PG, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Injury-induced 92kDa gelatinase and urokinase expression in rat brain. *Lab Invest*. 1994;71:417-422.

Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16:360 –366.

Rosenberg GA, Cunningham LA, Wallace J, Alexander S Estrada EY, Grossetete M, Razhagi A, Miller K, Gearing A. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures. *Brain Res*. 2001;893:104-112.

Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia*. 2002;39:279-291.

S

Scheufler KM, Dreves J, van Velthoven V, Reusch P, Klisch J, Augustin HG et al. Implications of vascular endothelial growth factor, sFlt-1, and sTie-2 in plasma, serum and cerebrospinal fluid during cerebral ischemia in man. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23:99-110.

Schwab S, Steiner T, Aschoff A, Schwarz S, Steiner HH, Jansen O, Hacke W. Early hemicraniectomy in patients with complete middle cerebral artery infarction. *Stroke*. 1998a;29:1888-1893.

Schwab S, Schwarz S, Spranger M, Keller E, Bertram M, Hacke W. Moderate hypothermia in the treatment of patients with severe middle cerebral artery infarction. *Stroke*. 1998b;29:2461-2466.

Sharp FR, Lu A, Tang Y, Millhorn DE. Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20: 1011–1032.

Slevin M., Krupinski J., Slowik A. Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor- β 1 in serum of patients with acute ischemic stroke. *Stroke*. 2000; 31: 1863-1870.

Sole S, Petegnief V, Gorina R, Chamorro A, Planas AM. Activation of matrix metalloproteinase-3 and agrin cleavage in cerebral ischemia/reperfusion. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004;63:338 –349.

Stickens D, Behonick DJ, Ortega N, Heyer B, Hartenstein B, Yu Y, Fosang AJ, Schorpp-Kistner M, Angel P, Werb Z. Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development*. 2004;131:5883–5895.

Sumii T, Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke*. 2002 Mar;33(3):831-6.

Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA. EGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. : *J Clin Invest*. 2003.Jun;111(12):1843-51.

T

Tan HK, Heywood D, Ralph GS, Bienemann A, Baker AH, Uney JB (2003) Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 inhibits excitotoxic cell death in neurons. *Mol Cell Neurosci* 22:98-106.

V

Valable S, Montaner J, Bellail A, Berezowski V, Brillault J, Cecchelli R, Divoux D, Mackenzie ET, Bernaudin M, Roussel S, Petit E. VEGF-induced BBB permeability is associated with an MMP-9 activity increase in cerebral ischemia: both effects decreased by Ang-1. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005 May 18; [Epub ahead of print].

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.*2003;92:827-839.

W

Wagner S, Nagel S, Kluge B, Schwab S, Heiland S, Koziol J, Gardner H, Hacke W. Topographically graded postischemic presence of metalloproteinases is inhibited by hypothermia. *Brain Res.* 2003;984:63-75.

Wallace JA, Alexander S, Estrada EY, Hines C, Cunningham LA, Rosenberg GA. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 is associated with neuronal death in reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22:1303-1310.

Wang X, Lee SR, Arai K, Lee SR, Tsuji K, Rebeck GW, Lo EH. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med.* 2003 9(10):1313-1317.

Z

Zalewska T, Ziemka-Nalecz M, Sarnowska A, Domanska-Janik K. Involvement of MMPs in delayed neuronal death after global ischemia. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2002;62:53-61.

Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C, Bruggen N, Chopp M. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest.* 2000 Oct;106(7):829-38.

Zhang ZG, Zhang L, Tsang W. Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22:379-392.

Zhao H, Bernardo MM, Osenkowski P, Sohail A, Pei D, Nagase H, Kashiwagi M, Soloway PD, DeClerck YA, Fridman R. Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem.*2004; 279:8592-8601.

Zheng Z, Yenari MA. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurol Res.* 2004;884-892.

8. ANNEXOS

8.1. Acrònims i Abreviacions

ACM: Artèria Cerebral Mitja
ADN: Àcid Desoxiribonucleic
bFGF: de l'anglès basic Fibroblast Growth Factor
BHE: Barrera Hematoencefàlica
CBV: : de l'anglès Cerebral Blood Volume
DAPI: de l'anglès Diamidino-phnylindole
DWI: de l'anglès Diffusion Weighted Image
EDTA: de l'anglès Etilendiaminotetracetic
ELISA: de l'anglès Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
eNOS: de l'anglès endothelial Nitric Oxide Synthasa
FITC: de l'anglès Fluorescein Isohiocyanate
HGF: de l'anglès Hepatocyte Growth Factor
HIF-1 de l'anglès Hipoxia Inducible Factor
ICAM: : de l'anglès Intercellular Adhesion Molecule
IL- : interleuquina
LRP de l'anglès Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein
MCP-1: : de l'anglès Monocyte Chemoattractant Protein
MMP: de l'anglès Matrix Metalloproteinase
MT-MMP: de l'anglès Membrane-Type Matrix Metalloproteinase
NIHSS: : de l'anglès National Institutes of Health Stroke Scale
NMDA: : de l'anglès N-Metil-D-Aspartat
NO: de l'anglès Nitric Oxide
PDGF: de l'anglès Platelet Derived Growth Factor
PWI: : de l'anglès Perfusion Weighted Image
RM: Ressonància Magnètica
rt-PA: de l'anglès recombinant tissue Plasminogen Activator
TAC: Tomografia Axial Computeritzada
TGF: de l'anglès Transforming Growth Factor
TIMP: de l'anglès Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TNF: de l'anglès Tissue Necrotic Factor
TTP: de l'anglès Time-To –Peak
VCAM: de l'anglès Vacular Cell Adhesion Molecule
VEGF: de l'anglès Vascular Endothelial Growth Factor