

EL PAPEL DE LAS METALOPROTEINASAS DE
MATRIZ EN LA FASE AGUDA DEL
ICTUS ISQUÉMICO

Joan Montaner Villalonga

Tesis Doctoral

Departament de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

Hospital Universitario Vall d'Hebron

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

Universidad Autónoma de Barcelona

**EL PAPEL DE LAS METALOPROTEINASAS
DE MATRIZ EN LA FASE AGUDA DEL
ICTUS ISQUÉMICO**

Memoria para optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Joan Montaner Villalonga 2001

A la *Bis* de Sara.

Reflexiones

Prácticamente todo lo que conocemos sobre la cascada isquémica que se produce durante la fase aguda del ictus proviene de estudios de isquemia cerebral focal realizados en animales. En estos modelos se introduce por vía intravascular una sutura de nylon que ocluye la arteria cerebral media durante las horas que requiera el experimento y luego se puede retirar permitiendo la reperfusión del territorio cerebral infartado.

Para poder validar o trasladar al hombre hipótesis generadas en modelos animales hemos de acercarnos lo más posible a dichos modelos. Esta es la idea que intentamos acometer en esta serie de trabajos, al estudiar un grupo muy homogéneo de pacientes en los que un émbolo originado en el corazón se enclava en la arteria cerebral media y se recanaliza de forma espontánea. Podemos decir que se trata de un “modelo de isquemia cerebral focal permanente/transitoria en humanos”.

Afortunadamente, unos meses después de concluir con la recogida de muestras para éstos estudios, se aprobó el empleo de trombolíticos con uso compasivo y, desde entonces, ya no hemos de asistir impasibles a la recanalización espontánea sino que podemos contribuir de forma activa a que la arteria ocluida se abra.

La *Bis* es mi abuela “na caragol”, y Sara es su biznieta. Hace unos años la *Bis* tuvo un ictus y sigue recitando sus poemas pero con un habla escándida que sólo entendemos los de la familia. Espero que los resultados de esta Tesis y muchas más que saldrán de la Unidad Cerebrovascular de nuestro hospital ayuden a que Sara y su generación no dejen nunca de recitar poemas...

Agradecimientos

A mi familia en Cádiz, mis padres, hermanos y amigos, por traerme hasta aquí y mimarme cuando estoy allí.

A mi familia de Barcelona, porque trabajando en la Unidad he encontrado otros primos, hermanas, hermanos pequeños y mayores...

A mi compañera Mila, porque con ella hemos hecho una nueva familia.

A mis directores de Tesis:

El Dr. Alvarez-Sabín me ha transmitido la pasión por el ictus, con él empecé a escribir mis primeros artículos, a planear estos estudios, a diseñar un ensayo clínico y con él he jugado en las playas del Caribe.

Al Dr. Molina que con su ritmo acelerado mantiene vivos todos los experimentos que he puesto en marcha, con él he soñado en todo lo que podríamos hacer al volver de los congresos. Con él he empezado a sentir que hacemos algo por nuestros pacientes.

El Dr. Codina me presentó, explorando al enfermo, a los doctores Babinski, Mingazzini, Opalski... y eso me ha dado una dimensión histórica de la Neurología, necesaria para entender los cambios que la Unidad está protagonizando.

Al pensar en la gente que me ha ayudado, me doy cuenta de que el mundo está lleno de parejas maravillosas e interesantes, como Ramón y Juana, Jaume y Quim, Sonia y Jaume, Carlos y Juanito, Pepe y Milu, Jasone y Ana, Pilar y Gloria, Antoni y Pepe, Gloria y Juan, Raúl y Silvia, Manoli y Miguelito, Elisa y Juanmi, Antonio y Juani, Teresa y Jaume, Montse y Jaume...

INDICE

Dedicatoria	I
Reflexiones	II
Agradecimientos	III
Indice	IV
Abreviaturas	VI
1. Introducción	1
1.1 El ictus isquémico de etiología cardioembólica	4
1.1.1 La cascada isquémica	6
1.1.2 Recanalización espontánea	13
1.1.3 Transformación hemorrágica	15
1.2 Las metaloproteinasas de matriz	18
1.2.1 Su papel fisiológico y patológico	22
1.2.2 Su papel en la isquemia cerebral	23
1.2.2.1 Modelos animales de isquemia cerebral focal	24
1.2.2.2 Necropsias de ictus y metaloproteinasas	26
1.2.3 Metaloproteinasas e inflamación	27
2. Objetivos	29
3. Métodos	31
3.1 Selección de la población	32
3.2 Población estudiada	33
3.3 Doppler Transcraneal	34
3.4 Neuroimagen	35
3.5 Escalas neurológicas	37
3.6 Determinaciones de laboratorio	38
3.7 Esquema del Protocolo del estudio	39

4. Copia de las publicaciones	41
4.1 Artículo 1.	
<i>Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke. Temporal profile and relation to neurological impairment.</i>	42
4.2 Artículo 2.	
<i>Matrix metalloproteinase (MMP-9) expression is related to hemorrhagic transformation after human cardioembolic stroke.</i>	63
4.3 Artículo 3.	
<i>Correlación entre la expresión de citocinas proinflamatorias y metaloproteinasas de matriz en la fase aguda del ictus isquémico.</i>	83
5. Resumen de resultados y discusión	96
5.1 Expresión de metaloproteinasas tras el ictus isquémico en humanos	97
5.2 Perfil temporal en la expresión de metaloproteinasas tras el ictus	99
5.3 Relación entre metaloproteinasas y déficit neurológico	101
5.4 Relación entre metaloproteinasas y evolución neurológica	102
5.5 Relación entre metaloproteinasas y estado de la arteria cerebral media	103
5.6 Relación entre metaloproteinasas y volumen del infarto cerebral	104
5.7 Relación entre metaloproteinasas y transformación hemorrágica	105
5.8 Correlación entre metaloproteinasas y citocinas proinflamatorias	107
5.9 Implicaciones de los resultados	108
6. Conclusiones	109
7. Bibliografía	111

Abreviaturas

ACM, arteria cerebral media.

AMPA, ácido amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoazol propiónico, receptor de glutamato.

BHE, barrera hematoencefálica.

DTC, doppler transcraneal.

ELAM-1, del inglés *endothelial-leukocyte adhesion molecule-1*, selectina.

ELISA, del inglés *enzyme linked immunoabsorbant assay*.

FSC, flujo sanguíneo cerebral.

HI, del inglés *hemorrhagic infarction*.

HSP, del inglés *heat shock proteins*.

IC, infarto cerebral.

ICAM-1, del inglés *intercellular adhesion molecule-1*.

IEG, del inglés *immediate early genes*.

IL-1, interleukina 1, citocina proinflamatoria.

IL-6, interleukina 6, citocina proinflamatoria.

IL-8, interleukina 8, quimiocina para neutrófilos.

MCP-1, del inglés *monocyte chemoattractant protein*, quimiocina para monocitos

MEC, matriz extracelular.

MMP-2, del inglés *matrix metalloproteinase*, metaloproteínasa de matriz tipo 2.

MMP-9, del inglés *matrix metalloproteinase*, metaloproteínasa de matriz tipo 9.

NMDA, *N*-metil-D-aspartato, receptor de glutamato.

PCr, fosfocreatina.

PH, del inglés *parenchymal hemorrhage*.

PMN, polimorfonucleares, células de la serie blanca.

P-Selectina, selectina plaquetar.

RM, resonancia magnética.

TC-C, tomografía computarizada craneal.

TGF- β , del inglés *transforming growth factor*.

TH, transformación hemorrágica.

TIMP, del inglés *tissue inhibitor of metalloproteinases*.

TNF- α , del inglés *tumoral necrosis factor*, citocina proinflamatoria.

1. INTRODUCCIÓN

La patología cerebrovascular aguda o ictus es un trastorno, transitorio o permanente, en una zona del parénquima encefálico secundario a una alteración de los vasos sanguíneos encefálicos. Según la naturaleza de la lesión encefálica, se distinguen dos grandes tipos de ictus: isquémico y hemorrágico. El primero es debido a una falta de aporte sanguíneo a una determinada zona del parénquima encefálico, y el segundo a la rotura de un vaso con extravasación de sangre fuera del torrente vascular. Constituye uno de los problemas más importantes del sistema sanitario, tal como se puede deducir de las cifras que comentamos a continuación.

La incidencia anual de ictus es de 150-200 casos por cada 100.000 habitantes. Ello significa que en una ciudad como Barcelona cada día 10-12 personas van a sufrir por primera vez un ictus, lo que representa unos 4.000 nuevos ictus al año. En Cataluña ocurren unos 10.000 nuevos ictus al año y en España no menos de 80.000.

Si nos fijamos en la prevalencia, entre 500 y 600 personas por cada 100.000 habitantes han sufrido en uno u otro momento un ictus. Siguiendo con los ejemplos anteriores, la prevalencia en la ciudad de Barcelona es de unas 15.000 personas, en Cataluña 37.500 y en España 300.000. Ya que un número importante de ellas presentan secuelas neurológicas, representa la primera causa de incapacidad física en las personas adultas.

A pesar de la reducción de un 10-15% en el porcentaje de mortalidad observado en España durante la década 1985-1994 (Sartri *et al.*, 2000) el ictus es la primera causa de mortalidad por entidades específicas, representando el 11,5% del total de fallecimientos en nuestro país. Además, es la causa más importante de morbilidad e incapacidad a largo plazo y consume una parte importante del gasto sanitario.

El ictus isquémico, que representa un 85% de todos los ictus, acontece por una interrupción brusca del flujo sanguíneo cerebral (FSC) focal. En la mayoría de los casos es secundaria a una oclusión, embólica o trombótica, de una arteria de gran o mediano calibre. Otras causas de disminución del FSC son: oclusión de arterias perforantes, estenosis de arterias intracraneales con mala circulación colateral, arteritis, disección arterial, oclusión venosa, y anemia o hiperviscosidad importantes (Brott y Bogousslavsky, 2000).

Ante la magnitud de estas cifras se hace necesario profundizar en la fisiopatología de la isquemia cerebral, con el objetivo de desarrollar fármacos eficaces para la prevención y el tratamiento del ictus. Habitualmente los avances en el campo de la patología cerebrovascular provienen de la experimentación animal. Recientemente estamos asistiendo al continuo fracaso de fármacos neuroprotectores. Cuando trasladamos los resultados del laboratorio a la clínica humana encontramos una falta de eficacia de drogas que resultaron prometedoras en modelos de isquemia cerebral en animales. Creemos que es importante corroborar en humanos las hipótesis generadas en dichos modelos antes de lanzarnos a diseñar costosos ensayos clínicos.

1.1 El ictus isquémico de etiología cardioembólica

El ictus cardioembólico o embolia cerebral de origen cardíaco es la oclusión de una arteria cerebral por un émbolo procedente del corazón. Constituye la segunda causa de ictus isquémico tras la embolia arteria-arteria secundaria a aterosclerosis de las grandes arterias extracraneales (Alvarez-Sabín *et al.*, 1999). En la actualidad representa del 20% al 30% de todos los ictus isquémicos.

El émbolo se localiza preferentemente en las bifurcaciones arteriales, particularmente de la carótida interna (cerebral media y anterior), troncos superior o inferior de la cerebral media, basilar distal y cerebrales posteriores, zonas donde se produce una reducción súbita del diámetro de la luz arterial, lo que facilita que el émbolo se detenga.

A diferencia de los trombos formados localmente en lugares de estenosis ateroscleróticas previas, los émbolos están menos adheridos a la pared de los vasos y pueden, por mecanismos trombolíticos intrínsecos, fragmentarse y/o disolverse, desplazarse a arterias más distales y finalmente desaparecer en el plazo de horas o días. Los émbolos de origen cardíaco suelen tener un volumen superior a los de origen arterial, de ahí que a menudo den lugar a infartos de gran tamaño. La evolución de estos pacientes se relaciona con el lugar inicial de la oclusión arterial y el tiempo en el que ocurre la migración distal del émbolo.

Existen diversas cardiopatías potencialmente embolígenas, que suelen dividirse por su diferente abordaje diagnóstico-terapéutico en cardiopatías de alto y mediano riesgo de embolia.

Son de alto riesgo:

- Fibrilación auricular
- Estenosis mitral reumática
- Prótesis valvulares mecánicas
- Infarto de miocardio reciente
- Miocardiopatía dilatada
- Tumores cardíacos
- Endocarditis infecciosa.

La fibrilación auricular no valvular (FANV), entidad cada vez más frecuente y de alto riesgo para desarrollar un ictus, merece especial atención; un cambio de conducta entre la comunidad médica respecto a su manejo terapéutico supondría una reducción importante de la patología cerebrovascular cardioembólica, así como de la elevada morbimortalidad asociada con este subtipo de ictus.

La FANV es la más frecuente de las cardiopatías embolígenas, siendo responsable de más de la mitad de los ictus cardioembólicos. Afecta del 2% al 5% de los adultos mayores de 60 años, incrementándose hasta el 12% a 16% en los de más de 75 años. Se asocia con un incremento de ictus isquémico, que es de un 6% anual.

El ictus cardioembólico con frecuencia origina infartos cerebrales de tamaño importante, presenta elevadas tasas de recanalización espontánea y se asocia con transformación hemorrágica. Todo ello, lo convierte en el subtipo de ictus humano más parecido al de los modelos animales de isquemia focal transitoria/permanente.

1.1.1 La cascada isquémica

El ictus cardioembólico es el resultado de una obstrucción del flujo sanguíneo de un vaso cerebral (habitualmente la arteria cerebral media) por un trombo formado en el corazón. Si esta oclusión no se resuelve dentro de un periodo de tiempo muy corto la isquemia resultante producirá de una forma rápida un centro de tejido cerebral infartado (core del infarto) rodeado por otro hipóxico y potencialmente salvable (penumbra). En la zona de penumbra isquémica la electrofisiología neuronal no está comprometida y el flujo sanguíneo aún se mantiene por encima de niveles permisibles para la viabilidad neuronal. Si el flujo sanguíneo en esta zona de penumbra desciende por debajo de un nivel crítico y/o se exceden los requerimientos energéticos, la zona de infarto se expandirá inevitablemente. Los niveles de flujo sanguíneo son los que en última instancia determinarán el tamaño del infarto pues son los que proveen las condiciones esenciales para mantener la homeostasis energética celular.

Los eventos moleculares iniciados tras la isquemia focal pueden ser resumidos como una cascada tiempo-dependiente. Lo primero es una disminución en la producción de energía. El descenso en el flujo sanguíneo conlleva una reducción de fosfocreatina y, básicamente, de ATP; si la isquemia se prolonga, la deplección energética será suficiente para producir una grave alteración de las funciones celulares secundaria a la interrupción de los procesos ATP dependientes.

La disrupción de los gradientes iónicos a través de las membranas excitables (neuronales) y no excitables (gliales), debido a la pérdida de ATP, se caracteriza por una salida de potasio (K^+) de las células, despolarización celular y una entrada de sodio (Na^+), cloro (Cl^-) y calcio (Ca^{2+}) hacia el interior celular (Siesjö, 1992). El incremento de K^+ extracelular junto al

descenso del pH precede a los otros cambios iónicos. En esta fase, los depósitos de ATP se depleccionan de forma rápida y finalmente se producen cambios marcados en la conductancia iónica. Se postula que el incremento de K^+ puede alcanzar niveles suficientes para liberar neurotransmisores como el glutamato, que estimulará a los canales Na^+-Ca^{2+} acoplados al receptor NMDA; estos eventos conducirán al acúmulo de Na^+ , Cl^- y agua, produciendo edema citotóxico. De forma paralela el Ca^{2+} extracelular penetra en las células a través de los canales de Ca^{2+} , voltaje y receptor dependientes, aumentando el Ca^{2+} citosólico libre que produce sobrecarga del Ca^{2+} mitocondrial y un posterior compromiso de la producción de ATP. Las despolarizaciones transitorias inducidas por el K^+ extracelular pueden también contribuir a la expansión de la lesión neuronal. La despolarización periinfarto produce disrupción de los gradientes iónicos y liberación de transmisores asociado al acúmulo de Ca^{2+} libre en la célula; ello conduce a una extensa rotura de fosfolípidos, proteínas y ácidos nucleicos por la activación de fosfolipasas Ca^{2+} dependientes, proteasas y endonucleasas. La despolarización causa un incremento del Ca^{2+} intracelular y un incremento del glutamato extracelular.

El glutamato, un neurotransmisor excitador implicado en el daño neuronal isquémico, produce excitotoxicidad. El exceso de glutamato extracelular mata a las neuronas a través de un incremento de Ca^{2+} intracelular. Se piensa que la excitotoxicidad mediada por glutamato ocurre por una excesiva activación de los receptores sinápticos del glutamato, AMPA y NMDA. El canal del receptor NMDA conduce Na^+ y Ca^{2+} como hacen algunos canales del receptor AMPA. Los receptores AMPA también controlan la despolarización inicial de membrana causada por glutamato y afectan la apertura de los receptores NMDA. Los receptores AMPA y NMDA son dos dianas que actualmente están siendo testadas farmacológicamente.

El acúmulo de productos como los ácidos grasos libres (principalmente los insaturados) que son metabolizados en peróxidos lipídicos tóxicos (vía peroxidación lipídica) contribuyen a las alteraciones estructurales y funcionales de la membrana y de la función celular. Los radicales libres (un grupo de especies altamente reactivas de oxígeno) son generadas durante la isquemia y producen un considerable daño a los lípidos, DNA y proteínas y contribuyen al proceso de muerte neuronal. Los radicales libres también contribuyen a la rotura de la barrera hematoencefálica (BHE) y a la formación de edema cerebral. Los niveles de enzimas secuestradoras de radicales libres (superóxido dismutasa) disminuyen durante la isquemia y se elevan los niveles de óxido nítrico. El óxido nítrico generado principalmente por las isoformas neuronal e inducible de la óxido nítrico sintetasa promueve la lesión neuronal que ocurre después de la isquemia. La activación de proteasas citosólicas por el incremento del Ca^{2+} intracelular puede producir un desensamblaje del sistema de microtúbulos celulares y degradación proteolítica de proteínas estructurales y funcionales.

En resumen, la reducción del FSC produce una deplección de energía a niveles tan bajos que alteran la homeostasis iónica celular. Una consecuencia clave es el incremento de Ca^{2+} intracelular, responsable de la liberación de neurotransmisores y de la activación de numerosas enzimas. El glutamato ha sido señalado como el principal neurotransmisor excitotóxico liberado por la despolarización inducida tras la isquemia. Estos han sido los principales eventos consistentes sobre los que han focalizado su atención los científicos, durante las tres últimas décadas, en la investigación del ictus.

Uno de los problemas que supone el intento de modificar dichos acontecimientos es el hecho de que se producen en minutos desde que se ocluye la arteria cerebral. Por eso nuestro grupo ha centrado su atención en una serie de eventos que ocurren algo más tarde en la cascada

isquémica (horas); en la mayoría de los casos, ese es el momento en el que nos encontramos frente al paciente que acude a urgencias y por ello el intento de modificar dicha parte de la cascada parece más atractivo y realista. Buena parte de los procesos a los que nos referimos implica a los fenómenos inflamatorios postisquemia (Figura 1).

La respuesta inflamatoria tras el ictus isquémico ha sido estudiada de forma sistemática por varios investigadores (Barone *et al.*, 1999). Esta respuesta inflamatoria produce lesión neuronal secundaria y favorece la extensión del infarto cerebral. Se caracteriza por la expresión local de citocinas inflamatorias como el factor α de necrosis tumoral (TNF- α), o la interleukina-1 β (IL-1 β), que lleva a la liberación de citocinas quimiotácticas, sobrerregulación de moléculas de adhesión leucocitaria y conversión del endotelio local en un estado protrombótico. Estos cambios promueven el reclutamiento y la migración de neutrófilos y macrófagos a la zona de lesión tisular. La acumulación precoz de neutrófilos en el parénquima cerebral isquémico ha sido claramente demostrada mediante estudios histopatológicos (García y Kamijyo, 1974; Hallenbeck *et al.*, 1986; Dereski *et al.*, 1992 y Ritter *et al.*, 1998), bioquímicos (Barone *et al.*, 1991) y de marcaje de leucocitos con In¹¹¹ (Pozzilli *et al.*, 1985 y Dutka *et al.*, 1989).

En la microcirculación cerebral normal no existen células inflamatorias; por el contrario, la microcirculación de las zonas isquémicas se encuentra rellena de leucocitos y está rodeada de una zona de edema. Muchos de los leucocitos, principalmente neutrófilos, hallados en los vasos del tejido isquémico se encuentran adheridos al endotelio. Algunos de estos neutrófilos migran a través de las paredes vasculares hacia el parénquima cerebral isquémico. El daño cerebral se asocia con la expresión de mediadores de la inflamación como citocinas proinflamatorias (IL-1, TNF α ...), y quimiocinas (IL-8 para neutrófilos, MCP1 para

monocitos). La sobreexpresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, selectinas, integrinas CD11/CD18) mantiene la adhesión leucocitaria al endotelio (Feuerstein *et al.*, 1998).

Esta reacción inflamatoria no sólo contribuye a la peroxidación de lípidos de membrana sino que también incrementa la lesión tisular causada por los efectos reológicos de los leucocitos atrapados en la microcirculación (el "plugging" leucocitario interfiere con la perfusión microvascular normal en un lecho previamente comprometido por la isquemia) y por la liberación de productos citotóxicos de los leucocitos activados (generación y liberación de radicales de oxígeno...) (Del Zoppo *et al.*, 1991 y Grau *et al.*, 1992).

La naturaleza exacta de los mecanismos de señal implicados en la inflamación cerebral no se conoce totalmente, pero no hay duda acerca del papel que juegan ciertas piezas como son las citocinas proinflamatorias y quimiotácticas, así como la expresión de moléculas de adhesión y proteinasas. Conjuntamente, promueven el reclutamiento, adhesión celular y la posterior infiltración e incremento en la permeabilidad endotelial.

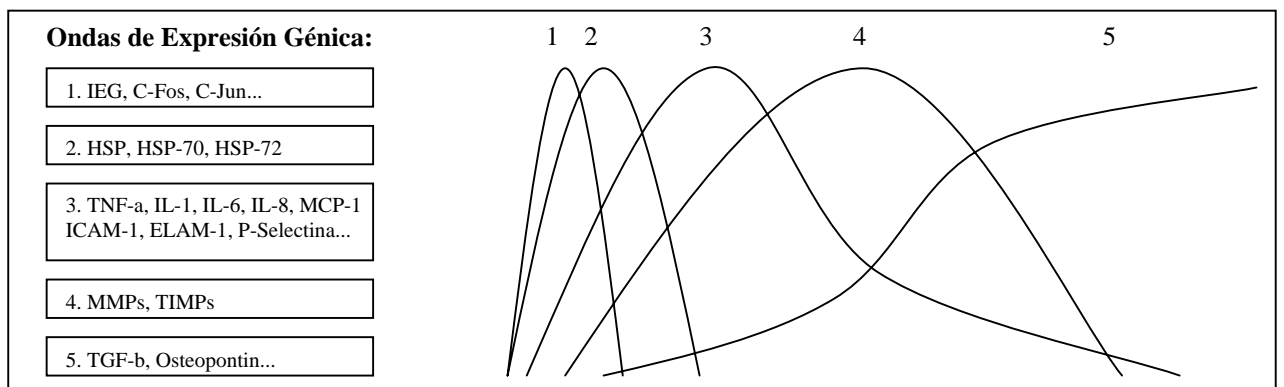
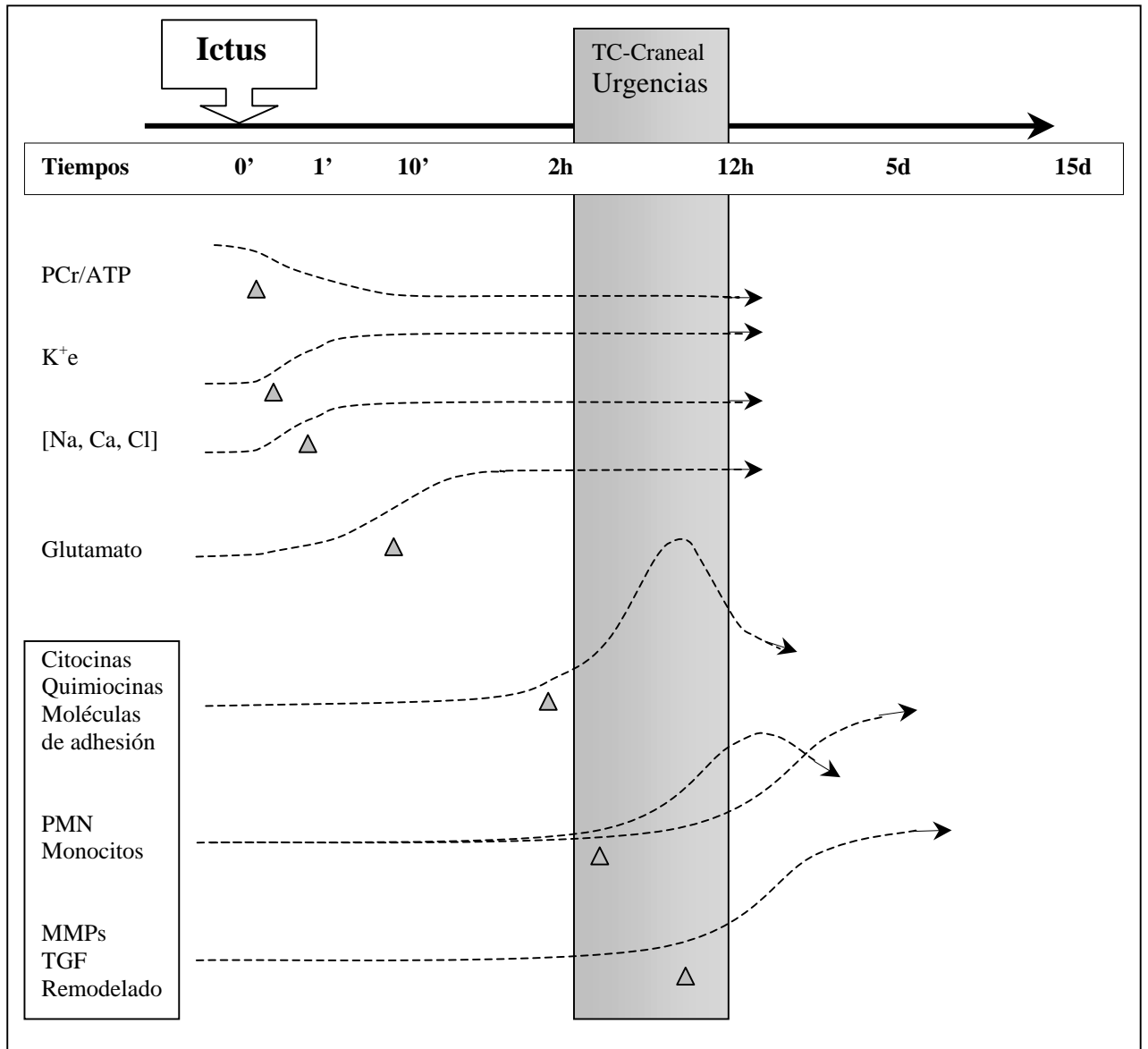
La cascada de expresión génica que ocurre tras el ictus (figura 1) es clave para la reacción inflamatoria que sigue al mismo. En primer lugar se produce una expresión transitoria de factores de transcripción (los genes de respuesta inmediata como c-fos, c-jun, zif 268, Jun-B...) (Uemura *et al.*, 1991 y Hsu *et al.*, 1993). Una segunda fase implica a las "heat shock proteins" cuyo mRNA se expresa dentro de la primera y segunda hora tras la isquemia (Nowak *et al.*, 1990 y Welsh *et al.*, 1992).

De gran interés es una tercera fase en la que se incrementa la expresión de genes para la producción de citocinas como las comentadas previamente (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-1ra, IL-8,

IP-10, MCP-1), que parecen jugar un papel en la infiltración por neutrófilos y células mononucleares (Liu *et al.*, 1993 y Wang *et al.*, 1995). Esta tercera fase comienza a la hora de producirse el ictus, siendo máxima alrededor de las doce horas y persistiendo hasta 2-5 días más tarde.

En una cuarta fase una nueva expresión de genes podría estar asociada a la reacción inflamatoria de la isquemia, incluyendo enzimas proteolíticas (metaloproteinasas) implicadas en el remodelado de la matriz extracelular y sus inhibidores endógenos (TIMPs). La expresión de estos genes en el ictus parece estar relacionada con el influjo de células inflamatorias y se asocia a la lesión neuronal secundaria y a los procesos de reparación tras el ictus (Wang *et al.*, 1998). En una quinta fase entran en juego mediadores como TGF β y osteopontina, relacionados con el remodelado tisular y otros que podrían contribuir a los fenómenos de plasticidad neuronal a largo plazo.

Figura 1. Cascada de eventos moleculares y genéticos tras la isquemia cerebral.



1.1.2 Recanalización espontánea

La embolia cerebral es por naturaleza un proceso dinámico. La extensión del infarto y la recuperación del paciente dependerán de la localización del émbolo (oclusión proximal o distal) y del tiempo que la oclusión de la arteria cerebral se mantenga. La recanalización espontánea es un fenómeno frecuente pero habitualmente tardío y no suele acompañarse de recuperación de la función neurológica. La recanalización depende del tamaño de la arteria ocluida y de la composición del coágulo.

Los estudios anatomopatológicos clásicos (Fisher y Adams, 1951) demostraron que el material embólico se fragmentaba desintegrándose, y migrando a través de la circulación arterial, llegando a menudo a desaparecer.

El sistema fibrinolítico endógeno puede acelerar este proceso. La incidencia real de recanalización espontánea es desconocida, debido al escaso número de estudios angiográficos. Realizar angiografías de forma repetida sería excesivamente agresivo en humanos y por ello, nuevas técnicas como el DTC y la angioRM han sustituido a la angiografía como procedimientos para verificar la recanalización espontánea o tras la administración de tratamientos trombolíticos.

En uno de los primeros estudios angiográficos Dalal et al. documentaron recanalización en un 47% de pacientes en los primeros cuatro días tras el ictus (Dalal *et al.*, 1965). Fieschi et al. estudiaron con angiografía 80 pacientes no tratados dentro de las primeras seis horas del ictus y hallaron una oclusión en el 76% de los pacientes. Un 73% de éstos mostraron recanalización al repetir la evaluación dentro de la primera semana (Fieschi *et al.*, 1989).

En un estudio de nuestro grupo aproximadamente el 72% de los pacientes con un ictus cardioembólico en territorio de la ACM, mostraron recanalización espontánea dentro de las primeras 48 horas (Molina *et al.*, 2001). Esta recanalización ocurría en menos de 6 horas en el 18,8% de los pacientes y tras las 6 horas en el 52,8% de los casos. Estas cifras coincidían con las de Ringelstein *et al.*, que también empleaban DTC para estudiar los fenómenos de recanalización espontánea (Ringelstein *et al.*, 1992).

Otro fenómeno estrechamente relacionado con la recanalización espontánea es la posibilidad de que ésta vaya seguida de un deterioro neurológico secundario (daño por reperfusión), cuando ocurre de forma tardía. Estas hipótesis, relacionadas en el modelo animal con generación de radicales libres y fenómenos inflamatorios, no han sido replicadas en el ser humano.

Ya que, tanto la duración como la severidad de la isquemia cerebral focal son importantes para determinar si ocurrirá o no el infarto, y si ocurre, cuánto, pensamos que la variable recanalización debe ser incluida en este tipo de estudios.

1.1.3 Transformación hemorrágica

Un *infarto hemorrágico* es aquel IC en el que se produce una extravasación de sangre en el interior del tejido isquémico provocada por la lisis de un émbolo (reperfusión) o por el aporte sanguíneo de arterias vecinas (red meningocortical). Estos cambios en el interior del IC se conocen como transformación hemorrágica (TH) y se presentan como un espectro en la intensidad y localización del sangrado que va desde el pequeño infarto hemorrágico (HI) petequiral, a la catastrófica hemorragia parenquimatosa (PH) con gran efecto de masa. La clasificación y definición de los mismos se comentan en el apartado Métodos.

La TH se ha asociado predominantemente con el ictus cardioembólico. En un estudio angiográfico, se encontraron infartos hemorrágicos en 45 (37,5%) de 120 pacientes con un ictus cardioembólico en comparación con sólo 2 (1,9%) de 105 pacientes con una trombosis cerebral (Yamaguchi *et al.*, 1984). En estudios anatomopatológicos el embolismo cerebral se ha asociado a TH en un 50-70% de los casos (Fisher y Adams, 1951; Jorgensen y Torvik, 1969).

El diagnóstico clínico de TH se basa principalmente en la neuroimagen, ya sea por TC o RM craneal. La sensibilidad limitada de la TC para detectar sangrados petequirales ligeros explica la menor incidencia de TH halladas en los estudios que emplean esta técnica, en comparación con las series autópsicas. La RM es más sensible que la TC en distinguir sangrados petequirales menores y explica la mayor incidencia de HT en los estudios mediante RM; en el 69% de los infartos cerebrales cardioembólicos se detecta la presencia de una TH cuando esta exploración se realiza durante las 3 primeras semanas del ictus (Hornig *et al.*, 1993). Sin embargo, la menor disponibilidad de RM en la fase aguda del ictus isquémico nos ha hecho

elegir la TC como técnica de elección de neuroimagen en nuestro estudio. La incidencia de TH en estudios que emplearon la TC para el estudio del parénquima encefálico en pacientes con infarto cerebral y no anticoagulados varía entre un 10% y un 43%. Los estudios que realizan TC seriados a lo largo de días o semanas en pacientes con embolismo cerebral encuentran una mayor incidencia de TH. Okada et al. hallan un espectro de sangrados intracraneales en 55 (40,7%) de 140 pacientes no tratados, incluyendo 12 (8,6%) pacientes con PHs de tamaño masivo (n=3) y pequeños o moderados (n=9) (Okada *et al.*, 1989). En el estudio de Hornig et al. hay un 43% de pacientes con TH dentro de las 4 primeras semanas desde el inicio del ictus, la mayoría en la 2ª semana (Hornig *et al.*, 1986).

Respecto al mecanismo de producción de las TH, clásicamente (Fisher y Adams, 1951) se ha postulado que la “migración del émbolo” es la responsable de los infartos hemorrágicos, basándose en las observaciones que demuestran que el material embólico frecuentemente fragmentado, migra distalmente, e incluso desaparece. Un estudio de nuestro grupo (Molina *et al.*, 2001) ha demostrado la relación de la TH con el momento de la recanalización espontánea. Por otra parte, la circulación colateral puede jugar un papel en algunos infartos hemorrágicos localizados principalmente en la periferia del infarto isquémico. Así, Ogata et al. reportaron 7 pacientes con TH en el territorio de una oclusión embólica persistente y sugirieron que el sangrado pudo originarse a partir de canales leptomeníngeos colaterales (Ogata *et al.*, 1989).

Otros factores relacionados con la presencia de TH son el tamaño del infarto (la TH es más prevalente en los infartos cerebrales grandes), la edad y la hiperglucemia. El papel de la elevación de la presión arterial en promover TH parece lógico, si bien no ha sido demostrado.

El deterioro clínico, tras la TH, ocurre en 0-11% de los casos, y en la mayoría de ellos no tiene efecto importante en la evolución (Hornig *et al.*, 1986; Hornig *et al.*, 1993 y Toni *et al.*, 1996). Sin embargo, la TH puede progresar hacia la formación de un hematoma franco (PH) con el consiguiente deterioro neurológico.

Además, algunos estudios han demostrado mayores tasas de TH en pacientes anticoagulados o tras recibir tratamiento trombolítico (Cerebral Embolism Study Group, 1987; Hacke *et al.*, 1995). Ya que en la actualidad ambos tratamientos son fundamentales para el manejo de la fase aguda y para la prevención secundaria del ictus isquémico cardioembólico, es necesario profundizar en el conocimiento de la fisiopatología de la TH.

En modelos de isquemia cerebral focal, se ha demostrado una relación entre la pérdida regional de la lámina basal y el desarrollo de TH (Hamman *et al.*, 1996). Como veremos en los siguientes apartados, las MMPs degradan los constituyentes más importantes de dicha lámina basal, por lo que podrían estar implicadas en la aparición de TH.

1.2 Las metaloproteinasas de matriz

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) son una familia de enzimas proteolíticas (Zn-dependientes) que se encargan del remodelado de la matriz extracelular (MEC) y que en conjunto pueden degradar todos los constituyentes de la misma.

La clasificación de esta familia de enzimas se ha ido modificando recientemente y aunque se tiende a agruparlas según la estructura en dominios de la proteína, el criterio empleado todavía es el que tiene en cuenta el sustrato sobre el que las MMPs actúan específicamente (Tabla 1). Actualmente se conocen seis subfamilias de MMPs: 1) las colagenasas, que degradan el colágeno del tejido conectivo; 2) las gelatinasas, que actúan sobre los colágenos tipo IV, V, VII y X, la elastina y los colágenos desnaturalizados; 3) las estromelinas y 4) la matrilisina, que degradan el núcleo de proteoglicanos de las proteínas, la laminina, la fibronectina, la elastina y la gelatina; 5) las MMPs de membrana, que degradan la fibronectina, la laminina y otras MMPs y, finalmente, 6) la metaloelastasa macrofágica, que actúa sobre la elastina insoluble, el colágeno IV, la fibronectina, la laminina y los proteoglicanos. Hasta ahora se han identificado 20 miembros de la familia de las MMPs.

Las MMPs pueden definirse por las siguientes características (McDonnell *et al.*, 1999): 1) comparten secuencias de aminoácidos comunes, 2) su acción proteolítica es inhibida por los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas o TIMPs, 3) son secretadas como proenzimas o bien existen como proenzimas transmembrana, pero, en cualquier caso, requieren ser activadas para llevar a término sus acciones, 4) el sitio activo contiene zinc (Zn^{2+}) y requiere un segundo cofactor como el calcio (Ca^{2+}), y 5) la actividad enzimática es óptima a pHs fisiológicos.

Tabla 1. Clasificación y propiedades de las metaloproteinasas de matriz.

Grupo	MMP	Nombre	Sustrato
Colagenasas	MMP-1	Colagenasa intersticial	Colágeno I, II, III, X; gelatinasa; proteoglicanos
	MMP-8	Colagenasa de los neutrófilos	
	MMP-13	Colagenasa-3	
<i>Gelatinasas</i>	MMP-2	Gelatinasa-A	Colágenos desnaturalizados; colágeno IV, V, VII, X, XI; elastina
	MMP-9	Gelatinasa-B	
Estromelsinas	MMP-3	Estromelsina-1	Proteoglicanos; Procolágenos; fibronectina; laminina; gelatina; colagenasas; gelatinasa-B
	MMP-10	Estromelsina-2	
	MMP-11	Estromelsina-3	
Matrilisinas	MMP-7	Pump-1, Matrilisina	Proteoglicanos; Procolágenos; fibronectina; laminina; gelatina; colagenasas; gelatinasa-B; elastina
Metaloelastasa	MMP-12	Metaloelastasa macrofágica	Elastina; fibronectina; colágeno IV; laminina; proteoglicanos
Metaloproteinasas de membrana	MMP-14	MT-MMP-1	Colágeno I, II, III; gelatina, elastina, caseína, vitronectina, MMP-2, MMP-13, pro-TNF α , dermatán sulfato
	MMP-15	MT-MMP-2	MMP-2, gelatina, tenascina, laminina, fibronectina
	MMP-16	MT-MMP-3	MMP-2
	MMP-17	MT-MMP-4	Desconocido
Miscelánea	MMP-19	RASI-1	Gelatinas
	MMP-20	Enamelsina	Amelogenina

Mediante técnicas de clonación y secuenciación de DNA se han identificado diversas MMPs y ello ha permitido conocer su estructura. Las secuencias aminoacídicas de todas las MMPs son similares, y presentan un alto grado de conservación entre cada tipo de enzima en diferentes especies de mamíferos.

Todas las MMPs contienen tres dominios diferentes: el propéptido, el dominio catalítico y el extremo C-terminal, cada uno de los cuales desarrolla una función específica. La estructura en dominios de la MMP-9 o gelatinasa B, también conocida como colagenasa tipo IV de 94 kD, es el prototipo de la familia de MMPs. Su propéptido, de aproximadamente 100 residuos, contiene un segmento de 8 aminoácidos estables, PRCGVDPV, la escisión de los cuales activará las MMPs latentes. El dominio catalítico, formado por 162 a 173 residuos, contiene el lugar activo que se unirá a Zn^{2+} y Ca^{2+} para llevar a término su acción. El resto de dominios tienen secuencias similares a la de otras proteínas estructurales de la MEC (Murphy *et al.*, 1992).

Respecto a la forma de actuar de estas moléculas, sabemos que las MMPs son secretadas como proenzimas que requieren ser activadas. Además, en los tejidos existen inhibidores de la acción de éstas, son los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs). Existen dos inhibidores fisiológicos de las MMPs: la α_2 -macroglobulina, con una actividad restringida dado su gran volumen (780 kD), y una familia de inhibidores específicos de las MMPs: los TIMPs. Hay dos hechos característicos de la interacción entre TIMPs y MMPs: 1) una afinidad muy elevada y 2) diferencias entre la especificidad de los diversos TIMPs, a pesar del alto grado de semejanza entre sus secuencias.

En el momento actual se han identificado cuatro inhibidores en mamíferos: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. La pluralidad de los TIMPs sugiere que podrían tener propiedades

funcionales diferentes y en este sentido se han publicado algunas diferencias en cuanto a sus acciones inhibitorias, aunque cada uno de los TIMPs pueden unirse a la mayoría de MMPs.

El TIMP-1 es una glicoproteína de 30 kD (Docherty *et al.*, 1985) y el TIMP-2 es una proteína no glicosilada de 23 kD (Boone *et al.*, 1990). Su distribución celular es bastante similar, aunque el TIMP-1 generalmente se encuentra en mayores cantidades. Presentan una estructura aminoacídica en la que se pueden reconocer dos dominios: el extremo N-terminal y el C-terminal. En el caso del TIMP-1 se ha demostrado que el extremo N-terminal, codificado por los aminoácidos 1 al 126, puede actuar independientemente del dominio C-terminal e inhibir de forma eficiente la mayoría de MMPs (Murphy *et al.*, 1991).

Existe un aumento en la expresión del gen del TIMP-1 tras la isquemia focal en ratas (Wang *et al.*, 1998), que se produciría con el fin de evitar la disrupción de la BHE por MMP-2 y MMP-9. Algunos estudios también muestran como la administración de TIMPs reduce el daño sobre la BHE (Rosenberg *et al.*, 1992).

1.2.1 Su papel fisiológico y patológico

Las MMPs intervienen en la mayoría de los procesos fisiológicos que requieren el recambio de la MEC y tienen un papel bien definido en diversos procesos celulares como la proliferación, la apoptosis y la morfogénesis tisular. Además de esta finalidad reparadora y de remodelado (reabsorción ósea, recambio endometrial...), la presencia de niveles altos de algunos miembros de la familia de las MMPs se ha asociado a destrucción tisular en una amplia variedad de procesos patológicos tales como: diseminación de metástasis tumorales, artritis, formación de aneurismas, aterosclerosis, etc.

En el campo de la neurología se han implicado en esclerosis múltiple (Rosenberg *et al.*, 1996), en formación de aneurismas cerebrales (Todor *et al.*, 1998; Peters *et al.*, 1999) y en la inestabilización de placas carotídeas (Galis *et al.*, 1994; Jenkins *et al.*, 1998; Loftus *et al.*, 2000).

1.2.2 Su papel en la isquemia cerebral

Entre las MMPs, la gelatinasa A (MMP-2) y la gelatinasa B (MMP-9), que serán objeto de nuestro estudio, son capaces de digerir la lámina basal endotelial, que juega un papel fundamental en el mantenimiento de la BHE. Recientemente la MMP-2 y/o MMP-9 han sido implicadas por diversos autores en isquemia cerebral (Rosenberg *et al.*, 1996; Romanic *et al.*, 1998 y Fujimura *et al.*, 1999). Parece ser que una de las vías finales de destrucción del tejido cerebral sometido a isquemia y uno de los efectos indeseables de los fenómenos de neuroinflamación, podría ser la activación de varias familias de proteasas.

Diversos hallazgos permiten también implicarlas en los procesos de transformación hemorrágica que pueden seguir a la isquemia. En modelos de isquemia cerebral se ha demostrado que la disrupción de la lámina basal de la microcirculación cerebral, cuyos componentes son atacados de forma específica por MMP-2 y MMP-9, ocurre de forma precoz tras la isquemia y que este hecho puede predisponer a la hemorragia (Hamman *et al.*, 1996). Así mismo, la inyección intracerebral de proteasas, colagenasas bacterianas, incrementa la permeabilidad capilar y produce hemorragia cerebral (Rosenberg *et al.*, 1992).

1.2.2.1 Modelos animales de isquemia cerebral focal

Desde 1996 hasta hoy se han publicado diversos estudios que han permitido comprender mejor el papel de las MMPs en la isquemia cerebral. Han empleado varias técnicas zimográficas sobre el parénquima cerebral de los animales (ratas, ratones y monos) a los que se había sometido previamente a isquemia focal por oclusión de la ACM, de forma permanente o transitoria.

Rosenberg fue el pionero en el estudio de estas proteasas en modelos de isquemia cerebral. Su grupo demostró una gran expresión de MMP-9 tras 12-24 horas de oclusión permanente de la ACM (Rosenberg *et al.*, 1996). Posteriormente en un modelo de isquemia-reperfusión, también en ratas, han demostrado como un inhibidor de MMPs (BB-1101) bloquea la apertura precoz de BHE relacionada en dicho experimento con la producción de MMP-2 (Rosenberg *et al.*, 1998).

Romanic *et al.* utilizando un modelo de isquemia cerebral focal permanente en ratas mostraron un progresivo incremento en la expresión de MMPs a lo largo del tiempo, señalando diferencias en el patrón temporal de expresión para MMP-9 y MMP-2. La MMP-9 se detectaba en el tejido isquémico desde las 24h hasta el 5º día tras la oclusión, mientras que la MMP-2 predominaba alrededor del 5º día (Romanic *et al.*, 1998). Utilizando criterios morfológicos detectaron producción de MMP-9 en células endoteliales y neutrófilos del interior y la periferia del infarto cerebral, y además identificaron MMP-2 en macrófagos de la región del infarto.

Dentro de esta serie de estudios experimentales, también se ha comprobado que la inhibición selectiva de MMP-9 (anticuerpo monoclonal neutralizante) reduce en un 30% el área del infarto, cuando se administra previamente a la oclusión arterial.

Con técnicas zimográficas más precisas, comienzan a detectarse formas activadas de las MMPs. En un modelo de isquemia focal transitoria en ratones (Fujimura *et al.*, 1999) se demuestra que la MMP-9 activada aparece a las tres horas de la isquemia-reperusión, coincidiendo en el tiempo con la disrupción de la BHE. Este estudio encuentra mayor expresión cortical de MMP-9. El mismo grupo demostró, en un modelo de isquemia focal permanente en ratones, un incremento significativo en la expresión de pro-MMP-9 tras dos horas de isquemia y de su forma activada a las 4 horas coincidiendo con un incremento de la permeabilidad de la BHE (Gasche *et al.*, 1999).

Existe un modelo de isquemia-reperusión en primates no humanos, empleado por el grupo de Del Zoppo, en el que se estudia la expresión de MMPs (Heo *et al.*, 1999). La expresión de MMP-2 se correlacionó con la extensión del daño neuronal y con el número de neuronas dañadas. La MMP-9 sólo se encontraba incrementada ante la presencia de TH. Todos los estudios comentados valoran la expresión de proformas o formas activas de MMPs mediante técnicas zimográficas. El estudio de Heo *et al.* es el único en que además se tomaron muestras plasmáticas, y el primero por tanto en que se encontró un incremento significativo de MMP-9 en sangre periférica a las 2 horas de la oclusión de la ACM.

Recientemente (Asahi *et al.*, 2000), se ha desarrollado un Knock-Out de MMP-9 y se ha demostrado que los infartos cerebrales que sufrían los animales carentes del gen MMP-9 eran de menor tamaño que los de los animales con MMP-9.

Todos los resultados obtenidos hasta el momento, siempre utilizando modelos animales, apuntan a un papel deletéreo de las MMPs en la isquemia cerebral.

1.2.2.2 Necropsias de pacientes con ictus y metaloproteinasas

Prácticamente todas las publicaciones acerca de metaloproteinasas en el campo de la patología cerebrovascular se han realizado en modelos animales. En una estricta revisión bibliográfica sólo existen dos estudios realizados en humanos sobre material de necropsias. No existen hasta el momento estudios *in vivo* en el hombre que confirmen las hipótesis generadas en el modelo animal. Esto se debe, además de al reciente interés por estas moléculas, a las dificultades de su determinación, que se venía realizando mediante técnicas zimográficas en tejido cerebral.

Ambos estudios necrópsicos (Anthony *et al.*, 1997 y Clark *et al.*, 1997) demuestran un incremento de la actividad de MMP-2 y MMP-9 en el parénquima cerebral tras el ictus. El perfil temporal de ambas MMPs mostraba peculiaridades ya que la MMP-9 se encontró sobreexpresada durante la fase proinflamatoria precoz del ictus y la MMP-2 durante la fase reparativa tardía de remodelado capilar (Clark *et al.*, 1997).

Se identificó la presencia de MMP-9 en los neutrófilos durante la primera semana después del ictus y tras esta primera semana se encontraron macrófagos que expresaban MMP-2 y matrilisina (Anthony *et al.*, 1997).

1.2.3 Metaloproteinasas e inflamación

Cada vez hay mayor evidencia de que la respuesta inflamatoria juega un papel fundamental en la isquemia cerebral y de que la invasión del tejido cerebral infartado por leucocitos provoca lesión neuronal secundaria (Kochanek *et al.*, 1992). Gran parte de esta respuesta está mediada por interleucinas. La adhesión y migración de neutrófilos está dirigida por varias clases de glicoproteínas entre las que se encuentran las moléculas de adhesión, las cuales son activadas por la producción de dichas citocinas proinflamatorias (Frenette *et al.*, 1996).

Parece ser que algunas citocinas (IL-1, IL-6 y TNF α) podrían tener un papel destacado en la regulación de las metaloproteinasas (Rawdanowicz *et al.*, 1994 y Kusano *et al.*, 1998). En cultivos neuronales se ha demostrado que la expresión de MMP-9 se incrementa tras la administración de IL-1 (Vecil *et al.*, 2000). Estas interrelaciones entre ambas familias se han comenzado a observar en ciertas patologías tumorales (Kossakowska *et al.*, 1999), en las que se demuestra como IL-6 estimula la producción de MMP-9 y MMP-2.

De forma indirecta se ha podido observar una relación entre citocinas proinflamatorias y MMPs en pacientes afectados de esclerosis múltiple, al comprobar como el tratamiento con beta-interferón disminuía de forma similar y paralela tanto los niveles de IL-6 como los de MMP-9 (Özenci *et al.*, 2000).

La región promotora del gen de la MMP-9 contiene una zona de unión para la proteína activadora 1 (AP-1) y para el factor de transcripción nuclear (NF-kB), que responden a una gran variedad de estímulos inflamatorios. Los genes de respuesta inmediata (*c-fos* y *c-jun*) forman heterodímeros que activan la zona de unión con AP-1 del gen de MMP-9.

Existen, por lo tanto, cualidades de las MMPs (al menos de MMP-9) que permiten catalogarlas como proteasas proinflamatorias.

También sabemos, que los neutrófilos podrían utilizar MMPs para su migración a través del parénquima cerebral (Weiss *et al.*, 1996). Un estudio (Romanic *et al.*, 1998) demuestra la expresión de MMP-9 en células endoteliales y en neutrófilos que infiltraban la zona de infarto.

La producción de IL-6 tras el ictus se ha relacionado con el tamaño del infarto (Tarkowski *et al.*, 1995) y con la evolución del paciente (Vila *et al.*, 2000). La IL-6 estimula la síntesis de fibrinógeno por los hepatocitos (Gabay *et al.*, 1999), por lo que los valores de fibrinógeno o el recuento de leucocitos son algunos de los reactantes de fase aguda (RFA) que están aumentados tras el ictus (Montaner *et al.*, 2001). La fácil detección de dicha IL en sangre periférica y el hecho de que se la empiece a considerar un marcador de fase aguda del ictus, nos ha hecho elegir esta molécula para estudiar posibles relaciones con la familia de las MMPs.

2. OBJETIVOS

Los objetivos principales de esta Tesis son:

- 1.- Determinar si existe sobreexpresión de MMPs tras el ictus isquémico en humanos de forma similar a lo que ocurre en modelos de isquemia cerebral en animales.**
- 2.- Describir el perfil temporal de la MMP-2 y la MMP-9 durante la fase aguda del ictus.**
- 3.- Valorar si la expresión de MMPs se relaciona con la situación neurológica del paciente y/o con su evolución durante la fase aguda.**
- 4.- Determinar si el tiempo de oclusión de la ACM y/o su localización, valorados por Doppler transcraneal, influyen en la expresión de MMPs.**
- 5.- Estudiar la presencia o no de correlación entre la expresión de MMPs y el tamaño del infarto cerebral medido en la Tomografía Computarizada craneal.**
- 6.- Valorar si la expresión de MMPs influye en la transformación hemorrágica del infarto cerebral.**
- 7.- Analizar si existen relaciones entre la expresión de MMPs y la de citocinas proinflamatorias tras la isquemia cerebral.**

3. MÉTODOS

3.1 Selección de la población

Se han evaluado de forma prospectiva y consecutiva los pacientes atendidos en la Unidad Cerebrovascular de nuestro hospital, durante un periodo de 10 meses, que cumplían los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

Criterios de inclusión

- Edad superior a 18 años.
- Ictus isquémico de etiología cardioembólica según los criterios de TOAST (Adams *et al.*, 1993) y del Grupo de Estudio de Enfermedades Cerebrovasculares de la S.E.N. (Arboix *et al.*, 1998).
- Afectación del territorio de la arteria cerebral media (ACM).
- Tiempo inferior a 12 horas desde el inicio de los síntomas hasta la visita basal.
- Firma del Consentimiento Informado.

Criterios de exclusión

- IC de otra etiología conocida.
- IC de etiología indeterminada.
- Afectación de un territorio arterial diferente al de la ACM.
- Tratamiento fibrinolítico.
- Terapia anticoagulante a dosis terapéuticas en la primera semana del ictus.
- Pacientes afectos de enfermedades inmunológicas o infecciosas agudas o crónicas activas en el momento del ictus.
- Toma de fármacos antiinflamatorios o inmunosupresores durante los días previos.

3.2 Población estudiada

Durante este período fueron estudiados 110 pacientes en las primeras 12 horas desde el inicio de los síntomas. De ellos, 84 (76,4 %) presentaban un ictus no lacunar, siendo de etiología cardioembólica 44 (40,0%) pacientes. Finalmente se incluyeron en el análisis definitivo a los 39 pacientes que satisfacían todos los criterios de inclusión/exclusión del estudio. La gran mayoría de los pacientes incluidos presentaban una fibrilación auricular.

Todos los pacientes recibieron heparinas de bajo peso molecular como profilaxis de trombosis venosa profunda. Los pacientes eran anticoagulados a dosis plenas (si era necesario) cuando la TC de control no mostraba transformación hemorrágica.

3.3 Doppler Transcraneal

El Doppler Transcraneal (DTC) es una exploración paraclínica muy útil para valorar el estado de la circulación en la fase aguda del ictus. Un estudio seriado de DTC permite objetivar la oclusión de la arteria cerebral media (ACM) por un émbolo, así como valorar el momento en que esta arteria se repermeabiliza de forma espontánea o tras la administración de un fibrinolítico.

Las determinaciones de DTC para valorar la recanalización espontánea, se llevaron a cabo con un aparato Multi-Dop X/TCD (DWL Elektronische Systeme GmbH) y con la sonda de 2 MHz en modo pulsado. Las velocidades de flujo sanguíneo de las arterias cerebrales anteriores, medias y posteriores se recogieron a ambos lados empleando la ventana transtemporal. Se realizó el estudio DTC de forma seriada, a la llegada del paciente, a las 12 horas, 24 horas y 48 horas del inicio del ictus.

Los criterios de DTC para identificar una oclusión intracraneal y la posterior recanalización han sido descritos previamente (Zanette *et al.*, 1995). Según los hallazgos del DTC consideramos que la ACM podía estar ocluida a nivel de su segmento proximal, presentar una asimetría $>21\%$ respecto a la ACM contralateral (equivale a una oclusión distal de ACM) o podía ser permeable (normal).

Consideramos recanalización el paso de oclusión a asimetría o a la normalidad, o el paso de una asimetría a la normalidad. Si la recanalización espontánea ocurría en las primeras 12 horas la consideramos recanalización precoz.

3.4 Neuroimagen

La técnica elegida es la tomografía computarizada (TC) (Montaner y Alvarez-Sabín, 1999).

En cada paciente las exploraciones de TC craneal deben dar respuesta a tres cuestiones básicas:

- La presencia de signos precoces de infarto a la llegada del paciente a urgencias.
- La cantidad de tejido cerebral infartado al final del estudio.
- La presencia de transformación hemorrágica en el interior del infarto o en alguna otra zona del parénquima cerebral.

Para obtener toda esta información se realizarán tres TC craneales, una basal dentro de las 12 primeras horas desde el inicio de los síntomas, una de control a las 48 horas, para valorar la presencia de transformación hemorrágica precoz y para medir el volumen del infarto, y una tercera entre el 5º-7º día para valorar la presencia de transformación hemorrágica tardía. En caso de deterioro neurológico se realizará una TC adicional.

El volumen del infarto se medirá según la fórmula $axbxc/2$ (Pullicino *et al.*, 1996) en que *a* y *b* equivalen a los mayores diámetros perpendiculares del área hipodensa de infarto y *c* al grosor del área del infarto.

La transformación hemorrágica será categorizada en cuatro subgrupos según los criterios empleados por Pessin (Pessin *et al.*, 1990) con ligeras modificaciones realizadas por los investigadores del ensayo europeo de trombólisis, ECASS-1 (Hacke *et al.*, 1995), en:

- **HI 1** = infarto hemorrágico tipo 1, con piqueteado hemorrágico alrededor del margen del infarto.
- **HI 2** = infarto hemorrágico tipo 2, con piqueteado confluyente en el interior del infarto, sin ejercer efecto de masa.
- **PH 1** = hemorragia parenquimatosa tipo 1, no superior al 30% del área del infarto, en ocasiones puede producir un ligero efecto de masa.
- **PH 2** = hemorragia parenquimatosa tipo 2, superior al 30% de la zona infartada, produciendo un efecto de masa significativo.

Desde un punto de vista práctico y de cara al análisis estadístico las transformaciones hemorrágicas se agruparán en HI (HI1 + HI2) y en PH (PH 1 + PH2).

Se considerarán transformaciones hemorrágicas precoces las que aparezcan en la TC de 48 horas o anteriores y tardías las que aparezcan por vez primera en la TC del 5º-7º día.

3.5 Escalas neurológicas

El objetivo principal de una escala neurológica es trasladar el conjunto de alteraciones neurológicas presentes en cada paciente a una puntuación global (cuantificación del déficit) en cada exploración sucesiva, de forma que permita valorar objetiva y dinámicamente la intensidad del déficit neurológico. Se diseñan con dos finalidades fundamentales: describir el estado neurológico inicial del paciente con el fin de predecir su evolución y cuantificar la mejoría en el déficit neurológico para poder establecer comparaciones (Alvarez-Sabín, 1999). Este último punto es de gran relevancia por el empleo de estas escalas en los ensayos clínicos de patología cerebrovascular aguda o en estudios prospectivos como los que nos ocupan en que la situación del paciente se valora en cuatro tiempos consecutivos durante las primeras 48 horas desde el inicio de los síntomas.

La escala de ictus de la NIH (National Institute of Health Stroke Scale, NIHSS) no solo es la escala más utilizada en los últimos años para valorar el estado neurológico inicial y final de los pacientes que reciben medicaciones experimentales en el contexto de ensayos clínicos, sino que también es muy útil en la práctica clínica habitual dentro de las unidades de ictus (Goldstein *et al.*, 1989). Varios puntos de corte en dicha escala permiten categorizar la severidad del ictus en ligero (NIHSS < 8), moderado (NIHSS 8-20) y grave (NIHSS ≥ 20) (DeGraba *et al.*, 1999; Gönner *et al.*, 1998 y Ueda *et al.*, 1999). Se considera mejoría la reducción de 4 puntos o más en dicha escala en dos exploraciones sucesivas y empeoramiento el incremento en cuatro puntos o más entre dos determinaciones o la muerte del paciente (Brott *et al.*, 1992 y Haley *et al.*, 1992).

3.6 Determinaciones de laboratorio

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de cada paciente a su llegada a urgencias (< 12 horas) a las 12 horas, 24 horas y 48 horas del inicio de los síntomas. Las determinaciones de IL-6 se realizaron en suero y las de MMP-2 y MMP-9 en plasma.

Tras 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del coágulo, se separó el suero centrifugando a 3000 rpm durante 15 minutos. Se alicuotó el suero obtenido y se congeló a -80° hasta ser analizado. Los niveles de IL-6 se determinaron con un ELISA comercializado (Bender MedSystems).

El plasma se separó de forma inmediata recogiendo la sangre en tubos con EDTA y siguiendo el mismo proceso de centrifugado y almacenaje descrito. Los niveles de MMP-2 y MMP-9 también se determinaron mediante técnicas de ELISA (Biotrak Amersham Pharmacia, UK).

Dicha técnica ha sido previamente estandarizada en el laboratorio de hemostasia lo que ha permitido obtener valores de referencia en población sana que podrán ser comparados con los resultados obtenidos en nuestros pacientes.

3.7 Esquema del Protocolo de Estudio

En la siguiente tabla se puede apreciar el cronograma con las principales variables que se utilizarán de forma conjunta en los estudios.

<i>Exploraciones</i>	<i>Basal (0-12h)</i>	<i>12 horas</i>	<i>24 horas</i>	<i>48 horas</i>	<i>5-7 dias</i>
<i>METALOPROTEINASAS</i>	●	●	●	●	
<i>CITOCINAS</i>	●	●	●	●	
<i>DOPPLER-TRANSCRANEAL</i>	●	●	●	●	
<i>TC-CRANEAL</i>	●			●	●
<i>ESCALAS NEUROLÓGICAS</i>	●	●	●	●	
<i>CONSTANTES</i>	●	●	●	●	

A continuación se muestran las exploraciones realizadas a pacientes representativos del primero y del segundo de los trabajos.

En el primer ejemplo se observa una recanalización espontánea dentro de las primeras 12 horas, que se hace completa a las 24 horas, quedando en la TC de control un infarto en la división anterior de la ACM derecha.

El segundo caso muestra la aparición de un infarto hemorrágico precoz en territorio profundo de la ACM izquierda tras recanalización espontánea.

4. COPIA DE LAS PUBLICACIONES

4.1 Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke.
Temporal profile and relation to neurological impairment.
(Stroke 2001)

Matrix Metalloproteinase Expression After Human Cardioembolic Stroke.
Temporal Profile And Relation To Neurological Impairment

Joan Montaner MD, José Alvarez-Sabín MD, Carlos Molina MD, Ana Anglés MD,

Sonia Abilleira MD, Juan Arenillas, Miguel Angel González, Jasone Monasterio MD.

Cerebrovascular Unit (J.M, J.A, C.M, S.A, M.G, J.A) and Hemostasia Research Unit (A.A, J.M).
Vall d'Hebron Hospital. Barcelona, Spain.

Correspondence:

Dr Joan Montaner
Unidad Cerebrovascular
Servicio de Neurología
(6ª planta, Hospital General)
Hospital Vall d'Hebron
Pg Vall d'Hebron 119-129
08035 Barcelona, Spain.

Phone: (+34) 93-2746235
Fax: (+34) 93-2746255
e-mail: alsa@hg.vhebron.es

Acknowledgments

This study was supported in part by a grant from the Catalan Society of Neurology for cerebrovascular diseases (sponsored by Uriach).

Summary

Background and Purpose- Uncontrolled expression of matrix metalloproteinases (MMPs) can result in tissue injury and inflammation. In animal models of cerebral ischemia, MMP-2 and MMP-9 expression was significantly increased. However, their role in human stroke *in vivo* remains unknown. Therefore, we aimed to determine the temporal profile of MMP expression in patients with acute ischemic stroke and to investigate its relationship to stroke severity, location of arterial occlusion and total infarct volume.

Methods- Serial MMP-2 and MMP-9 determinations were performed in 39 patients with cardioembolic strokes involving the MCA territory by means of ELISA. Blood samples, TCD recordings and NIHSS scores were obtained at baseline, 12h, 24h and 48h of stroke onset. Infarct volume was measured on CT scan at 48 hours.

Results- No correlation was found between MMP-2 and NIHSS score at any time point, although a close relation appeared between mean MMP-9 and final NIHSS score ($r = 0.486$, $p = 0.002$). MMP-9 value was the only factor associated to final NIHSS score in the multiple logistic regression model (OR = 4.54; CI 1.5, 13.75). A cut-point of MMP-9 = 142.18 ng/ml had a positive predictive value of 94.4% to assess patient's NIHSS (<8 or ≥ 8) by the end of the study. Final MMP-2 and MMP-9 levels were significantly lower when recanalization occurred (528 ± 144.3 ng/ml versus 681.4 ± 239.2 ng/ml, $p = 0.031$ for MMP-2 and 110.2 ± 100.9 ng/ml versus 244.8 ± 130 ng/ml, $p = 0.004$ for MMP-9). A positive correlation was found between mean MMP-9 and infarct volume ($r = 0.385$, $p = 0.022$).

Conclusions- MMPs are involved in the acute phase of human ischemic stroke. MMP-9 levels are associated with neurological deficit, MCA occlusion and infarct volume.

Key words. cerebral ischemia, embolic, matrix metalloproteinases, MMP-2, MMP-9, stroke.

Introduction

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc-binding proteolytic enzymes that normally remodel the extracellular matrix (ECM) and pathologically attack substrates as part of the neuroinflammatory response (1). MMP-2 (72-kDa, Gelatinase A) and MMP-9 (92-kDa, Gelatinase B) specifically attack type IV collagen, laminin and fibronectin, which are the major components of the basal lamina around cerebral blood vessels. Proenzyme activation and enzyme activities are tightly regulated by tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) and interactions with surrounding ECM molecules (2).

MMPs participate in many physiologic tissue remodeling processes, including embryologic and bone remodeling, wound healing, angiogenesis, ovulation, and implantation (3). However, uncontrolled expression of MMPs can result in tissue destruction and inflammation.

Recently, abnormal MMPs activity has been implicated in cerebral ischemia. In animal models, MMP-2 and MMP-9 expression has been shown to increase early after ischemic onset (4-6). Treatment with MMPs inhibitors and MMPs-neutralizing antibodies has also been shown to reduce both vasogenic edema formation and infarct size in a rat model of focal cerebral ischemia (5,7). In addition, reduced ischemic lesion volumes have been observed in MMP-9 knockout mice as compared with wild-type littermates (8). These studies suggest that the MMP family participates in the pathophysiology of cerebral ischemia.

As this hypothesis has not been tested for humans *in vivo*, we aimed to determine the temporal profile of MMP expression in patients with acute ischemic stroke and to investigate its relationship with stroke severity, location of arterial occlusion and total infarct volume.

Subjects and Methods

Study population

From June 1999 to March 2000, we prospectively studied consecutive patients with an acute stroke. A total of 110 patients evaluated within the first 12 hours of stroke onset were included in the study. A detailed history of vascular risk factors was obtained from each patient. To identify potential mechanism of cerebral infarction, a set of diagnostic tests was performed that included electrocardiogram, chest radiography, carotid ultrasonography, complete blood count and leukocyte differential, and blood biochemistry in all patients; many also underwent special coagulation tests, transthoracic ecocardiography and Holter monitoring. With this information, and the neuroimaging and transcranial Doppler (TCD) data, previously defined etiologic subgroups were determined (9).

Eighty-four (76.4%) patients had a non-lacunar stroke involving the vascular territory corresponding to the MCA. Of these, 44 (40%) patients were considered as a cardioembolic stroke. Most of these patients had atrial fibrillation.

We excluded patients with a known inflammatory or malignant disease (n=3) as well as patients with an inadequate transtemporal window for TCD (n=2). A total of 39 patients (51.3% male, mean age 74 ± 15 years) were included in the definitive analysis.

Clinical examination was performed on admission and at 12, 24 and 48 hours of symptom onset, at the time of each MMP determination. Stroke severity was assessed by using the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS). The NIHSS was used as a measure of initial (baseline) and final (48 hours) neurological deficit. Baseline blood samples, TCD recordings and NIHSS scores were obtained in the first six hours in 80% of patients, and between 6 and 12 hours in all others. If a patient died before the 48 hour time point, the last obtained score was used as final NIHSS score.

We defined neurological improvement as a decrease in the stroke score by 4 or more points and neurological deterioration as either death or an increase in score by 4 or more points at 48 hours (10,11). We stratified patients according to the NIHSS score at each time point with previously used cut-points (<8; 8 to 20; >20). Patients with a NIHSS score >20 were considered to have a severe neurological deficit (12,13) and those patients with a NIHSS score <8 were considered to have a slight deficit (14).

CT scans were carried out in all patients on admission and a control CT scan was performed at 48 hours to measure infarct volume (cubic centimeters), according to the formula $0.5 \times A \times B \times C$, where A and B represent the largest perpendicular diameters through the hypodense area on CT scans, and C the thickness of the infarction area (15).

All patients received subcutaneous low molecular weight heparin as prophylaxis for deep venous thrombosis. Intravenous heparin was not administered during the study period. No patient received tPA. This study was approved by the Ethics Committee of the hospital and all patients or relatives gave informed consent.

TCD Protocol

Serial TCD studies were conducted on admission and at 12, 24 and 48 hours of stroke onset. All TCD examinations were performed by an experienced neurologist. TCD measurements were performed using a Multi-Dop X/TCD (DWL Elektronische Systeme GmbH) device, with a hand-held transducer in a range-gated, pulsed-wave mode at a frequency of 2 MHz.

Blood flow velocities of the MCAs, anterior cerebral arteries (ACAs) and posterior cerebral arteries (PCAs) were recorded on both sides through the transtemporal window (16). Proximal MCA occlusion was defined as the absence of flow or the presence of minimal flow signal throughout the MCA at an insonation depth between 45 to 65 mm, while blood flow signal from the ipsilateral ACA and PCA was detected. Distal MCA division occlusion was indicated when there was a diffuse dampening of blood flow velocity in the affected MCA greater than 21% as compared to the contralateral MCA.

During the follow-up controls, spontaneous recanalization was diagnosed when a previously absent blood flow signal reappeared (dampened or normal waveform) for a proximal MCA occlusion or when a previously dampened waveform came within the normal range for a distal MCA occlusion (17).

MMP-9 and MMP-2 determinations

Peripheral blood samples were drawn from each patient at study entry and at 12, 24 and 48 hours from stroke onset. From the 156 expected extractions, missing data for MMPs included five baseline determinations which were so close to the 12-hour time point that only one extraction was done. No missing data existed for the 12-hour time point. Two missing data for the 24-hour and six for the 48-hour time point corresponded mostly to patients who died or to technical problems.

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 until analysis. MMP-2 and MMP-9 levels were determined by commercially available enzyme linked immunosorbent assay (ELISA, Biotrak Amersham Pharmacia, UK). ELISAs were performed according to manufacturer's instruction. Our laboratory reference intervals for healthy controls are: 41 ± 27.8 ng/ml for MMP-9 (n=62, 58% males, mean age 43 years, normal range = < 97 ng/ml) and 630.8 ± 101.8 ng/ml for MMP-2 (n=40, 47% males, mean age 43 years, normal range = 427-835 ng/ml). The mean intra-assay coefficients of variation were 8.9% for MMP-9 and 10.7% for MMP-2.

Statistical Analysis

Descriptive and frequency statistical analyses were performed and comparisons were made by use of the SPSS statistical package, version 9.0. Statistical significance for intergroup differences was assessed by the χ^2 or Fisher exact test for categorical variables and the t test and ANOVA for continuous variables (a post-hoc analysis was conducted by means of Tukey test). MMP values were normally distributed (Kolmogorov-Smirnov and P-P plot). A t test was performed for paired data with Bonferroni correction for multiple comparison in order to compare MMP levels for different time

points. To calculate the sensitivity and specificity for MMP values to predict neurological improvement as well as final NIHSS score, a receiver operator characteristic (ROC) curve was configured. Two logistic regression analyses were performed to determine factors that could be considered as independent predictors for neurological improvement and final NIHSS score. Cutoff values for MMP-9 and MMP-2 with the highest sensitivity and specificity, according to outcome groups, were included. To study the correlation between MMPs and other continuous variables, the Pearson test was used except for NIHSS scores (Spearman test). A p value <0.05 was considered statistically significant.

Results

MMP-2 and MMP-9 temporal profile

Peak MMP-2 was observed at baseline determination (752.5 ± 210.9 ng/ml) and significantly decreased on follow-up determinations (12h = 668.8 ± 254.6 ng/ml, $p = 0.011$; 24h = 599 ± 195.4 ng/ml, $p < 0.001$; and 48h = 580.1 ± 188 ng/ml, $p < 0.001$). Mean MMP-2 level for all these times was 644.2 ± 185.8 ng/ml. All MMP-2 levels indicated above were included in the normality interval of our laboratory for healthy controls (427-835 ng/ml) (Figure 1).

Baseline MMP-9 level was 147.1 ± 118.6 ng/ml and no significant changes on MMP-9 levels were found on follow-up determinations (12h = 140.4 ± 120.7 ng/ml, 24h = 172.6 ± 139 ng/ml and 48h = 144.5 ± 127.6 ng/ml). Mean MMP-9 level for all these times was 149.6 ± 99 ng/ml. All MMP-9 levels indicated above exceeded the reference interval for healthy controls (< 97 ng/ml) (Figure 1).

No difference was found for MMP-2 or MMP-9 regarding age, gender or any vascular risk factor, except for higher MMP-2 mean levels in patients with history of a previous stroke (764.2 ± 208.7 ng/ml for patients with a previous stroke and 608.2 ± 165.6 ng/ml for first stroke patients; $p = 0.025$). Mean plasma levels of MMP-2 and MMP-9 were both correlated ($r = 0.340$, $p = 0.034$). Moreover, a significant correlation was found between MMP-9 and other laboratory parameters such as glucose ($r = 0.349$, $p = 0.037$), leukocyte count ($r = 0.395$, $p = 0.014$) and mean temperature ($r = 0.332$, $p = 0.039$).

Relation to NIHSS

Median baseline NIHSS score of the series was 17 (range 5-25) and median final NIHSS score was 15 (range 0-30). No correlation was found between MMP-2 and NIHSS at any time point. In contrast, MMP-9 was increasingly correlated to NIHSS scores at different time points (baseline: $r = 0.302$ $p = 0.083$; 12h: $r = 0.364$ $p = 0.023$; 24h: $r = 0.408$ $p = 0.012$; 48h: $r = 0.439$ $p = 0.011$).

There was a trend of association between stroke severity on admission and MMP-9 overexpression at 48 hours. Final MMP-9 was lower in patients with a baseline NIHSS < 8 (15.9 ± 15 ng/ml) compared to those with a baseline NIHSS score between 8-20 (133.9 ± 124.3 ng/ml) and to those with a baseline NIHSS score > 20 (212.0 ± 121.9 ng/ml) ($p = .053$). Baseline NIHSS-final MMP-9 correlation was $r = 0.416$ ($p = 0.016$).

Interestingly, there was also a positive correlation between mean MMP-9 and final NIHSS ($r = 0.486$, $p = 0.002$) as shown in Figure 4. Patients with a good neurological status at the end of the study (final NIHSS <8, $n = 13$) were those who had lower MMP-9 levels at anytime (baseline: 97.8 ± 84.2 vs 177.6 ± 128.1 ng/ml $p = 0.05$; 12h: 94.2 ± 84.7 vs 163.5 ± 130.5 ng/ml $p = 0.09$; 24h: 87 ± 65.5 vs 213.7 ± 146.9 ng/ml $p = 0.001$; 48h: 48.6 ± 62.4 vs 199.2 ± 123.5 ng/ml $p < 0.001$) (Figure 2). Other parameters influencing final NIHSS score are shown in Table 1.

In fact, MMP-9 value was the only factor associated to the final NIHSS in the multiple logistic regression model (OR = 4.54; CI 1.5, 13.75). A cut-point of MMP-9 = 142.18 ng/ml had a positive predictive value of 94.4% to assess patient's NIHSS (<8 or ≥ 8) by the end of the study (Table 3).

As NIHSS scores were obtained at different times, we classified patients according to whether they improved, remained stable or worsened. During the study period 14 patients improved, 10 remained stable and 15 deteriorated. When the improving group was analyzed we found lower MMP-2 and MMP-9 levels than in the non-improving group (Figure 3). Other parameters related to neurological improvement are shown in Table 2. MMP-9 was the main factor associated to neurological recovery in a logistic regression model (OR = 12; CI 1.64, 88.09) in which a cut-point of MMP-9 = 142.18 ng/ml gave a positive predictive value of 83.33% for detecting neurological improvement (Table 3).

Although higher MMP-9 levels were found for those patients who deteriorated or remained stable (deterioration: 170.6 ± 82.1 ng/ml; stability: 176.2 ± 124.9 ng/ml; improvement: 90.5 ± 60.3 ; $p = 0.036$), this significance was mainly due to the difference between high MMP-9 levels in the deteriorating group and low MMP-9 levels in the improving group when a post-hoc analysis was conducted.

Relation to TCD

Baseline TCD showed an occluded MCA in 37 patients (97.4%); a distal occlusion in 16 patients (42.1%) and a proximal occlusion in 21 of them (55.3%). Another patient had a normal TCD (one missing data existed for baseline TCD). By the end of the study (48 hours TCD), 16 patients' artery remained occluded (44.4%); 9 of them were distal occlusions (25%) and 7 were proximal occlusions (19.4%). Finally, a normal TCD was found in the other 20 patients (55.6%). The remaining three patients died before the study period was finished.

MMP expression was related to the time the vessel remained occluded and to the extent of the occlusion (distal or proximal MCA occlusion) as observed in Table 4.

MMP-2 levels were significantly higher when the MCA persisted proximally occluded during the study period compared to those patients with distal occlusion or normal MCA at 48 hours TCD ($p < .05$ for all time points). MMP-9 levels were also higher when a proximal occlusion was recorded at 48 hours TCD ($p < 0.05$ for baseline and 24-hour determinations).

In the 37 patients with baseline MCA occlusion, we studied MMP levels according to whether a spontaneous recanalization was present during the study period ($n = 25$) or not ($n = 12$). Final MMP-2 levels were significantly lower when recanalization occurred (528 ± 144.3 ng/ml versus 681.4 ± 239.2 ng/ml, $p = 0.031$) and final MMP-9 levels were also lower when spontaneous recanalization occurred (110.2 ± 100.9 ng/ml versus 244.8 ± 130 ng/ml, $p = 0.004$).

Relation to infarct volume

Mean infarct volume was 89.77 ± 95.66 cc. Patients with neurological improvement had smaller infarctions than those who remained stable or worsened (15.1 ± 23.5 cc versus 128.7 ± 96.1 cc, $p < 0.001$) as well as those with a final NIHSS score under 8 (12 ± 15.7 cc versus 135.6 ± 96.6 cc, $p < 0.001$).

A positive correlation was found between mean MMP-9 and infarct volume ($r = 0.385$, $p = 0.022$) as shown in Figure 4. Although there was a trend ($r = 0.322$, $p = 0.07$) for baseline MMP-9 to correlate with the infarct volume measured in the 48-hour CT scan, the best correlation was obtained for the 48-hour MMP-9 determination ($r = 0.500$, $p = 0.005$). No correlation existed for MMP-2 and infarct volume at any time point.

Discussion

Our study found an association between MMP up-regulation and neurological impairment. We evaluated the role of MMPs during the acute phase of stroke by means of several approaches including stroke severity, infarction size and hemodynamic status. Stroke severity as measured with the NIHSS was correlated to MMP-9 levels at different time points after symptom onset. Lower MMP-9 levels were strongly associated with neurological improvement during the first 48 hours. In contrast, higher MMP-9 levels were associated with neurological deterioration in the same time frame. MMP expression was related to the time and location of MCA occlusion. In addition, a positive correlation between mean MMP-9 and total infarct volume was found.

The temporal profile of MMPs in our series pointed out a MMP-9 overproduction in acute stroke patients as compared to controls. MMP-9 levels exceeded the reference values in each time point measurement. In contrast, our patients exhibited MMP-2 levels within the normal range during the study period. Although differences in MMP levels between patients and controls may be influenced by the younger age in our healthy controls, no differences were found in MMP levels regarding age among our stroke population (21 to 95 years).

In our study, peak levels of MMP-9 were found at the 24-hour determination. This observation is in line with that of a rat model of permanent MCA occlusion, in which a large increase in the MMP-9 occurred 12 to 24 hours after the injury (18). Romanic et al. showed that MMP-9 was detected in the ischemic tissue within 24 hours after MCA occlusion and was maximally observed up to the 5-day time point (7). MMP-2 expression was also detected in ischemic tissue but predominantly at the five-day time point.

Although this study identified a baseline peak of MMP-2 levels, we cannot rule out a delayed (>48 hours) or very early (prior to our baseline determination) elevation of MMP-2. In fact, in a non-human primate stroke model, latent MMP-2 was significantly increased in the basal ganglia 1 hour after MCA occlusion compared to controls (6).

The temporal profile of animal MMP expression varies, depending on the author and the ischemia model. Activated MMP-9 appeared 3 hours after 60 min of transient ischemia (19), and pro-MMP-9 induced as soon as 2 hours after the onset of ischemia in a permanent occlusion model (4). Discrepancies in temporal profile of MMPs and in the presence of active or pro-MMP forms in these animal models of cerebral ischemia may be influenced by different zymographic techniques and MMP purification methods that have allowed the threshold of MMP-9 detection to increase. ELISA methods to measure MMPs are currently available and promising results are appearing in other cardiovascular fields (20). The ELISA method used in our experiment detects the proform of the MMPs as well as the MMPs-TIMPs complex (pro-MMP-9, pro-MMP-9-TIMP-1 and pro-MMP-2, pro-MMP-2-TIMP-2). Several studies suggest that enzymatic activation of MMP-9 proenzyme occurs by binding at the cell surface, and activated enzyme is then rapidly degraded to prevent excess activity (21). Therefore, only very low levels of active MMP-9 may be present in tissue at any given time (8).

MMPs have been studied by immunohistochemistry in humans with strokes (22, 23), showing overproduction of MMP-9 during the early and proinflammatory phases of stroke, whereas MMP-2 was found in the later reparative phases when the blood vessels begin to regrow. These necropsic findings identified MMP-9 in neutrophils for 1 week after the infarction. Macrophages that expressed matrilysin and MMP-2 were observed after 1 week. Clark et al. found that human brain tissue after a stroke shows MMP-2 after several months, whereas MMP-9 is elevated within days after the infarct (23). The later rise in MMP-2 activity would correlate better with the post-stroke time course of

capillary remodeling than with that of cerebral edema. In accordance with this observations, our study found that MMP-2 levels were higher in patients with a previous cerebrovascular event.

In animal models and necropsy studies, a causal link between MMPs overexpression and brain damage is suggested. However, whether MMP-9 overexpression contributes to the development of infarct or simply represents a marker of the extent of brain ischemia remains unclear. Our study does not elucidate this controversy. We observed a trend of correlation between baseline MMP-9 and infarct volume measured on CT at 48 hours, although the best correlation was obtained for the 48-hour MMP-9 determination. The study is a correlative survey of several phenomena and one cannot chose one explanation over the other since the cause-effect relationships between the neurological impairment and the biochemical marker was not established. As MMP expression was related to the time of persistent arterial occlusion in our study and a significant increase of pro-MMP-9 occurred in a time-dependent manner during reperfusion in a model of transient ischemia, (19) we hypothesize that MMPs may contribute to the fact that longer ischemia leads to greater infarctions.

Animal studies are being designed to answer questions about what produces these MMPs, why they are up-regulated after stroke and how they damage the infarcted brain parenchyma. We have no information on the cell types that serve as sources for plasmatic MMP-9 in our study. The large increase in MMP-9 may have been endogenous from astrocytes and microglia or exogenous from invading neutrophils and macrophages (24). A transient increase of latent MMP-9 in plasma after MCA occlusion in baboons (6) did not result from blood cell sources. This lack of correlation between neutrophil number and gelatinase also has been observed in human plasma (25). Nevertheless, we found a correlation between MMP-9 and leukocyte count. It has been demonstrated that neutrophils utilize MMPs for migration (26) and that substantial infiltration of leukocytes occurs 12 to 24 hours to several days after focal cerebral ischemia (27). We cannot exclude the possibility that MMP-9 from activated leukocytes contributes to infarct progression. Based on morphological criteria, MMP-9 appeared to stain with endothelial cells and neutrophils within and at the periphery of the infarct within 24 hours of focal ischemia in rats (7).

Although increasing evidence for the role of MMPs is available from animal models of ischemia, information in humans is lacking. Based on our results, ELISA measures of MMPs for stroke patients seem to be a good tool for further research into this field, particularly when new drugs blocking MMPs offer attractive results (28). As no difference was found for MMP-2 or MMP-9 regarding age, gender or any vascular risk factor, MMPs determination could be a useful surrogate marker in the acute phase of stroke.

In conclusion, our study demonstrates an association between MMP-9 overexpression and stroke severity, infarct size and the time and location of MCA occlusion. These findings suggest a deleterious role for MMP-9 in the development of brain damage after human ischemic stroke.

References

- 1.- Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet.* 1990;6:121-125.
- 2.- Mun-Bryce S, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:1163-1172.
- 3.- Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases: a minireview. *J Biol Chem.* 1999;274:21491-21494.
- 4.- Gasche Y, Fujimura Y, Copin J, Kawase M, Masengale 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.
- 5.- Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke.* 1998;29:2189-2195.
- 6.- 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.
- 7.- 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.
- 8.- Asahi M, Asahi K, Jung J, del Zoppo G, 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.
- 9.- Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE, the TOAST Investigators. Classification of subtype of acute ischemic stroke: definitions for use in a multicenter clinical trial. *Stroke* 1993;24:35-41.
- 10.- Brott TG, Haley EC, Levy DE, Barsan W, Broderick J, Sheppard GL, Spilker J, Kongable GL, Massey S, Reed R, Marler JR. Urgent therapy for stroke, part I: pilot study of tissue plasminogen activator administered within 90 minutes. *Stroke.* 1992;23:632-640.
- 11.- Haley EC, Levy DE, Brott TG, Sheppard GL, Wong MCW, Kongable GL, Torner JC, Marler JR. Urgent therapy for stroke, part II: pilot study of tissue plasminogen activator administered within 91-180 minutes from onset. *Stroke.* 1992;23:641-645.
- 12.- Gönner F, Remonda L, Mattle H, Sturzenegger M, Ozdoda C, Lövlad KO, Baumgartner R, Bassetti C, Schroth G. Local intra-arterial thrombolysis in acute ischemic stroke. *Stroke.* 1998;29:1894-1900.
- 13.- Ueda T, Sakaki S, Kumon Y, Ohta S. Multivariable analysis of predictive factors related to outcome at 6 months after intra-arterial thrombolysis for acute ischemic stroke. *Stroke.* 1999;30:2360-2365.

- 14.- DeGraba TJ, Hallenbeck JM, Pettigrew KD, Dutka AJ, Kelly BJ. Progression in acute stroke. Value of the initial NIH stroke scale score on patient stratification in future trials. *Stroke*. 1999;30:1208-1212.
15. Pullicino P, Snyder W, Munschauer F, Pordell R, Greiner F. Interrater agreement in computed tomography infarct measurement. *J Neuroimaging*. 1996;6:16-19.
16. Fujioka KA, Douville CM. Anatomy and freehand examination techniques. In: Newell DW, Aaslid R. *Transcranial Doppler*. New York, NY: Raven Press Publishers; 1992:9-31.
17. Zanette EM, Roberti C, Mancini G, Pozzilli C, Bragoni M, Toni D. Spontaneous middle cerebral artery reperfusion in acute ischemic stroke: a follow-up study with transcranial Doppler. *Stroke*. 1995;26:430-433.
- 18.- 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.
- 19.- 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 Research*. 1999;842:92-100.
- 20.- Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, Ueno T, Sugi K, Imaizumi T. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:368-372.
- 21.- Yu Q, Stamenkovic I. Localization of metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev*. 1999;13:35-48.
- 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.
- 23.- 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. *Neuroscience Letters*. 1997;238:53-56.
- 24.- Gottschall PE, Deb S. Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons. *Neuroimmunomodulation*. 1996;3:69-75.
- 25.- Kjeldsen L, Bjerrum OW, Hovgaard D, Johnsen AH, Sehested M, Borregaard N. Human neutrophil gelatinase: a marker for circulating blood neutrophils. Purification and quantification by enzyme linked immunosorbant assay. *Eur J Haematol*. 1992;49:180-191.
- 26.- Weiss SJ, Peppin GJ. Collagenolytic metalloenzymes of the human neutrophil. *Biochem Pharmacol*. 1986;35:3189-3197.
- 27.- Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Lian J, Chen S, del Zoppo GJ. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol*. 1994;144:188-199.
- 28.- Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke*. 2000;31:3034-3040.

Figure 1.

Temporal profile for MMP-9 and MMP-2. Broken line indicates reference interval for healthy controls (MMP-9 = < 97 ng/ml and MMP-2 = 427-835 ng/ml).

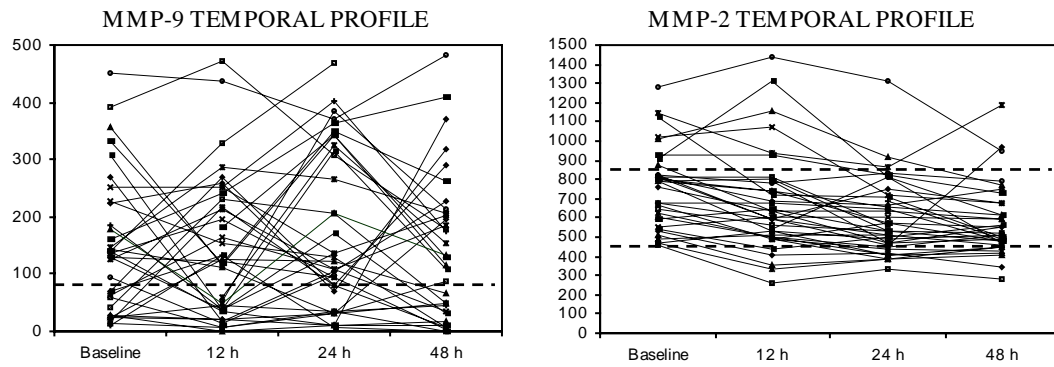


Table 1. Main characteristics of patients regarding final NIHSS score.

	NIHSS < 8 (n = 13)	NIHSS ≥ 8 (n = 26)	<i>p</i>
Male	6 (46.2)	14 (53.8)	0.651
Age, y	76.5 (9.9)	72.7 (17.3)	0.474
Hypertension	6 (46.2)	14 (53.8)	0.651
Hyperlipidemia	1 (7.7)	5 (22.7)	0.377
Diabetes	2 (15.4)	7 (26.9)	0.420
Previous Stroke	2 (15.4)	7 (26.9)	0.420
Temperature, °C	36.4 (0.3)	36.9 (0.4)	0.002 *
TCD (N/D.o/P.o)	0 (0)/10 (76.9)/3 (23.1)	1 (4.5)/6 (24)/18 (72)	0.007 *
SBP, mmHg	168.3 (20.3)	153.0 (39.8)	0.144
DBP, mmHg	93.1 (14.3)	81.9 (22.4)	0.117
Glucose, mg/dL	128.7 (81.7)	165.8 (94.1)	0.253
Platelets,	233538 (66817)	188360 (44900)	0.018 *
Leukocyte, x10E9/L	8653 (1827)	10356 (3720)	0.130
Fibrinogen, g/L	4.0 (0.8)	3.9 (1.0)	0.610
MMP-2, ng/ml	614.4 (120.3)	659.1 (211.8)	0.487
MMP-9, ng/ml	82.1 (55)	183.43 (99.5)	0.000 *

Values are mean (SD) or n (%), as appropriate. Baseline data are shown except for temperature and MMP (mean values of the four time points).

For TCD: N = normal, D.o = distal occlusion, P.o = proximal occlusion.

* Factors with a value of $p < 0.1$ were included in the regression model.

Table 2. Main characteristics of patients with and without neurological improvement.

	Neurological improvement (n = 14)	Stability or deterioration (n = 25)	<i>p</i>
Male	7 (50)	13 (52)	0.905
Age, y	73.6 (17.6)	74.2 (14.1)	0.909
Hypertension	5 (35.7)	15 (60)	0.146
Hyperlipidemia	1 (7.1)	5 (20)	0.391
Diabetes	1 (7.1)	8 (32)	0.077 *
Previous Stroke	2 (14.3)	7 (28)	0.330
Temperature, °C	36.4 (0.3)	36.8 (0.4)	0.013 *
NIHSS (<8/8-20/>20)	1 (7.7)/10 (76.9)/2 (15.4)	2 (8.3)/14 (58.3)/8 (33.3)	0.482
TCD (N/D.o/P.o)	0 (0)/9 (64.3)/5 (35.7)	1 (4.2)/7 (29.2)/16 (66.7)	0.095 *
SBP, mmHg	158.4 (27)	156.4 (37.6)	0.866
DBP, mmHg	86.5 (12.8)	84.5 (23.3)	0.734
Glucose, mg/dL	130.9 (76.7)	167.8 (97.6)	0.239
Platelets,	231428 (64484)	187708 (45901)	0.020 *
Leukocytes, x10E9/L	8814 (1754)	10333 (3826)	0.104
Fibrinogen, g/L	3.9 (1)	3.9 (0.9)	0.896
MMP-2, ng/ml	570.1 (129.8)	685.7 (201.4)	0.062 *
MMP-9, ng/ml	108.1 (87.8)	172.8 (98.9)	0.049 *

Values are mean (SD) or n (%), as appropriate. Baseline data are shown except for temperature and MMP (mean values of the four time points). For TCD: N = normal, D.o = distal occlusion, P.o = proximal occlusion. * Factors with a value of $p < 0.1$ were included into the regression model.

Table 3.

Factors associated with neurological outcome (improvement vs stability-deterioration) and final NIHSS (<8 vs ≥8) on univariate analysis and multiple logistic regression model.

<i>Neurological outcome</i>	Univariate Analysis OR (95% CI)	Logistic Regression OR (95% CI)	logLR <i>p</i>
MMP-9	5.49 (1.21, 24.80)	12.05 (1.64, 88.09)	0.0049
MMP-2	3.75 (0.91, 15.34)	8.93 (1.27, 62.84)	0.0138
Baseline TCD			
Normal	1		
Dist Occ	0.26 (0.002, 7.34)		
Prox Occ	1 (0.035, 28.3)		
Platelet count	0.24 (0.057, 0.99)	0.11 (0.01, 0.86)	0.0185
Temperature	3.75 (0.916, 15.3)		
Diabetes Mellitus	6.11 (0.676, 55.1)		
<i>Final NIHSS</i>	Univariate Analysis OR (95% CI)	Logistic Regression OR (95% CI)	logLR <i>p</i>
MMP-9	22.64 (2.5, 203.06)	4.54 (1.50, 13.75)	0.005
Baseline TCD			
Normal	1		
Dist Occ	1.76 (0.059, 52.6)		
Prox Occ	8.53 (1.89, 38.40)		
Platelet count	0.16 (0.037, 0.77)		
Temperature	10.38 (1.8, 57.4)		

MMP cut-point levels were obtained from the ROC curves.
For MMP-2 = “< 603.77” and for MMP-9 = “<142.18 ng/ml”.

Table 4.

MMP-2 and MMP-9 levels at different time points depending on final MCA status (TCD recording at 48 h from stroke onset). Data from patients who died before final TCD was performed (n=3) are not included. MMP values are expressed as mean (SD), ng/dL.

TCD (48 h)	Normal MCA n = 20	Distal Occlusion n = 9	Proximal Occlusion n = 7	<i>p</i>
MMP-2				
Baseline	612.9 (128.4)	853.5 (242.6)	903.7 (130.5)	0.001
12 hours	543.5 (131.7)	804.5 (352.1)	821.8 (272.7)	0.023
24 hours	514.6 (125.6)	653.4 (295.0)	722.1 (121.8)	0.012
48 hours	508.0 (141.6)	596.9 (187.4)	751.9 (225.8)	0.017
MMP-9				
Baseline	99.4 (102.4)	188.1 (149.3)	236.4 (81.1)	0.032
12 hours	124.6 (122.2)	154.2 (133.0)	185.7 (126.7)	0.528
24 hours	126.2 (115.8)	211.2 (143.4)	282.4 (147.9)	0.029
48 hours	118.1 (108.9)	182.3 (173.7)	216.1 (72.4)	0.203

Figure 2.

MMP-9 levels during the study period for patients with final NIHSS <8 (48h) and for patients with final NIHSS ≥ 8. Mean ± SE are shown. Broken line indicates MMP-9 reference interval for healthy controls (< 97 ng/ml).

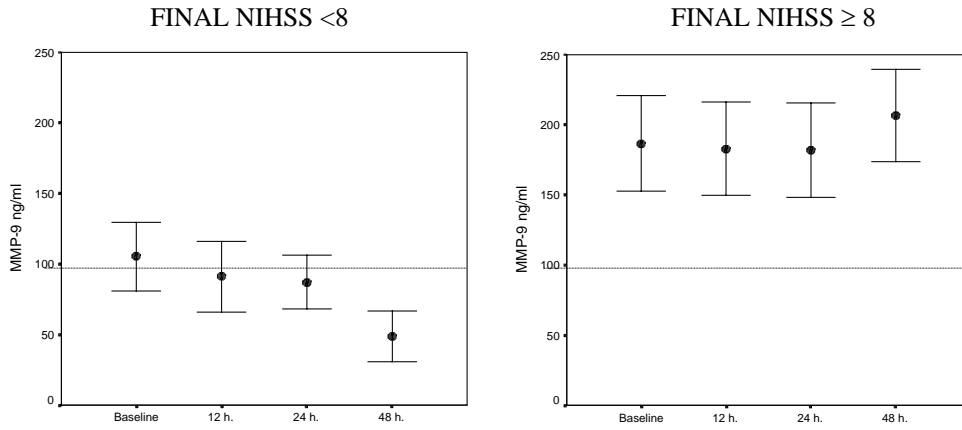


Figure 3.

MMP-9 levels according to neurological improvement. Mean ± SE are shown. Broken line indicates MMP-9 reference interval for healthy controls (< 97 ng/ml).

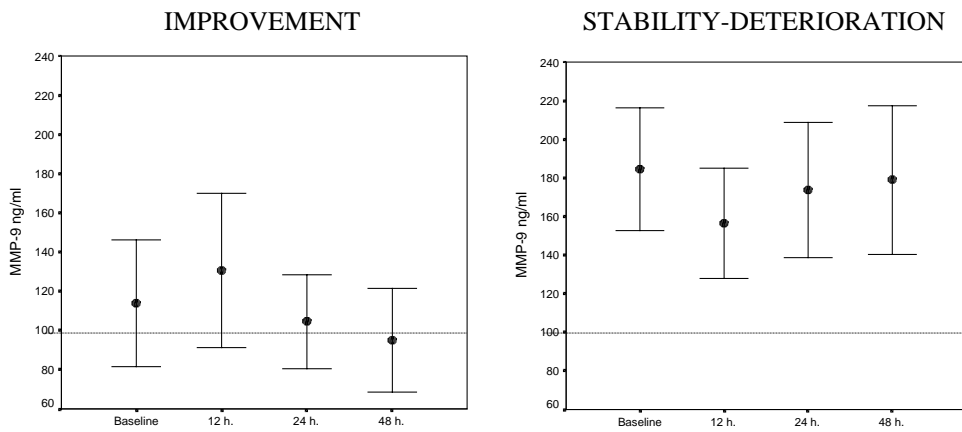
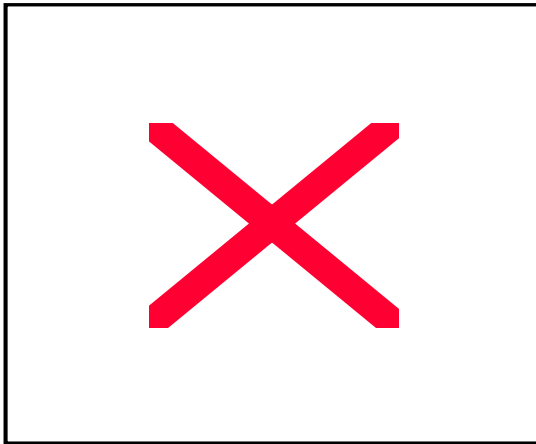
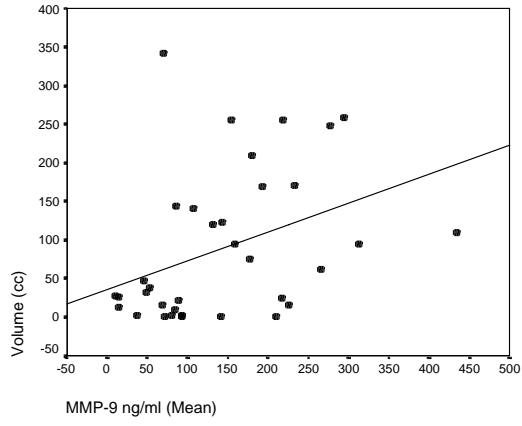


Figure 4.

Correlation between MMP-9 and both infarct volume ($r = .385$ $p = .022$) and final NIHSS ($r = .486$ $p = .002$) are shown (Pearson and Spearman tests respectively).



4.2 Matrix metalloproteinase (MMP-9) expression is related to hemorrhagic transformation after human cardioembolic stroke.
(sometido a Stroke)

Matrix Metalloproteinase (MMP-9) Expression Is Related To Hemorrhagic Transformation After Cardioembolic Stroke.

J. Montaner MD, C. Molina MD, J. Alvarez-Sabín MD, A. Anglés MD, S. Abilleira MD,

J. Arenillas MD, J. Monasterio MD.

From the Cerebrovascular Unit (J. M, C. M, J. A, S. A, J. A) and Hemostasia Research Unit (A. A, J. M). Vall d'Hebron Hospital. Barcelona. Spain.

Acknowledgments

This study was supported in part by a grant from the Catalan Society of Neurology for cerebrovascular diseases (sponsored by Uriach).

Summary

Background and Purpose- In animal models of cerebral ischemia, matrix metalloproteinase (MMPs) expression was significantly increased and related to blood brain barrier disruption, edema formation and hemorrhagic transformation (HT). MMP inhibitors reduce HT after embolic ischemia in tPA treated animals. We aimed to correlate the expression of MMPs after human ischemic stroke with the presence of HT.

Methods- Serial MMP-2 and MMP-9 determinations were performed in 39 cardioembolic strokes involving the MCA territory by means of ELISA. Hemorrhagic events were classified according to clinical and CT criteria [hemorrhagic infarction (HI) and parenchymal hemorrhage (PH)]. HT was evaluated in a 48h CT scan (early-HT) and again between day 5 and 7 (late-HT).

Results- HT was present in 42.1% of the patients (43.75% early-HI, 25% early-PH and 31.25% late-HI). MMP-2 values were included in the normality range and not related to HT. An overexpression of MMP-9 (normality range <97 ng/ml) was found among patients with and without HT (159.3 ± 82 ng/ml versus 143.9 ± 112.6 ng/ml; $p=0.64$). According to HT subtypes, those with a late-HI were the patients with higher baseline MMP-9 levels (240.4 ± 111.2 ng/ml versus 102.5 ± 76.7 ng/ml for all other patients; $p=.002$). Baseline MMP-9 was the only variable associated to late-HI in the multiple logistic regression model (OR = 9; CI 1.46, 55.24; $p=0.010$). A peak of MMP-9 at the 24h-timepoint (250.6 ng/ml) was found prior to the appearance of a PH.

Conclusions- Matrix metalloproteinases are involved in some subtypes of HT after human cardioembolic stroke. Baseline MMP-9 level predicts late-HI and a 24h-peak precedes early-PH.

Key words. cerebral ischemia, embolic, hemorrhagic transformation, hemorrhagic infarction, matrix metalloproteinase, MMP-9, parenchymal hematoma, stroke.

Hemorrhagic infarction and hematoma are feared events that may follow ischemic stroke. As thrombolytic agents are beneficial for acute stroke treatment even though increase the risk of hemorrhagic transformation (HT) (1), it is critical to identify the underlying mechanisms of this complication, to make tPA a safer stroke therapy.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc-binding proteolytic enzymes that normally remodel the extracellular matrix (ECM) and pathologically attack substrates as part of the neuroinflammatory response (2). MMP-2 and MMP-9 specifically attack type IV collagen, laminin and fibronectin, which are the major components of the basal lamina around cerebral blood vessels. (3) In animal models of cerebral ischemia, MMPs expression was significantly increased and related to blood brain barrier disruption, edema formation and HT (4,5).

Whether HT in humans is also related to MMPs action, remains unknown. As HT has been predominantly associated with embolism, we aimed to correlate the expression of MMPs after human cardioembolic stroke with the appearance of different subtypes of HT.

Subjects and Methods

Study population

From June 1999 to March 2000, we prospectively studied consecutive patients with an acute stroke. A total of 110 patients evaluated within the first 12 hours of stroke onset were included in the study. A detailed history of vascular risk factors was obtained from each patient. To identify potential mechanism of cerebral infarction, a set of diagnostic tests was performed that included electrocardiogram, chest radiography, carotid ultrasonography, complete blood count and leukocyte differential, and blood biochemistry in all patients; many also underwent special coagulation tests, transthoracic ecocardiography and Holter monitoring. With this information, and the neuroimaging data, previously defined etiologic subgroups were determined (6). Eighty-four (76.4%) patients had a non-lacunar stroke involving the vascular territory corresponding to the MCA. Of these, 44 (40%) patients were considered as a cardioembolic stroke. Most of these patients had atrial fibrillation.

Serial TCD studies were conducted using a Multi-Dop X/TCD (DWL Elektronische Systeme GmbH) device, with a hand-held transducer in a range-gated, pulsed-wave mode at a frequency of 2 MHz. During the follow-up controls, spontaneous recanalization was diagnosed when a previously absent blood flow signal reappeared (dampened or normal waveform) for a proximal MCA occlusion or when a previously dampened waveform came within the normal range for a distal MCA occlusion (7).

We excluded patients with a known inflammatory or malignant disease (n=3) as well as patients with an inadequate transtemporal window for TCD (n=2). A total of 39 patients (51.3% male, mean age 74 ± 15 years) were included in the definitive analysis.

Clinical examination was performed on admission and at 12, 24 and 48 hours of symptom onset, at the time of each MMP determination. Stroke severity was assessed by using the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS).

All patients received subcutaneous low molecular weight heparin as prophylaxis for deep venous thrombosis. Intravenous heparin was not administered during the study period and no patient received tPA. This study was approved by the Ethics Committee of the hospital and all patients or relatives gave informed consent.

Computed tomography. Criteria of hemorrhagic transformation.

On admission, all patients underwent a CT within the first 12 hours of stroke onset, which was repeated after 48 hours (or earlier when a rapid neurological deterioration occurred) to evaluate the presence of an early-HT. In addition, another CT was performed between day five and seven to rule out the existence of a delayed or late-HT, that did not appear in the previous CT.

CT scans were reviewed by a neuroradiologist with extensive experience in acute stroke who was blinded to the clinical and MMPs details. The presence and type of HT were defined according to previously published criteria (8,9). Hemorrhagic infarction (HI) was defined as a petechial infarction without space-occupying effect, and parenchymal hematoma (PH) was defined as hemorrhage with mass effect. For statistical analysis both subtypes of HI and PH were considered together (HI1, small petechiae along the margins of the infarct. HI2, more confluent petechiae within the infarcted area.

PH1, when hematoma involved $\leq 30\%$ of the infarcted area with some slight space-occupying effect and PH2, when hematoma involved $> 30\%$ of the infarcted area with substantial mass effect, or clot remote to the infarcted area). Symptomatic intracranial haemorrhage was defined as blood at any site in the brain on the CT scan, documentation by the investigator of clinical deterioration evidenced by events related clinical worsening (eg, drowsiness, increase of hemiparesis) or causing a decrease in the NIHSS score of 4 or more points.

MMP-2 and MMP-9 ELISA

Peripheral blood samples were drawn from each patient at study entry and at 12, 24 and 48 hours from stroke onset. From the 156 expected extractions, missing data for MMPs included five baseline determinations which were so close to the 12-hour time point that only one extraction was done. Two missing data for the 24-hour and six for the 48-hour time point corresponded mostly to patients who died or to technical problems.

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 until analysis. MMP-2 and MMP-9 levels were determined by commercially available enzyme linked immunosorbent assay (ELISA, Biotrak Amersham Pharmacia, UK). ELISAs were performed according to manufacturer's instruction. Our laboratory reference intervals for healthy controls are: 41 ± 27.8 ng/ml for MMP-9 (n=62, 58% males, mean age 43 years, normal range = < 97 ng/ml) and 630.8 ± 101.8 ng/ml for MMP-2 (n=40, 47% males, mean age 43 years, normal range = 427-835 ng/ml). The mean intra-assay coefficients of variation were 8.9% for MMP-9 and 10.7% for MMP-2.

Statistical Analysis

Descriptive and frequency statistical analysis were obtained and comparisons were made by use of the SPSS statistical package, version 9.0. Statistical significance for intergroup differences were assessed by the X^2 test for categorical variables and the Student's t test and ANOVA for continuous variables.

MMP values were normally distributed (Kolmogorov-Smirnov and P-P plot). Baseline MMP or mean MMP levels (mean value of the four timepoints) were used for different analysis.

When indicated, Mann-Whitney *U* test or Kruskal-Wallis test were used and median and rank are shown. To calculate the sensitivity and specificity for MMP values to predict HT, a receiver operator characteristic (ROC) curve was configured. A logistic regression analyses was performed to determine factors that could be considered as independent predictors for HT subtypes. Cutoff value for MMP-9 with the highest sensitivity and specificity, according to HT groups, was included. A *p* value <0.05 was considered statistically significant.

Results

Baseline blood samples, CT scans and NIHSS scores were obtained in the first six hours in 80% of patients, and between 6 and 12 hours in all others.

HT on CT was detected in 16 (42.1%) patients. Mean MMP-2 levels for patients with and without HT were included in the normality interval of our laboratory for healthy controls (427-835 ng/ml) but mean MMP-9 levels for patients with and without HT exceeded the reference interval for healthy controls (< 97 ng/ml) (Figure 1). Mean MMP-9 and MMP-2 levels were not different according to the presence or absence of HT considered globally (159.3 ± 82.9 ng/ml versus 143.9 ± 112.6 ng/ml, $p=0.64$ for MMP-9 and 629.1 ± 200.2 ng/ml versus 655.1 ± 183.1 ng/ml, $p=0.68$ for MMP-2) (Figure 1).

On temporal basis, early-HT, occurring within the first 48 hours, was present in 11 (28.9%) and late-HT, detected at the 5-7 days CT scan, in 5 patients (13.2%). In Figure 2 we can observe high MMP-9 levels present in the late-HT subgroup as compared to patients with no-HT or early-HT. Baseline MMP-9 values for these temporal HT subtypes were 157.6 ± 126.0 ng/ml for patients without HT, 87.6 ± 65.4 ng/ml for early-HT and 240.4 ± 111.2 ng/ml for late-HT ($p=0.05$) (Figure 2 A).

Main baseline characteristics of HT patients, attending subtypes, are shown in Table 1. In those 16 patients with a HT, 7 (43.75%) early-HI, 4 (25%) early-PH and 5 (31.25%) late-HI were described.

The higher MMP-9 values were found in patients with a late-HI and the lower in those with an early-HI (Figure 3 A). These differences were even higher when baseline MMP-9 levels were considered (Figure 3 B).

Temporal profile of MMPs according to HT subtypes is shown in Figure 4. Interestingly, the temporal profile of early-PH disclosed a peak MMP-9 at the 24 hour timepoint (250.6 ± 165.1 ng/ml). At this timepoint all 4 PH-patients deteriorated (symptomatic PH). The temporal profile for late-HI disclosed a peak baseline MMP-9. This timepoint offered the best association with the development of a late-HI. Baseline MMP-9 was statistically higher for patients with late-HI than for the remaining patients (240.4 ± 111.2 ng/ml versus 102.5 ± 76.7 ng/ml, $p = 0.002$). These differences were also achieved for the mean MMP-9 (212.4 ± 89.0 ng/ml, late-HI versus 130.3 ± 80.9 ng/ml, all other patients; $p = 0.049$). At the 24 hour timepoint also MMP-2 levels were higher if a late-HI occurred (721.0 ± 217.8 ng/ml, late-HI versus 537.6 ± 116.1 ng/ml, all other patients; $p = 0.009$).

Table 2 illustrates different subtypes of HT according to the time presence of spontaneous recanalization. HT subtypes showed a different distribution ($p=0.036$) mainly due to the opposite recanalization pattern between early-HI and late-HI. No patient who recanalized during the first 12 hours from symptom onset (early recanalization) had late-HT. Conversely, 6 of 7 (85.7%) patients who recanalized in the first 12 hours experienced early-HI.

In order to confirm the association between MMP-9 and late-HI a multiple logistic regression model was used (Table 3). Although hypertension and the absence of early recanalization were significantly associated with late-HI on univariate analysis, only baseline MMP-9 levels (OR = 9; CI 1.46, 55.24; $p=0.010$) emerged as an independent predictor of late-HI. A cut-point of MMP-9 = 144.81 ng/ml had a sensitivity of 80% and a specificity of 79.2% to detect the presence of a late-HI.

HT was located in the deep MCA territory in 10 patients (26.3%) and in the 6 remaining (15.8%) HT involved the superficial MCA territory. MMP expression was similar whether HT was located in the deep MCA territory or involved the superficial MCA territory. Although mean MMP-9 level was higher in superficial (178.7 ± 119.4 ng/ml) than in deep HT (147.6 ± 56.0 ng/ml) and in the opposite way mean MMP-2 level was higher in deep HT (681.7 ± 218.4 ng/ml) compared to superficial HT

(541.5 ± 140.2 ng/ml), none of these differences achieved statistical significance (p= 0.76 and p= 0.33 respectively).

Discussion

This study shows for the first time an association between MMP-9 expression and several subtypes of HT after human cardioembolic stroke.

In a large CT study of acute cerebral embolism, Okada et al. (10) noted a spectrum of intracranial bleeding in 40.7 % of nonanticoagulated patients, including 8.6% of PHs. These numbers are very similar to the HT rates in our series (42.1% and 10.2%, respectively). In these patients, MMP-9 was specially overexpressed in cases of late-HI. Also a significant increase of latent MMP-9 was found in baboons with HT (5). In fact, baseline MMP-9 level was the only factor independently associated to late-HI among our patients.

A prospective study using serial scanning up to 3 weeks after stroke reported a high prevalence of HT (43% of all supratentorial infarcts, 61% of presumed cardioembolic infarcts) the majority in the second week (11). As we performed the last CT scan between day 5-7, later HT may have been missed, that could be related to MMP-9 expression as late-HT were. In addition, MRI is highly sensitive for identifying HT (12), and more accurate relations to MMP expression could be defined if this approach used. Other limitation of the study is the small number of cases when subtypes of HT are considered for statistical analysis.

Our findings support the idea that after degradation of ECM components of the basal lamina by MMPs, blood plasma or cellular elements may extravasate. Following experimental MCAO a gradual loss of laminin-1, laminin-5, fibronectin and collagen IV antigens within the basal lamina occurs (13,14). Hamman et al. (15) demonstrated a significant correlation between the development of HT and the regional loss of basal lamina after 3 hours of MCAO.

MMP-2 and MMP-9 released from vascular endothelium and leukocytes, during the inflammatory phase of ischemic stroke, employ collagen IV and laminin as substrates (16,17). Ogata et al. found that leukocyte plugging in microvessels of brain tissue was more frequent in hemorrhagic infarcts than in pale infarcts (18), and it is also known that neutrophils utilize MMPs for their migration (19).

After intracerebral injection of MMP-2 brain regions displayed necrosis, hemorrhage and migration of blood cells to the site of the injury (20). In our study MMP-2 was only related to late-HI at the 24h timepoint and other studies did not find constitutive expressed MMP-2 to increase the risk of HT (5). Perhaps only very high levels of MMP-2 (all values in our study were included into the normality range) lead to HT.

Classic works stated that the primary mechanism for HT in cardioembolic stroke appears to be reperfusion of infarcted or ischemic brain tissue following distal migration or dissolution of the embolus (21). Occasionally, delayed hemorrhage occurs without reperfusion, and in these cases the source of the hemorrhage is postulated to be collateral circulation to the damaged area (22).

There is also an interesting relation between the time to artery reopening and the presence of HT in our series. The majority of patients with an early-HI recanalized within 12 hours, but all patients who developed a late-HI had an absence of early spontaneous recanalization.

In a previous study (23) MMPs expression was strongly correlated with the extent and duration of MCAO. Taken together, these data permits to hypothesize that the longer the MCAO the higher the MMP-9 expression with a greater basal lamina disruption responsible of the HT, after restoration of circulation to the injured capillary bed either by reopening of the initial site of occlusion or by establishment of collateral circulation.

Several conditions which are aggravated by advancing age, as long-term hypertension, and diabetes target the microvasculature and may contribute to loss of microvascular integrity (24). All PH and late-HI in our series were hypertensives and many diabetics. MMP-9 proteolytic activity could easily undermine the integrity of a weakened arterial wall.

HT leading to clinical deterioration represents the main limitation for both intravenous and intra-arterial thrombolysis. We considered the possibility that MMPs were playing an active role in the matrix degradation that either initiated or propagated the formation of PHs. In our study a peak of MMP-9 was found at the 24h timepoint prior to the presence of a symptomatic PH. A rupture of the vascular wall is likely in several instances of intrainfarct hematoma (25). It is not possible to determine whether this high peak of MMP-9 is the cause of the hematoma or simply represents a marker of the extent of tissue destruction following PH, in the present study.

Our series included cardioembolic stroke patients, and many of them need anticoagulant therapy as secondary prevention. We suggest that baseline MMP-9 levels may help to decide the safer moment to initiate anticoagulation.

As plasmin is involved in the cascade that process proMMP-9 to the active form (26), the administration of tPA may activate and promote the destructive potential of this enzyme, thereby leading to hemorrhage. This hypothesis could explain the higher rates of HT after thrombolysis and the reduction of tPA induced hemorrhages after administering a MMP inhibitor (BB-94) in a rabbit cardioembolic stroke model (27).

ELISA methods to measure MMPs are currently available and promising results are appearing in other cardiovascular fields (28). Further studies are required to determine whether MMP-9 increases the risk of clinically relevant HT in patients receiving thrombolytic therapy. To measure the plasma levels of MMPs in order to identify patients at higher risk of HT seem attractive, and its potential usefulness could be tested in a future clinical trial.

References

- 1.- 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.
- 2.- Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet*. 1990;6:121-125.
- 3.- Mun-Bryce S, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cerebral Blood Flow Metab*. 1998;18:1163-72.
- 4.- Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in the rat. *Stroke*. 1990;21:801-807.
- 5.- Heo JH, et al. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19:624-33.
- 6.- Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE, the TOAST Investigators. Classification of subtype of acute ischemic stroke: definitions for use in a multicenter clinical trial. *Stroke*. 1993;24:35-41.
- 7.- Zanette EM, Roberti C, Mancini G, Pozzilli C, Bragoni M, Toni D. Spontaneous middle cerebral artery reperfusion in acute ischemic stroke: a follow-up study with transcranial Doppler. *Stroke*. 1995;26:430-433.
- 8.- Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Hoxter G, Mahagne M, Hennerici M. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke: the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA*. 1995;274:1017-1025.
- 9.- Pessin M, del Zoppo G, Estol C. Thrombolytic agents in the treatment of stroke. *Clin Neuropharmacol*. 1990;13:271-289.
- 10.- Okada Y, Yamaguchi T, Minematsu K, et al. Hemorrhagic transformation in cerebral embolism. *Stroke*. 1989;20:598-603.
- 11.- Hornig CR, Dorndorf W, Agnoli AL. Hemorrhagic cerebral infarction: A prospective study. *Stroke*. 1986;17:179-185.
- 12.- Hornig CR, Bauer T, Simon C, et al. Hemorrhagic transformation in cardioembolic infarction. *Stroke*. 1993;24:465-468.
- 13.- Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo GJ. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*. 1995;26:2120-6.
- 14.- Wagner S, Tagya M, Koziol JA, et al. Rapid disruption of an astrocyte interaction with the extracellular matrix mediated by alpha 6-beta 4 integrin during focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke*. 1997;28:858-65.
- 15.- Hamman GF, Okada Y, del Zoppo GJ. Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Cerebral Blood Flow Metab*. 1996;16:1373-1378.

- 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.- Hamann GF, del Zoppo GJ, von Kummer R. Hemorrhagic transformation of cerebral infarction. Possible mechanisms. *Thromb Haemost*. 1999;82 (Suppl.):92-4.
- 18.- Ogata J, Masuda J, Yutani C, Minematsu K, Yamaguchi T. Microvascular leukocyte plugging in evolving brain infarction in humans. In: Yamaguchi T, Mori E, Minematsu K, del Zoppo G.J (eds). *Thrombolytic therapy in acute ischemic stroke III*. Springer-Verlag Tokyo 1995:311-314.
- 19.- Weiss SJ, Peppin GJ. Collagenolytic metalloenzymes of the human neutrophil. *Biochem Pharmacol*. 1986;35:3189-3197.
- 20.- 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 Research*. 1992;576:203-207.
- 21.- Fisher CM, Adams RD. Observations on brain embolism with special reference to the mechanism of hemorrhagic infarction. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1951;10:92-94.
- 22.- Ogata J, Yutani C, Imakita M, Ishibashi-Ueda H, Saku Y, Minematsu K, Sawada T, Yamaguchi T. Hemorrhagic infarct of the brain without a reopening of the occluded arteries in cardioembolic stroke. *Stroke*. 1989;20:876-883.
- 23.- Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina C, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, González MA, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke. Temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke*. 2001 (in press).
- 24.- del Zoppo GJ, Okada Y, Hamann GF, et al. Mechanisms of fibrinolysis-associated hemorrhagic transformation. In: Yamaguchi T, Mori E, Minematsu K, del Zoppo G.J (eds). *Thrombolytic therapy in acute ischemic stroke III*. Springer-Verlag Tokyo 1995:254-66.
- 25.- Hart RG, Easton JD. Hemorrhagic infarcts. *Stroke*. 1986;17:586-589.
- 26.- Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem*. 1997;378:151-160.
- 27.- Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke*. 2000;31:3034-3040.
- 28.- Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, Ueno T, Sugi K, Imaizumi T. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:368-372.

Figure 1.

**Mean MMP-9 and MMP-2 levels according to the presence of HT (p=0.64 and p=0.68).
Broken line indicates reference interval for healthy controls (MMP-9 = < 97 ng/ml
and MMP-2 = 427-835 ng/ml).**

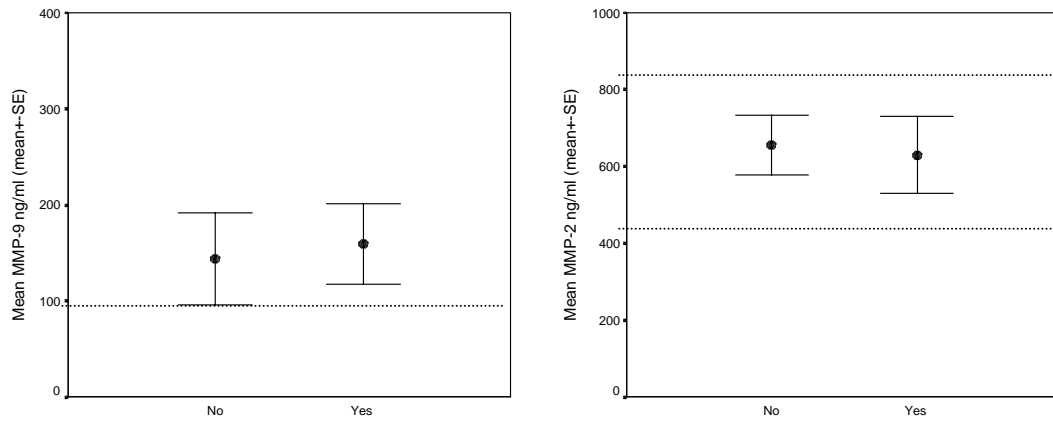


Figure 2.

MMP-9 levels according to temporal HT patterns. A, mean MMP-9 levels ($p=0.33$) and B, baseline MMP-9 levels ($p=0.05$). Broken line indicates reference interval for healthy controls (MMP-9 = < 97 ng/ml).

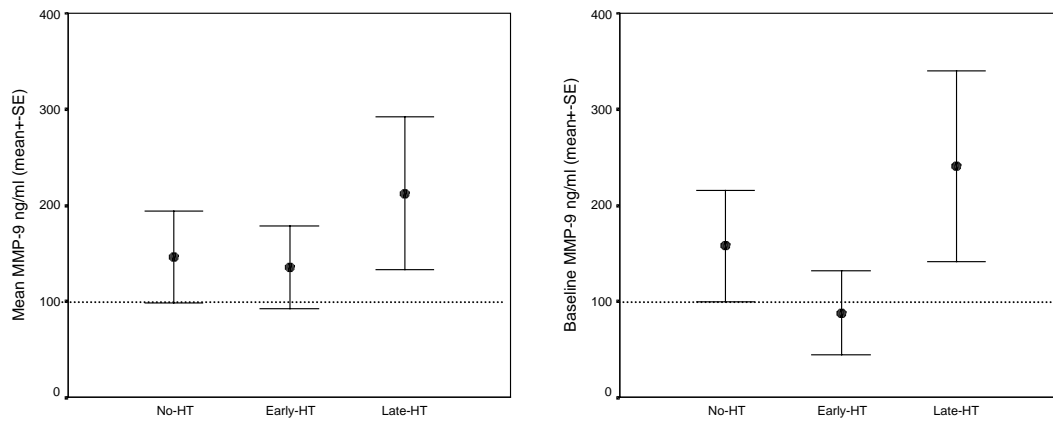


Figure 3.

MMP-9 levels according to all different subtypes of HT. A, mean MMP-9 levels (p=0.06) and B, baseline MMP-9 levels (p=0.04). Broken line indicates reference interval for healthy controls (MMP-9 = < 97 ng/ml).

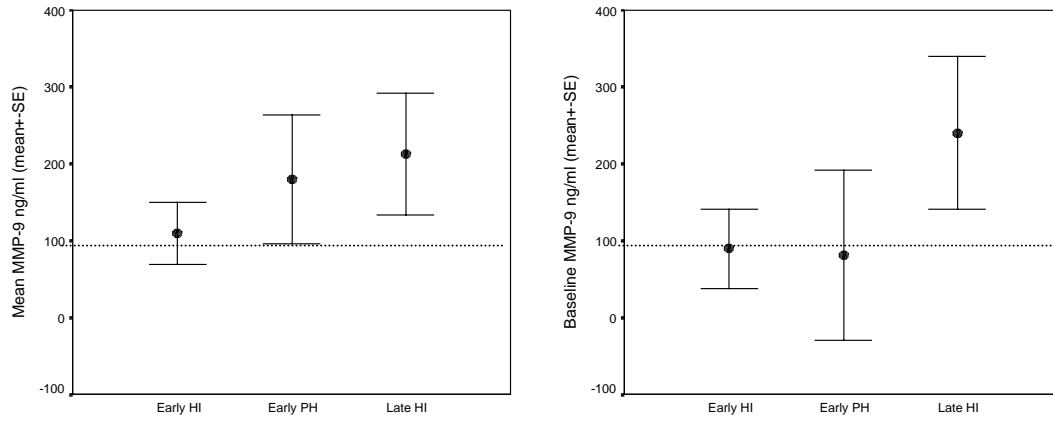


Figure 4.

MMP-9 and MMP-2temporal profile for HT subtypes. Patients with an early-PH showed a peak value preceding these symptomatic hemorrhages at 24h timepoint (MMP-9 = 250.6 ng/ml).

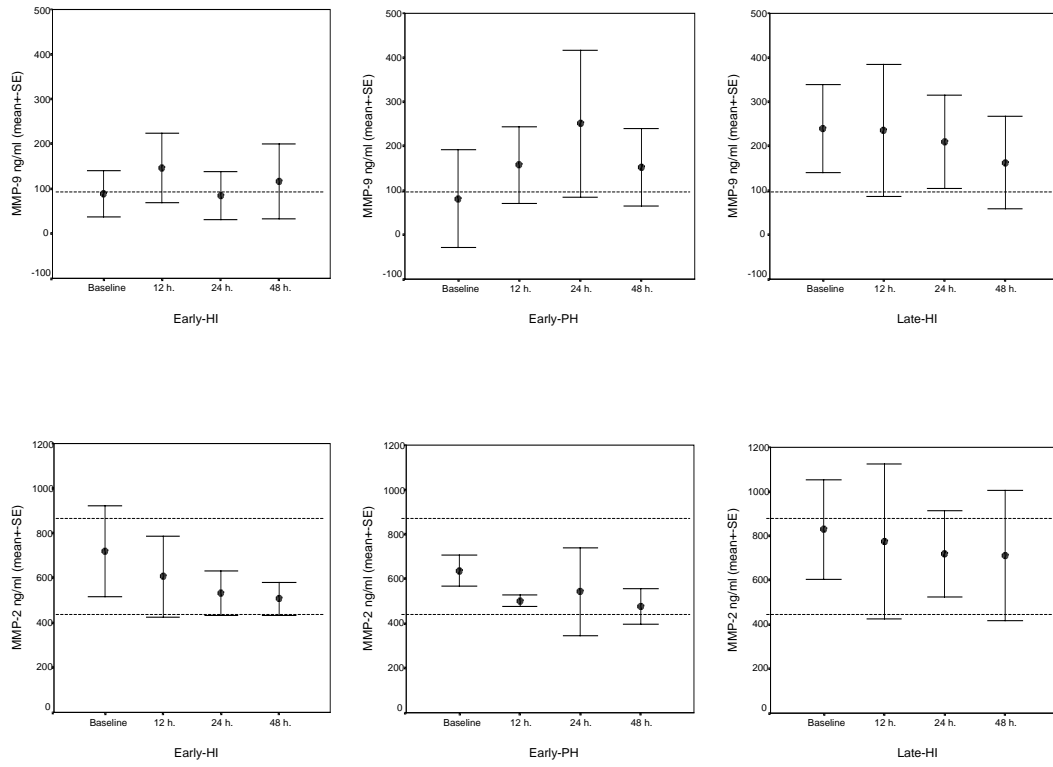


Table 1. Main baseline characteristics of patients according to the presence and subtype of HT.

	Early HI n = 7	Early PH n = 4	Late HI n = 5	<i>p</i>
Male	3 (42.8)	3 (75.0)	2 (40)	0.511
Age, y	77.0	72.0	83.0	0.288
Hypertension	2 (28.5)	4 (100)	5 (100)	0.009 *
Hyperlipidemia	0 (0)	0 (0)	2 (40)	0.081
Diabetes	0 (0)	2 (50)	2 (40)	0.118
Previous Stroke	1 (14.2)	0 (0)	2 (40)	0.287
Temperature, °C	36.6	36.3	36.0	0.918
NIHSS score	20	20	20	0.986
Early recanalization	6 (85.7)	1 (25.0)	0 (0)	0.014 *
Infarct Volume, cc	60.6	133.1	22.0	0.417
SBP, mmHg	135.0	170.0	180.0	0.173
DBP, mmHg	70.0	87.5	100.0	0.026 *
Glucose, mg/dL	116.0	360.0	159.0	0.026 *
Platelets,	178000	179000	188000	0.685
Leukocyte,x10E9/L	9700	9700	7600	0.331
PTT	32.0	32.6	32.1	0.018 *
Fibrinogen, g/L	3.8	4.0	4.2	0.847
MMP-2, ng/ml	647.6	636.2	825.1	0.587
MMP-9, ng/ml	70.7	81.0	223.8	0.047 *

Values are median or n (%), as appropriate. Baseline data are shown, except for early recanalization, assessed within 12 hours from symptom onset and infarct volume measured at the 48 hour CT-scan. * Factors with a value of $p < 0.05$.

Table 2. Relation between hemorrhagic transformation (HT) and MCA status. HT subtypes showed a different distribution (p=0.036) mainly due to the opposite recanalization pattern between early-HI and late-HI.

HT subtype	Early recanalization (<12 hours)	
	Yes	No
Non HT	11 (50%)	11 (50%)
Early HI	6 (85.7%)	1 (14.3%)
Early PH	1 (25%)	3 (75%)
Late HI	0 (0%)	4 (100%)

In the fifth case of late-HI only a TCD recording was available until 12 hours, so recanalization could not be assessed.

Table 3.

Factors associated with late hemorrhagic infarctions on univariate analysis and multiple logistic regression model.

<i>Late HI</i>	Univariate Analysis OR (95% CI)	Logistic Regression OR (95% CI)	logLR <i>p</i>
Baseline MMP-9	15.2 (1.37, 167.98)	9 (1.46, 55.24)	0.010
Absence of early recanalization	0.06 (0.003, 1.36)		
Hypertension	13.6 (0.68, 271.03)		

MMP-9 cut-point level (144.81 ng/ml) was obtained from the ROC curve.

4.3 Correlación entre la expresión de citocinas proinflamatorias y metaloproteinasas de matriz en la fase aguda del ictus isquémico.
(Rev Neurol 2001)

Correlación entre la expresión de citocinas proinflamatorias y metaloproteinasas de matriz en la fase aguda del ictus isquémico.

J. Montaner, J. Alvarez-Sabín, G. Barberá, A. Anglés, C. Molina, S. Abilleira, J. Arenillas, P. Chacón, J. Monasterio, A Codina.

Unidad Cerebrovascular. Servicio de Neurología (J.M, J.A, C.M, S.A, J.A). Unidad de Lípidos. Servicio de Bioquímica (G.B, P.C). Unidad de Investigación en Hemostasia. Servicio de Hematología (A.A, J.M). Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona.

Resumen. Las citocinas proinflamatorias son las principales responsables de la puesta en marcha de la cascada inflamatoria postisquémica. Recientemente se ha demostrado el papel deletéreo de las metaloproteinasas de matriz (MMPs) en la fase aguda del ictus. En modelos animales se ha sugerido la existencia de una conexión entre la activación de ambas familias.

Objetivo- Valorar si existe relación entre la expresión de MMPs y la de citocinas proinflamatorias en la fase aguda del ictus isquémico en humanos.

Material y métodos- De todos los ictus atendidos de forma consecutiva en un periodo de 10 meses, seleccionamos aquellos de etiología cardioembólica y que afectaban el territorio de la ACM. Se determinaron de forma seriada MMP-9, MMP-2 e IL-6 mediante técnicas de ELISA a la llegada del paciente a urgencias y a las 12, 24 y 48 horas del inicio de los síntomas.

Resultados- Se estudiaron en total 39 pacientes. Se encontró una correlación positiva entre la expresión media de ambas MMPs y la de IL-6 ($r = 0.33$, $p = 0.040$ para MMP-2 y $r = 0.45$, $p = 0.004$ para MMP-9). De los distintos tiempos estudiados, la mejor correlación fue la de MMP-9 con IL-6 a las 24 horas ($r = 0.418$, $p = 0.010$). A las 24h se registró un pico de expresión de IL-6. Se evidenció una tendencia a que los valores basales de MMP-2 y MMP-9 se correlacionaran con el pico de IL-6 ($r = 0.329$, $p = 0.061$ para MMP-2 y $r = 0.325$, $p = 0.061$ para MMP-9).

Conclusiones- Existe una relación entre la expresión de MMPs y los fenómenos inflamatorios que ocurren durante la fase aguda del ictus isquémico.

Palabras clave. *Citocinas, ictus cardioembólico, IL-6, metaloproteinasas, MMP.*

Summary. Proinflammatory cytokines are the main responsible for the onset of postischemic inflammatory cascade. Recently, the deleterious effect of matrix metalloproteinases (MMPs) in the acute phase of stroke has been described. Animal models suggest a link between both families.

Objective- We aimed to investigate possible relations between the MMP overproduction and proinflammatory cytokine expression after human ischemic stroke.

Methods- From all consecutive stroke patients attended during a 10 months period, we selected and prospectively studied those presenting as a cardioembolic stroke involving the MCA territory. MMP-9, MMP-2 and IL-6 were serially measured by means of ELISA at study entry and at 12, 24 and 48 hours after symptoms onset.

Results- A total of 39 patients were studied. A positive correlation was found between mean expression of both MMPs and IL-6 ($r = 0.33$, $p = 0.040$ for MMP-2 y $r = 0.45$, $p = 0.004$ for MMP-9). From all measured timepoints, the best obtained correlation was that of MMP-9 with IL-6 at 24 hours ($r = 0.418$, $p = 0.010$). At 24h a peak value of IL-6 was observed. Baseline MMP-2 and MMP-9 levels showed a trend to correlate with that peak of IL-6 ($r = 0.329$, $p = 0.061$ for MMP-2 y $r = 0.325$, $p = 0.061$ for MMP-9).

Conclusions- MMP expression correlates with the inflammatory cascade activation after acute cardioembolic stroke.

Key words. *Cytokines, embolism, IL-6, metalloproteinases, MMP, stroke.*

INTRODUCCIÓN

Cada vez hay mayor evidencia de que la respuesta inflamatoria juega un papel fundamental en la isquemia cerebral y de que la invasión por leucocitos del tejido cerebral infartado provoca lesión neuronal secundaria (1,2). Las citocinas proinflamatorias son las principales responsables de la puesta en marcha de la cascada inflamatoria postisquémica (3). La adhesión y migración de neutrófilos está dirigida por varias clases de glicoproteínas entre las que se encuentran las moléculas de adhesión, las cuales son activadas por la producción de dichas citocinas proinflamatorias (4).

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) son una familia de enzimas proteolíticas (Zn-dependientes) que intervienen de forma fisiológica en procesos de remodelado de la matriz extracelular como son la angiogénesis, la ovulación, la reabsorción ósea, el recambio endometrial... (5). La presencia de niveles elevados de algunos miembros de la familia de las MMPs se ha asociado a destrucción tisular en diversas patologías (6). En el campo de la neurología se han implicado en esclerosis múltiple (7), en formación de aneurismas cerebrales (8,9) y en la inestabilización de placas carotídeas (10,11).

Entre las MMPs, la gelatinasa A (MMP-2) y la gelatinasa B (MMP-9) son capaces de digerir la lámina basal endotelial que rodea los vasos sanguíneos cerebrales, ya que atacan de forma específica el colágeno tipo IV, la laminina y la fibronectina que son sus componentes básicos y que juegan un papel fundamental en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica (12). En modelos animales de isquemia cerebral se ha demostrado un rápido incremento de la expresión de ambas MMPs (13-15) así como una reducción del tamaño del infarto cerebral cuando se administraban fármacos para bloquear la acción de las MMPs (14,16). Recientemente se ha descrito en humanos el perfil temporal de MMP-2 y MMP-9 tras el ictus y se ha demostrado que su expresión se relaciona con el volumen del infarto, el deterioro neurológico y la extensión y duración de la oclusión arterial (17).

Parece ser que algunas citocinas (IL-1, IL-6 y TNF α) podrían tener un papel destacado en la regulación de las metaloproteinasas (18,19). En cultivos neuronales se ha demostrado que la expresión de MMP-9 se incrementa tras la administración de IL-1 (20). No obstante, todavía no sabemos si esta relación está también presente en humanos, hemos diseñado un estudio en que de forma simultánea se determinan MMPs (MMP-2 y MMP-9) y citocinas (IL-6) en la fase aguda del ictus isquémico. Su objetivo es investigar si existe una conexión en la activación y las vías de actuación de ambas familias o si su expresión tras el ictus sigue mecanismos independientes.

MATERIAL Y METODOS

Pacientes

De todos los enfermos atendidos en la Unidad Cerebrovascular de nuestro hospital, durante un periodo de 10 meses, se han estudiado de forma prospectiva 39 pacientes consecutivos que presentaban un ictus cardioembólico en el territorio de la arteria cerebral media (ACM). Todos los pacientes fueron incluidos en el estudio habiendo transcurrido menos de 12 horas desde el inicio de los síntomas.

Desde el punto de vista etiológico se han considerado como ictus cardioembólicos, aquellos que satisfacían los criterios TOAST (21). La gran mayoría de los pacientes incluidos la cardiopatía embolígena era una fibrilación auricular.

Se excluyeron los que estaban afectados de enfermedades de tipo inmunológico o infecciones agudas o crónicas activas en el momento del ictus, y aquellos que habían tomado en los días previos medicación antiinflamatoria o inmunosupresora.

A todos los pacientes se les realizó una tomografía computarizada (TC) craneal a su llegada a urgencias y un control a las 48 horas del inicio de la clínica. Todos los pacientes recibieron heparinas de bajo peso molecular como profilaxis de trombosis venosa profunda. Eran anticoagulados a dosis plenas (si era necesario) cuando el TC-C de control no mostraba transformación hemorrágica. Los pacientes anticoagulados desde las primeras horas del ictus o que recibieron fibrinólisis no se han incluido en el estudio.

Los pacientes o, si ello no era posible, sus familiares dieron su consentimiento para participar en el estudio.

Determinación MMP-2, MMP-9 e IL-6

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de cada paciente a su llegada a urgencias (< 12 horas) a las 12 horas, 24 horas y 48 horas del inicio de los síntomas. Las determinaciones de IL-6 se realizaron en suero y las de MMP-2 y MMP-9 en plasma.

Tras 15 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación del coágulo, se separó el suero centrifugando a 3000 rpm durante 15 minutos. Se alicuotó el suero obtenido y se congeló a -80° hasta ser analizado. Los niveles de IL-6 se determinaron con un ELISA comercializado (Bender MedSystems).

El plasma se separó de forma inmediata recogiendo la sangre en tubos con EDTA y siguiendo el mismo proceso de centrifugado y almacenaje descrito. Los niveles de MMP-2 y MMP-9 también se determinaron mediante técnicas de ELISA (Biotrak Amersham Pharmacia, UK).

Análisis estadístico

Se empleó el paquete informático SPSS, versión 9.0. Para analizar las correlaciones entre los valores de MMP e IL-6 se empleó el test de Spearman. Para analizar diferencias en los valores de IL-6 a lo largo del tiempo se empleó la prueba de Friedman. Se consideraron como significativas los valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestran todas las correlaciones halladas entre IL-6 y ambas MMPs en los diferentes tiempos del estudio en que se realizaban las extracciones.

Para obtener una impresión global de las relaciones entre ambas familias llevamos a cabo un análisis de las correlaciones entre MMP e IL-6 empleando las medias de los valores de cada molécula en los 4 tiempos (Figura 1). Se encontró una correlación positiva entre la expresión media de ambas MMPs y la de IL-6 ($r = 0.33$, $p = 0.040$ para MMP-2 y $r = 0.45$, $p = 0.004$ para MMP-9).

En la Figura 2 se muestra el perfil temporal de IL-6 y se observa la presencia de un pico de expresión de IL-6 a las 24h del inicio de los síntomas. Los valores de IL-6 de 12h, 24h y 48h, son significativamente mayores que los valores basales de IL-6 ($p < 0.01$). De los distintos tiempos estudiados, la mejor correlación fue la de MMP-9 con IL-6 a las 24 horas ($r = 0.418$, $p = 0.010$) como se muestra en la Figura 3, coincidiendo con la máxima expresión de IL-6.

También se evidenció una tendencia a que los valores basales de MMP-2 y MMP-9 se correlacionaran con el pico de IL-6 ($r = 0.329$, $p = 0.061$ para MMP-2 y $r = 0.325$, $p = 0.061$ para MMP-9).

Otra correlación significativa fue la que apareció entre IL-6 a las 12h ($r = 0.390$, $p = 0.027$) y a las 24h ($r = 0.363$, $p = 0.035$) con los valores finales de MMP-2.

DISCUSIÓN

Nuestro estudio confirma la existencia de relaciones estrechas entre la expresión de MMPs y citocinas proinflamatorias. Este es el primer estudio que valora de forma conjunta la expresión de MMPs y citocinas en patología cerebrovascular. Dichas relaciones se habían demostrado en diversos cultivos celulares (18-20) y recientemente en patologías no neurológicas (22,23).

De forma indirecta se ha podido observar una relación entre citocinas proinflamatorias y MMPs en pacientes afectados de esclerosis múltiple, al comprobar como el tratamiento con beta-interferón disminuía de forma similar y paralela tanto los niveles de IL-6 como los de MMP-9 (24).

Una de las claves de la relación entre citocinas y MMPs pasa por conocer dónde se producen ambas familias de moléculas tras los fenómenos inflamatorios que desencadena la isquemia. Por el momento sabemos que varias citocinas como TNF- α estimulan la producción de MMPs en cultivos de astrocitos y microglia (25) y otras como IL-1 β lo hacen en cultivos neuronales (20).

Otra de las posibles conexiones entre ambas familias es la que se produce a través de los neutrófilos. Sabemos que IL-6 estimula la producción de moléculas de adhesión como ICAM-1 que hace que un gran número de células de la serie blanca acudan a la zona del infarto. Estos neutrófilos marginados en el endotelio contribuyen a los fenómenos de “plugging” y de “no-reflow” (26-28), pero además los leucocitos pueden producir MMPs. Los neutrófilos emplean la producción de MMPs para migrar a través del endotelio (29) y mediante este mecanismo podrían ampliar el daño en la zona, desestructurando la barrera hematoencefálica, y contribuyendo así a la producción de edema y facilitando la transformación hemorrágica del infarto. En un modelo de isquemia focal, la MMP-9 estaba presente en el interior de las células endoteliales y los neutrófilos de la zona del infarto dentro de las primeras 24 horas (16).

El hecho de que las correlaciones obtenidas sean mejores entre IL-6 y MMP-9 que entre IL-6 y MMP-2 se pueden explicar por el hecho de que la MMP-2 no posee el sitio AP-1 que se encuentra en el gen de la MMP-9, sobre el que actuarían las citocinas inflamatorias (30).

Es posible que otras citocinas proinflamatorias, por ejemplo IL-1, se correlacionen de forma más potente que la IL-6 con las diversas MMPs, tal como se ha demostrado en otros modelos (18); el hecho de que dicha citocina sea difícil de detectar mediante técnicas de ELISA, nos hizo optar por IL-6 cuya detección ha sido fácilmente reproducible en varios trabajos de pacientes afectados de ictus. El perfil temporal de IL-6 en nuestros pacientes es similar al descrito por otros autores (3). En un estudio previo (17) los niveles de MMP-9 también eran máximos a las 24 horas y, de hecho, la mejor correlación encontrada en nuestro estudio es la que existe entre estas dos moléculas en ese tiempo. Los niveles elevados de MMP-9 se asociaban a deterioro neurológico de forma parecida a lo que ocurría al medir IL-6 (31).

Probablemente una de las vías finales por las que IL-6 ejerce sus efectos deletéreos es a través de la activación de la MMP-9. Sin embargo, llama la atención el hecho de que los niveles basales de MMP-

2 y de MMP-9 muestren una tendencia a correlacionarse con el posterior pico de IL-6. Sabemos que las MMPs pueden activar las proformas de TNF- α (32), y dicha citocina amplificar la expresión de IL-6. Cabe por último la posibilidad de que MMP-9 e IL-6 sean estimuladas de forma paralela por una tercera citocina y que la correlación implique simplemente una respuesta común de dos productos (33).

Si bien existe una correlación entre la expresión de MMPs y los fenómenos inflamatorios que ocurren en la fase aguda del ictus isquémico, ésta relación es compleja y no comprensible en su totalidad. Este tipo de estudios correlativos no permiten aseverar si alguno de los dos fenómenos ocurre primero o cuál es la cadena de causalidad de los acontecimientos. Es necesario, por tanto, diseñar nuevos estudios para definir con precisión el orden con el que ocurren los acontecimientos; lo que en un futuro nos permitirá aconsejar el bloqueo de una u otra vía con el objetivo de evitar la extensión de la lesión neuronal secundaria que se produce tras un infarto cerebral.

Bibliografía:

- 1.- DeGraba. The role of inflammation after acute stroke. *Neurology*. 1998; 51(suppl 3): S62-S68.
- 2.- Kochanek PM, Hallenbeck JM. Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke* 1992; 23: 1367-1379.
- 3.- Fassbender K, Rossol S, Kammer T, et al. Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia: kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease. *J Neurol Sci* 1994; 122: 135-139.
- 4.- Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules, part I. *N Eng J Med*. 1996; 334: 1526-1529.
- 5.- Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet*. 1990; 6: 121-125.
- 6.- Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases: a minireview. *J Biol Chem*. 1999; 274: 21491-21494.
- 7.- Rosenberg GA, Dencoff JE, Correa N, Reiners M, Ford CC. Effect of steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: relation to blood-brain barrier injury. *Neurology* 1996; 46: 1626-1632.
- 8.- Todor DR, Lewis I, Bruno G, Chyatte D. Identification of a serum gelatinase associated with the occurrence of cerebral aneurysms as pro-matrix metalloproteinase-2. *Stroke* 1998; 29: 1580-1583.
- 9.- Peters DG, Kassam A, Jean PL, Yonas H, Ferrell RE. Functional Polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter as a potential risk factor for intracranial aneurysm. *Stroke* 1999; 30: 2612-2616.
- 10.- Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994; 94: 2493-2503.
- 11.- Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Crowther M, Jones L, Bell PRF, Thompson MM. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. *Stroke* 2000; 31: 40-47.
- 12.- Mun-Bryce S, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18: 1163-1172.
- 13.- Gasche Y, Fujimura Y, Copin J, Kawase M, Masengale 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.
- 14.- Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 1998; 29: 2189-2195.
- 15.- 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.

- 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, Alvarez-Sabín J, Molina C, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, González MA, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke. Temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* 2001 (en prensa).
- 18.- Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, Kamoi K, Suda T. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* 1998; 139: 1338-1345.
- 19.- Rawdanowicz TJ, Hampton AL, Nagase H, Woolley DE. Matrix metalloproteinase production by cultured human endometrial stromal cells: identification of interstitial collagenase, gelatinase-A, gelatinase-B, and stromelysin-1 and their differential regulation by interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α . *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 79: 530-536.
- 20.- Vecil GG, Larsen PH, Corley SM, Herx LM, Besson A, Goodyer CG, Yong VW. Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo. *J Neurosci Res* 2000; 61: 212-224.
- 21.- Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE, the TOAST Investigators. Classification of subtype of acute ischemic stroke: definitions for use in a multicenter clinical trial. *Stroke* 1993; 24: 35-41.
- 22.- Pajulo OT, Pulkki KJ, Alanen MS, Reunanen MS, Lertola et al. Correlation between interleukin-6 and matrix metalloproteinase-9 in early wound healing in children. *Wound Repair Regen* 1999; 7: 453-457.
- 23.- Kossakowska AE, Edwards DR, Prusinkiewicz C, Zhang M, et al. Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1999; 94: 2080-2089.
- 24.- Özenci V, Kouwenhoven M, Teleshova N, Pashenkov M, Fredrikson S, Link H. Multiple sclerosis: Pro- and anti-inflammatory cytokines and metalloproteinases are affected differentially by treatment with IFN- β . *Journal of Neuroimmunology* 2000; 108: 236-243.
- 25.- Gottschall PE, Yu X. Cytokines regulate gelatinase A and B (matrix metalloproteinase 2 and 9) activity in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 1995; 64: 1513-1520.
- 26.- del Zoppo GJ, Schmid-Schönbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 1991; 22: 1276-1283.
- 27.- Schmid-Schonbein GW. Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in the microcirculation. *FASEB J.* 1987; 46: 2397-2401.
- 28.- Montaner J, Molina C, Abilleira S, Arenillas, Alvarez-Sabín J. Adhesion molecule (ICAM-1) serum levels are related to spontaneous recanalization in human ischemic stroke. *Stroke* 2001; 32: 340.

- 29.- Weiss SJ, Peppin GJ. Collagenolytic metalloenzymes of the human neutrophil. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 3189-3197.
- 30.- Frisch S, Morisaki JH. Positive and negative transcriptional elements of the human type IV collagenase gene. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 6524-6532.
- 31.- Vila N, Castillo J, Dávalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* 2000; 31: 2325-2329.
- 32.- Gearing AJH, Beckett P, Christodoulou M, Chruchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gibert R, Gordon JL, Leber TM, et al. Processing of tumour necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. *Nature* 1994; 370: 555-557.
- 33.- Gottschall PE, Yu X, Bing B. Increased production of gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) and interleukin-6 by activated rat microglia in culture. *J Neurosci Res* 1995; 42: 335-342.

Tabla 1. Correlación entre los valores de MMPs e IL-6 en los distintos tiempos del estudio. Los valores superiores de cada celda indican la “r” y los inferiores la “p”. * La correlación es significativa al nivel 0.05 (bilateral).

	MMP-2 Basal	MMP-2 12 h	MMP-2 24 h	MMP-2 48 h	MMP-9 Basal	MMP-9 12 h	MMP-9 24 h	MMP-9 48 h
IL-6 Basal	0.324 0.066	0.224 0.195	0.283 0.105	0.323 0.082	0.155 0.388	0.181 0.298	0.078 0.660	-0.045 0.815
IL-6 12 h	0.238 0.189	0.209 0.215	0.244 0.152	0.390* 0.027	0.014 0.940	0.342 0.038*	0.328 0.051	0.119 0.516
IL-6 24 h	0.329 0.061	0.236 0.159	0.166 0.319	0.363* 0.035	0.325 0.061	0.280 0.089	0.418* 0.010	0.215 0.230
IL-6 48 h	0.346 0.066	0.282 0.112	0.253 0.148	0.282 0.106	0.260 0.166	0.042 0.813	0.321 0.068	0.195 0.278

Figura 1. Correlaciones entre MMPs e IL-6 empleando las medias de los valores de cada molécula en los 4 tiempos. Existe una correlación positiva entre la expresión media de MMP-2 y de IL-6 ($r = 0.33$, $p = 0.040$) y una correlación positiva entre MMP-9 e IL-6 ($r = 0.45$, $p = 0.004$).

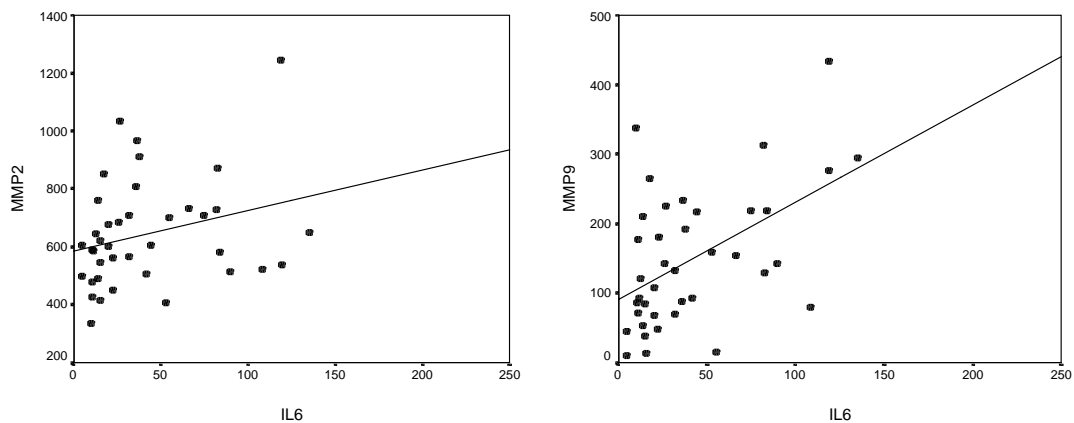


Figura 2. Perfil temporal de la expresión de IL-6 en la fase aguda del ictus. Los valores de IL-6 se expresan en pg/ml.

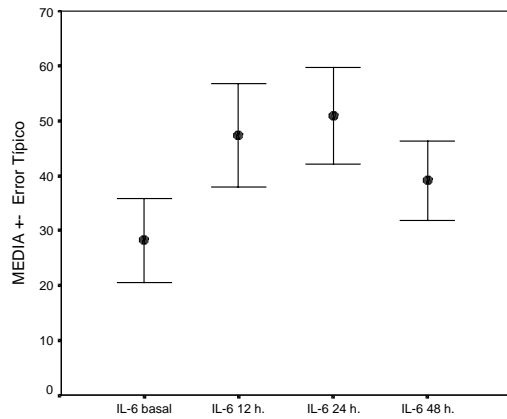
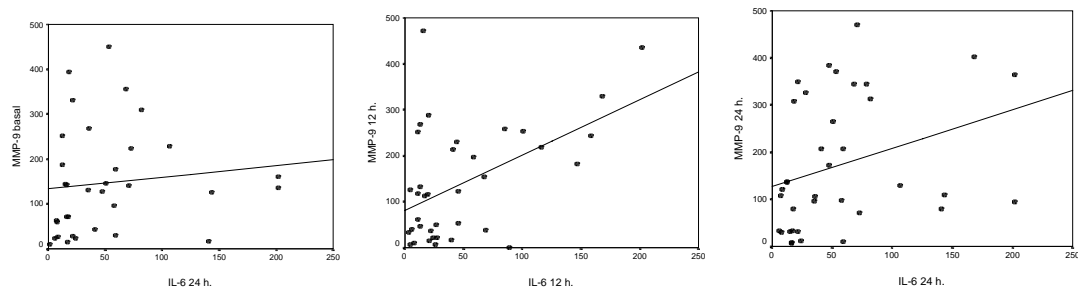


Figura 3. Correlaciones más relevantes entre MMP-9 e IL-6. Existe una tendencia a que los niveles de MMP-9 basal se correlacionen con el pico de IL-6 a las 24 horas ($r = 0.325$, $p = 0.061$). Existe una correlación positiva entre ambas moléculas a las 12 horas ($r = 0.342$, $p = 0.038$) y a las 24 horas ($r = 0.418$, $p = 0.010$) del inicio de los síntomas.



5. RESUMEN DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Expresión de metaloproteinasas tras el ictus isquémico en humanos

En el primero de los estudios se demuestra la existencia de una sobreexpresión de la MMP-9 en la fase aguda del ictus isquémico. Los valores para esta MMP se encontraban, en todos los tiempos en que fue determinada, muy por encima de los niveles de referencia obtenidos en controles sanos. Por el contrario, los niveles plasmáticos de la MMP-2 se hallaban dentro de los valores de normalidad en los diferentes tiempos del estudio.

La expresión de las metaloproteinasas 2 y 9 no estaba relacionada con la presencia de ninguno de los factores de riesgo cardiovascular previos al ictus. Ello, convierte a estas moléculas en buenos marcadores para la fase aguda del ictus.

Hemos encontrado unos niveles mayores de MMP-2 en aquellos pacientes que habían sufrido un ictus previo. Este patrón temporal de activación distinto para MMP-9 y MMP-2, recuerda al encontrado en estudios necrópsicos en los que la MMP-9 se hallaba sobreexpresada durante la fase proinflamatoria precoz del ictus y la MMP-2 durante la fase reparativa tardía de remodelado capilar (Clark *et al.*, 1997).

Nuestro estudio no permite identificar la fuente de producción de estas metaloproteinasas. Cabe la posibilidad de que el origen de la sobreexpresión de MMP-9 sea endógeno, por producción en los astrocitos y la microglía, o exógeno al liberarse desde los neutrófilos y macrófagos (Gottschal *et al.*, 1996). Estudios inmunohistoquímicos localizan la producción de MMPs en los leucocitos y las células endoteliales (Romanic *et al.*, 1998). También se ha identificado MMP-9 en los neutrófilos del parénquima cerebral durante la primera semana tras el ictus y en las semanas siguientes se han encontrado macrófagos que expresaban MMP-2

y matrilisina (Anthony *et al.*, 1997). También sabemos que los neutrófilos producen MMPs para migrar a través de los tejidos (Weiss *et al.*, 1986) y que éstos se acumulan en el parénquima isquémico a partir de las 12-24 horas del inicio del ictus (García *et al.*, 1994).

En nuestro estudio existía una correlación entre la expresión de MMPs y el número de leucocitos en sangre periférica. Esta correlación no se ha demostrado en sujetos sanos (Kjeldsen *et al.*, 1992). En un estudio con primates, en el que se halló un pico plasmático de MMP-9 tampoco se atribuyó su producción a células de la serie blanca de la sangre periférica (Heo *et al.*, 1999).

Es probable, que en un futuro próximo, empleando citometría de flujo u otras técnicas más complejas como la microscopía confocal, podamos dar respuesta a estas cuestiones en el humano.

5.2 Perfil temporal en la expresión de metaloproteinasas tras el ictus

Los niveles más elevados de MMP-9 se encontraron en la determinación de 24 horas, sin que se observase la presencia de un pico de producción significativo entre las distintas determinaciones. Al valorar el perfil de la MMP-2 se apreció la existencia de un pico basal seguido de un descenso significativo en las determinaciones posteriores.

Estos resultados están en consonancia con los hallazgos obtenidos en modelos de isquemia focal permanente en ratas, en los que se evidenció un gran incremento de MMP-9 entre las 12 y 24 horas posteriores a la oclusión arterial (Rosenberg *et al.*, 1996). También Romanic *et al.* encontraron expresión de MMP-9 en el tejido isquémico dentro de las 24 primeras horas, con un incremento que se hacía máximo al quinto día (Romanic *et al.*, 1998); la expresión de MMP-2 predominaba a partir del quinto día.

Aunque nuestro estudio muestra un pico basal de MMP-2, que se mantiene dentro del rango de normalidad para controles sanos, no podemos descartar que si la determinación basal se hubiera realizado antes ($t < 3$ horas?) los valores de MMP-2 hubiesen podido estar por encima de los normales. De hecho, en un modelo de isquemia cerebral en primates existía una expresión significativa de MMP-2 al cabo de una hora de ocluir la ACM (Heo *et al.*, 1999). Por otro lado, la última determinación del estudio tenía lugar a las 48 horas, lo que no descarta la posibilidad de una sobreexpresión posterior a dicha determinación.

Debemos destacar, que incluso entre los modelos animales existen discrepancias en el perfil temporal de expresión de las MMPs. Los trabajos de Fujimura y Gasche, son los que han encontrado un incremento más rápido en la producción de MMP-9 tras la isquemia focal

transitoria (Fujimura *et al.*, 1999) y permanente (Gasche *et al.*, 1999), situándose este alrededor de las 2-3 horas tras la oclusión. Es posible que estas discrepancias obedezcan al empleo de técnicas de zimografía diferentes y a las diversas especies animales en que estos experimentos se realizaron. Estas diferencias deberán tenerse en cuenta cuando en el futuro los diferentes grupos que investigamos en el campo de las MMPs en humanos comparemos resultados procedentes de técnicas de ELISA distintas.

5.3 Relación entre las metaloproteinasas y el déficit neurológico

Existe una estrecha relación entre la expresión de la MMP-9 y la situación neurológica del paciente valorada mediante la escala NIHSS. Esta correlación se hace más intensa con las sucesivas determinaciones, obteniéndose la mejor correlación cuando se comparan los valores de MMP-9 a las 48 horas con la situación neurológica en ese mismo tiempo.

Sin embargo, y ello puede ser más importante para el manejo del enfermo, la determinación basal de MMP-9 permite discriminar de forma significativa a los pacientes con un déficit neurológico ligero de los que van a quedar con un déficit neurológico moderado o grave al final del estudio.

Para estudiar el peso real de la MMP-9 en la situación neurológica final del paciente teniendo en cuenta otros factores que también influyen en la misma, se incluyó el valor ponderado de MMP-9 a lo largo del estudio en un modelo de regresión logística. De esta forma demostramos que dicha MMP era el único factor independientemente asociado a la situación neurológica final del paciente. Un punto de corte de MMP-9 =142 ng/ml tenía un valor predictivo positivo del 94% para determinar si el paciente quedaría con una puntuación por encima o por debajo de 8 en la NIHSS.

No hemos encontrado correlaciones significativas entre la puntuación de la NIHSS y los valores de MMP-2.

5.4 Relación entre las metaloproteinasas y la evolución neurológica

Como conocíamos la situación neurológica del paciente en cada momento del estudio pudimos agruparlos según la evolución del déficit neurológico, en:

- los pacientes que mejoraban,
- los que permanecían estables, y
- los que empeoraban durante la fase aguda del ictus.

Existen diferencias significativas entre los pacientes con altos niveles de MMP-9 correspondientes al grupo de empeoramiento clínico y los pacientes con bajos niveles de MMP-9 en el grupo de mejoría clínica.

Aunque los valores de la MMP-9 son el factor predictivo más importante de evolución favorable en el análisis de regresión múltiple, los niveles de la MMP-2 también influyen de forma estadísticamente significativa en el pronóstico del paciente.

En próximos estudios será necesario valorar si la influencia sobre la evolución se mantiene al considerar el pronóstico funcional del paciente a medio y largo plazo.

5.5 Relación entre las metaloproteinasas y el estado de la ACM

La situación de la ACM valorada por DTC en los distintos tiempos del estudio, nos permitió obtener información acerca de la extensión y duración de la oclusión arterial, así como de la posible aparición de una recanalización espontánea de la misma.

Hemos encontrado relaciones estrechas entre la expresión de MMPs y la duración y extensión de la oclusión arterial. Así, los niveles más altos de MMP-9 y de MMP-2 se observan en aquellos pacientes con una oclusión proximal del tronco de la ACM que persiste ocluida durante todo el periodo del estudio. Así mismo, los niveles de MMPs son más bajos cuando la oclusión de la ACM es distal y todavía menores cuando la situación de la arteria se ha normalizado, desapareciendo la oclusión.

En un experimento animal también se evidenciaron relaciones tiempo-oclusión dependientes (Fujimura *et al.*, 1999).

Los enfermos que presentan una recanalización arterial espontánea tienen unos niveles significativamente menores de ambas MMPs que los que no se recanalizan durante el periodo del estudio. Ello cuestiona el concepto clásico de "lesión por reperfusión" ya que a diferencia de lo que ocurre en la isquemia-reperfusión en animales, no aparecen elevaciones de estas moléculas que puedan ser responsables de dicha lesión en nuestro modelo en humanos.

5.6 Relación entre las metaloproteinasas y el volumen del infarto cerebral

Existe una correlación positiva entre los valores medios de MMP-9 y el volumen del infarto cerebral medido en la TC craneal realizada a las 48 horas del inicio de la clínica. Aunque encontramos una tendencia a que los valores basales de MMP-9 se correlacionen con el volumen final del infarto, la mejor correlación es la obtenida con la determinación de MMP-9 de las 48 horas que es la que corresponde al momento en que se mide el tamaño del infarto cerebral.

El hecho de que la expresión de MMPs dependa del tiempo que la arteria permanece ocluida, permite lanzar la hipótesis de que: a mayor duración de la oclusión de la ACM se produce un mayor infarto cerebral mediado, al menos en parte, por la acción proteolítica de las MMPs.

Diversos estudios experimentales demuestran de forma elegante esta hipótesis, ya que se consiguen reducciones importantes del tamaño del infarto tras la administración de inhibidores de MMPs (Rosenberg *et al.*, 1998), tras el tratamiento con anticuerpos monoclonales contra la MMP-9 (Romanic *et al.*, 1998) y en ratones Knock-Out de MMP-9 (Asahi *et al.*, 2001).

5.7 Relación entre las metaloproteinasas y la transformación hemorrágica

El segundo estudio demuestra la existencia de relación entre la expresión de MMPs y la TH. Esta afirmación requiere ser matizada ya que, en sentido estricto, nuestro estudio encuentra relaciones significativas con la TH tardía. Son los valores basales de MMP-9 los que parecen tener una influencia más importante en el desarrollo de infartos hemorrágicos tardíos (5°-7° día tras el ictus). Además, dichos valores son el único predictor independiente de TH tardía en el modelo de regresión logística.

De interés, también, es la aparición de un pico de MMP-9 en la determinación de las 24 horas en aquellos pacientes que horas después desarrollan un hematoma parenquimatoso sintomático.

Poco conocemos acerca de los mecanismos implicados en la TH que ocurre tras un ictus cardioembólico. El conocimiento de la situación de la arteria es capital tal como se sugiere en la hipótesis de Fisher y Adams de 1951, según ella, la TH obedecería a la migración distal del émbolo, tal como se ha demostrado más recientemente (Molina et al, 2001). Pero la TH también ocurre en casos de ausencia de repermeabilización, llegando la sangre, posiblemente, a través de arterias colaterales leptomeníngicas (Ogata et al, 1989). No obstante, no sabíamos cuáles eran los mecanismos que alteraban la pared de los vasos facilitando que los hematíes llegasen al parénquima encefálico.

Este trabajo demuestra como a mayor expresión de MMPs mayor probabilidad de presentar una TH. Para poder dar una explicación a este resultado es importante recordar uno de los hallazgos del estudio previo: cuanto mayor es el tiempo que permanece el vaso ocluido mayor es la expresión de MMPs.

En aquellos casos en los que el tiempo de oclusión es relativamente corto, porque se produce una recanalización muy rápida, las MMPs tendrían poco tiempo para actuar y en consecuencia se destruiría poco tejido, la ruptura de la BHE sería menor y todo ello haría improbable la extravasación de sangre al parénquima encefálico. Sin embargo, si las MMPs actúan mayor tiempo, porque la ACM persiste ocluida, la gran destrucción producida por la MMP hace que si ese tejido se reperfundes (via anterógrada por recanalización o retrógrada por colaterales) tenga lugar con mayor probabilidad una extravasación de material hemático. También se puede sugerir, que en aquellas situaciones de producción muy elevada de MMPs, éstas podrían llegar a provocar la rotura de una arteriola o una arteria perforante con la consiguiente hemorragia intraparenquimatosa.

Hemos de recordar que la TH es el gran enemigo de la fibrinólisis, por lo que si administrando inhibidores de las MMPs redujeramos el número o la cuantía de la TH originada por el tPA beneficiaríamos en gran medida al paciente. Dicha hipótesis se ha corroborado recientemente en un modelo de isquemia focal embólica en conejos que recibían tPA, ya que la administración concomitante de un inhibidor de MMPs (BB-94) redujo en gran medida la producción de hemorragias inducidas por tPA (Lapchak *et al.*, 2000). Además se debe recordar que la plasmina y el tPA intervienen en la cascada que estimula la activación de MMP-9 (Nagase *et al.*, 1997), lo cual explicaría al menos en parte el aumento de TH que produce la terapia trombolítica.

5.8 Correlación entre metaloproteinasas y citocinas proinflamatorias

Nuestro tercer estudio confirma la existencia de relaciones significativas entre la expresión de MMPs y citocinas proinflamatorias, al valorar ambas familias en muestras obtenidas en los mismos tiempos. Este es el primer estudio que valora de forma conjunta la expresión de MMPs y citocinas en patología cerebrovascular. Dichas relaciones se habían sugerido recientemente en patologías no neurológicas (Pajulo *et al.*, 1999 y Kossakowska *et al.*, 1999).

El hecho de que las correlaciones obtenidas sean mejores entre IL-6 y MMP-9 que entre IL-6 y MMP-2 se podría explicar, si tenemos en cuenta que la MMP-2 no posee el sitio AP-1 que se encuentra en el gen de la MMP-9, sobre el que actuarían las citocinas inflamatorias (Frisch *et al.*, 1990).

Una de las claves de la relación entre citocinas y MMPs pasa por conocer dónde se producen ambas familias de moléculas tras los fenómenos inflamatorios que desencadena la isquemia. Por el momento sabemos que varias citocinas, como TNF- α , estimulan la producción de MMPs en cultivos de astrocitos y microglia (Gottschall *et al.*, 1995) y otras como IL-1 β lo hacen en cultivos neuronales (Vecil *et al.*, 2000).

Otra de las posibles conexiones entre ambas familias es la que se produce a través de los neutrófilos. La IL-6 estimula la producción de moléculas de adhesión como ICAM-1 lo que hace que un gran número de células de la serie blanca acudan a la zona del infarto. Los neutrófilos emplean la producción de MMPs para migrar a través del endotelio (Weiss *et al.*, 1986) y mediante este mecanismo pueden ampliar el daño en la zona al desestructurar la BHE lo que contribuye a la producción de edema y facilita la transformación hemorrágica del infarto.

5.9 Implicaciones de los resultados

En el conocimiento de la isquemia cerebral.

Se trata del primer estudio realizado en humanos *in vivo* que valora el papel de las MMPs en la fase aguda del ictus isquémico. Esta serie de trabajos corroboran los resultados del modelo animal en el ser humano. Además, sitúan a la MMP-9 dentro de la cascada inflamatoria.

Como herramienta de investigación.

El simple hecho de poder medir variaciones plasmáticas de las MMPs permitirá diseñar estudios poco invasivos para valorar el papel de éstas moléculas en diversos campos de la patología cerebrovascular.

En el tratamiento del ictus isquémico y sus complicaciones

Diversos estudios han demostrado una reducción del tamaño del infarto inhibiendo la MMP-9, la importancia de conocer que sus valores son tan elevados tras el ictus en el hombre la convierten en una diana potencial en el tratamiento neuroprotector del ictus.

También se trata del primer estudio que lanza en humanos nuevas hipótesis acerca de la transformación hemorrágica. Es muy posible que en un futuro próximo la determinación de estas moléculas nos pueda ayudar en la toma de decisiones terapéuticas durante la fase aguda del ictus, mejorando la eficiencia de tratamientos como la fibrinólisis y la anticoagulación.

6. CONCLUSIONES

- 1.- Existe una sobreexpresión de MMP-9 en la fase aguda del ictus isquémico en humanos.**
- 2.- Los niveles de MMP-2 son máximos en el momento basal y los de MMP-9 alcanzan su pico a las 24 horas.**
- 3.- Existe una correlación estrecha entre la expresión de MMP-9 y la situación neurológica del paciente en la fase aguda. Cuanto mayores son los niveles de MMP-9 y MMP-2 la evolución del paciente es más desfavorable.**
- 4.- La duración de la oclusión arterial y su localización influyen en la expresión de MMPs. Los pacientes con oclusiones proximales de la ACM durante todo el periodo del estudio son los que tienen niveles más elevados de MMPs.**
- 5.- La expresión de MMP-9 se correlaciona con el tamaño del infarto cerebral medido en la Tomografía Computarizada craneal.**
- 6.- Los niveles basales de MMP-9 influyen en la aparición de un infarto hemorrágico en fase tardía. Su pico a las 24 horas se asocia con la presencia de un hematoma parenquimatoso.**
- 7.- Existen una relación estrecha entre la expresión de MMPs y la de citocinas proinflamatorias como la IL-6, tras la isquemia cerebral.**

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE, the TOAST Investigators. Classification of subtype of acute ischemic stroke: definitions for use in a multicenter clinical trial. *Stroke* 1993;24:35-41.
- Alvarez-Sabín J. Escalas de valoración. En: Manual de enfermedades vasculares cerebrales. Eds. J.Castillo, J. Álvarez Sabín, J.L. Martí-Vilalta, E. Martínez Vila, J. Matías-Guiu. Prous science. 2ª edición. Barcelona 1999.
- Alvarez-Sabín J, Molina C, Dávalos A, Rubio F, Montaner J. Ictus cardioembólico. En: Protocolos Diagnóstico-Terapéuticos en Patología Cerebrovascular. Grupo de estudio de enfermedades cerebrovasculares de la SEN.1999.
- 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.
- Arboix A, Alvarez Sabín J, Soler L. Ictus. Clasificación y criterios diagnósticos. *Neurología* 1998; 13 (supl 3): 3-10.
- Asahi M, Asahi K, Jung J, del Zoppo G, 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.
- Barone FC, Hillegass LM, Price WJ, White RF, Lee EV, Feuerstein GZ, Sarau HM, Clark RK, Griswold DE. Polymorphonuclear leukocyte infiltration into cerebral focal ischemic tissue: myeloperoxidase activity assay and histologic verification. *J Neurosci Res* 1991;29:336-345.
- Barone FC, Feuerstein GZ. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:819-834.
- Boone TC, Johnson MJ, De Clerck YA, Langley KE. C-DNA cloning and expression of a metalloproteinase inhibitor related to tissue inhibitor of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; : 2800-2804.
- Brott TG, Haley EC, Levy DE, Barsan W, Broderick J, Sheppard GL, Spilker J, Kongable GL, Massey S, Reed R, Marler JR. Urgent therapy for stroke, part I: pilot study of tissue plasminogen activator administered within 90 minutes. *Stroke* 1992;23:632-640.
- Brott T, Bogousslavsky J. Treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2000;343:710-722.
- Cerebral Embolism Study Group. Cardioembolic stroke, early anticoagulation, and brain hemorrhage. *Arch Intern Med* 1987;147:636-640.
- 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. *Neuroscience Letters* 1997;238:53-56.
- Dalal PM, Shah PM, Aiyar RR. Arteriographic study of cerebral embolism. *Lancet* 1965;2:358-361.
- Danielsen CC, Wiggers H, Andersen HR. Increased amounts of collagenase and gelatinase in porcine myocardium following ischemia and reperfusion. *J Moll Cell Cardiol* 1998;30:1431-1442.
- DeGraba TJ, Hallenbeck JM, Pettigrew KD, Dutka AJ, Kelly BJ. Progression in acute stroke. Value of the initial NIH stroke scale score on patient stratification in future trials. *Stroke* 1999;30:1208-1212.
- Del Zoppo GJ, Schmid-Schönbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 1991;22:1276-1283.
- Del Zoppo GJ, Okada Y, Hamann GF, et al. Mechanisms of fibrinolysis-associated hemorrhagic transformation. In: Yamaguchi T, Mori E, Minematsu K, del Zoppo G.J (eds). *Thrombolytic therapy in acute ischemic stroke III*. Springer-Verlag Tokyo 1995:254-66.

- Dereski MO, Chopp M, Knight RA, Chen H, Garcia JH. Focal ischemia in the rat: temporal profile of neutrophil responses. *Neurosci Res Comm* 1992;11:179-186.
- Docherty AJP, Lyons A, Smith BJ. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* 1985; 318: 66-69.
- Dutka AJ, Kochanek PM, Hallenbeck JM. Influence of granulocytopenia on canine cerebral ischemia induced by an embolism. *Stroke* 1989;20:390-395.
- Fassbender K, Rossol S, Kammer T, et al. Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia: kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease. *J Neurol Sci* 1994;122:135-139.
- Feuerstein GZ, Wang XK, Barone FC. Inflammatory mediators of ischemic injury: cytokine gene regulation in stroke. In: *Cerebrovascular Disease: Pathophysiology, Diagnosis and Management* (Ginsberg MD, Bogousslavsky J, eds), Blackwell Science, 507-531.
- Fieschi C, Argentino C, Lenzi GL, et al. Clinical and instrumental evaluation of patients with ischemic stroke within the first six hours. *J Neurol Sci* 1989;91:311-321.
- Fisher CM, Adams RD. Observations on brain embolism with special reference to the mechanism of hemorrhagic infarction. *J Neuropathol Exp Neurol* 1951;10:92-94.
- Frenette PS, Wagner DD. Adhesion molecules, part I. *N Eng J Med* 1996;334:1526-1529.
- Frisch S, Morisaki JH. Positive and negative transcriptional elements of the human type IV collagenase gene. *Moll Cell Biol* 1990;10:6524-6532.
- 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 Research* 1999;842:92-100.
- Fujioka KA, Douville CM. Anatomy and freehand examination techniques. In: Newell DW, Aaslid R. *Transcranial Doppler*. New York, NY: Raven Press Publishers; 1992:9-31.
- Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 1999;340:448-454.
- Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;94:2493-2503.
- Garcia JH, Kamijyo Y. Cerebral infarction: Evolution of histopathological changes after occlusion of a middle cerebral artery in primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 1974;33:409-421.
- Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Lian J, Chen S, del Zoppo GJ. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol* 1994;144:188-199.
- Gasche Y, Fujimura Y, Copin J, Kawase M, Masengale 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.
- Gearing AJH, Beckett P, Christodoulou M, Chruchill M, Clements J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gibert R, Gordon JL, Leber TM, et al. Processing of tumour necrosis factor- α precursor by metalloproteinases. *Nature* 1994;370:555-557.
- Goldstein LB, Bertels C, Davis JN. Interrater reliability of the NIH stroke scale. *Arch Neurol* 1989;46:660-662.
- Gönnér F, Remonda L, Mattle H, Sturzenegger M, Ozdoda C, Lövlad KO, Baumgartner R, Bassetti C, Schroth G. Local intra-arterial thrombolysis in acute ischemic stroke. *Stroke* 1998;29:1894-1900.

- Gottschall PE, Yu X, Bing B. Increased production of gelatinase B (matrix metalloproteinase-9) and interleukin-6 by activated rat microglia in culture. *J Neurosci Res* 1995;42:335-342
- Gottschall PE, Yu X. Cytokines regulate gelatinase A and B (matrix metalloproteinase 2 and 9) activity in cultured rat astrocytes. *J Neurochem* 1995;64:1513-1520.
- Gottschall PE, Deb S. Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons. *Neuroimmunomodulation* 1996;3:69-75.
- Grau AJ, Berger E, Sung KL, Schmid-Schonbein P. Granulocyte adhesion, deformability and super oxide formation in acute stroke. *Stroke* 1992;23:33-39.
- Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Blumki E, Hoxter G, Mahagne M, Hennerici M. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke: the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA* 1995;274:1017-1025.
- Haley EC, Levy DE, Brott TG, Sheppard GL, Wong MCW, Kongable GL, Torner JC, Marler JR. Urgent therapy for stroke, part II: pilot study of tissue plasminogen activator administered within 91-180 minutes from onset. *Stroke* 1992;23:641-645.
- Hallenbeck JM, Dutka AJ, Tanishima T, Kochanek PM, Kummaroo KK, Thompson CB, Obrenovitch TP, Contreras TJ. Polymorphonuclear leukocyte accumulation in brain regions with low blood flow during the early postischemic period. *Stroke* 1986;17:246-253.
- Hamann GF, Okada Y, Fritridge R, del Zoppo GJ. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 1995;26:2120-6.
- Hamann GF, Okada Y, del Zoppo GJ. Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Cerebral Blood Flow Metab* 1996;16:1373-1378
- Hamann GF, del Zoppo GJ, von Kummer R. Hemorrhagic transformation of cerebral infarction. Possible mechanisms. *Thromb Haemost* 1999;82 (Suppl.):92-4.
- Hart RG, Easton JD. Hemorrhagic infarcts. *Stroke*. 1986;17:586-589.
- 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.
- Hornig CR, Dorndorf W, Agnoli AL. Hemorrhagic cerebral infarction: A prospective study. *Stroke* 1986;17:179-185.
- Hornig CR, Bauer T, Simon C, et al. Hemorrhagic transformation in cardioembolic infarction. *Stroke* 1993;24:465-468.
- Hsu CY, An G, Liu JS, Xue JJ, He YY, Lin TN. Expression of immediate early gene and growth factor mRNAs in a focal cerebral ischemia model in the rat. *Stroke* 1993;24:178-8.
- Jenkins GM, Crow MT, Bilato C, Gluzband Y, Ryu WS, Li Z, Stetler-Stevenson W, Nater C, Froehlich JP, Lakatta EG, Cheng L. Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation* 1998;97:82-90.
- Jorgensen L, Torvik A. Ischemic cerebrovascular diseases in an autopsy series: Part 2. Prevalence, location, pathogenesis, and clinical course of cerebral infarcts. *J Neurol Sci* 1969;9:285-320.
- Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, Kai M, Seki Y, Kuwahara F, Ueno T, Sugi K, Imaizumi T. Peripheral blood levels of matrix metalloproteinases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:368-372.

- Kjeldsen L, Bjerrum OW, Hovgaard D, Johnsen AH, Sehested M, Borregaard N. Human neutrophil gelatinase: a marker for circulating blood neutrophils. Purification and quantification by enzyme linked immunosorbant assay. *Eur J Haematol* 1992;49:180-191.
- Kochanek PM, Hallenbeck JM. Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke* 1992;23:1367-1379.
- Kossakowska AE, Edwards DR, Prusinkiewicz C, Zhang MC, Guo D, Urbanski SJ, Grogan T, Marquez LA, Janowska-Wieczorek A. Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1999;94:2080-9.
- Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, Kamoi K, Suda T. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology* 1998;139:1338-1345.
- Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke* 2000;31:3034-3040.
- Liu T, McDonnell PC, Young PR, White RF, Siren AL, Barone FC, Feuerstein GZ. Interleukin-1 β mRNA expression in ischemic rat cortex. *Stroke* 1993;24:1746-1751.
- Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Crowther M, Jones L, Bell PRF, Thompson MM. Increased matrix metalloproteinase-9 activity in unstable carotid plaques. *Stroke* 2000;31:40.
- Matrisian LM. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 1990;6:121-125.
- Molina C, Montaner J, Abilleira S, Ibarra B, Romero F, Arenillas J, Alvarez-Sabín J. Timing of spontaneous recanalization and risk of hemorrhagic transformation in acute cardioembolic stroke. *Stroke* 2001;32:1079-1084.
- Montaner J, Alvarez-Sabín J. Neuroimagen en el ictus isquémico. *Neurología* 1999;14 (supl 2):13-21.
- Montaner J, Alvarez-Sabín J, Abilleira S, Molina C, Arenillas J, Codina A. Reactantes de fase aguda en el ictus: diferencias entre el infarto isquémico y la hemorragia intracerebral. *Med Clin (Barc)* 2001;116:54-55.
- Montaner J, Molina C, Abilleira S, Arenillas, Alvarez-Sabín J. Adhesion molecule (ICAM-1) serum levels are related to spontaneous recanalization in human ischemic stroke. *Stroke* 2001;32:340.
- Mun-Bryce S, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18:1163-1172.
- Murphy G, Docherty AJP. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992; 7: 120-125.
- Murphy G. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Acta Orthop Scand* 1995; 66 (suppl 256): 55-60.
- Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* 1997;378:151-160.
- Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases: a minireview. *J Biol Chem* 1999;274:21491-21494.
- Nowak TS, Ikeda J, Nakajima T. 70 kDa heat shock protein and c-fos gene expression after transient ischemia. *Stroke* 1990;21(suppl III):107-111.
- Ogata J, Yutani C, Imakita M, Ishibashi-Ueda H, Saku Y, Minematsu K, Sawada T, Yamaguchi T. Hemorrhagic infarct of the brain without a reopening of the occluded arteries in cardioembolic stroke. *Stroke* 1989;20:876-883.
- Ogata J, Masuda J, Yutani C, Minematsu K, Yamaguchi T. Microvascular leukocyte plugging in evolving brain infarction in humans. In: Yamaguchi T, Mori E, Minematsu K, del Zoppo G.J (eds). *Thrombolytic therapy in acute ischemic stroke III*. Springer-Verlag Tokyo 1995:311-314.

- Okada Y, Yamaguchi T, Minematsu K, et al. Hemorrhagic transformation in cerebral embolism. *Stroke* 1989;20:598-603.
- Özenci V, Kouwenhoven M, Teleshova N, Pashenkov M, Fredrikson S, Link H. Multiple sclerosis: Pro- and anti-inflammatory cytokines and metalloproteinases are affected differentially by treatment with IFN- β . *Journal of Neuroimmunology* 2000;108:236-243.
- Pajulo OT, Pulkki KJ, Alanen MS, Reunanen MS, Lertola et al. Correlation between interleukin-6 and matrix metalloproteinase-9 in early wound healing in children. *Wound Repair Regen* 1999;7:453-7.
- Pessin M, del Zoppo G, Estol C. Thrombolytic agents in the treatment of stroke. *Clin Neuropharmacol* 1990;13:271-289.
- Peters DG, Kassam A, Jean PL, Yonas H, Ferrell RE. Functional Polymorphism in the matrix metalloproteinase-9 promoter as a potential risk factor for intracranial aneurysm. *Stroke* 1999;30:2612-2616.
- Pozzilli C, Lenzi GL, Argentino C, Bozzao L, Rasura M, Giubilei F, Fieschi C. Peripheral white blood cell count in cerebral ischemic infarction. *Acta Neurol Scand* 1985;71:396-400.
- Pullicino P, Snyder W, Munschauer F, Pordell R, Greiner F. Interrater agreement in computed tomography infarct measurement. *J Neuroimaging* 1996;6:16-19.
- Rawdanowicz TJ, Hampton AL, Nagase H, Woolley DE. Matrix metalloproteinase production by cultured human endometrial stromal cells: identification of interstitial collagenase, gelatinase-A, gelatinase-B, and stromelysin-1 and their differential regulation by interleukin-1 α and tumor necrosis factor- α . *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:530-536.
- Ringelstein EB, Biniek R, Weiller C, Ammeling B, Nolte PN, Thron A. Type and extent of hemispheric brain infarctions and clinical outcome in early and delayed middle cerebral artery recanalization. *Neurology* 1992;42:289-298.
- Ritter L, Coull B, Davisgoman G, McDonagh P. Leukocytes accumulate in the cerebral microcirculation during the first hour of reperfusion following stroke. *FASEB J* 1998;12:180-188.
- 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, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in the rat. *Stroke* 1990;21:801-807.
- 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 Research* 1992;576:203-207.
- Rosenberg GA, Dencoff JE, Correa N, Reiners M, Ford CC. Effect of steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: relation to blood-brain barrier injury. *Neurology* 1996;46:1626-1632.
- 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, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* 1998;29:2189-2195.
- Sartri C, Rastenyte D, Cepaitis Z, Tuomilehto J. International trends in mortality from stroke, 1968 to 1994. *Stroke* 2000;31:1588-1601.
- Schmid-Schonbein GW. Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in the microcirculation. *FASEB J* 1987;46:2397-2401.

- Siesjö BK. Pathophysiology and treatment of focal ischemia. Part I: pathophysiology. *J Neurosurg* 1992;177:169-184.
- Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelso C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A. Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the volume of brain lesion in stroke. *Stroke* 1995;26:1393-1398.
- 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.
- Todor DR, Lewis I, Bruno G, Chyatte D. Identification of a serum gelatinase associated with the occurrence of cerebral aneurysms as pro-matrix metalloproteinase-2. *Stroke* 1998;29:1580-1583.
- Toni D, Fiorelli M, Bastianello S, Sacchetti ML, Sette G, Argentino C, Montinaro E, Bozzao L. Hemorrhagic transformation of brain infarct: predictability in the first 5 hours from stroke onset and influence on clinical outcome. *Neurology* 1996;46:341-345.
- Ueda T, Sakaki S, Kumon Y, Ohta S. Multivariable analysis of predictive factors related to outcome at 6 months after intra-arterial thrombolysis for acute ischemic stroke. *Stroke* 1999;30:2360-2365.
- Uemura Y, Kowall NW, Moskowitz MA. Focal ischemia in rats causes a time-dependent expression of c-fos protein immunoreactivity in widespread regions of ipsilateral cortex. *Brain Res* 552:99-105.
- Vecil GG, Larsen PH, Corley SM, Herx LM, Besson A, Goodyer CG, Yong VW. Interleukin-1 is a key regulator of matrix metalloproteinase-9 expression in human neurons in culture and following mouse brain trauma in vivo. *J Neurosci Res* 2000;61:212-224.
- Vila N, Castillo J, Dávalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* 2000;31:2325-2329.
- Wagner S, Tagya M, Koziol JA, et al. Rapid disruption of an astrocyte interaction with the extracellular matrix mediated by alpha 6-beta 4 integrin during focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke* 1997;28:858-65.
- Wang XK, Yue TL, Barone FC, White R, Young PR, McDonell PC, Feuerstein GZ. Concomitant cortical expression of TNF- α and IL-1 β mRNA following transient focal ischemia. *Mol Chem Neuropathol* 1994;23:103-114.
- Wang XK, Yue TL, Barone FC, Feuerstein GZ. Demonstration of increased endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 mRNA expression in rat ischemic cortex. *Stroke* 1995;26:1665-1669.
- Wang XK, Yue TL, Barone FC, Feuerstein GZ. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) mRNA expression in rat ischemic cortex. *Stroke* 1995;26:661-666.
- Wang XK, Barone FC, White RF, Feuerstein GZ. Subtractive cloning identifies tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) increased gene expression following focal stroke. *Stroke* 1998;29:516-520.
- Welsh FA, Moyer DJ, Harris VA. Regional expression of heat shock protein 70 mRNA and c-fos mRNA following focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992;12:204-212.
- Weiss SJ, Peppin GJ. Collagenolytic metalloenzymes of the human neutrophil. *Biochem Pharmacol* 1986;35:3189-3197.
- Yamaguchi T, Minematsu K, Choki JI, Ikeda M. Clinical and neuroradiological analysis of thrombotic and embolic cerebral infarction. *Jpn Circ J* 1984;48:50-58.
- Yu Q, Stamenkovic I. Localization of metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev* 1999;13:35-48.
- Zanette EM, Roberti C, Mancini G, Pozzilli C, Bragoni M, Toni D. Spontaneous middle cerebral artery reperfusion in acute ischemic stroke: a follow-up study with transcranial Doppler. *Stroke* 1995;26:430-433.

