

Tesis Doctoral

MARCADORES BIOLÓGICOS
TRAS LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL Y SU RELACIÓN
CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICO-RADIOLÓGICA

Pilar Delgado Martínez

MARCADORES BIOLÓGICOS
TRAS LA HEMORRAGIA INTRACEREBRAL Y SU RELACIÓN
CON LA EVOLUCIÓN CLÍNICO-RADIOLÓGICA

Tesis defendida por Pilar Delgado Martínez
para aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Facultad de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona/ Departament de Medicina

Directores: Dr. José Álvarez Sabín
 Dr. Joan Montaner Villalonga

Barcelona, julio del 2006

Esta tesis ha sido realizada en parte gracias a financiación del Instituto de Salud Carlos-III (contrato de investigación post formación sanitaria especializada), la Sociedad Española de Neurología y el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 01/1389).

A mis padres y hermano

"La casualidad favorece a las mentes entrenadas"
(Louis Pasteur, 1822-1895)

AGRADECIMIENTOS

No recuerdo porqué decidí estudiar Medicina, sólo sé que la idea surgió un par de días antes de las pruebas de acceso a la Universidad. Tampoco recuerdo porqué escogí Neurología como especialidad, ni el Hospital Vall d'Hebron como el lugar donde quería formarme. Pero el caso es, que ahora sé que me alegro de todas esas decisiones, porque me han llevado por un camino lleno de alegrías, disgustos, esperanzas, fracasos, risas, cansancio...pero sobretodo, me han llevado a conocer a muchas personas a las que me gustaría expresar mi agradecimiento. Gracias.

Al Dr. Álvarez Sabin, director de esta Tesis por implicarme en las tareas de la Unidad Neurovascular, y por ofrecerme nuevas oportunidades para seguir aprendiendo. Estos dos últimos años no han hecho más que estimular mi interés por esta patología.

Al Dr. Joan Montaner, también director de esta tesis, por confiar y ver lo bueno que hay en mí, por sus opiniones sistemáticamente opuestas a las mías y sus intentos por contagiarme su optimismo y en resumen por guiarme (en ocasiones, más bien empujarme) por ese buen camino.

Al Dr. Carlos Molina por transmitirme sus conocimientos y su desbordado entusiasmo por el paciente hiperagudo.

A la Dra. Sonia Abilleira, ella fue la primera que me enseñó a medir una hemorragia e incluyó a muchos de los pacientes que forman parte de esta Tesis.

A aquellos miembros de la Unidad Neurovascular con los que empecé mis andanzas, en especial a los que ya no están, como el Dr. Juan Arenillas, al que admiro como gran compañero y profesional y el Dr. Francisco Purroy, con quién tuve la gran suerte de compartir los años de la residencia, los cursos, congresos, cenas y un montón de buenos momentos. También al Dr. Rafael Huertas, por su constante buen humor.

A los que actualmente comparten el trabajo de la Unidad, a Esteban, siempre dispuesto a ayudar y a buscar soluciones a cualquier problema, y a Marta, Olga y Marc, por aguantarme.

A todos los residentes pasados y presentes con los que he compartido trabajo, pacientes y guardias, muchas guardias.

A Manolo, por hacer que la estadística parezca más sencilla. Y a Carme y Gemma, por estar siempre dispuestas a echar una mano y por las partidas de bolos.

A todos los médicos adjuntos del Servicio de Neurología, que tanto me han enseñado y a todo el personal de la Planta de Neurología, la Unidad de ictus y en especial, las consultas externas, por facilitarme el trabajo, y compartir tantos ratos agradables.

A Anna Rosell, por su siempre divertida visión crítica de la realidad y por ayudarme a aguantar estoicamente las clases del curso de experimentación animal. También por introducirme, junto con Eloi en "el mundo del western", por ellos conozco ese gran mundo, no diré más.

A Anna Penalba, Anita, por compartir conmigo el polvo de los archivos, por familiarizarme con las ELISAs y explicarme mil veces los factores de conversión.

Al resto de los miembros del Laboratorio de Investigación Neurovascular, con los que espero seguir pasando interminables tardes de viernes, porque mantienen vivo mi interés por la ciencia.

Por último, pero no por ello menos importante quisiera mostrar mi más profundo agradecimiento a mi familia y mis amigos más cercanos.

A mis padres, dos seres extraordinarios, humildes, trabajadores, a quienes odiaría defraudar nunca, por ser mi ejemplo a seguir en la vida. Gracias por su ayuda, comprensión y amor incondicional.

A mi hermano, por cuidar de mí, por ser mi hermano mayor (con todo lo que ello conlleva) y por enseñarme que los ordenadores no tienen vida propia y únicamente hacen lo que uno les ordena.

A Silvia, por ayudarme a hacer más fácil la escritura de esta tesis. A ella y a Merche les debo el enseñarme el valor de la verdadera amistad, la que perdura con los años (muchos) y va cambiando conforme pasa el tiempo.

Y a todos aquellos pacientes y familiares que depositan su confianza en nosotros, cuando tantas veces, sólo podemos compartir con ellos la esperanza de un futuro mejor y ofrecerles consuelo, silencio y comprensión.

A todos, gracias.

ÍNDICE

1. ÍNDICE DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS	10
2. INTRODUCCIÓN.....	12
2.1. HEMORRAGIA INTRACEREBRAL.....	13
2.2. EPIDEMIOLOGÍA	14
2.3. FACTORES DE RIESGO.....	14
2.4. ETIOLOGÍA DE LA HIC	15
2.4.1. Hipertensión arterial.....	16
2.4.2. Angiopatía amiloide cerebral.....	17
2.4.3. Malformaciones vasculares y aneurismas.....	19
2.4.4. Tumores cerebrales.....	20
2.4.5. Anticoagulantes.....	20
2.4.6. Antiagregantes plaquetarios.....	21
2.4.7. Trombolíticos.....	21
2.4.8. Drogas simpaticomiméticas.....	22
2.4.9. Miscelánea.....	22
2.5. CLÍNICA	23
2.6. DIAGNÓSTICO DE LA HIC	23
2.6.1. Tomografía computerizada craneal.....	24
2.6.1.1. Medición del volumen lesional.....	25
2.6.2. Resonancia magnética cerebral.....	27
2.6.3. Angiografía convencional.....	28
2.7. TRATAMIENTO DE LA HIC.....	29
2.7.1. Tratamiento médico.....	29
2.7.2. Tratamiento quirúrgico.....	32
2.7.3. Nuevas perspectivas en el tratamiento.....	35
2.8. PRONÓSTICO DE LA HIC.....	37
2.8.1. Pronóstico a corto plazo.....	37
2.8.2. Pronóstico a largo plazo.....	40

2.9. FISIOPATOLOGÍA DE LA HIC	40
2.9.1. <i>Cronología del edema perihematoma y crecimiento de la hemorragia</i>	42
2.10. BIOMARCADORES EN LA HIC	43
2.10.1. <i>Definición</i>	43
2.10.2. <i>D-dímero</i>	43
2.10.3. <i>S100B</i>	48
2.10.4. <i>Metaloproteasas de matriz</i>	52
2.10.5. <i>Fas y caspasa-3</i>	59
3. OBJETIVOS	66
4. METODOLOGÍA	68
4.1. SELECCIÓN DE PACIENTES	69
4.1.1. <i>Criterios de inclusión</i>	69
4.1.2. <i>Criterios de exclusión</i>	70
4.2. MUESTRA DE PACIENTES	71
4.3. VARIABLES CLÍNICAS	72
4.4. VARIABLES RADIOLÓGICAS	72
4.5. DETERMINACIÓN DE LOS BIOMARCADORES.....	73
4.6. SEGUIMIENTO CLÍNICO	74
4.7. ESQUEMA DEL PROTOCOLO DE LOS ESTUDIOS.....	75
4.8. ESTUDIOS EN TEJIDO CEREBRAL	77
4.8.1. <i>Extracción de muestras y Western Blot</i>	77
4.8.2. <i>Esquema del protocolo de estudio</i>	79
5. COPIA DE LAS PUBLICACIONES.....	80
5.1. MARCADORES BIOLÓGICOS EN LA HIC ESPONTÁNEA. NEUROLOGÍA 2006; 21: EN PRENSA.	81
5.2. PLASMA D-DIMER PREDICTS POOR OUTCOME AFTER ACUTE ICH. NEUROLOGY 2006; 67:94-98.	90
5.3. PLASMA S100B LEVEL AFTER ACUTE SPONTANEOUS ICH. STROKE 2006; EN PRENSA.....	96
5.4. TEMPORAL PROFILE OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND THEIR INHIBITORS AFTER SPONTANEOUS ICH. STROKE 2004; 35:1316-1322.....	101

5.5. FAS SYSTEM ACTIVATION IN PERIHEMATOMAL AREAS AFTER SPONTANEOUS ICH. ARTÍCULO EN PREPARACIÓN.....	109
6. SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	116
6.1. VARIABLES CLÍNICO-RADIOLÓGICAS Y PRONÓSTICO	118
6.2. EL D-DÍMERO COMO PREDICTOR DE MAL PRONÓSTICO	120
6.3. EL CRECIMIENTO DE LA HIC Y EL D-DÍMERO	121
6.4. RELACIÓN DE LA PROTEÍNA S100B CON EL VOLUMEN DE HIC	123
6.5. METALOPROTEASAS Y EDEMA PERIHEMATOMA.....	125
6.6. MMP-3 Y MORTALIDAD	127
6.7. INHIBICIÓN DE LAS METALOPROTEASAS	127
6.8. IMPLICACIÓN DEL SISTEMA FAS EN LA HIC	128
6.9. APLICACIONES PRÁCTICAS DEL USO DE BIOMARCADORES	128
7. CONCLUSIONES.....	130
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
9. ANEXOS	144
ESCALA DE COMA DE GLASGOW.....	145
ESCALA DE RANKIN MODIFICADA	145
ESCALA DEL ICTUS DEL NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (NIH STROKE SCALE).....	146
ÍNDICE DE FIGURAS.....	148
ÍNDICE DE TABLAS.....	148

1. ÍNDICE DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico
AIT: ataque isquémico transitorio
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
BHE: barrera hematoencefálica
ELISA: del inglés, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
GCS: del inglés, Glasgow Coma Scale o escala de valoración del coma
HIC: hemorragia intracerebral
HTA: hipertensión arterial
LCR: líquido cefalorraquídeo
MAVs: malformaciones arteriovenosas
MEC: matriz extracelular
MMP: del inglés, Matrix MetalloProteinase, Metaloproteasa de matriz
mRS: del inglés, modified Rankin Scale, escala funcional tras el ictus
NIHSS: del inglés, National Institutes of Health Stroke Scale, escala de gravedad neurológica del ictus
NSE: del inglés Neuronal Specific Enolase, enolasa neuronal específica
OMS: Organización Mundial de la Salud
PIC: presión intracraneal
RAGE: del inglés, Receptor for Advanced Glication End-products
rFVIIa: del inglés, recombinant factor VII activated, o factor VII activado recombinante
RM: resonancia magnética
rt-PA: del inglés recombinant tisular plasminogen activator, activador tisular del plasminógeno recombinante, agente trombolítico.
STICH: del inglés, International Surgical Trial in Intracerebral Hemorrhage, estudio internacional de tratamiento quirúrgico en la HIC
TC: tomografía computerizada
TEP: tromboembolismo pulmonar
TIMPs: del inglés, Tisular Inhibitor MetalloProteinase, inhibidor tisular de metaloproteasas
TUNEL: del inglés, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine 5-triphosphate nick-end labelling.
TVP: trombosis venosa profunda
VCAM-1: del inglés, Vascular Cellular Adhesión Molecule-1, molécula de adhesión

2. INTRODUCCIÓN

2.1. HEMORRAGIA INTRACEREBRAL

El ictus se define como un síndrome clínico, de presumible origen vascular, que se caracteriza por el desarrollo rápido de signos de afectación neurológica focal. Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), es la tercera causa de muerte después de la cardiopatía isquémica y el cáncer. En nuestro país constituye la primera causa de muerte en las mujeres de más de 65 años y en los hombres de más de 75 años. También es la primera causa de invalidez y la segunda de demencia.

En Cataluña, la prevalencia de ictus fue en el año 2002 del 1,8% en los hombres y del 1,4% en las mujeres de todas las edades. Ello supone que el ictus es el responsable de más de 15.000 ingresos hospitalarios al año, y más de 5.000 pacientes mueren al año por esta enfermedad (Document Marc per al Pla d'Atenció a la malaltia vascular cerebral 2003-2006).

Aproximadamente el 80% de todos los ictus son isquémicos, es decir están producidos por una disminución súbita del aporte sanguíneo al parénquima cerebral. El ictus hemorrágico, constituye el 20% restante y aparece como consecuencia de la rotura de un vaso del interior de la cavidad craneal. En función de la localización de la sangre extravasada puede dividirse en cinco categorías: hemorragia intracerebral (HIC), hemorragia subaracnoidea, hemorragia intraventricular, y hematomas subdural y extradural. La HIC se define como aquella colección hemática situada dentro del parénquima

encefálico, con o sin comunicación con los ventrículos o el espacio subaracnoideo.

Esta tesis está dirigida al estudio de los procesos moleculares que suceden tras la HIC, y con especial énfasis, en la identificación de marcadores biológicos relacionados con la evolución y el pronóstico de los pacientes que puedan ser aplicados en la práctica clínica.

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

La incidencia anual de la HIC en la población europea es de aproximadamente 15 por cada 100.000 habitantes (Broderick J, Handbook of Neuroepidemiology, 1994). Esta cifra aumenta con la edad, de modo que llega a ser de 25 por cada 100.000 habitantes en el grupo de población superior a los 80 años. Otras razas, como la negra y la asiática, muestran una mayor incidencia, alcanzando hasta 35 por cada 100.000 habitantes (Broderick et al, N Engl J Med, 1992).

2.3. FACTORES DE RIESGO

Los factores de riesgo no modificables mejor conocidos para presentar una HIC son la edad y la raza.

Existen otros factores de riesgo potencialmente modificables, de los cuáles el más importante es la hipertensión arterial (HTA), cuya relación con la HIC se analizará en detalle en el apartado 2.4 de etiología de la HIC. Otros, como el abuso de alcohol aumentan el riesgo de presentar una HIC por múltiples mecanismos. Así, actúa produciendo alteraciones plaquetarias y de la

coagulación, y afectando a la integridad de los vasos (Juvola et al, Stroke, 1995).

La angiopatía amiloide cerebral es un factor de riesgo para los pacientes de edad avanzada, especialmente para los portadores de los alelos $\epsilon 2$ y $\epsilon 4$ del gen de la apolipoproteína E (O'Donnell et al, N Engl J Med, 2000).

El creciente uso de fármacos antiagregantes, anticoagulantes, trombolíticos y el consumo de fármacos o drogas con actividad simpaticomimética también aumentan el riesgo de sufrir una HIC, así como el ser portador de una diátesis hemorrágica. Otros factores de riesgo menos establecidos son la hipocolesterolemia (Segal et al, Neuroepidemiology, 1999), el haber presentado un infarto cerebral previo, la leucoaraiosis y ciertos polimorfismos genéticos (Woo et al, Stroke, 2002).

Por último, las variaciones estacionales influyen en el riesgo de sufrir una HIC de origen hipertensivo, con mayor incidencia en el invierno (Caplan et al, Arch Neurol, 1984).

2.4. ETIOLOGÍA DE LA HIC

La clasificación etiológica de las hemorragias cerebrales distingue entre primarias y secundarias. Las primarias son las más frecuentes y se deben a la ruptura espontánea de un vaso afectado por los cambios producidos por la hipertensión arterial o la angiopatía amiloide. Las secundarias se asocian a tumores, malformaciones vasculares, consumo de drogas o alteraciones de la coagulación, entre otras múltiples causas. La siguiente tabla (Tabla 1) resume las posibles etiologías de la HIC.

Tabla 1: Factores etiológicos en la HIC

<ul style="list-style-type: none"> • Hipertensión arterial crónica • Angiopatia amiloide cerebral • Malformaciones vasculares Malformación arteriovenosa Telangiectasia Angioma cavernoso o cavernoma Angioma venoso • Aneurismas (saculares, infecciosos, traumáticos, neoplásicos) • Diátesis hemorrágicas Coagulopatías primarias: hemofilia A y B, déficit de factor de Von Willebrand, afibrinogenemia. Coagulopatías secundarias: púrpura trombocitopénica idiopática, coagulación intravascular diseminada, púrpura trombótica trombocitopénica, trombocitopenia y síndromes mieloproliferativos, mieloma múltiple Fármacos antitrombóticos: antiagregantes, anticoagulantes, trombolíticos • Tumores cerebrales primarios o metastáticos • Vasculopatías Vasculitis sistémicas Vasculitis aislada del SNC Otras: sarcoidosis, Enfermedad de Behçet, Enfermedad de Moya-Moya, disección arterial, vasculitis infecciosas • Causas relacionadas con picos hipertensivos Fármacos o drogas con efecto simpaticomimético (anfetaminas, efedrina, descongestionantes nasales, cocaína, IMAO) Exposición al frío Tras estimulación del nervio trigémino Durante cateterismo cardíaco Tras picadura de escorpión o avispa • Tras situaciones de cambio de flujo cerebral Tras endarterectomía o angioplastia carotídea Tras intervención por cardiopatía congénita Tras trasplante cardíaco • Otras Alcohol, metanol Migraña Trombosis venosa cerebral Desconocida

2.4.1. Hipertensión arterial

La HIC de causa hipertensiva se produce principalmente por dos mecanismos:

a) por la ruptura de pequeñas arterias perforantes lesionadas por la HTA crónica y b) por alteraciones agudas en la presión arterial en arteriolas y capilares no acostumbrados a estos cambios circulatorios.

La HTA crónica produce cambios histológicos que afectan predominantemente las porciones medias o distales de las arterias perforantes (de un diámetro entre 50 y 200 μm) o bien sus bifurcaciones. Dichos cambios son la

lipohialinosis, necrosis fibrinoide, degeneración de la capa media y microaneurismas de Charcot-Bouchard (Fisher, J Neuropathol Exp Neurol, 1971). Al afectarse principalmente las arterias perforantes, las localizaciones más típicas de las hemorragias de origen hipertensivo son el putamen, tálamo, protuberancia, cerebelo y sustancia blanca subcortical, aunque en menor proporción, la HTA puede ser la causa de una HIC de localización lobar (Broderick et al, Stroke, 1993).

2.4.2. Angiopatía amiloide cerebral

La angiopatía amiloide cerebral, también denominada angiopatía congófila, se debe al depósito de proteína beta-amiloide en la pared de las arterias de pequeño y mediano calibre de la superficie cortical y leptomeníngea.

Su incidencia aumenta con la edad y en sujetos con enfermedad de Alzheimer, cuya presencia en series necrópsicas puede llegar hasta el 98% de los casos. Es la causa más frecuente de HIC de origen no hipertensivo en adultos de más de 55-60 años de edad.

Existen varias formas familiares de angiopatía amiloide cerebral, que se heredan con un patrón de herencia autosómica y en las que se han encontrado diferentes mutaciones en el gen de la proteína precursora de la beta amiloide. Dichas formas familiares asocian la presencia de HIC, a crisis comiciales, demencia de inicio precoz, etc. Sin embargo, la forma más común de angiopatía amiloide cerebral, es la esporádica, asociada a la edad (Greenberg, Neurology, 1998).

La localización más frecuente de la hemorragia cerebral asociada a angiopatía amiloide cerebral es, al contrario de lo que ocurre en la HTA, la lobar, con preferencia por los lóbulos occipital y parietal, aunque puede localizarse en cualquiera de los demás. Con frecuencia el sangrado puede tener una localización subaracnoidea y tiende a ser recurrente y múltiple.

La agrupación de estas características (localización lobar, multiplicidad, edad) y la ausencia de otras causas que puedan producir las hemorragias son la base del diagnóstico clínico de probabilidad, cuyos criterios han sido validados con estudios histológicos (Knudsen et al, *Neurology*, 2001). Dado que el depósito de la proteína es parcheado, el estudio histológico de biopsias corticales es poco rentable (Greenberg et al, *Stroke*, 1997) y el diagnóstico definitivo sólo puede realizarse mediante el estudio necrópsico cerebral, una vez ha fallecido el paciente.

Como factores de riesgo, independientes de la edad, para presentar una angiopatía amiloide cerebral se han descrito diversos polimorfismos genéticos, el más importante de los cuales es el del gen de la apolipoproteína E (Greenberg et al, *Stroke*, 1996).

La existencia de otras posibles etiologías, como la HTA, no excluye a la angiopatía amiloide cerebral como causa de HIC de localización lobar, si se cumplen el resto de criterios diagnósticos, como se ha demostrado recientemente en un estudio histopatológico (Ritter et al, *Neurology*, 2005).

2.4.3. Malformaciones vasculares y aneurismas

Las malformaciones vasculares son causa de aproximadamente el 5% de las HIC y deben sospecharse en personas jóvenes, ya que en la población menor de 45 años pueden representar hasta un 38% de los casos.

Entre las malformaciones vasculares se incluyen las malformaciones arteriovenosas (MAVs), angiomas cavernosos (o cavernomas), angiomas venosos y telangiectasias capilares.

Las MAVs se subclasifican en piales y durales y su ruptura conduce a un sangrado de localización lobar, siendo necesaria la práctica de una arteriografía para su diagnóstico. El riesgo neto de un primer sangrado por una MAV no rota es de aproximadamente un 2%. Sin embargo, el riesgo de recurrencia hemorrágica durante el primer año puede llegar al 18%, siendo posteriormente más incierto (Al Shahi et al, Brain, 2001).

Los angiomas cavernosos o cavernomas son malformaciones vasculares de pequeño tamaño, excluidas de la circulación, por lo que su diagnóstico se realiza por RM craneal, siendo arteriográficamente ocultas. Pueden ser múltiples y mostrar agregación familiar y el riesgo de sangrado es menor que para las MAVs, alrededor de un 4,5% al año (Kondziolka, J Neurosurg, 1995). Los angiomas venosos suelen ser hallazgos incidentales y se asocian con frecuencia a cavernomas. Su riesgo de sangrado es bajo, del orden del 0,15%.

La ruptura de aneurismas intracraneales se asocia a hemorragia subaracnoidea, pero puede producir también una HIC. El riesgo de recurrencia es muy elevado durante los primeros 6 meses (hasta un 50%) reduciéndose posteriormente

hasta un 3% al año (Jane et al, J Neurosurg, 1985). Para su diagnóstico, en general se requiere la práctica de una arteriografía convencional, si bien la angiografía por tomografía computerizada puede detectar con alta sensibilidad y especificidad la mayoría de casos de aneurismas rotos de la arteria cerebral media (Anderson et al, Neurosurgery, 1999).

2.4.4. Tumores cerebrales

Los tumores constituyen una causa menos frecuente de HIC, situándose entre el 6 y 10% (Wakai et al, Neurosurgery, 1982). En general cursan con datos clínicos o radiológicos que nos hacen sospechar esta etiología, como son: la localización atípica de la HIC, un gran efecto de masa asociado a edema de la sustancia blanca y el realce nodular en la periferia del hematoma tras la administración de contraste, entre otros datos.

Dentro de los tumores cerebrales primarios los que más sangran son los gliomas. En cuanto a las metástasis, su frecuencia de sangrado en orden decreciente es: carcinoma broncogénico, melanoma, mama, coriocarcinoma e hipernefroma.

2.4.5. Anticoagulantes

El tratamiento con anticoagulantes orales dobla el riesgo de presentar una HIC, alcanzando una incidencia anual de entre el 0,3% al 0,6%. Los factores de riesgo mejor conocidos para presentar esta complicación son la edad avanzada (especialmente en mayores de 75 años), la HTA mal controlada, la historia de ictus previos y la intensidad de la anticoagulación (Hart et al, Stroke, 2005). Las

HIC asociadas a anticoagulantes orales tienen en general un peor pronóstico, aumentando la mortalidad de forma dependiente a la intensidad de la anticoagulación (Rosand et al, Arch Intern Med, 2004).

El tratamiento con heparina también puede producir hemorragias intracerebrales, aunque con mucha menor frecuencia.

2.4.6. Antiagregantes plaquetarios

El tratamiento con ácido acetilsalicílico aumenta el riesgo de HIC en aproximadamente un 40% (riesgo estimado entre 23% y 84%), siendo éste menor con otros antiagregantes plaquetarios (Hart et al, Stroke, 2005).

El riesgo de presentar una HIC en pacientes tratados con doble antiagregación (ácido acetilsalicílico y clopidogrel) parece ser superior en la prevención secundaria del ictus que en la de eventos coronarios (Yusuf et al, N Engl J Med, 2001). Así, la combinación de dosis bajas de estos antiplaquetarios ha mostrado una tasa superior de HIC que el tratamiento aislado con clopidogrel en el estudio MATCH (Management of Atherothrombosis with Clopidogrel in High risk patients), que incluyó a pacientes con un ictus o AIT reciente (Diener et al, Lancet, 2004).

2.4.7. Trombolíticos

El tratamiento trombolítico para el ictus isquémico y el infarto agudo de miocardio se asocia a HIC. Las variables predictoras más importantes del riesgo de desarrollo de HIC en pacientes que reciben tratamiento trombolítico por un infarto agudo de miocardio son: la edad >65 años, peso <70 kg, la presión

arterial por encima de 170/95 mm de Hg y el tratamiento con rtPA (The GUSTO investigators, N Engl J Med, 1993).

El uso de rtPA endovenoso en pacientes con infarto cerebral se relacionó con una frecuencia de HIC de 6,4% respecto a 0,6% en el grupo placebo en el estudio aleatorizado del NINDS y del 8,1% vs. 0,8% en el ensayo clínico ECASS-II (Hacke et al, Lancet, 1998; The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, N Engl J Med, 1995). Los factores de riesgo implicados son: a) edad > 75 años, b) déficit neurológico importante, c) presencia de signos precoces de isquemia extensa en la TC inicial, d) diabetes mellitus o glucemia elevada y e) plaquetopenia.

2.4.8. Drogas simpaticomiméticas

Las drogas que se asocian más frecuentemente a la HIC son las anfetaminas, la cocaína y los descongestionantes nasales.

2.4.9. Miscelánea

Entre las causas más raras asociadas a HIC cabe considerar aquellas relacionadas con vasculitis sistémicas o primarias del SNC, o las relacionadas con picos hipertensivos.

La HIC puede producirse también en el contexto de un síndrome de hiperperfusión tras endarterectomía carotídea o angioplastia carotídea hasta en un 1% de los casos. Los factores de riesgo más importantes asociados a ésta son el grado de estenosis arterial ipsilateral, la presencia de estenosis u

oclusión carotídea contralateral y la presencia de HTA en el momento del procedimiento (Abou-Chebl et al, J Am Coll Cardiol, 2004) .

2.5. CLÍNICA

La HIC suele debutar como un déficit neurológico focal de inicio brusco que progresa en los siguientes minutos u horas. La progresión precoz del déficit neurológico en muchos pacientes con HIC se debe a persistencia del sangrado y crecimiento del hematoma durante las primeras horas. Hasta en el 50% de los casos, el déficit neurológico se acompaña de disminución del nivel de conciencia de forma precoz, un hecho menos frecuente en el ictus isquémico. Asimismo, es frecuente la presentación clínica con cefalea (hasta 40% de los pacientes) y vómitos (50%). La HTA puede ocurrir hasta en un 90% de los pacientes con HIC. En los casos en que hay extensión de la HIC hacia el espacio subaracnoideo puede haber rigidez de nuca.

Y hasta en un 6-7% de los casos se pueden presentar de forma precoz crisis comiciales parciales o secundariamente generalizadas, sobretodo en las HIC de localización lobar.

2.6. DIAGNÓSTICO DE LA HIC

Para la realización de un correcto diagnóstico de la HIC deberán seguirse varios pasos. Por un lado, la historia clínica deberá incluir los antecedentes médicos personales y familiares y estará dirigida a descartar todas aquellas causas potenciales de HIC previamente descritas. La exploración física nos ayudará a descartar enfermedades sistémicas (como por ejemplo una vasculitis, o una

neoplasia diseminada) y a determinar la repercusión sistémica de una posible HTA.

Por otra parte nos ayudaremos de las exploraciones complementarias básicas como las pruebas de laboratorio (que deberán incluir un hemograma completo, perfil de coagulación, función hepática y renal, ionograma y despistaje de ciertas drogas), el electrocardiograma y la radiografía de tórax.

Finalmente, serán necesarias una o varias exploraciones de neuroimagen y/o angiográficas. La necesidad de las exploraciones angiográficas se valorará individualmente en función de la edad, localización de la HIC, antecedentes médicos y estabilidad clínica en cada caso.

2.6.1. Tomografía computerizada craneal

La tomografía computerizada (TC) craneal simple constituye el método más rápido y fidedigno para el diagnóstico de la HIC aguda. Permite la localización de la lesión, el cálculo del volumen del componente hemorrágico y aporta información sobre el efecto de masa que ejerce la HIC en el resto de estructuras cerebrales. Está indicada como prueba de elección para el diagnóstico en cualquier paciente con sospecha de HIC. En fase aguda, la lesión hemorrágica aparece como una colección hiperdensa (a veces con un halo hipodenso periférico debido a la formación de edema cerebral). Sólo en pacientes con intensa anemia puede aparecer isodensa en dicha fase.

La TC craneal nos ofrece información acerca de la etiología en algunos casos. La presencia de sangre en ciertos compartimentos cerebrales, la localización de

la HIC y la presencia de calcificaciones o de lesiones expansivas nos puede orientar hacia una causa subyacente. Además, hoy en día están disponibles técnicas de angiografía por TC (Angio-TC) que ayudan al diagnóstico de malformaciones vasculares subyacentes.

A grandes rasgos, la TC cerebral nos permitirá diferenciar tres grandes tipos de HIC: hemorragias profundas, lobares y de fosa posterior (Figura 1).

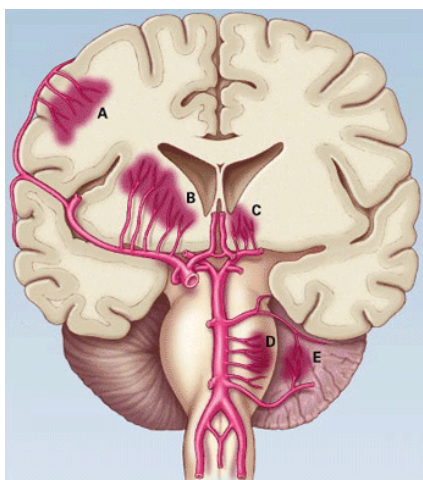


Figura 1: Representación de las principales localizaciones de la HIC.

A: hemorragia de localización lobar, B y C: hemorragias profundas (ganglios basales), D y E: hemorragias de fosa posterior (D: tronco encefálico, E: cerebelo). Tomada de Qureshi et al. Spontaneous intracerebral hemorrhage. NEJM 2001: 1450-60.

2.6.1.1. Medición del volumen lesional

Para la medición del volumen de la lesión hemorrágica se debe seguir el método denominado ABC/2 (Gebel et al, Stroke, 1998; Kothari et al, Stroke, 1996), basado en el cálculo del volumen de una esfera o un elipsoide. Para la aplicación de este método en la HIC se selecciona el corte de la TC craneal donde se observa el área hemorrágica de mayor tamaño, siendo A la longitud máxima del área hiperdensa y B el diámetro transversal determinado en el mismo corte. El parámetro C o altura de la lesión se calcula mediante la

sustracción de los valores de la posición de la camilla del último y del primer corte en los cuales se visualiza la lesión (Figura 2).

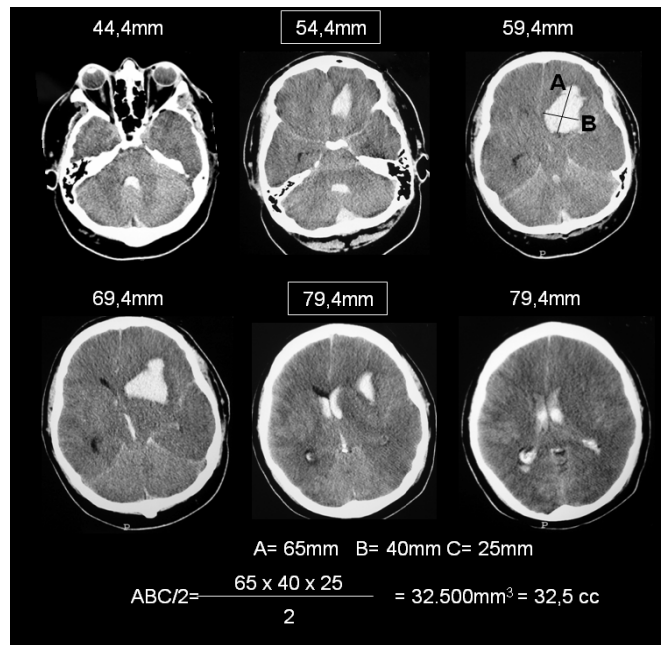


Figura 2: Ejemplo del cálculo del volumen de la HIC. Tomada de “Protocolo de diagnóstico y tratamiento de la Hemorragia Intracerebral de origen no traumático”. Hospital Vall d’Hebron.

La TC permite la aproximación a otros datos de interés en la fisiopatología de la HIC, como son el crecimiento y la presencia de edema perilesional.

El crecimiento de la HIC entre dos exploraciones de TC craneal fue definido por primera vez por Brott y colaboradores (Brott et al, Stroke, 1997) como un incremento en el volumen superior al 33% en una exploración de TC comparada con la previa. Los motivos para escoger el 33% como un crecimiento relevante fueron los siguientes:

- El 33% es el cambio en el volumen de una esfera que corresponde a un 10% de cambio en su diámetro, el cuál puede ser fácilmente observable a simple vista.

- Especialmente en las HIC de pequeño tamaño, un cambio en el volumen de hasta el 33% puede producirse al haberse obtenido las imágenes de TC de diferentes formas en las dos exploraciones.

En estudios posteriores se han utilizado definiciones similares del cálculo del crecimiento de la HIC para las hemorragias de pequeño volumen (<20 mL), aplicando un incremento superior al 10% en las de mayor tamaño (Leira et al, *Neurology*, 2004; Silva et al, *Stroke*, 2005).

La medición del edema o hipodensidad perilesional se calcula al sustraer el volumen de la HIC al volumen total de la lesión (HIC+ hipodensidad perihematoma).

2.6.2. Resonancia magnética cerebral

Dada la progresiva instauración del tratamiento trombolítico en el infarto cerebral, existen cada vez más evidencias de que la resonancia magnética (RM) cerebral permite el diagnóstico de la HIC de forma fiable y rápida desde las primeras horas (Kidwell et al, *JAMA*, 2004). Además, gracias a la técnica de angiografía por RM (Angio-RM) puede realizarse el diagnóstico de la causa subyacente, constituyendo la prueba de elección cuando no existe la posibilidad de realizar un estudio de TC craneal y/o Angio-TC. Así pues, los estudios de RM cerebral y Angio-RM tendrán las mismas indicaciones que la TC craneal y Angio-TC en situaciones especiales (alergia a contrastes yodados, gestación, problemas técnicos de la TC o Angio-TC, etc).

Constituye también la técnica diagnóstica de elección ante la sospecha de trombosis de senos venosos. La RM craneal es especialmente útil en el diagnóstico de malformaciones vasculares arteriográficamente ocultas (cavernomas) y de causas más raras de HIC (vasculitis, enfermedad de Moya-Moya, etc.).

2.6.3. Angiografía convencional

La posibilidad de realizar una valoración angiográfica tanto por TC como por RM craneal, ha modificado el papel en los últimos años de la arteriografía convencional. Sin embargo, esta técnica continúa siendo la exploración de elección ante la sospecha de patología vascular estructural subyacente. Dado que dicha exploración no carece de complicaciones, su indicación deberá establecerse en función del riesgo/beneficio y de forma individualizada.

Los signos sugestivos en la TC de la existencia de una lesión vascular subyacente son la presencia de sangre subaracnoidea o intraventricular, las calcificaciones intracraneales, las estructuras vasculares prominentes o la presencia de una HIC de localización determinada (por ejemplo perisilviana en los aneurismas de la arteria cerebral media). En dichos casos y según el estudio de Halpin y colaboradores (Halpin et al, J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1994), la arteriografía es positiva hasta en el 84% de los casos respecto a sólo un 24% de los casos cuando no existe ningún dato sugestivo.

También la edad del paciente, la localización de la HIC y la HTA preexistente se consideran factores determinantes de la probabilidad de encontrar una malformación vascular subyacente. Así, en el estudio de Zhu y colaboradores

(Zhu et al, Stroke, 1997), la arteriografía fue positiva en el 49% de los hematomas lobares (únicamente en un 10% en ancianos hipertensos pero en 64% de los pacientes de edad inferior a 45 años no hipertensos) y hasta en el 65% de las hemorragias intraventriculares puras. No se obtuvo ningún beneficio diagnóstico en los pacientes hipertensos con HIC de localización típicamente hipertensiva (putamen, tálamo o fosa posterior).

En resumen, la arteriografía convencional estaría indicada en los pacientes con HIC no traumática, a excepción de los mayores de 45 años, con HTA previa y con hemorragias localizadas en putamen, tálamo o fosa posterior.

2.7. TRATAMIENTO DE LA HIC

Pese al conocimiento de la elevada mortalidad y discapacidad que conlleva la HIC, aún hoy día se desconoce cuál es su tratamiento óptimo, tanto desde el punto de vista médico como quirúrgico. En este apartado revisaremos brevemente las evidencias de las que se dispone en cuanto al tratamiento médico y quirúrgico de estos pacientes y finalmente nos centraremos en las nuevas perspectivas de tratamiento, que han sido el resultado de la investigación en los últimos años.

2.7.1. Tratamiento médico

Sólo se han realizado cuatro pequeños estudios aleatorizados de tratamiento médico para la HIC en los que se testaba la eficacia de: esteroides vs. placebo, hemodilución vs. mejor tratamiento médico y glicerol vs. placebo (Italian Acute Stroke Study Group, Lancet, 1988; Tellez et al, Stroke, 1973; Yu et al, Stroke,

1992). Ninguno de estos estudios mostró un beneficio significativo del tratamiento. El tratamiento con esteroides mostró incluso mayor tendencia a presentar complicaciones infecciosas que el grupo placebo.

En consecuencia, las guías de tratamiento médico actuales se basan en la experiencia de series clínicas y en las guías generales de tratamiento de enfermos de cuidados intensivos (Broderick et al, Stroke, 1999; Hack et al, Cerebrovasc Dis, 2003; Laínez et al, Rev Neurol, 2000).

De forma muy resumida, las medidas generales del tratamiento médico se basan en los siguientes puntos:

a) Mantener permeable la vía aérea y una oxigenación adecuada.

Los pacientes que presenten una disminución progresiva del nivel de conciencia o signos de disfunción del tronco encefálico (alteraciones pupilares, patrón respiratorio severamente afectado, respuestas posturales anómalas...) pueden ser candidatos a mantener permeable la vía aérea mediante intubación orotraqueal.

b) Manejo de la presión arterial.

En general, las recomendaciones de tratamiento de la presión arterial en la hemorragia cerebral son más agresivas que en los pacientes con ictus isquémico, por el teórico aumento de riesgo de sangrado persistente desde las arterias pequeñas y arteriolas. Sin embargo, un tratamiento hipotensor demasiado agresivo puede disminuir la presión de perfusión cerebral y teóricamente empeorar el daño cerebral, particularmente en casos en que hay hipertensión intracraneal. Para balancear estos dos hechos, se recomienda que

la presión arterial sistólica no exceda los 185 mmHg y/o la presión arterial diastólica los 105 mmHg.

c) Fluidoterapia y manejo hidroelectrolítico.

Se administrarán líquidos con el objetivo de conseguir la euvolemia e intentando evitar soluciones hipoosmolares.

d) Tratamiento de la hipertermia.

Se deberá tratar la hipertermia e investigar las fuentes de infección más comunes (respiratorias y del tracto urinario), administrándose tratamiento antibiótico en los casos oportunos.

e) Manejo de la hipertensión intracraneal.

La hipertensión intracraneal se define como una presión intracraneal (PIC) superior a 20 cm de H₂O durante más de 5 minutos. Clínicamente se sospechará ante un paciente que presenta cefalea, vómitos y edema de papila, con mayor o menor grado de disminución del nivel de conciencia y con evidencia en la TC craneal de una HIC con efecto de masa o hidrocefalia.

Además de las medidas generales (elevar la cabecera 30°, evitar aumentos de la presión intratorácica, control de la agitación psicomotora y de la hipertermia...), la osmotherapia con manitol (un máximo de 5 días y nunca de forma profiláctica) puede utilizarse como medida específica para el control de la PIC. La hiperventilación, los relajantes musculares, fármacos sedantes y como último recurso el coma barbitúrico, son medidas avanzadas para el control de la PIC.

e) Tratamiento de las crisis comiciales.

f) Prevención de la trombosis venosa profunda (TVP) y el tromboembolismo pulmonar (TEP).

g) Prevención de la aspiración del contenido gástrico.

i) Medidas específicas:

-En pacientes con alteraciones de la hemostasia, como aquellos que reciben tratamiento anticoagulante, se planteará el uso de plasma fresco o factores del complejo protrombínico, lo antes posible, para normalizar la coagulación (Goldstein et al, Stroke, 2006).

-Los pacientes trombopénicos pueden requerir transfusiones de plaquetas en fase aguda.

-En etiologías especiales (trombosis de senos y venas cerebrales, vasculitis) se realizará el tratamiento específico de cada entidad.

2.7.2. Tratamiento quirúrgico

En la actualidad, el manejo quirúrgico de la HIC continúa estando poco claro. Ello, en parte, se debe a una escasez cualitativa y cuantitativa de estudios que permitan otorgar una suficiente evidencia científica para establecer unas claras indicaciones quirúrgicas, e incluso, ni siquiera para permitir afirmar si la cirugía ofrece unas mejores posibilidades pronósticas que el tratamiento médico. La siguiente tabla (Tabla 2) resume las principales características de los estudios más importantes que se han realizado en este campo (Auer et al, J Neurosurg, 1989; Batjer et al, Arch Neurol, 1990; Juvela et al, J Neurosurg, 1989; McKissock W et al, Lancet, 1961; Morgenstern et al, Neurology, 1998; Teernstra et al, Stroke, 2003; Zuccarello et al, Stroke, 1999).

Tabla 2: Estudios randomizados publicados comparando tratamiento médico y quirúrgico.

AUTORES	GRUPOS DE TRATAMIENTO	NÚMERO DE PACIENTES POR GRUPO	MUERTE O DISCAPACIDAD AL 6º MES/%	CARACTERÍSTICAS
McKissock	Craneotomía	89	88	Era pre-TC
	Tratamiento médico	91	89	
Juvela	Craneotomía	26	96	Tiempo largo hasta el tratamiento: el más precoz a las 6 horas Pacientes graves
	Mejor tratamiento médico	26	81	
Batjer	Craneotomía	8	75	Incluidos solo pacientes con hemorragias putaminales ≥ 3 cm de diámetro
	Mejor tratamiento médico y monitorización PIC	9	78	
		4	100	
Auer	Cirugía endoscópica	50	74	Beneficios limitados a pacientes con hemorragias lobares
	Tratamiento médico	50	90	
Zuccarello	Craneotomía o aspiración estereotáxica	9	22 (3 ^{er} mes)	Escaso número de pacientes
	Tratamiento médico	11	27 (3 ^{er} mes)	
Morgenstern	Craneotomía	17	17 mortalidad	Cirugía precoz (dentro de las primeras 12 horas)
	Tratamiento médico	17	24 mortalidad	
Teernstra	Aspiración estereotáxica+urokinasa	36	56	Alto índice de resangrado en el grupo quirúrgico
	Tratamiento médico	35	59	

Por último, recientemente se han publicado los resultados del STICH (International Surgical Trial in Intracerebral Hemorrhage) (Mendelow et al, Lancet, 2005), el estudio randomizado con mayor número de pacientes incluidos hasta la fecha. En total, se incluyeron 1033 pacientes (503 en el grupo de cirugía y 530 en el grupo de tratamiento médico conservador). La cirugía se realizó dentro de las primeras 24 tras la aleatorización (mediana de 30 horas). Globalmente, no se obtuvieron beneficios significativos del tratamiento quirúrgico respecto al médico (el 26% de los pacientes tuvieron un pronóstico favorable en el grupo quirúrgico comparado con el 24% de pacientes en el grupo de tratamiento médico). Sin embargo, en el análisis por subgrupos, las HIC localizadas en la superficie (a menos de 1 cm de la superficie cortical) se beneficiaron del tratamiento quirúrgico, que en un 70% fue realizado mediante

una craneotomía, aunque el abordaje quirúrgico fuese decisión del neurocirujano responsable.

Es importante remarcar que la aleatorización de los pacientes incluyó sólo a aquellos en los que el neurocirujano responsable tuvo dudas sobre cuál podía ser el mejor tratamiento. Además, un 26% de los pacientes que inicialmente fueron asignados a recibir tratamiento médico, se operaron posteriormente, en su mayor parte por presentar deterioro neurológico. La mayoría de los pacientes que deterioraron tenían a su llegada hemorragias subcorticales y más grandes que las del grupo de tratamiento conservador.

En resumen, los resultados del STICH no han cambiado significativamente la práctica clínica habitual, siendo las HIC profundas en pacientes con una puntuación en la escala del coma de Glasgow (GCS) entre 7 y 12, aquellas en las que el beneficio de la cirugía es más incierto (Tabla 3).

En el futuro, y sobretodo en las HIC profundas, debería considerarse si el abordaje quirúrgico menos invasivo (por ejemplo, por vía endoscópica) puede resultar de utilidad.

Tabla 3: Recomendaciones para el tratamiento quirúrgico de la HIC. Tomada de: Broderick JP et al. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage. A statement for healthcare professionals from a special writing group, American Heart Association. Stroke 1999; 30:905-915.

PACIENTES NO QUIRÚRGICOS
<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes con HIC pequeñas (<10 cm³) o con déficits neurológicos mínimos (niveles de evidencia de II a V, grado de recomendación B). • Pacientes con una puntuación en la GCS ≤ 4 (niveles de evidencia de II a V, grado de recomendación B). Sin embargo, pacientes con una puntuación en dicha escala ≤ 4 que tienen una hemorragia cerebelosa con compresión del tronco del encéfalo pueden ser candidatos quirúrgicos en determinadas situaciones clínicas.
CANDIDATOS QUIRÚRGICOS
<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes con HIC cerebelosas > 3 cm que presentan deterioro neurológico o que tienen compresión de tronco o hidrocefalia obstructiva, tan pronto sea posible (niveles de evidencia de III a V, grado de recomendación C). • HIC asociada a una lesión estructural como aneurismas, malformaciones arteriovenosas o angiomas cavernosos deberían ser evacuados si hay posibilidad de un buen pronóstico y la lesión es accesible quirúrgicamente (niveles de evidencia de III a V, grado de recomendación C). • Pacientes jóvenes con una hemorragia lobar de tamaño moderado a grande que estén clínicamente deteriorando (niveles de evidencia de II a V, grado de recomendación B).
NO ESTÁ CLARO CUÁL ES LA MEJOR TERAPIA
<ul style="list-style-type: none"> • El resto de pacientes.

2.7.3. Nuevas perspectivas en el tratamiento

En el último año se han publicado también los resultados del tratamiento ultraprecoz con factor VII activado recombinante (rFVIIa) (Mayer et al, N Engl J Med, 2005). Dicho factor de la coagulación promueve la hemostasia en

pacientes hemofílicos que tienen anticuerpos dirigidos contra los factores VIII o IX, pero también en pacientes sin coagulopatía. Las bases para dicho tratamiento en la HIC asientan en el hecho de que aproximadamente un tercio de los pacientes con una HIC diagnosticada dentro de las tres primeras horas, van a presentar un crecimiento significativo de ésta, sobretodo durante la siguiente hora. Además, dicho crecimiento se asocia a deterioro neurológico posterior.

Este estudio aleatorizó a 399 pacientes con una HIC de menos de 3 horas de evolución, a recibir placebo (n=96), 40 µg/kg de rFVIIa (n=108), 80 µg/kg de rFVIIa (n=92) o 160 µg/kg de rFVIIa (n=103) dentro de la siguiente hora tras la realización de la TC cerebral basal. El porcentaje en el cambio de volumen de la HIC (objetivo primario del estudio) en el grupo placebo fue del 29% respecto a 16%, 14% y 11% en los tres grupos de tratamiento (40, 80 y 160 µg/kg), en el que se consiguieron reducciones absolutas del volumen de 3,3; 4,5 y 5,8 mL a las 24 horas. La mortalidad y la discapacidad severa a los tres meses (puntuación en la escala mRS>3) fue significativamente superior en el grupo placebo que en los grupos tratados. En cuanto a la seguridad del tratamiento, éste se asoció a un 7% de efectos adversos serios tromboembólicos (sobretodo a infartos agudos de miocardio e infartos cerebrales), respecto a un 2% en el grupo placebo, sin ser dicha diferencia estadísticamente significativa.

2.8. PRONÓSTICO DE LA HIC

2.8.1. Pronóstico a corto plazo

Pese a los avances diagnósticos y terapéuticos en el campo de la patología cerebrovascular, el pronóstico de la HIC, hoy en día, continúa siendo malo, con una alta tasa de mortalidad y morbilidad. Así, se estima que entre un 35 y un 50% de los pacientes han fallecido al final del primer mes de la HIC, sobretodo durante los dos primeros días (Counsell C et al, Cerebrovascular Diseases, 1995).

Los factores mejor conocidos que confieren un mal pronóstico a los pacientes con HIC son el volumen inicial de la hemorragia y la disminución inicial del nivel de conciencia, medido según la escala de coma de Glasgow (GCS) (Broderick et al, Stroke, 1993). Otros factores descritos que también se asocian de forma clara al mal pronóstico de la HIC son la invasión ventricular, la edad y la localización primariamente infratentorial (Hemphill, III et al, Stroke, 2001).

El crecimiento precoz de la HIC se asocia de forma independiente a un mal pronóstico, afectando tanto a la supervivencia como al estado funcional (Davis et al, Neurology, 2006), y en íntima relación con el crecimiento, el uso de fármacos antitrombóticos se ha asociado también a un peor pronóstico precoz (Saloheimo et al, Stroke, 2006a).

Existen diferentes aproximaciones estadísticas al uso combinado de varios de los factores pronósticos más importantes en la HIC, de complejidad variada en su aplicación. De todas ellas, una de las que más sencillamente puede aplicarse, es la desarrollada por Hemphill y colaboradores en el año 2001

(Hemphill, III et al, Stroke, 2001). Este grupo, tras estudiar una amplia muestra de pacientes, construyó una escala pronóstica que contiene los ítems que se muestran en la siguiente tabla (Tabla 4).

Tabla 4: Escala pronóstica “ICH score” (Hemphill et al, Stroke, 2001)

Puntuación GCS	Extensión ventricular
3-4.....2	Sí.....1
	No.....0
5-12.....1	Edad
	Superior o igual a 80 años.....1
13-15.....0	Inferior a 80 años.....0
Volumen HIC	Origen infratentorial
Superior o igual a 30 cm ³1	Sí.....1
Inferior a 30 cm ³0	No.....0

La puntuación total se sitúa entre 0 y 6, siendo la mortalidad en el grupo con 0 puntos del 0%, y aumentando progresivamente hasta el 100% en los pacientes que sumaron 5 puntos. Ningún paciente obtuvo 6 puntos (Figura 3).

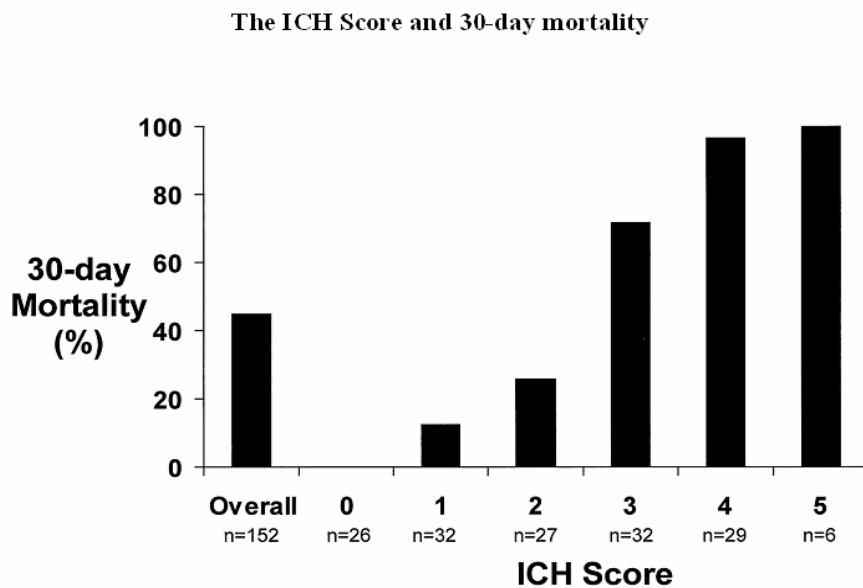


Figura 3: ICH Score, tomada de Hemphill et al. The ICH Score: a simple, reliable grading scale for Intracerebral Hemorrhage. Stroke 2001;32:891-897.

Esta escala ha sido validada por diversos grupos y en distintas comunidades (Cheung et al, Stroke, 2003; Godoy et al, Stroke, 2003; Jamora et al, Stroke, 2003), con resultados similares.

Pese a que la mayoría de la literatura publicada con respecto al pronóstico en la HIC se refiere, como hemos comentado anteriormente, a los factores de mal pronóstico, el pasado año se publicaron los resultados de un trabajo multicéntrico que abordaba qué factores basales se asociaban, por el contrario, a un buen pronóstico, especialmente en las HIC de tamaño moderado a grande (Castellanos et al, J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2005). Los autores mostraron que los niveles bajos de fibrinógeno, una puntuación elevada en la escala canadiense del ictus y la localización lobar hacían más probable un buen

pronóstico final, sugiriendo que estos datos podían ayudar a escoger a aquellos pacientes candidatos a tratamiento quirúrgico.

2.8.2. Pronóstico a largo plazo

La supervivencia a largo plazo tras la HIC se ha descrito en varias series alrededor del 20% al 40% a los dos años del evento (Counsell C. et al, Cerebrovascular Diseases, 1995). Los factores predictores más importantes de ésta incluyen el estado inicial de conciencia, la severidad de la discapacidad producida en las etapas tempranas, la edad del paciente y la localización y volumen del hematoma (Franke et al, J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1992).

A largo plazo, existe un riesgo anual de recurrencia hemorrágica, de presencia de cualquier evento vascular o de muerte de origen vascular que se sitúa entre el 2,1% y el 5,9%, doblándose en el sexo masculino y en edades superiores a 65 años (Vermeer et al, Neurology, 2002). Sin embargo, para aquellos pacientes que al tercer mes presentan una buena recuperación, el pronóstico a largo plazo es similar al de la población general (Saloheimo et al, Stroke, 2006).

2.9. FISIOPATOLOGÍA DE LA HIC

Como se ha comentado en el apartado anterior, la HIC continúa asociándose a un mal pronóstico; ello obedece, en gran parte, al desconocimiento que todavía tenemos de su fisiopatología.

Si bien inicialmente, se describió la HIC como un proceso monofásico tras la rotura única de un vaso (Qureshi et al, N Engl J Med, 2001), desde hace varias

décadas se sabe que el sangrado inicial persiste durante las siguientes horas-días, condicionando un crecimiento del hematoma. Además, el tejido que rodea al hematoma sufre las consecuencias de una lesión cerebral secundaria que puede observarse en las secuencias de TC cerebral en forma de anillo hipodenso, también denominado edema perihematoma. Ambos fenómenos (sobretudo el crecimiento del hematoma) se asocian a deterioro neurológico (Montaner J. et al, *Seminars in Cerebrovascular Diseases and Stroke*, 2005).

Desde el punto de vista molecular, existen una serie de procesos que se desencadenan tras la HIC y que están en la base del crecimiento y de la aparición del edema. La descripción de la literatura referente a dichos procesos ha sido el objetivo del primer artículo que conforma esta tesis doctoral, por lo que nos referiremos aquí muy brevemente a este aspecto.

Así, en las fases precoces tiene un papel importante la activación de la cascada de la coagulación, con la producción de trombina y otros productos intermedios que serán responsables de fenómenos posteriores (inflamación, alteración de la permeabilidad de la barrera hemato-encefálica, activación del sistema del complemento, producción de metaloproteasas, etc.).

En fases más tardías, la lisis de los eritrocitos y posterior liberación de aminoácidos excitotóxicos y de productos derivados de la hemoglobina, también va a influir en la lesión cerebral secundaria, entre otros procesos.

2.9.1. Cronología del edema perihematoma y crecimiento de la hemorragia

La hipodensidad o edema perihematoma aparece de forma precoz tras la HIC, de forma que ya existe en la mayoría de los casos diagnosticados dentro de las tres primeras horas y duplica su volumen durante las siguientes 20 horas (Gebel et al, Stroke, 2002). Posteriormente, el edema continúa creciendo de una forma retardada durante los siguientes días e incluso semanas, y puede asociarse a un incremento del efecto de masa (Zazulia et al, Stroke, 1999).

En cuanto al crecimiento del hematoma, diversos estudios (Tabla 5) con diseño retrospectivo evaluaron la pasada década este fenómeno (Fujii et al, Stroke, 1998; Kazui et al, Stroke, 1996).

Sin embargo, el primer estudio prospectivo destinado a conocer su historia natural fue publicado por Brott y colaboradores en 1997 (Brott et al, Stroke, 1997). De los 103 pacientes que se incluyeron diagnosticados durante las tres primeras horas, hasta un 38% presentaban crecimiento dentro de las 24 horas siguientes (pero sobretudo en las primeras 4 horas tras el inicio de los síntomas). Posteriores estudios han confirmado porcentajes similares de crecimiento (Silva et al, Stroke, 2005).

Tabla 5: Crecimiento de la HIC en los diferentes estudios retrospectivos.

Intervalo desde inicio síntomas /h	Fujitsu, 1990 (n=107)	Kazui, 1996 (n=207)	Fujii, 1998 (n=627)
0-3	-	36%	18%
3-6	-	16%	8%
0-6	21%	29%	-
6-24	-	10%	2%

2.10. BIOMARCADORES EN LA HIC

2.10.1. Definición

En el año 2001, se publicó la definición oficial de marcador biológico o biomarcador, como aquella característica que puede ser medida de forma objetiva y evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (Biomarkers Definition Working Group, Clin Pharmacol Ther, 2001).

A continuación describiremos los biomarcadores que han sido de nuestro interés en esta tesis.

2.10.2. D-dímero

Los sistemas de coagulación y fibrinólisis juegan un papel destacado en la HIC, como se comentó anteriormente, principalmente asociado a la generación de trombina.

La activación del sistema de la coagulación conduce a la síntesis de fibrina, componente fundamental de los trombos. La producción de fibrina se sigue de la activación del sistema fibrinolítico, que resulta en la generación de plasmina, que se encargará de romper la malla de fibrina. Así, bajo condiciones fisiológicas normales existe un equilibrio entre estos dos procesos opuestos. La disolución de la fibrina ligada ("crosslinked fibrin") conduce a la formación de productos específicos de su degradación, incluyendo el D-dímero, que puede ser determinado en sangre total y en plasma utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítomos localizados en el fragmento de D-dímero. La actividad del D-dímero se considera que es un reflejo de la actividad global de formación y lisis de los coágulos y dado que no se puede generar *in vitro* tras la recogida de la sangre, su determinación se considera un reflejo de la actividad hemostática *in vivo* (Figura 4).

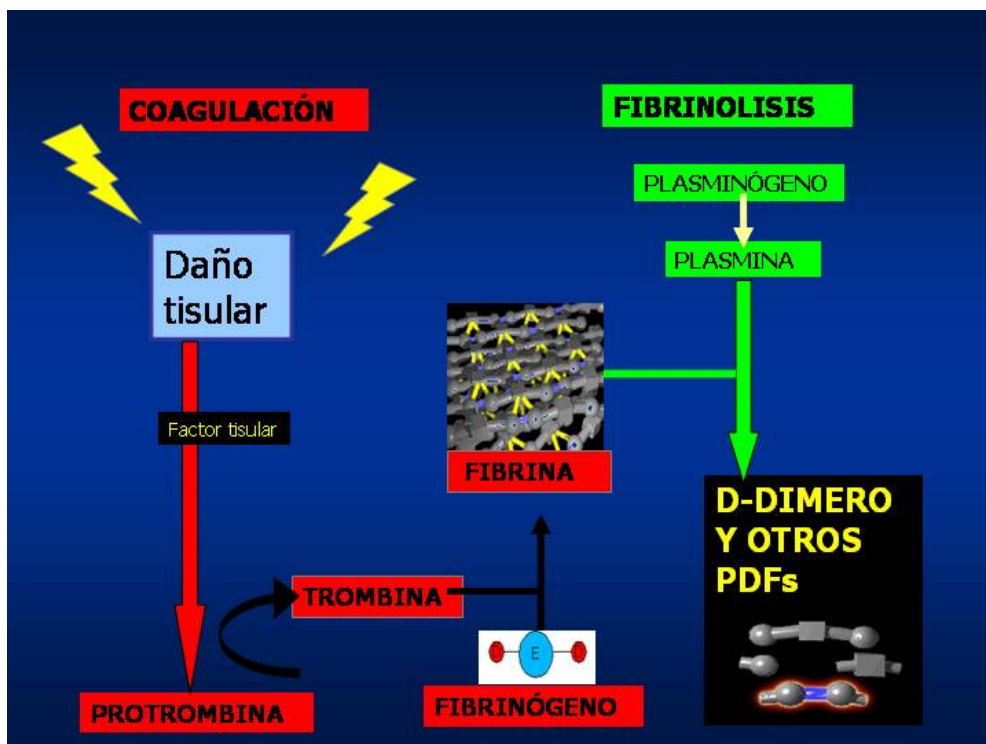


Figura 4: Cascada de la coagulación y fibrinólisis y formación del D-dímero de la fibrina.

Entre las principales aplicaciones clínicas de la determinación de D-dímero, la más ampliamente utilizada, es la de ayudar al diagnóstico del TEP. En este caso, concentraciones bajas de D-dímero, prácticamente lo descartan y por su bajo coste se ha incorporado a los algoritmos diagnósticos de esta patología (Wakai et al, *Emerg Med J*, 2003).

En el caso de la trombosis venosa cerebral, los niveles elevados de D-dímero acompañados de un cuadro clínico sugestivo apoyarían el diagnóstico de trombosis venosa cerebral. Por el contrario, en el caso de las trombosis de venas cerebrales que cursan únicamente con cefalea aislada, no serían suficientes unos niveles bajos de D-dímero para excluir este diagnóstico (Crassard I. et al, *Stroke*, 2005; Lalive PH et al, *Neurology*, 2003).

El D-dímero también se ha asociado a la incidencia de síndromes coronarios agudos y a su recurrencia, independientemente de otros factores de riesgo clásico como el tabaquismo o la hipercolesterolemia. Sin embargo, su falta de especificidad ha limitado su uso como marcador diagnóstico en dicha patología.

Además de las aplicaciones diagnósticas, el D-dímero también puede constituir un marcador pronóstico útil en varias patologías, como por ejemplo, en la isquemia intestinal donde su determinación podría ayudar al clínico a tomar la decisión de realizar una laparotomía urgente, o en la hemorragia digestiva alta, indicando la necesidad de una endoscopia digestiva (Acosta et al, *Br J Surg*, 2001; Vreeburg et al, *Aliment Pharmacol Ther*, 2001; Wakai et al, *Emerg Med J*, 2003).

En el caso de otras enfermedades que afectan al sistema nervioso central, tales como la hemorragia subaracnoidea, el ictus isquémico y el traumatismo craneoencefálico, el D-dímero también ha sido descrito como un buen marcador pronóstico (Barber et al, *Stroke*, 2004; Hoffmann et al, *Acad Emerg Med*, 2001; Nina et al, *Surg Neurol*, 2001; Sanchez CM et al, *Neurología*, 2004).

En la hemorragia subaracnoidea se ha descrito la existencia de una elevación sistémica de varios factores de la coagulación y del D-dímero, que en concentraciones elevadas, se asocia a un peor pronóstico. La información aportada por el D-dímero es comparable a la de otros índices de severidad como la puntuación en la escala Hunt y Hess o en la escala de Fisher. Los niveles más elevados de D-dímero se asocian a la aparición de vasoespasmos y fenómenos isquémicos retardados (Nina et al, *Surg Neurol*, 2001).

En el ictus isquémico, el D-dímero nos puede ser de utilidad en varios aspectos. Por una parte, Barber y colaboradores (Barber et al, *Stroke*, 2004) publicaron un artículo en el año 2004, que mostraba la elevación precoz del D-dímero y de otros marcadores hemostáticos en el ictus isquémico, especialmente en aquellos pacientes en riesgo de presentar un deterioro neurológico precoz posteriormente. También puede ser utilizado, incluso en la fase aguda, para ayudar a realizar el diagnóstico etiológico. Así, el D-dímero parece estar más elevado en aquellos pacientes que presentan un ictus de etiología cardioembólica, que en los de etiología aterotrombótica o lacunar (Montaner J et al, *Cerebrovasc Dis*, 2006), ya desde el inicio.

En cuánto a la HIC, existen algunos trabajos que nos informan de la elevación en sangre periférica del D-dímero tras la HIC, como reflejo de una activación de las vías de coagulación y fibrinólisis a nivel sistémico. Así, Fujii y colaboradores (Fujii et al, Stroke, 2001) investigaron en un estudio retrospectivo de 358 pacientes con una HIC espontánea y menos de 6 horas de evolución desde el inicio de los síntomas, los niveles de complejo trombina-antitrombina, complejo plasmina-antiplasmina y de D-dímero en sangre periférica. En conjunto, las tres variables anteriores estaban más elevadas en los pacientes con HIC que en los controles sanos que se utilizaron para el estudio y además fueron significativamente más altos en los que presentaban invasión intraventricular y/o subaracnoidea, por lo que plantearon la hipótesis de que la llegada de la sangre al espacio subaracnoideo sería la responsable de la activación de los sistemas de coagulación.

Otros trabajos han mostrado también que aunque la elevación del D-dímero de la fibrina se produce tanto en la HIC espontánea como en la de origen traumático, aumenta significativamente más en los pacientes con un traumatismo previo y mayor depresión inicial del nivel de conciencia valorado por la escala GCS (Sanchez CM et al, Neurología, 2004). La liberación a la circulación de factor tisular producida por el daño cerebral sería la responsable última de la activación de la cascada de la coagulación.

2.10.3. S100B

El término S100 se refiere a un conjunto de proteínas diméricas- Ca^{2+} dependientes, consistentes en la unión de dos subunidades denominadas α y β . Así, S100B ($\beta\beta$), compuesta por dos subunidades β , está presente a altas concentraciones en las células gliales y células de Schwann del sistema nervioso central y periférico. Algunas subpoblaciones neuronales también expresan esta proteína (Donato, Int J Biochem Cell Biol, 2001).

Aunque originariamente S100B se obtuvo de extractos de cerebro, no está únicamente localizada en el sistema nervioso. Así, se ha encontrado también en tejidos no neurales, incluyendo melanocitos, células de Langerhans, condrocitos, células adenohipofisarias, células de Leydig y adipocitos, entre otras.

La proteína S100B se encarga de la regulación de múltiples procesos intracelulares y extracelulares. A nivel extracelular, y en función de la concentración que alcanza, puede tener efectos tanto tróficos (concentraciones nanomolares) como tóxicos (concentraciones micromolares). Entre sus efectos tróficos destacan el favorecer el crecimiento de las neuritas y la supervivencia de las neuronas durante el desarrollo y tras una lesión. La actividad protectora extracelular de S100B depende de la unión a su receptor RAGE (Receptor for Advanced Glycation End Products) en las neuronas. Pero a concentraciones mayores, S100B induce apoptosis de dichas células, activando la cascada de caspasas e incrementando la cantidad de especies reactivas de oxígeno (Donato, Int J Biochem Cell Biol, 2001).

La hipótesis de que los astrocitos responden al daño cerebral con un aumento de la liberación de S100B proviene de la observación de concentraciones elevadas de S100B en sangre periférica tras un paro cardíaco (Rosen et al, Stroke, 1998), un traumatismo craneal (Rothoerl et al, Acta Neurochir Suppl, 2000) o tras un ictus isquémico (Buttner et al, Stroke, 1997). Posiblemente, tras la muerte astrocitaria, la proteína S100B se acumularía en el espacio extracelular, adhiriéndose a la matriz extracelular y/o siendo liberada a su vez por astrocitos activados. Bajo estas condiciones, las concentraciones en el espacio extracelular estarían en rango micromolar, resultando pues tóxicas.

La proteína S100B ha sido implicada en la fisiopatología de múltiples procesos neurodegenerativos. En este sentido, puede ser relevante el hecho de que está codificada en el brazo largo del cromosoma 21, que también está implicado en la traslocación que causa el síndrome de Down. Así, en los procesos neurodegenerativos asociados con el síndrome de Down o en la enfermedad de Alzheimer se ha observado un aumento en la expresión génica de esta proteína. Se cree que en estos casos, la proteína beta-amiloide puede estimular la síntesis de S100B y a la inversa (Michetti et al, Clin Chem, 2002).

La utilidad de la determinación de la proteína S100B en líquidos biológicos ha sido mostrada en varias ocasiones en neonatos con un alto riesgo de presentar daño cerebral perinatal (Michetti et al, Clin Chem, 2002). Por una parte, permite predecir las complicaciones hemorrágicas (hemorragia intraventricular) en los

neonatos prematuros o a término con complicaciones anóxicas, incluso antes de que aparezcan los signos clínicos o los hallazgos ultrasonográficos (Gazzolo et al, Clin Chem, 2001). Además, la concentración de dicha proteína está bien correlacionada con la extensión del daño cerebral en estos casos y es fácilmente detectable en una gran cantidad de líquidos biológicos, como la orina, la sangre, el líquido cefalorraquídeo (LCR), etc.

En el ictus isquémico, la relación de la proteína S100B con el volumen del infarto cerebral, con la dinámica de lisis del trombo y con la evolución clínica a corto y largo plazo ha sido motivo de estudio y publicaciones en diversas ocasiones, aportando información de gran valor. Por un lado, Missler y colaboradores (Missler et al, Stroke, 1997) estudiaron las concentraciones sanguíneas de enolasa neuronal específica (NSE) y S100B en 44 pacientes, a su llegada y en los días 3, 4, 7 y 14 tras presentar un ictus isquémico. Encontraron la máxima concentración plasmática de S100B, alrededor del tercer día ($2,5 \pm 1,3$), momento en el que existía también una mayor correlación con el volumen del infarto y con el pronóstico final. De igual forma, la NSE se relacionó con el volumen del infarto pero no se observó ninguna relación con la evolución clínica de los pacientes.

Más interesante desde el punto de vista clínico, resulta la capacidad de la S100B de predecir un curso maligno del infarto cerebral, es decir de la aparición durante los primeros días de signos clínicos y/o radiológicos de un edema masivo ocupante de espacio. Foerch y colaboradores (Foerch et al, Stroke,

2004), así lo encontraron en un estudio que incluyó a 51 pacientes (16 de los cuales evolucionaron presentando un infarto maligno) mostrando que a partir de las 12 horas, las concentraciones plasmáticas de S100B eran mayores en dichos pacientes que en los que no tenían un curso maligno. Además, un punto de corte $>1,03 \mu\text{g/L}$ lo predecía con una elevada sensibilidad (94%) y especificidad (83%).

Los mismos autores mostraron que las concentraciones de esta proteína también eran diferentes en función del momento en que se producía la recanalización arterial, de tal manera que cuando la recanalización era precoz, (en menos de seis horas tras el inicio de los síntomas) los valores obtenidos de S100B en sangre también eran menores que en aquellos pacientes en los que la arteria persistía ocluida tras ese momento (Foerch et al, *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2003).

La proteína S100B podría tener utilidad en el diagnóstico precoz del ictus isquémico, en combinación con otros biomarcadores. Así, Lynch y colaboradores publicaron en el año 2004, los resultados de un estudio en que estudiaron si la combinación de varias moléculas era útil para establecer el diagnóstico de ictus isquémico respecto a una población sana (Lynch et al, *Stroke*, 2004). Encontraron que concretamente S100B, MMP-9, VCAM (Vascular Cellular Adhesión Molecule-1) y el factor von Willebrand podían discriminar a los sujetos con un ictus isquémico con gran sensibilidad y especificidad (90%).

También se ha descrito su utilidad en la diferenciación entre el ictus isquémico y el hemorrágico, junto a otros biomarcadores como el RAGE (Delgado P et al, Cerebrovasc Dis, 2005).

Este tipo de aproximaciones diagnósticas podría servir en el futuro para el manejo prehospitalario del paciente con un ictus.

Pese a toda la información de la que disponemos en el ictus isquémico, y a diferencia de éste, el papel de la determinación de S100B en sangre periférica en pacientes con una HIC espontánea no ha sido investigada por el momento.

2.10.4. Metaloproteasas de matriz

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) constituyen una familia de peptidasas endógenas dependientes de Zn^{2+} , cuya principal finalidad es la de degradar la mayoría de los componentes de la matriz extracelular (MEC) (Rosenberg, Glia, 2002). Las MMPs tienen un papel importante en los procesos fisiológicos que requieren el recambio de la MEC y también participan en procesos celulares como la proliferación, apoptosis y morfogénesis tisular. Sin embargo, además de esta función reparadora y remodeladora, están implicadas en una amplia variedad de procesos patológicos como la diseminación de metástasis tumorales, la artritis, la formación de aneurismas, la aterosclerosis, el enfisema pulmonar, etc.

Esta numerosa familia se clasifica en función del sustrato sobre el que actúan (Tabla 6), conociéndose hoy en día varias subfamilias (Rosenberg, Glia, 2002), como las gelatinasas, colagenasas, etc.

Brevemente, las características comunes a todas ellas son: 1) comparten secuencias de aminoácidos, 2) su actividad proteolítica se inhibe por los inhibidores endógenos, 3) se secretan como pro-enzimas o como pro-enzimas transmembrana, por lo que requieren ser activadas para llevar a cabo su función, 4) su sitio activo contiene Zn^{2+} y requieren un segundo factor como el Ca^{2+} y 5) su actividad enzimática es óptima a pH fisiológicos.

Tabla 6: Clasificación de las metaloproteasas de matriz.

GRUPO	IDENTIFICACIÓN	NOMBRE	SUSTRATOS
Colagenasas	MMP-1 MMP-8 MMP-13	Colagenasa intersticial Colagenasa de los neutrófilos Colagenasa-3	Colágeno I, II, III, X; gelatina; proteoglicanos
Gelatinasas	MMP-2 MMP-9	Gelatinasa-A Gelatinasa-B	Colágenos desnaturalizados; colágeno IV, V, VII, X, XI; elastina
Estromelisinias	MMP-3 MMP-10 MMP-11	Estromelisinina-1 Estromelisinina-2 Estromelisinina-3	Proteoglicanos; Procolágenos; Fibronectina, laminina; gelatina; colagenasas; gelatinasa-B Desconocido
Matrilisinias	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
Metaloproteasas de membrana	MMP-14 MMP-15 MMP-16 MMP-17	MT-MMP-1 MT-MMP-2 MT-MMP-3 MT-MMP-4	Colágeno I, II, III; gelatina, elastina, caseína, vitronectina, MMP-2, MMP-13, pro-TNF- α , dermatán sulfato MMP-2, gelatina, tenascina, laminina, fibronectina MMP-2 Desconocido
Miscelánea	MMP-19 MMP-20	RASI-1 Enamelisina	Gelatinas Amelogenina

Existen dos tipos de inhibidores fisiológicos de las MMPs: la α_2 -macroglobulina y una familia de inhibidores específicos, los TIMPs (inhibidores tisulares de las metaloproteasas). Las características de la interacción entre TIMPs y MMPs son: 1) una elevada afinidad y 2) diferencias para la especificidad entre los diversos TIMPs, pese al alto grado de similitud en sus secuencias. Así, el TIMP-2 y TIMP-3, a diferencia del TIMP-1, son inhibidores efectivos de las MT-MMPs.

Dada la gran cantidad de sustratos sobre los que actúan las MMPs, su regulación es necesariamente restrictiva a varios niveles: a nivel de su expresión génica, a nivel de la activación de sus formas proenzimáticas y por inhibición a través de los TIMPs.

Las MMPs interaccionan con otros sistemas proteolíticos, revistiendo especial importancia, la interacción con el sistema plasminógeno/plasmina, ya que ambos sistemas cooperan en la degradación de la MEC.

Entre las diversas patologías neurológicas en que participa la familia de las MMPs, las más estudiadas han sido: la ateromatosis carotídea, la esclerosis múltiple, el ictus isquémico y la HIC. Nos referiremos aquí brevemente al ictus isquémico y a la HIC.

La participación de las MMPs en la isquemia cerebral ha sido ampliamente estudiada tanto en modelos animales como en el humano. Así, Rosenberg mostró en un modelo animal de isquemia cerebral focal que existe un incremento de la actividad de MMP-9 desde las 12 horas hasta el 5º día, mientras que la MMP-2 se eleva discretamente a partir del 5º día post-isquemia

(Rosenberg GA et al, J Cereb Blood Flow Metab, 1996). En condiciones normales podría pensarse que el plasma contiene MMP-2 y MMP-9 y que por tanto en situaciones en las que existe un edema vasogénico con filtración de elementos plasmáticos al tejido cerebral, se podría originar el aumento de dichas MMPs como efecto, más que como causa. Sin embargo, en modelos animales, la MMP-2 se encuentra sólo mínimamente elevada en la semana posterior al ictus, mientras que el incremento de la MMP-9 es máximo desde el principio. Estos datos sugieren que la contribución plasmática de estos cambios es modesta y que el aumento de la MMP-9 sería la causa de la rotura de la barrera hematoencefálica (BHE).

El papel deletéreo de las MMPs en la isquemia cerebral, ha sido estudiado por otros autores. Así, Asahi y colaboradores (Asahi et al, J Cereb Blood Flow Metab, 2000) mostraron en un modelo animal, que tras la isquemia existe una sobreexpresión de formas latentes de MMP-9 en el hemisferio afecto (pero no en el contralateral ni en animales control); y que entre las 12 y las 24 horas posteriores al inicio de la isquemia cerebral permanente, los niveles de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) de MMP-9 están aumentados. En tercer lugar, en animales deficitarios tras una modificación genética en el gen de la MMP-9, se observó que ofrecían mayor resistencia a la isquemia y presentaban infartos más pequeños y por último, que tras la administración de un inhibidor sintético de las MMPs (BB-94), en los animales no modificados genéticamente, el volumen de infarto era inferior a los controles y en los modificados genéticamente, permanecía igual.

En el hombre, tras el ictus cardioembólico se encuentran concentraciones elevadas de MMP-9 en sangre y especialmente en relación con la transformación hemorrágica del infarto (Montaner et al, Stroke, 2001). Además, en los pacientes tratados con rt-PA (activador tisular del plasminógeno recombinante), la determinación de MMP-9 antes del tratamiento permite identificar a los pacientes con riesgo de presentar complicaciones hemorrágicas (Montaner et al, Circulation, 2003).

Diversas células del sistema nervioso central, como la microglía, la astrogliá y las células endoteliales, pueden producir MMP-9, en respuesta a diversas citoquinas y factores de crecimiento. Los leucocitos y macrófagos tisulares también colaboran en su síntesis. Esto ha sido motivo de estudio, en un trabajo reciente de Rosell y colaboradores (Rosell et al, Stroke, 2006), que ha mostrado la presencia y localización de MMP-9 y MMP-2 en diferentes muestras de tejido cerebral (core del infarto, zona peri-infarto y contralateral) obtenidas de estudios necrópsicos de pacientes con ictus isquémicos dentro de las primeras 6 horas tras el éxitus. Para cuantificar dichas gelatinasas se realizaron diversas técnicas: zimografías en gelatina que fueron confirmadas por análisis de Western Blot, estudios de inmunohistoquímica para localizar la fuente de MMP y zimografía *in situ* para detectar la actividad gelatinasa. La zimografía mostró un alto contenido de MMP-9 en el core del infarto y en las zonas de peri-infarto, con respecto al hemisferio contralateral. En el core del infarto, la MMP-9 se localizó predominantemente alrededor de los vasos sanguíneos, asociada a infiltración por neutrófilos y células de la microglía, mientras que en la zona del peri-infarto la fuente principal de MMP-9 fueron las células microgliales. En

contraposición, la expresión de la MMP-2 fue constitutiva e invariable en las diferentes zonas de cerebro examinado.

En cuanto a la hemorragia intracerebral, el primer modelo experimental que sugirió un papel de las metaloproteasas en la hemorragia cerebral fue publicado por Rosenberg y colaboradores (Rosenberg et al, *Neurology*, 1997). Dicho trabajo consistió en la inducción de una HIC profunda en 30 ratas, mediante la administración intracerebral por estereotaxia de una colagenasa bacteriana. Dicho trabajo mostró que la MMP-2 y la MMP-9 endógenas se encontraban significativamente elevadas a las 24 horas tras el inicio de la HIC y que su elevación coincidía con el momento en que el edema era máximo. A la mitad de los animales se les administró a las 6 horas un inhibidor de MMPs, y fueron sacrificados a las 24 horas. El experimento mostró que en el grupo de animales que recibieron el fármaco inhibidor, el desarrollo de edema era significativamente menor que en el grupo sin tratamiento.

Otro trabajo más reciente, en modelos animales ha estudiado el perfil de expresión de estas y otras metaloproteasas en el tejido cerebral (Power et al, *Ann Neurol*, 2003). Concretamente, los niveles de ARNm de MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 y MMP-12 se hallaron elevados en la vecindad del hematoma en un modelo de inyección de colagenasa en rata, siendo la última de ellas la más fuertemente inducida. La MMP-12 se encontró localizada a nivel de las células monocitarias activadas. En otro experimento del estudio, en que se administró minociclina a un grupo de animales, se redujeron tanto la activación de dichas células como los niveles de MMP-12 en el parénquima cerebral. Además el

tratamiento mejoraba significativamente los resultados de las pruebas neurológicas en el grupo de animales tratados respecto al grupo control.

Por último, en un trabajo publicado recientemente se ha descrito la co-localización de la MMP-9 con los astrocitos en la región perihematoma en el modelo animal y en el hombre (Tejima et al, *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006).

En el hombre, los niveles en sangre de la MMP-9 tras la HIC también han sido estudiados (Abilleira et al, *J Neurosurg*, 2003). En dicho trabajo se obtuvieron los niveles basales de dicha gelatinasa en plasma, mediante técnicas de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) en las primeras 24 horas tras el inicio de la HIC. Los niveles de MMP-9 se encontraron elevados en los pacientes con HIC, y en el subgrupo de pacientes con una HIC de localización profunda, se relacionaron con la aparición de deterioro neurológico y fueron el factor predictor independiente más importante de la presencia de edema perihematoma.

A nivel del tejido cerebral en el hombre, el papel de las MMPs se ha descrito recientemente en el estudio anteriormente mencionado (Rosell et al, *Stroke*, 2006), en que los autores estudiaron a 8 pacientes fallecidos tras una HIC, de los cuales se obtuvieron muestras de tejido de las regiones del perihematoma y contralateral, dentro de las seis primeras horas tras la muerte. En el tejido del perihematoma se encontraron niveles más elevados de MMP-9 que en el hemisferio contralateral, en relación con las células gliales.

2.10.5. Fas y caspasa-3

Desde hace algunos años conocemos que en la HIC se producen fenómenos de muerte celular tanto por necrosis como por apoptosis.

La necrosis ocurre en el sistema nervioso, en áreas severamente afectadas por un colapso bioquímico y conduce a la liberación de radicales libres y excitotoxinas (glutamato, calcio, citoquinas citotóxicas...). Los hallazgos histológicos de la muerte celular en la necrosis suponen "hinchazón" (swelling) mitocondrial y nuclear, disolución de organelas y condensación de la cromatina alrededor del núcleo. Estos eventos se siguen de la ruptura de las membranas nucleares y citoplasmáticas y de degradación del ADN (ácido desoxirribonucleico) por cortes enzimáticos producidos al azar en la molécula. Dados los mecanismos que participan y la rapidez con que se produce dicho proceso, la muerte celular por necrosis es muy difícil de prevenir y/o tratar (Friedlander, N Engl J Med, 2003).

La apoptosis, también denominada muerte celular programada, en el sistema nervioso, ocurre tanto en patologías crónicas como agudas. En el caso de las agudas, ocurre en áreas que no están muy gravemente afectadas. Por ejemplo, en la isquemia cerebral, encontramos células necróticas en el core de la lesión, donde la hipoxia es más importante, y la apoptosis ocurre en la penumbra isquémica, donde el grado de hipoxia tisular es menor (Charriaut-Marlangue et al, J Cereb Blood Flow Metab, 1996). En la apoptosis se produce una cascada bioquímica que activa proteasas que se encargarán de destruir a aquellas moléculas necesarias para la supervivencia celular. Durante el proceso, el

citoplasma se condensa, los ribosomas y las mitocondrias se agregan, el núcleo se condensa y la cromatina se agrega, de tal manera, que, tras su muerte, los fragmentos celulares se convierten en los denominados "cuerpos apoptóticos".

La apoptosis requiere la activación de un "programa genético de muerte celular" que concluye en la activación de las caspasas. Las caspasas son unas proteasas cisteín-dependientes que existen como precursores latentes, y cuando se activan, destruyen componentes clave de la infraestructura celular y activan a otros factores que median el daño celular. Se conocen, por lo menos 14 miembros de esta familia de proteasas, de las cuales 11 existen en el humano. La complejidad de esta familia es muy elevada, pero de forma genérica, las caspasas pueden dividirse en iniciadoras y ejecutoras. Las caspasas iniciadoras (caspasas 1, 2, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12 y 13) se caracterizan por activar a las ejecutoras (caspasas 3, 6, 7 y 14), cuya finalidad es activar la maquinaria necesaria para degradar el ADN nuclear.

Un aspecto crítico de la muerte celular mediada por caspasas es su regulación, que encontramos a diferentes puntos. Por un lado, las caspasas están reguladas a nivel transcripcional y por otro, existen múltiples señales extracelulares que regulan su activación. Uno de ellos, es el sistema del receptor de muerte Fas.

El receptor Fas (también denominado CD95 ó Apo-1), es un miembro de la superfamilia del factor de necrosis tumoral/factor de crecimiento nervioso, que se localiza en la superficie celular. El receptor Fas se ha visto implicado en el

inicio del programa apoptótico en una gran variedad de enfermedades, como la esclerosis múltiple, el traumatismo craneal y el daño cerebral por hipoxia-isquemia (D'Souza et al, J Exp Med, 1996; Dowling et al, J Exp Med, 1996; Felderhoff-Mueser et al, Brain Pathol, 2000). Las células que expresan el receptor Fas en su membrana celular, son susceptibles de entrar en la cascada apoptótica cuando el Fas ligando (o Fas-L) se une al receptor Fas (Figura 5). Tanto el receptor Fas como el Fas-L existen en forma soluble y en forma unida a la membrana. Durante la activación celular, la forma soluble del receptor Fas se genera por "splicing" alternativo del ARNm del Fas completo. Este Fas soluble (s-Fas) regula la muerte celular inhibiendo la unión entre Fas y su ligando en la superficie celular.

En la isquemia cerebral, los niveles en LCR de Fas soluble se han estudiado en 30 pacientes en los días 0 a 4, 7 a 9, 21 a 26 y 90 de evolución clínica, encontrándose disminuidos durante todo el período de observación e inversamente relacionados con el volumen de infarto cerebral y el déficit neurológico en diversos momentos de la evolución (Tarkowski et al, Stroke, 1999). Estos hallazgos sugieren cierta propensión hacia la apoptosis en esta patología.

Otra de las formas solubles descritas de este sistema es el Fas ligando (Fas-L) soluble. El Fas-L soluble es una proteína de membrana tipo-II, que se expresa en células T activadas y se libera por rotura a través de ciertas MMPs. El Fas-L soluble funciona como inductor de muerte celular, aunque en condiciones

experimentales es menos potente que el Fas-L por sí mismo. La inhibición terapéutica del Fas ligando atenúa el daño cerebral tras la isquemia cerebral tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* (Martin-Villalba et al, Cell Death Differ, 2001).

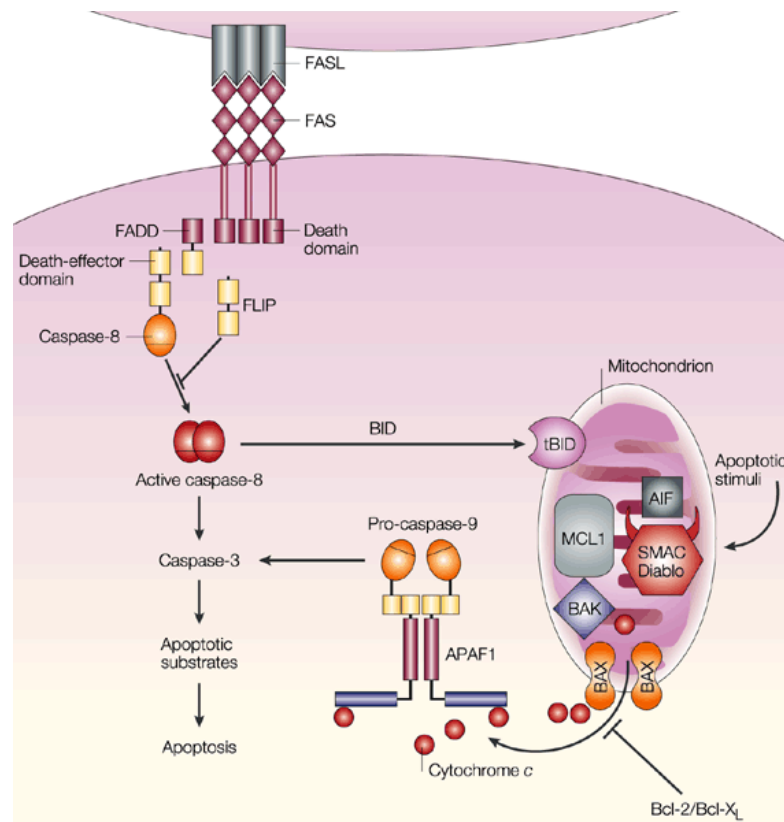


Figura 5: Esquema de las vías de apoptosis mediada por el receptor Fas. Tomada de: Pope R. Nature Reviews Immunology 2002; 2:527-535.

Estos sistemas han sido estudiados en diversas enfermedades, por ejemplo en la hidrocefalia, patología que se supone puede resultar de la pérdida de tejido asociada a degeneración neuronal, daño axonal y gliosis reactiva (Felderhoff-Mueser et al, Pediatr Res, 2003). Los autores compararon los niveles en LCR de Fas soluble (s-Fas), Fas-L soluble (s-Fas-L) y caspasa-3 activada en tres grupos diferentes: 1) niños prematuros con hidrocefalia posthemorrágica; 2) niños con hidrocefalia no post-hemorrágica y 3) controles sanos. Lo que encontraron fue

que los niveles de s-Fas estaban significativamente elevados con respecto a los controles en los grupos con hidrocefalia (tanto post-hemorrágica como no post-hemorrágica), mientras que los niveles de s-FasL y caspasa-3 activada no diferían en los tres grupos estudiados, sugiriendo que la liberación de s-Fas intratecal era una respuesta al daño cerebral secundario a la progresiva dilatación ventricular.

Tal y como se ha comentado en la introducción de este apartado, existen evidencias de estudios experimentales y estudios en el hombre, de la presencia de apoptosis como forma de muerte celular asociada a la HIC.

Los modelos animales que han estudiado dichos fenómenos, mostraron la presencia de células apoptóticas en la periferia del hematoma y en su interior (matriz del hematoma), de forma precoz tras la inducción de la HIC (Matsushita et al, *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000). La mayor parte de células encontradas con características apoptóticas eran neuronas y células gliales. Estos autores mostraron, además que la gelsolina (un sustrato de la caspasa) se encontraba activado en el lado afecto por la hemorragia pero no en el hemisferio contralateral, por análisis mediante técnicas de Western Blot. Además, al administrar un inhibidor de amplio espectro de las caspasas (denominado zVADfmk), entre las 24 y las 48 horas disminuía de forma significativa la proporción de células apoptóticas, evidenciando un papel de la muerte celular por apoptosis en los mecanismos relacionados con el daño cerebral secundario producido por la HIC.

En otro trabajo muy interesante, Felberg y colaboradores (Felberg et al, *Ann Neurol*, 2002) investigaron el número y densidad neuronal en la zona del perihematoma, en los primeros 7 días y en el día 100 (en fase crónica una vez establecida la cicatriz). Para determinar los mecanismos de muerte celular, investigaron la presencia de citocromo c, una molécula mitocondrial que cuando se libera al citoplasma desencadena fenómenos de apoptosis. Encontraron que existía una pérdida neuronal en la zona adyacente al hematoma desde el día 1 hasta el día 7, asociada a liberación de citocromo c. Sin embargo, en fase crónica, el tejido adyacente a la cicatriz era morfológicamente normal. Con dichos resultados hipotetizaron que el daño tisular producido por la HIC, se asemejaría al producido en un agujero negro astronómico, en el que, de forma continuada durante los primeros días, las neuronas y fibras de la sustancia blanca en contacto con la HIC quedan abocadas a sufrir fenómenos de destrucción (entre ellos, de apoptosis) para acabar formando parte de una cicatriz residual.

En el caso de los humanos, Qureshi y colaboradores (Qureshi et al, *Neurosurgery*, 2003) estudiaron la presencia de muerte celular por necrosis y por apoptosis en la región perihematoma de 12 sujetos sometidos a una evacuación quirúrgica de la HIC. La cuantificación de células apoptóticas se realizó mediante la tinción de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine 5-triphosphate nick-end labeling) y la necrosis se identificó en base a criterios morfológicos, mediante tinción con hematoxilina-eosina. Los autores encontraron evidencias de apoptosis en la

muestras de tejido de 10 de los 12 pacientes, con una media del 38% de las células apoptóticas. Las muestras se habían obtenido en los días 1, 2 y 5 desde el inicio de los síntomas. El único sujeto al que se había evacuado la HIC más allá del 5º día, únicamente presentaba características histológicas de necrosis.

El papel del sistema Fas y caspasa-3 en la HIC en el humano está por determinar.

3. OBJETIVOS

Los objetivos principales de la presente Tesis Doctoral son:

1. Realizar una revisión bibliográfica extensa y actualizada de los procesos fisiopatológicos que se desencadenan tras la HIC, las moléculas implicadas y su potencial empleo como marcadores de la evolución clínica y radiológica de los pacientes con HIC.
2. Determinar las concentraciones plasmáticas basales y el perfil temporal de moléculas implicadas en coagulación/fibrinólisis (D-dímero), en daño glial (S100B), en sistemas proteolíticos (MMP-2, 3, 9 y TIMP-1 y 2) y en fenómenos de apoptosis (Fas soluble y caspasa-3) en una amplia muestra de pacientes con HIC.
3. Estudiar la relación existente entre los marcadores biológicos estudiados y la evolución clínica y radiológica en los pacientes con una HIC.
4. Analizar la implicación de fenómenos apoptóticos mediados por el sistema Fas en el tejido cerebral tras la HIC.

4. METODOLOGÍA

En el primer trabajo se realizó una extensa búsqueda bibliográfica en diversas bases de datos, fundamentalmente MEDLINE, de la literatura publicada referente a los procesos fisiopatológicos desencadenados tras la HIC y al papel de los marcadores biológicos útiles en esta patología.

Las palabras clave utilizadas para la búsqueda fueron:

ICH, Intracerebral hemorrhage, biomarkers, edema, hematoma enlargement, hematoma growth, pathophysiology, outcome, coagulation, blood brain barrier, blood, peripheral hypodensity, inflammation, excitotoxicity, secondary brain injury.

La metodología de los siguientes trabajos fue muy similar, por lo que la resumiremos en los siguientes apartados.

4.1. SELECCIÓN DE PACIENTES

Todos los trabajos incluyeron a pacientes atendidos en el servicio de urgencias de nuestro hospital, diagnosticados de presentar una HIC supratentorial de origen no traumático. Los principales criterios de inclusión y exclusión fueron los siguientes:

4.1.1. Criterios de inclusión

-Pacientes con una HIC de localización supratentorial diagnosticados mediante la práctica de una TC craneal.

-Tiempo de evolución desde el inicio de los síntomas de menos de 24 horas (excepto en el trabajo de las metaloproteasas, que fue de 12 horas). En aquellos pacientes con inicio al despertar, se consideró el momento del inicio aquel en que fueron vistos sin síntomas por última vez.

-Firma del consentimiento informado por parte de los pacientes o sus familiares para participar en el estudio.

4.1.2. Criterios de exclusión

-HIC de causa secundaria (malformaciones vasculares subyacentes, alteraciones de la coagulación o toma de anticoagulantes orales, transformación hemorrágica en el seno de un infarto cerebral, lesión tumoral subyacente).

-Pacientes que precisaran de una intervención quirúrgica (drenaje ventricular externo u evacuación quirúrgica de la HIC).

-Origen de la hemorragia a nivel infratentorial (tronco del encéfalo o cerebelo) o primariamente intraventricular.

Para asegurar el correcto cumplimiento de los criterios de inclusión-exclusión se procedió de forma sistemática a:

- 1) Recogida en la historia clínica de los antecedentes médicos de interés y anamnesis dirigida a descartar las etiologías secundarias de la HIC anteriormente mencionadas.
- 2) Exploración física.
- 3) Analítica general incluyendo hemograma, pruebas básicas de coagulación y bioquímica básica.

- 4) Electrocardiograma.
- 5) Radiografía de tórax.
- 6) Tomografía computerizada craneal.

4.2. MUESTRA DE PACIENTES

En el primer trabajo en el que se determinó el papel del D-dímero, se incluyeron consecutivamente a 98 pacientes, diagnosticados dentro de las primeras 24 horas desde el inicio de los síntomas.

En un subgrupo de 21 de estos pacientes se determinó el D-dímero de forma seriada (24 horas, 48 horas, 7º día y 3er mes).

En el segundo trabajo, en que se valoró el papel de la determinación basal de la proteína S100B en plasma, se incluyó un total de 78 pacientes.

En el tercer trabajo, se determinó el perfil temporal de varias metaloproteasas y sus inhibidores endógenos en un grupo de 21 pacientes consecutivos.

Por último, en el cuarto trabajo se incluyeron a un total de 78 pacientes, a los que se determinaron las concentraciones basales de Fas soluble y caspasa-3.

En un subgrupo de 21 pacientes se determinó también el perfil temporal de estas moléculas en plasma.

4.3. VARIABLES CLÍNICAS

Entre las variables clínicas basales estudiadas se recogieron la edad, el sexo, los hábitos tóxicos (tabaquismo, alcoholismo) y los principales factores de riesgo vascular (HTA, diabetes mellitus y dislipemia) y medicación concomitante.

A su llegada a urgencias se determinó la temperatura corporal, la presión arterial sistólica y diastólica, el nivel de conciencia mediante la escala de coma de Glasgow (GCS) (Teasdale et al, Acta Neurochir, 1976) y de la situación neurológica mediante la escala National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) (Brott et al, Stroke, 1989) que se utilizaron también para comprobar la evolución clínica posterior (24 horas, 48 horas, 7º día y tercer mes). Los ítems incluidos en dichas escalas y su puntuación se recogen en los anexos de esta tesis.

4.4. VARIABLES RADIOLÓGICAS

Se realizaron dos exploraciones de TC, una basal y otra entre el 2º y el 3º día. En los pacientes en que se determinó el perfil temporal de las metaloproteasas se realizó una exploración radiológica adicional para determinar el volumen residual al tercer mes.

Cabe remarcar que se repitió una TC craneal a todo paciente que presentara deterioro neurológico durante el seguimiento, independientemente de las exploraciones citadas anteriormente, aunque dicho estudio no fue utilizado en el análisis.

Los parámetros radiológicos recogidos fueron los volúmenes de HIC y edema perihematoma basal y a las 48-72 horas y el cambio entre ambos. El cálculo del volumen se realizó con la fórmula $ABC/2$, expuesta con anterioridad. Se definió el crecimiento tanto de hematoma como de edema según criterios clásicos, cuando el incremento era superior al 33% del volumen inicial.

En el caso del crecimiento del edema, cuando entre dos exploraciones existía una retracción del coágulo, ésta se restó.

Otros datos de interés recogidos fueron la presencia de extensión intraventricular o subaracnoidea en la TC inicial y el tiempo exacto transcurrido entre el inicio de los síntomas y la realización de la TC craneal.

4.5. DETERMINACIÓN DE LOS BIOMARCADORES

Para la determinación de los biomarcadores a estudio se obtuvo sangre venosa mediante venopunción, en cada paciente a su llegada a urgencias y con anterioridad a la práctica del TC craneal. Una vez centrifugada, se separó el plasma, y se congeló a -80°C hasta el momento de la determinación.

El análisis se realizó por técnicas de inmunoensayo, concretamente mediante técnicas de ELISA, siempre por duplicado y siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Los valores obtenidos a partir de las muestras de nuestros pacientes se compararon con aquellos procedentes de un grupo de controles sanos. A continuación se enumeran los kits comerciales disponibles en el mercado que se utilizaron en nuestros estudios:

- **D-dímero:** AutoDimer Test (AGEN, Brisbane, Australia) para las 98 muestras basales, y VIDAS D-dimer (Biomerieux, Lyon, France) en el subgrupo de 21 pacientes.
- **Metaloproteasas MMP-9, 2, 3 y TIMPs-1 y 2:** Biotrak; Amersham Biosciences, Little Chalfont Buckinghamshire, UK.
- **S100B:** Biosite Inc, San Diego, USA.
- **Caspasa-3 y Fas soluble:** Bender Medsystems, Viena, Austria.

4.6. SEGUIMIENTO CLÍNICO

El seguimiento clínico fue muy similar en todos los trabajos.

En la primera semana (concretamente en las visitas de seguimiento anteriormente citadas) se recogieron las constantes vitales (presión arterial y temperatura axilar) y las puntuaciones en las escalas iniciales (NIHSS y GCS). En la visita del tercer mes, se recogió la puntuación en la escala modificada de Rankin (ver anexos).

Así, los parámetros pronósticos utilizados fueron:

- Presencia de **deterioro neurológico** precoz (en las primeras 48 horas), definido como un incremento de cuatro o más puntos en la escala NIHSS con respecto a la situación basal (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, N Engl J Med, 1995).
- **Mortalidad** en la primera semana (trabajo del D-dímero) y al tercer mes (trabajos de las metaloproteasas, S100B y marcadores de apoptosis).

-**Estado funcional** según la escala modificada de Rankin (Rankin, Scott Med J, 1957) al tercer mes (ver anexo).

4.7. ESQUEMA DEL PROTOCOLO DE LOS ESTUDIOS

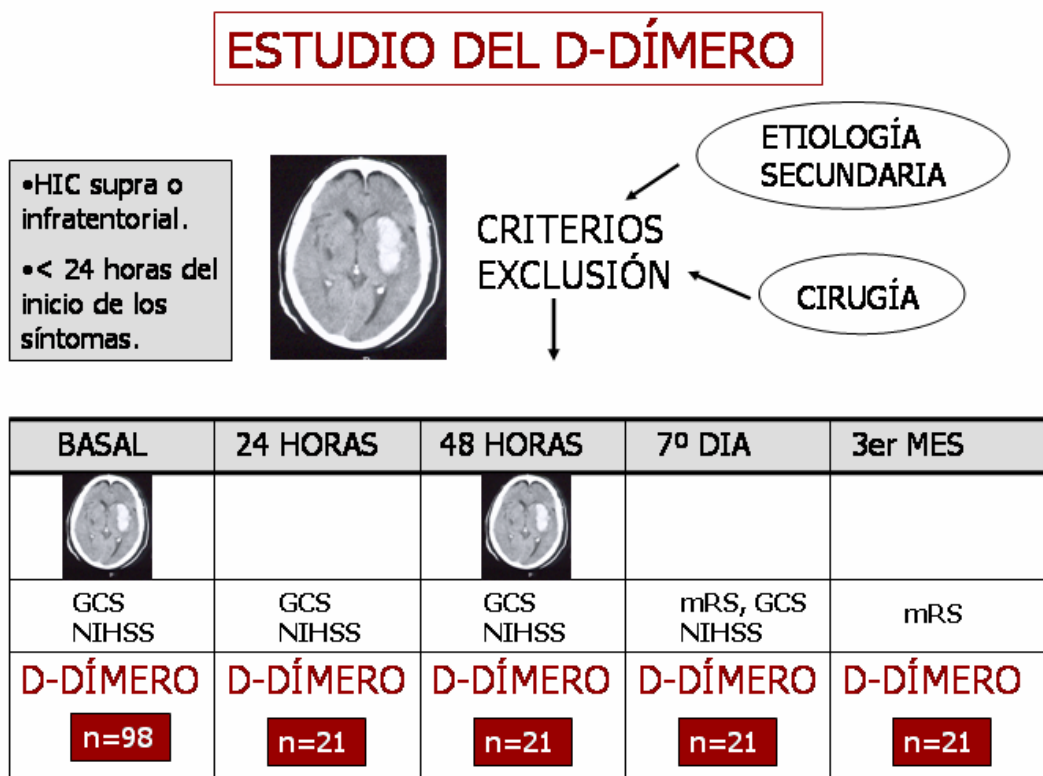


Figura 6: Esquema del protocolo en el estudio del D-dímero.

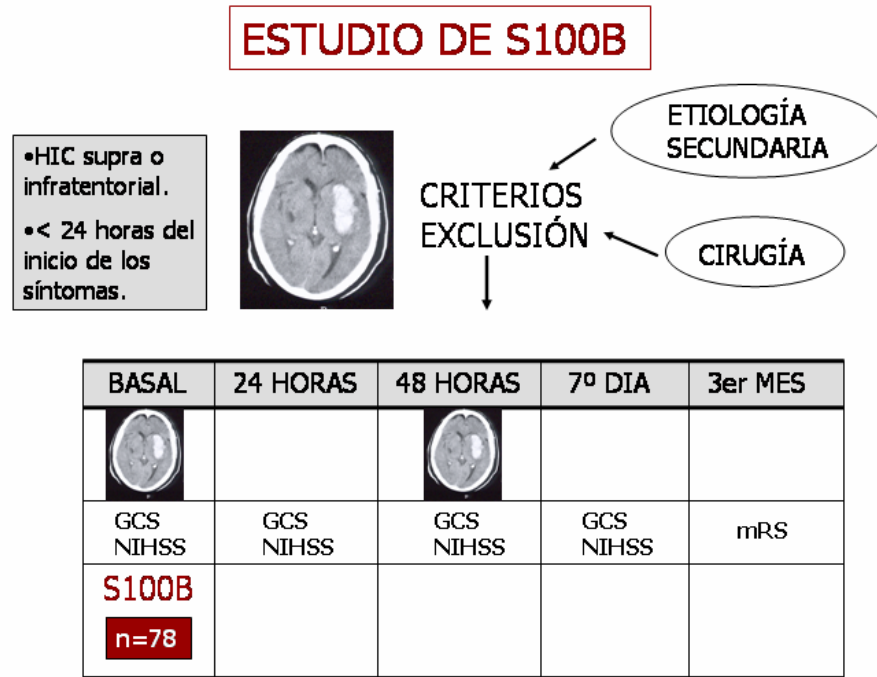


Figura 7: Esquema del protocolo en el estudio de la proteína S100B.

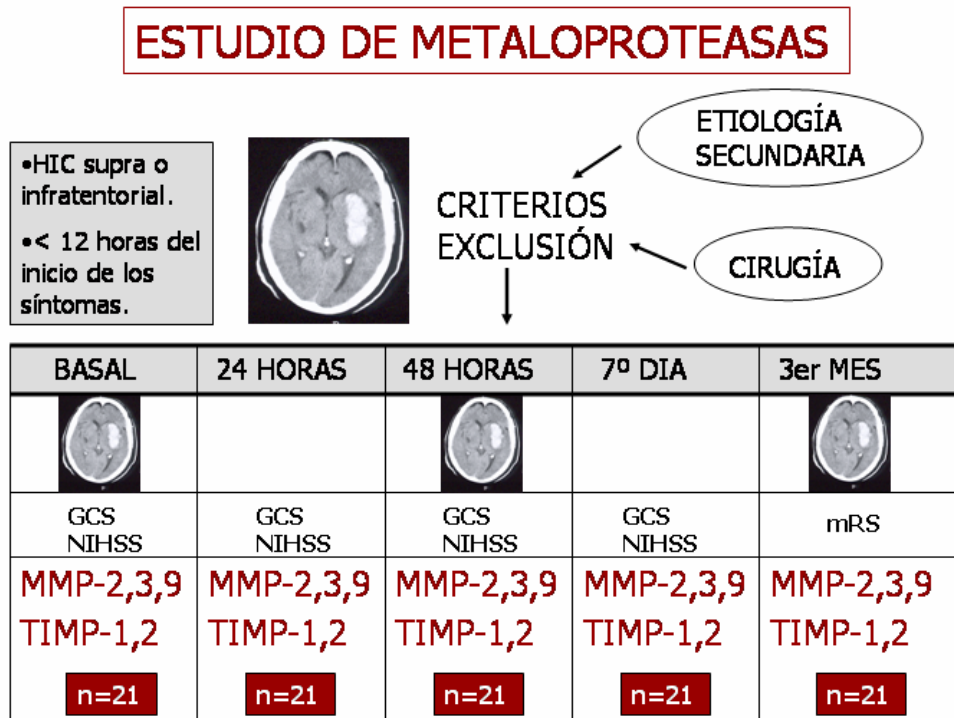


Figura 8: Esquema del protocolo en el estudio de las metaloproteasas.

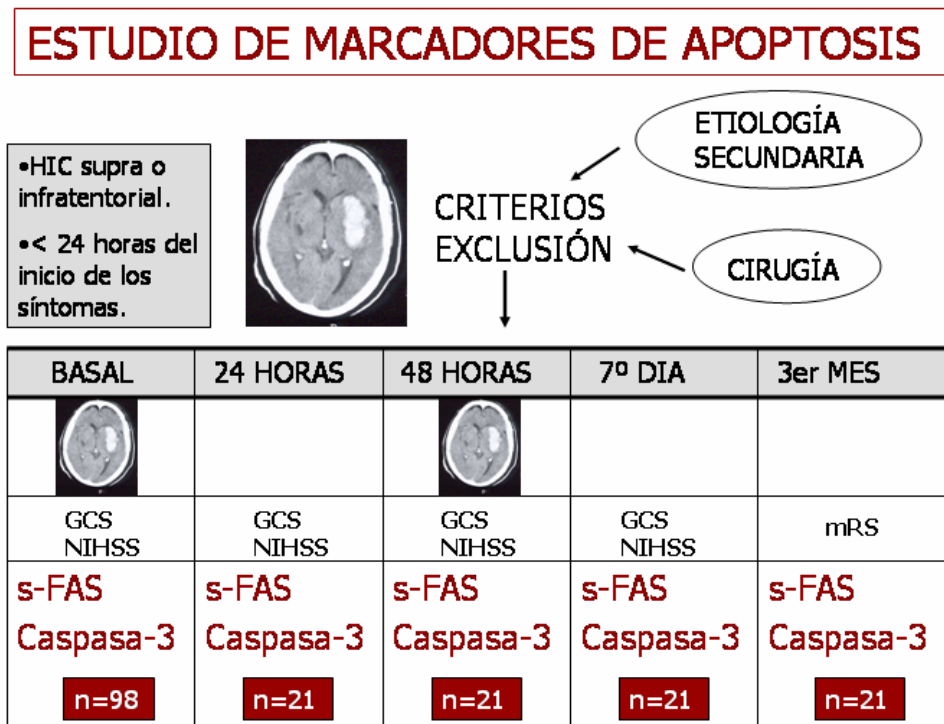


Figura 9: Esquema del protocolo de Fas soluble y caspasa-3 en sangre.

4.8. ESTUDIOS EN TEJIDO CEREBRAL

4.8.1. Extracción de muestras y Western Blot

Se estudiaron diferentes muestras de tejido cerebral de cuatro pacientes que fallecieron a consecuencia de una HIC y de dos pacientes fallecidos por otras causas no inflamatorias que se utilizaron como controles. Brevemente, durante el estudio necrópsico, y una vez retirado el coágulo, se obtuvo 1 cm³ del parénquima cerebral adyacente (área perihematoma), una zona sana del hemisferio ipsilateral alejada del hematoma, y una tercera del hemisferio contralateral.

La extracción de muestras se realizó dentro de las seis primeras horas tras la muerte para evitar la degradación del tejido y todas las muestras fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C .

La presencia de la proteína del receptor Fas, del Fas-ligando y de la caspasa-3 se realizó mediante técnicas de Western Blot (ver apartado métodos de 5.5).

Brevemente, dicha técnica se basa en una reacción inmunológica para detectar antígenos proteicos específicos en las muestras a estudiar (en nuestro caso tejido cerebral) reconocidos por un anticuerpo monoclonal o policlonal y combinado con una electroforesis de proteínas previa. Así, el contenido total de proteínas se separa en un gel de acrilamida que permite el desplegamiento de las proteínas, y una vez separadas, se realiza la transferencia a una membrana de PVDF, donde se podrá hacer la detección mediante un anticuerpo primario contra los antígenos deseados (en nuestro caso marcadores de apoptosis, como Fas receptor, Fas ligando o caspasa-3). Posteriormente se añade un anticuerpo secundario y tras una reacción enzimática final, con peroxidasa se podrá hacer el revelado, obteniendo una imagen de bandas en el lugar en que se haya producido la reacción antígeno-anticuerpo.

4.8.2. Esquema del protocolo de estudio

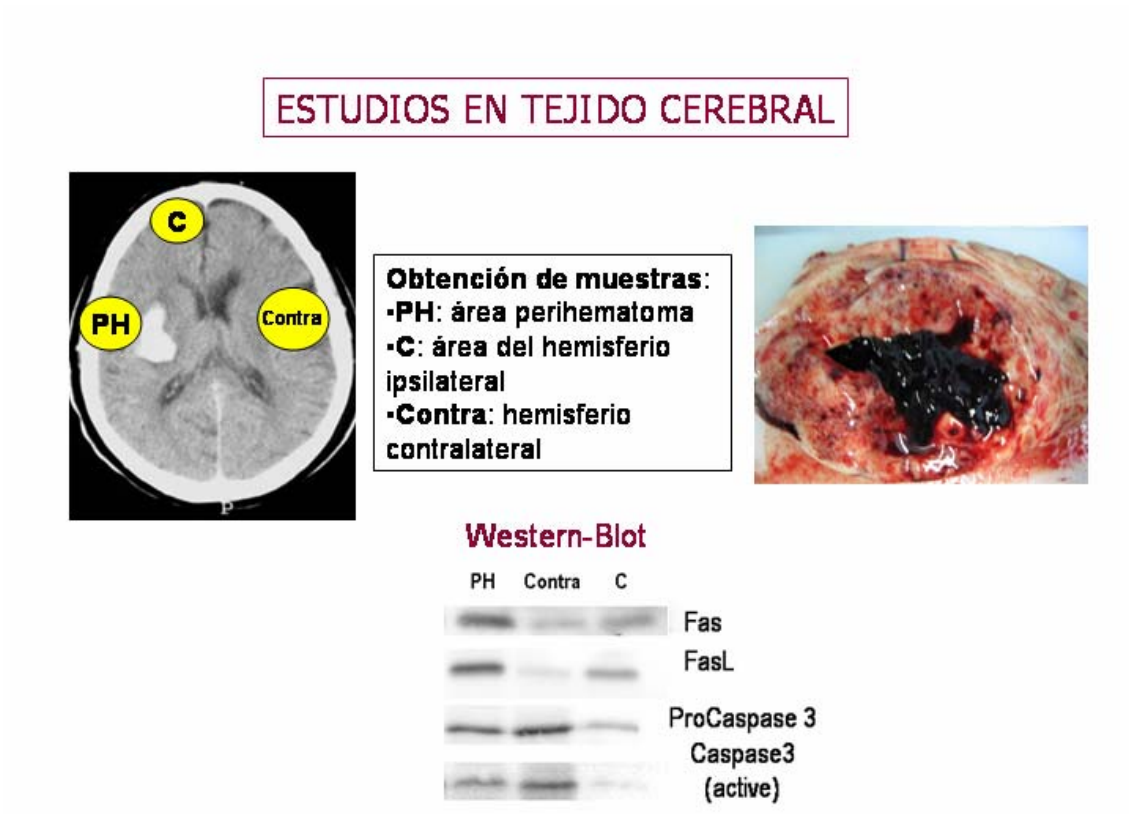


Figura 10: Esquema del protocolo de estudio del tejido cerebral.

5. COPIA DE LAS PUBLICACIONES

**5.1. MARCADORES BIOLÓGICOS EN LA HIC ESPONTÁNEA.
NEUROLOGÍA 2006; 21: EN PRENSA.**

Revisión

P. Delgado

J. Alvarez Sabín

J. Montaner

Marcadores biológicos en la hemorragia intracerebral espontánea

Laboratorio de Investigación Neurovascular y Unidad de Ictus.
Hospital Vall d'Hebron.
Departamento de Medicina.
Universidad Autónoma de Barcelona.
Hospital de la Vall d'Hebron.
Barcelona.

Tras la hemorragia intracerebral se desencadenan una serie de procesos, como la activación de la cascada de la coagulación y fenómenos inflamatorios, que conducen a una lesión cerebral secundaria, todo lo cual conlleva un mal pronóstico vital y funcional en una gran parte de los pacientes. En el presente trabajo se realiza una revisión de la literatura disponible acerca de estos procesos y del uso de marcadores biológicos que permitan avanzar en el conocimiento y manejo de esta patología.

Palabras clave:

Hemorragia intracerebral (HIC), marcadores biológicos, edema perihematoma.

Neurología 2006;21(0):0-0.

Biological markers in spontaneous intracerebral hemorrhage

After intracerebral hemorrhage (ICH), some molecular processes (such as coagulation cascade activation, neuroinflammation, etc.) appear and contribute to the secondary brain damage.

All of them lead to a poor prognosis in patients after ICH. The purpose of this paper is to review the literature regarding this processes and the biological markers implicated in them that allow us to a better knowledge and management of this disease.

Keywords:

Intracerebral hemorrhage, biomarkers, perihematoma edema.

INTRODUCCIÓN

La hemorragia intracerebral (HIC) espontánea se produce por la ruptura de un vaso a nivel intracerebral, con la consiguiente extravasación de sangre al parénquima encefálico. Representa aproximadamente el 4-14% de todos los ictus y

Correspondencia:

Dra. Pilar Delgado Martínez
Laboratorio de Investigación Neurovascular
Institut de Recerca, Hospital General Vall d'Hebron
Passeig Vall d'Hebrón 119-129
08035 Barcelona, Spain.
Correo electrónico: 35070pdm@comb.es

se asocia a elevadas tasas de morbimortalidad¹. Se estima que entre el 32% y el 50% de los pacientes mueren durante el primer mes, sobretudo en los dos primeros días^{2,3}, y sólo un 20% de los pacientes están en una situación de independencia funcional a los 6 meses de la hemorragia^{3,4}.

A pesar de la descripción en los últimos años de avances significativos en el tratamiento médico⁵, el pronóstico asociado a la HIC sigue siendo desfavorable en un número importante de pacientes, y ello obedece en gran parte, al desconocimiento que todavía tenemos de su fisiopatología.

Si bien inicialmente se definió la HIC como un proceso monofásico que sucedía tras la rotura de una arteria perforante⁶, desde hace varias décadas sabemos que el sangrado inicial persiste durante las siguientes horas-días, condicionando un crecimiento del hematoma. Además, el tejido encefálico que rodea al hematoma sufre las consecuencias de la lesión secundaria, lo que puede observarse en las secuencias de tomografía computerizada (TC) cerebral en forma de anillo hipodenso, también denominado edema perihematoma.

Los procesos fisiopatológicos que conducen tanto al crecimiento del hematoma como al edema perihematoma están siendo estudiados en los últimos años, debido a su asociación con la presencia de deterioro neurológico en estos pacientes⁷.

En su desarrollo, participan una serie de moléculas susceptibles de ser utilizadas en un futuro como marcadores biológicos que nos ayuden a predecir la evolución de los pacientes afectados de una HIC. Además, el mejor conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad es el paso previo al desarrollo de tratamientos más específicos y eficaces.

Los objetivos del presente trabajo son describir los procesos moleculares que se desencadenan tras la HIC y su relación con el crecimiento del hematoma y la formación de edema perilesional. En primer lugar, describiremos brevemente como se comportan el edema y el crecimiento en los modelos animales y en

el hombre. Posteriormente, revisaremos los marcadores biológicos que pueden ser útiles como herramientas de predicción de la evolución clínica de nuestros pacientes y por lo tanto, ayudarnos a comprender mejor su fisiopatología.

EDEMA PERIHEMATOMA EN EL MODELO ANIMAL Y EN EL HOMBRE

Los primeros modelos animales de HIC se basaron en la hipótesis de que la lesión producida por ésta, era únicamente secundaria a un efecto de masa importante en el seno del parénquima encefálico. Básicamente consistían en la colocación de un balón inflado o en la inoculación de una sustancia inerte (suero salino/aceite) a nivel cerebral^{8,9}. Sorprendentemente, en dichos modelos no aparecía el edema que la caracteriza a la HIC en el humano, por lo que posteriormente se desarrollaron nuevos modelos basados en la infusión lenta de sangre autóloga^{10,11} en los que desde la primera hora aparecía una zona, adyacente al hematoma, con mayor contenido en agua y proteínas séricas (edema). Dicha zona se correspondía con el halo hipodenso que se observa en las imágenes de TC cerebral o con la hiperintensidad que aparece en las secuencias de T2 y FLAIR de la resonancia magnética. El edema en animales, aparecía muy precozmente, desde la primera hora y podía persistir por lo menos hasta, el 4º día de evolución¹¹.

El edema perihematoma en el hombre también aparece de forma precoz. Existe en la mayoría de los casos diagnosticados en las tres primeras horas de evolución y duplica su volumen en las 20 horas siguientes¹². Posteriormente, el edema continúa creciendo de forma retardada durante los siguientes días o semanas y puede asociarse a un aumento del efecto de masa¹³.

La influencia del edema perihematoma en el pronóstico de los pacientes con una HIC es motivo de controversia, sobretodo en relación al edema precoz. Por un lado, Gebel y colaboradores mostraron que el edema relativo (o cantidad de edema en relación al volumen de la hemorragia) basal, condiciona un mejor pronóstico funcional al tercer mes¹⁴. Sin embargo, estos resultados no se han confirmado en otros estudios. Al contrario, aunque el edema inicial se ha visto asociado a deterioro neurológico precoz, no afecta al pronóstico final, una vez corregido por el volumen de la HIC¹⁵.

Más adelante, el edema tardío, que se visualiza en las exploraciones pasados los primeros días, si parece estar relacionado con una peor evolución clínica, al producir un incremento en el efecto de masa¹³.

CRECIMIENTO DE LA HIC EN EL MODELO ANIMAL Y EN EL HOMBRE

Todos los datos que se conocen sobre el crecimiento de las hemorragias cerebrales provienen de estudios en humanos, ya que no existe por ahora ningún modelo animal que permita reproducir un crecimiento espontáneo, sino que éste pasa a ser controlado cuando se realiza el experimento.

El primer estudio diseñado de forma prospectiva y destinado a conocer la historia natural del crecimiento de las HIC fue publicado por Brott y colaboradores en 1997¹⁶. En él se incluyeron 103 pacientes diagnosticados dentro de las tres primeras horas tras el inicio de los síntomas, a los cuales se repetía una TC craneal a la hora y a las 20 horas. Durante el periodo de estudio (24 horas) hasta un 38% de las HIC crecían; en la mayor parte de los casos, el crecimiento era precoz, concretamente dentro de las primeras 4 horas tras el inicio de los síntomas. Dicho crecimiento precoz estaba asociado claramente a un mal pronóstico clínico.

El análisis conjunto de los estudios retrospectivos y prospectivos demuestra que el crecimiento de la hemorragia es un factor independiente de mal pronóstico y que se asocia a una elevada mortalidad¹⁷⁻²¹. Del análisis retrospectivo de series con gran número de pacientes conocemos que el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas es el factor predictor más importante del crecimiento posterior de la hemorragia y que pueden existir otros factores clínicos asociados, como el consumo importante de alcohol, la forma irregular de la HIC, o la disminución basal del nivel de conciencia¹⁸. El antecedente de haber sufrido un infarto cerebral o de hepatopatía y la hipertensión arterial sistólica (especialmente en pacientes diabéticos mal controlados) también se han asociado a crecimiento posterior del hematoma²⁰.

PROCESOS FISIOPATOLÓGICOS QUE SE DESENCADENAN TRAS LA HIC

Consideraremos que los procesos que se desarrollan tras una HIC y que conducen a la lesión cerebral secundaria ocurren, por lo menos, en dos etapas.

El primer proceso implicado sería la activación de la cascada de la coagulación para conseguir la hemostasia local. Así, la mayoría de las evidencias de que disponemos hoy en día apuntan a que el edema en los primeros días refleja una coagulación exitosa del hematoma²²⁻²⁴. De hecho, los modelos de HIC que emplean sustancias inertes, como ya se ha comentado anteriormente, pueden reproducir un mínimo edema perilesional pero éste es más evidente cuando se instila a nivel cerebral sangre entera que se coagulará una vez inyectada. Además, aquellos modelos animales en los que se instila, junto a la sangre, heparina o activador tisular del plasminógeno, apenas desarrollan edema²². Y, de igual forma, en los pacientes con HIC secundarias al tratamiento con fármacos anticoagulantes o trombolíticos, el edema apenas aparece²³. Todo ello confirma que la coagulación de la sangre es esencial para la formación del edema inicial.

Durante esta fase precoz, se inician una serie de procesos que van a influir en que el edema se perpetúe en etapas posteriores. Por un lado, en uno de los primeros pasos de la cascada de coagulación se va a generar trombina. La trombina es una serin-proteasa, derivada de la protrombina, cuya principal acción es convertir al fibrinógeno en fibrina, componente esencial de los coágulos. La trombina puede existir en forma libre o ligada a la fibrina, de la cual se va a ir liberando lentamente hacia el tejido que rodea el hematoma. En

modelos animales, la infusión de trombina en el cerebro, es capaz de producir un edema que se inhibe administrando inhibidores de esta proteasa, como el argatroban²⁵. Pese a la acción anticoagulante de estos inhibidores, los modelos animales han mostrado que su administración es segura, pues no aumentan el volumen de la hemorragia²⁶.

La capacidad de la trombina para desarrollar edema reside en sus efectos a nivel celular y como inductora de fenómenos inflamatorios, los cuáles resultan deletéreos tras la HIC. A nivel celular y tras unirse a sus propios receptores, la trombina induce la mitosis y proliferación de plaquetas, células endoteliales, fibroblastos, neuronas y glia²⁷ y aunque a bajas concentraciones es neuroprotectora, puede matar a estas células *in vitro* cuando está presente a elevadas concentraciones^{28,29}. También posee propiedades vasoactivas³⁰ y es capaz de alterar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica³¹.

Pero, sin lugar a dudas, la trombina juega un papel central en los procesos de neuroinflamación que se van a desencadenar posteriormente, participando en la quimiotaxis, la expresión de moléculas de adhesión y la liberación de citoquinas³².

La infiltración inflamatoria por neutrófilos se ha descrito en el interior y en la periferia del hematoma desde el primer día, con un aumento importante hasta el tercer día, para posteriormente decaer hacia el final de la primera semana. En ese último momento las células inflamatorias que predominan en el tejido son los macrófagos y la microglía activada, que pueden persistir al menos hasta el 10º día³³. Algunas de las moléculas que participan en la migración y adhesión de los leucocitos, como es la molécula de adhesión intercelular (ICAM-1), se ha descrito localizada a nivel de las neuronas, microglía y vasos de la vecindad del hematoma, ya desde el primer día y aumentando progresivamente durante la primera semana³³.

Los leucocitos que se infiltran liberan a su vez otras sustancias como el anión superóxido, tromboxano A2, endotelina-1, prostaglandina I2 y prostaglandina H2 que pueden alterar la vasoreactividad arterial cerebral. La liberación de proteasas como las metaloproteasas (como se explicará posteriormente) pueden dañar la lámina basal, alterando la barrera hemato-encefálica y contribuyendo así a la lesión cerebral. Aunque el papel de la microglía inicialmente sería el de eliminar las células muertas y los residuos, su activación acabará por contribuir a la lesión cerebral secundaria³³.

De todos estos datos se desprende que los fármacos antiinflamatorios pueden ser útiles para frenar los procesos que aparecen tras una HIC; en este sentido, varios modelos experimentales han valorado la administración de drogas que inhiben la inflamación en diferentes puntos obteniendo unos buenos resultados. Como ejemplos, el celecoxib³⁴, un inhibidor de la ciclooxigenasa-2 ó el tuftsín 1-3 (también denominado factor inhibidor de los macrófagos/microglía)³⁵ son de utilidad cuando se administran en modelos animales precozmente (2 horas tras la inducción del hematoma). La administración de inhibidores de la trombina (argatroban), que como hemos dicho juega un papel central en todos estos procesos, también disminuye la

respuesta inflamatoria tanto precoz como tardía²⁶. De igual forma, el sistema del complemento también se ha relacionado con la respuesta inflamatoria y la lesión cerebral secundaria. Su llegada al cerebro, de donde habitualmente se halla excluido, se realizaría a través de la sangre extravasada en él y de la barrera hematoencefálica que él mismo contribuye a romper³⁶. El paso final de la cascada de activación del complemento (CAM ó complejo de ataque a la membrana) produce la lisis de los eritrocitos y de otras células (endoteliales, neuronas y glia) aumentando el daño cerebral. También estaría modulando la liberación de citoquinas, radicales libres de oxígeno y metaloproteasas. La depleción sistémica del sistema del complemento también se ha asociado a disminución del edema perihematoma en modelos animales³⁷. Sin embargo, no todos los factores del complemento actúan aumentando el daño, como lo hace el factor 3 activado, sino que otros pueden ser beneficiosos³⁸.

Los propios componentes de la sangre también tienen un papel deletéreo tras la HIC, aunque de forma más tardía. En general, la lisis de los eritrocitos va asociada a la resolución del coágulo y se produce varios días después de la HIC, aunque algunos estudios han mostrado que puede suceder antes³⁹⁻⁴¹. La salida del contenido intracelular de los hematíes se asocia a edema cerebral, disrupción de la barrera hematoencefálica y lesión del DNA^{40,42,43}. Por una parte, el grupo hemo de la hemoglobina es degradada a hierro y biliverdina por la acción de la hemo-oxigenasa. Estos productos inducen daño cerebral que se atenúa cuando se administra un inhibidor de la hemo-oxigenasa o un quelante del hierro (como la desferroxiamina) en modelos animales^{40,44-46}. La lisis eritrocitaria puede conducir asimismo a la liberación de aminoácidos excitotóxicos como el glutamato, cuyos niveles cerebrales se han encontrado aumentados de forma muy precoz⁴⁷. La unión del glutamato y la activación de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) produce un aumento del calcio y muerte celular en modelos animales de ICH, que puede ser inhibida experimentalmente mediante la administración de memantina⁴⁸. Por distintos mecanismos este fármaco puede reducir asimismo la expansión del hematoma cuando se instila diariamente tras la inducción de la hemorragia.

Otro grupo de moléculas que se han estudiado en relación a la lesión cerebral secundaria tras la HIC son las metaloproteasas de matriz. Las metaloproteasas de matriz (MMPs) son una extensa familia de enzimas proteolíticas Zn²⁺-dependientes que se encargan del remodelado de la matriz extracelular (MEC) y que en conjunto pueden degradar todos los constituyentes de la misma. Intervienen en la mayoría de procesos que requieren el recambio de la MEC, como por ejemplo la reabsorción ósea, recambio endometrial, etc. Pero la presencia de estas proteasas a altas concentraciones se ha asociado con una amplia variedad de procesos patológicos como la diseminación de metástasis, artritis, esclerosis múltiple, etc. En concreto, dentro de la familia de las MMPs, las gelatinasas A y B (ó MMP-2 y 9 respectivamente) son capaces de digerir la lámina basal endotelial, que en condiciones normales tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad de la barrera hemato-encefálica⁴⁹. Se cree que los neutrófilos emplean la producción de MMPs para migrar a través del endotelio y mediante este mecanismo pueden ampliar el daño en la zona al desestructurar la barrera hematoencefálica⁵⁰, contribuyendo a la producción de edema.

Otras células contribuyen a fabricar metaloproteasas como los astrocitos, oligodendrocitos, células endoteliales, neuronas, pericitos, etc. aunque el tipo concreto de metaloproteasa que producen y el estímulo que las induce es diferente para cada una de ellas⁴⁹. En el ictus isquémico, la presencia de niveles elevados de estas MMPs se ha visto asociado a la transformación hemorrágica del infarto^{51,52}. Por otra parte, existen modelos animales consistentes en la infusión intracerebral de una colagenasa bacteriana⁵³, que es uno de los miembros de esta familia, en que se reproduce de forma inequívoca la HIC y el edema perilesional. Dicho edema puede bloquearse si se administra un inhibidor de las metaloproteasas⁵⁴. En este modelo, los niveles de MMP-9 endógena son máximos coincidiendo con el edema máximo⁵³. La actividad de estas metaloproteasas está íntimamente regulada, entre otros, por los TIMPs, que son los inhibidores tisulares endógenos de estas proteasas. El perfil temporal de expresión in vivo de algunas de estas metaloproteasas y sus inhibidores endógenos ha sido estudiada en un modelo histopatológico en rata⁵⁵, mostrando que en su mayoría tienen un patrón bifásico de expresión. En dicho trabajo, la metaloproteasa con mayor expresión fue la MMP-12, que además aumentaba de forma tardía (séptimo día).

Por último, otro de los procesos que ha sido ampliamente estudiado como responsable del daño secundario en la región que rodea al hematoma ha sido la presencia de isquemia cerebral secundaria, que sería causada por el efecto compresivo sobre los vasos que rodean al coágulo. Sin embargo, se han realizado múltiples trabajos, tanto en animales como en el hombre, con diferentes aproximaciones⁵⁶⁻⁶² (diferentes técnicas para evaluar el flujo sanguíneo cerebral, diferentes tiempos desde el inicio, diferentes volúmenes de hematoma) sin llegar a establecer claramente la presencia de una zona isquémica perihematoma, al menos que perdure en el tiempo. Más bien, se trataría de un área en que se reduce el flujo sanguíneo cerebral pero de una forma transitoria y sin llegar a los niveles que habitualmente causan isquemia (con la excepción de los casos en que el hematoma es muy voluminoso y la presión intracraneal está muy elevada). En dicha zona existiría una fracción de extracción de oxígeno reducida⁵⁷, y en conjunto una tasa metabólica reducida⁵⁶.

UTILIDAD DE LOS MARCADORES BIOLÓGICOS EN LA HIC

El empleo de marcadores que pueden medirse en sangre periférica u otros líquidos biológicos tras la HIC tiene varias aplicaciones potenciales. En primer lugar, puede ayudar al diagnóstico de la HIC, de forma precoz, incluso cuando las pruebas de neuroimagen no están disponibles. Como ejemplo en este sentido, la GFAP (proteína acidica fibrilar glial) es un biomarcador relacionado con el daño glial, que ha mostrado gran capacidad para discriminar entre el ictus isquémico y hemorrágico⁶³. La combinación de varios biomarcadores implicados en algunos de los procesos que se desencadenan tras la HIC (como por ejemplo D-dímero, RAGE (receptor de los productos avanzados de glicosilación), caspasa-3, s100b, etc...) ofrece resultados similares⁶⁴.

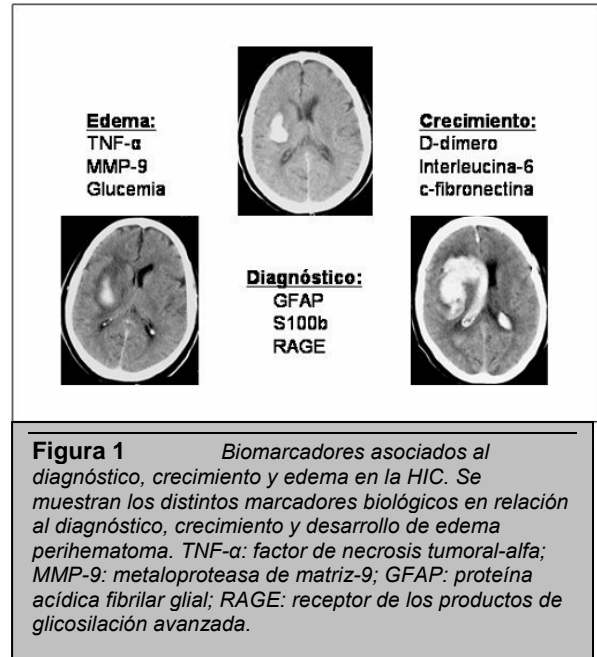


Figura 1 Biomarcadores asociados al diagnóstico, crecimiento y edema en la HIC. Se muestran los distintos marcadores biológicos en relación al diagnóstico, crecimiento y desarrollo de edema perihematoma. TNF- α : factor de necrosis tumoral-alfa; MMP-9: metaloproteasa de matriz-9; GFAP: proteína acidica fibrilar glial; RAGE: receptor de los productos de glicosilación avanzada.

La segunda aplicación constituye el uso de estos biomarcadores en la predicción del pronóstico clínico, ya que permiten identificar a los pacientes que pueden presentar un deterioro neurológico precoz o un peor pronóstico vital o funcional a largo plazo. Hasta el momento, los factores mejor conocidos relacionados con el pronóstico tras la HIC son eminentemente clínicos y radiológicos, y de todos ellos el más potente es el volumen inicial de la HIC^{2,65}. Sin embargo, los marcadores biológicos pueden ofrecer información pronóstica adicional independientemente del resto de factores y esto podría ayudar al mejor manejo clínico de los pacientes, sobretodo en aquellos casos en que la toma de decisiones resulte más complicada⁶⁶. Como ejemplos podríamos citar la relación con el deterioro neurológico dentro de las primeras 48 horas de los niveles basales de fibrinógeno o del recuento leucocitario¹⁵.

Por último, los biomarcadores pueden ayudarnos a conocer mejor la cronología de los procesos implicados en el daño cerebral que han sido motivo de esta revisión. Como ejemplos, dentro de la cascada de la coagulación, Fujii y colaboradores mostraron que los sistemas hemostáticos estaban activados de forma sistémica tras la HIC, con aumento del complejo trombina-antitrombina, del complejo plasmina-antiplasmina y del D-dímero de la fibrina, especialmente cuando la sangre alcanzaba el espacio subaracnoideo⁶⁷. Otros autores han mostrado la activación precoz de los sistemas de la coagulación tras la HIC y en el paciente traumático⁶⁸. Nuestro grupo también ha mostrado recientemente que el D-dímero se encuentra elevado en la sangre de los pacientes con HIC y que ya a nivel basal predice un mal pronóstico clínico, al estar asociado con el deterioro neurológico precoz y con mayor mortalidad⁶⁹.

Dentro de los marcadores de inflamación, Castillo y colaboradores¹⁶ encuentran niveles elevados de

citoquinas proinflamatorias (interleucina-6 y factor de necrosis tumoral- α) en sangre periférica de pacientes de menos de 24 horas tras el inicio de los síntomas. Los niveles del factor de necrosis tumoral- α se relacionan con la zona de hipodensidad perihematoma a los 2 días. En el mismo estudio se determinaron los niveles de glutamato, un neurotransmisor excitotóxico, mostrando que éstos permitían identificar a los pacientes con un peor pronóstico final y una mayor lesión residual¹⁶. Los marcadores de inflamación también pueden estar participando activamente en los procesos iniciales que comportan crecimiento de la hemorragia, como mostraron Silva y colaboradores²¹, junto a otras moléculas de daño endotelial como la fibronectina celular.

Las metaloproteasas, que también se han observado aumentadas tras la HIC, pueden estar en relación con el edema inicial, al igual que la propia coagulación de la sangre^{70,71}.

Por último, entre los biomarcadores que se determinan de forma rutinaria, no se debe olvidar la glucemia. La hiperglucemia en sangre periférica en el momento del ictus se ha visto asociada a un peor pronóstico, tanto en pacientes diabéticos como en no diabéticos^{72,73}. Los niveles más altos de glucemia se asocian a las HIC de mayor volumen, en pacientes con déficits neurológicos muy importantes, por lo que podrían poner de manifiesto únicamente una respuesta al estrés. Sin embargo, en los modelos experimentales, la hiperglucemia se asocia a un mayor edema cerebral y a muerte celular en la región perihematoma⁷⁴.

Es probable que marcadores que desde el punto de vista teórico parecen relevantes, como el factor VII de la coagulación, etc. se analicen en futuros estudios.

NUEVAS PERSPECTIVAS EN EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

En el último año hemos asistido a un avance importante en el tratamiento médico de la hemorragia intracerebral, tras la publicación de los primeros resultados positivos del tratamiento con factor VII recombinante activado⁵. Este factor promueve la hemostasia, aún en ausencia de alteraciones de la coagulación, y permite limitar el crecimiento de la hemorragia cuando se administra dentro de las cuatro primeras horas tras el inicio de los síntomas. Además mejora el pronóstico vital y funcional a los tres meses tras el episodio.

Muchos de los agentes que mejoran a nivel experimental algunos de los aspectos fisiopatológicos en la HIC que se han comentado previamente (argatroban, antiinflamatorios, inhibidores de las metaloproteasas, etc.) podrían ser futuras dianas terapéuticas. Sin embargo el paso previo a su aplicación en humanos reside en el mejor entendimiento de la cronología de estos procesos, el desarrollo de nuevas técnicas de neuroimagen que proporcionen información en tiempo real y el desarrollo de nuevos modelos animales donde podamos reproducir el crecimiento del hematoma, entre otros⁷⁵. En este sentido, resulta muy interesante

la posibilidad de estudiar la dinámica de la HIC, por medio de una técnica poco invasiva de neuroimagen como el Duplex transcerebral⁷⁶.

Por último, en lo referente al empleo de biomarcadores plasmáticos sería muy conveniente el desarrollo de técnicas rápidas de detección de las moléculas a las que nos hemos referido en esta revisión, para hacerlas útiles en la práctica clínica diaria, así como el descubrimiento de nuevos biomarcadores. Este último punto es posible que se vea facilitado por el uso de nuevas técnicas de proteómica y genómica. Quizás en el futuro encontremos marcadores de susceptibilidad genética no sólo para identificar el riesgo de presentar una HIC sino también para que los procesos comentados de edema y crecimiento de la HIC sean predecibles en función del bagaje genético de cada paciente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kase CS, Crowell RM. Prognosis and treatment of patients with intracerebral hemorrhage. In: Kase Cs, Caplan LR, eds. Intracerebral Hemorrhage. Boston: Butterworth-Heinemann, 1994;467-489.
2. Broderick JP, Brott TG, Duldner JE, Tomsick T, Huster G. Volume of intracerebral hemorrhage. A powerful and easy-to-use predictor of 30-day mortality. Stroke 1993;24:987-993.
3. Counsell C, Boonyakarnkul S, Dennis M, Sandercock P, Bamford J, Burn J, et al. Primary intracerebral haemorrhage in the Oxfordshire Community Stroke Project. Cerebrovasc Dis 1995;26-34.
4. Broderick J. Intracerebral Hemorrhage. In: Gorelick PB, Alter M, eds. Handbook of Neuroepidemiology. New York: Marcel Dekker, Inc, 1994;141-167.
5. Mayer SA, Brun NC, Begtrup K, Broderick J, Davis S, Diringer MN, et al. Recombinant activated factor VII for acute intracerebral hemorrhage. N Engl J Med 2005;352:777-785.
6. Qureshi AI, Tuhrim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, Hanley DF. Spontaneous intracerebral hemorrhage. N Engl J Med 2001;344:1450-1460.
7. Montaner J, Rodríguez-Yañez M, Castellanos M, Alvarez-Sabin J, Castillo J. Molecular signatures of course and prognosis of intracerebral hemorrhage. Seminars in Cerebrovascular Diseases and Stroke. "Update in intracerebral hemorrhage" 2006; in press.
8. Sinar EJ, Mendelow AD, Graham DI, Teasdale GM. Experimental intracerebral hemorrhage: effects of a temporary mass lesion. J Neurosurg 1987;66:568-576.
9. Suzuki J, Ebina T. Sequential changes in tissue surrounding ICH. In Pia HW, Langmaid C, Zierske J, eds. Spontaneous Intracerebral Haematomas:

- Advances in diagnosis and therapy. Berlin: Springer-Verlag, 1980:121-128.
10. Wagner KR, Xi G, Hua Y, Kleinholz M, de Courten-Myers GE, Myers RE, et al. Lobar intracerebral hemorrhage model in pigs: rapid edema development in perihematomal white matter. *Stroke* 1996;27:490-497.
 11. Yang GY, Betz AL, Chenevert TL, Brunberg JA, Hoff JT. Experimental intracerebral hemorrhage: relationship between brain edema, blood flow, and blood-brain barrier permeability in rats. *J Neurosurg* 1994;81:93-102.
 12. Gebel JM, Jauch EC, Brott TG, Khoury J, Sauerbeck L, Salisbury S, et al. Natural history of perihematomal edema in patients with hyperacute spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2002;33:2631-2635.
 13. Zazulia AR, Diringer MN, Derdeyn CP, Powers WJ. Progression of mass effect after intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1999;30:1167-1173.
 14. Gebel JM, Jauch EC, Brott TG, Khoury J, Sauerbeck L, Salisbury S, et al. Relative edema volume is a predictor of outcome in patients with hyperacute spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2002;33:2636-2641.
 15. Leira R, Davalos A, Silva Y, Gil-Peralta A, Tejada J, Garcia M, et al. Early neurologic deterioration in intracerebral hemorrhage: predictors and associated factors. *Neurology* 2004;63:461-467.
 16. Castillo J, Davalos A, Alvarez-Sabin J, Pumar JM, Leira R, Silva Y, et al. Molecular signatures of brain injury after intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2002;58:624-629.
 17. Brott T, Broderick J, Kothari R, Barsan W, Tomsick T, Sauerbeck L, et al. Early hemorrhage growth in patients with intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1997;28:1-5.
 18. Fujii Y, Takeuchi S, Sasaki O, Minakawa T, Tanaka R. Multivariate analysis of predictors of hematoma enlargement in spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1998;29:1160-1166.
 19. Fujii Y, Tanaka R, Takeuchi S, Koike T, Minakawa T, Sasaki O. Hematoma enlargement in spontaneous intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg* 1994;80:51-57.
 20. Kazui S, Minematsu K, Yamamoto H, Sawada T, Yamaguchi T. Predisposing factors to enlargement of spontaneous intracerebral hematoma. *Stroke* 1997;28:2370-2375.
 21. Silva Y, Leira R, Tejada J, Lainez JM, Castillo J, Davalos A. Molecular signatures of vascular injury are associated with early growth of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2005;36:86-91.
 22. Wagner KR, Xi G, Hua Y, Zuccarello M, de Courten-Myers GM, Broderick JP, et al. Ultra-early clot aspiration after lysis with tissue plasminogen activator in a porcine model of intracerebral hemorrhage: edema reduction and blood-brain barrier protection. *J Neurosurg* 1999;90:491-498.
 23. Gebel JM, Brott TG, Sila CA, Tomsick TA, Jauch E, Salisbury S, et al. Decreased perihematomal edema in thrombolysis-related intracerebral hemorrhage compared with spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2000;31:596-600.
 24. Xi G, Wagner KR, Keep RF, Hua Y, de Courten-Myers GM, Broderick JP, et al. Role of blood clot formation on early edema development after experimental intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1998;29:2580-2586.
 25. Lee KR, Betz AL, Keep RF, Chenevert TL, Kim S, Hoff JT. Intracerebral infusion of thrombin as a cause of brain edema. *J Neurosurg* 1995;83:1045-1050.
 26. Nagatsuna T, Nomura S, Suehiro E, Fujisawa H, Koizumi H, Suzuki M. Systemic Administration of Argatroban Reduces Secondary Brain Damage in a Rat Model of Intracerebral Hemorrhage: Histopathological Assessment. *Cerebrovasc Dis* 2005;19:192-200.
 27. De Caterina R, Sicari R. Cellular effects of thrombin: pharmacology of the receptors in various cell types and possible development of receptor antagonists. *Pharmacol Res* 1993;27:1-19.
 28. Striggow F, Riek M, Breder J, Henrich-Noack P, Reymann KG, Reiser G. The protease thrombin is an endogenous mediator of hippocampal neuroprotection against ischemia at low concentrations but causes degeneration at high concentrations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2264-2269.
 29. Vaughan PJ, Pike CJ, Cotman CW, Cunningham DD. Thrombin receptor activation protects neurons and astrocytes from cell death produced by environmental insults. *J Neurosci* 1995;15:5389-5401.
 30. Glusa E. Vascular effects of thrombin. *Semin Thromb Hemost* 1992;18:296-304.
 31. Lee KR, Kawai N, Kim S, Sagher O, Hoff JT. Mechanisms of edema formation after intracerebral hemorrhage: effects of thrombin on cerebral blood flow, blood-brain barrier permeability, and cell survival in a rat model. *J Neurosurg* 1997;86:272-278.

-
32. Bar-Shavit R, Benezra M, Sabbah V, Bode W, Vlodaysky I. Thrombin as a multifunctional protein: induction of cell adhesion and proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1992;6:123-130.
 33. Gong C, Hoff JT, Keep RF. Acute inflammatory reaction following experimental intracerebral hemorrhage in rat. *Brain Res* 2000;871:57-65.
 34. Chu K, Jeong SW, Jung KH, Han SY, Lee ST, Kim M, et al. Celecoxib induces functional recovery after intracerebral hemorrhage with reduction of brain edema and perihematomal cell death. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:926-933.
 35. Wang J, Tsirka SE. Tuftsin fragment 1-3 is beneficial when delivered after the induction of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2005;36:613-618.
 36. Morgan BP, Gasque P, Singhrao S, Piddlesden SJ. The role of complement in disorders of the nervous system. *Immunopharmacology* 1997;38:43-50.
 37. Xi G, Hua Y, Keep RF, Younger JG, Hoff JT. Systemic complement depletion diminishes perihematomal brain edema in rats. *Stroke* 2001;32:162-167.
 38. Yang S, Nakamura T, Hua Y, Keep RF, Younger JG, He Y, et al. The role of complement C3 in intracerebral hemorrhage-induced brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; in press.
 39. Xi G, Keep RF, Hoff JT. Erythrocytes and delayed brain edema formation following intracerebral hemorrhage in rats. *J Neurosurg* 1998;89:991-996.
 40. Nakamura T, Keep RF, Hua Y, Schallert T, Hoff JT, Xi G. Deferoxamine-induced attenuation of brain edema and neurological deficits in a rat model of intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg* 2004;100:672-678.
 41. Wu J, Hua Y, Keep RF, Nakamura T, Hoff JT, Xi G. Iron and iron-handling proteins in the brain after intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2003;34:2964-2969.
 42. Xi G, Hua Y, Bhasin RR, Ennis SR, Keep RF, Hoff JT. Mechanisms of edema formation after intracerebral hemorrhage: effects of extravasated red blood cells on blood flow and blood-brain barrier integrity. *Stroke* 2001;32:2932-2938.
 43. Wu J, Hua Y, Keep RF, Schallert T, Hoff JT, Xi G. Oxidative brain injury from extravasated erythrocytes after intracerebral hemorrhage. *Brain Res* 2002;953:45-52.
 44. Hua Y, Keep RF, Hoff JT, Xi G. Thrombin preconditioning attenuates brain edema induced by erythrocytes and iron. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003;23:1448-1454.
 45. Huang FP, Xi G, Keep RF, Hua Y, Nemoianu A, Hoff JT. Brain edema after experimental intracerebral hemorrhage: role of hemoglobin degradation products. *J Neurosurg* 2002;96:287-293.
 46. Koeppen AH, Dickson AC, Smith J. Heme oxygenase in experimental intracerebral hemorrhage: the benefit of tin-mesoporphyrin. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:587-597.
 47. Qureshi AI, Ali Z, Suri MF, Shuaib A, Baker G, Todd K, et al. Extracellular glutamate and other amino acids in experimental intracerebral hemorrhage: an in vivo microdialysis study. *Crit Care Med* 2003;31:1482-1489.
 48. Lee ST, Chu K, Jung KH, Kim J, Kim EH, Kim SJ, et al. Memantine reduces hematoma expansion in experimental intracerebral hemorrhage, resulting in functional improvement. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:536-544.
 49. Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 2002;39:279-291.
 50. Weiss SJ, Peppin GJ. Collagenolytic metalloenzymes of the human neutrophil. Characteristics, regulation and potential function in vivo. *Biochem Pharmacol* 1986;35:3189-3197.
 51. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribo M, et al. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* 2003;107:598-603.
 52. Castillo J, Leira R, Blanco M. Metalloproteinases and neurovascular injury. *Neurología* 2004;19:312-320.
 53. Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke* 1990;21:801-807.
 54. Rosenberg GA, Navratil M. Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology* 1997;48:921-926.
 55. Power C, Henry S, Del Bigio MR, Larsen PH, Corbett D, Imai Y, et al. Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases. *Ann Neurol* 2003;53:731-742.
 56. Wagner KR, Xi G, Hua Y, Kleinholz M, de Courten-Myers GM, Myers RE. Early metabolic alterations in edematous perihematomal brain regions following experimental intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg* 1998;88:1058-1065.

-
57. Zazulia AR, Diringer MN, Videen TO, Adams RE, Yundt K, Aiyagari V, et al. Hypoperfusion without ischemia surrounding acute intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:804-810.
58. Carhuapoma JR, Wang PY, Beauchamp NJ, Key PM, Hanley DF, Barker PB. Diffusion-weighted MRI and proton MR spectroscopic imaging in the study of secondary neuronal injury after intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2000;31:726-732.
59. Kidwell CS, Saver JL, Mattiello J, Warach S, Liebeskind DS, Starkman S, et al. Diffusion-perfusion MR evaluation of perihematomal injury in hyperacute intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2001;57:1611-1617.
60. Qureshi AI, Wilson DA, Hanley DF, Traystman RJ. No evidence for an ischemic penumbra in massive experimental intracerebral hemorrhage. *Neurology* 1999;52:266-272.
61. Schellinger PD, Fiebich JB, Hoffmann K, Becker K, Orakcioglu B, Kollmar R, et al. Stroke MRI in intracerebral hemorrhage: is there a perihemorrhagic penumbra? *Stroke* 2003;34:1674-1679.
62. Mayer SA, Lignelli A, Fink ME, Kessler DB, Thomas CE, Swarup R, et al. Perilesional blood flow and edema formation in acute intracerebral hemorrhage: a SPECT study. *Stroke* 1998;29:1791-1798.
63. Foerch C, Curdt I, Yan B, Dvorak F, Hermans M, Berkefeld J, et al. Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for intracerebral haemorrhage in patients with acute stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;77:181-184.
64. Delgado P, Alvarez Sabin J, Ribo M, Purroy F, Rosell A, Penalba A, et al. Differentiating ischemic and hemorrhagic stroke by means of a panel of plasma biomarkers. *Cerebrovasc Dis* 2005;19:59.
65. Hemphill JC, Bonovich DC, Besmertis L, Manley GT, Johnston SC. The ICH score: a simple, reliable grading scale for intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2001;32:891-897.
66. Zurasky JA, Aiyagari V, Zazulia AR, Shackelford A, Diringer MN. Early mortality following spontaneous intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2005;64:725-727.
67. Fujii Y, Takeuchi S, Harada A, Abe H, Sasaki O, Tanaka R. Hemostatic activation in spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2001;32:883-890.
68. Sanchez CM, Suarez MA, Nebra A, Gutierrez I, Guallart A, Millaste A. Early activation of coagulation and fibrinolysis in traumatic brain injury and spontaneous intracerebral hemorrhage: a comparative study. *Neurología* 2004;19:44-52.
69. Delgado P, Montaner J, Santamarina E, Abilleira S, Purroy F, Ribo M, et al. Relación del D-dímero con la mortalidad y el deterioro neurológico en la hemorragia intracerebral (HIC) espontánea. *Neurología* 2004;19:546.
70. Abilleira S, Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Castillo J, Alvarez-Sabin J. Matrix metalloproteinase-9 concentration after spontaneous intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg* 2003;99:65-70.
71. Alvarez-Sabin J, Delgado P, Abilleira S, Molina CA, Arenillas J, Ribo M, et al. Temporal profile of matrix metalloproteinases and their inhibitors after spontaneous intracerebral hemorrhage: relationship to clinical and radiological outcome. *Stroke* 2004;35:1316-1322.
72. Fogelholm R, Murros K, Rissanen A, Avikainen S. Admission blood glucose and short term survival in primary intracerebral haemorrhage: a population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005;76:349-353.
73. Passero S, Ciacci G, Ulivelli M. The influence of diabetes and hyperglycemia on clinical course after intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2003;61:1351-1356.
74. Song EC, Chu K, Jeong SW, Jung KH, Kim SH, Kim M, et al. Hyperglycemia exacerbates brain edema and perihematomal cell death after intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2003;34:2215-2220.
75. NINDS ICH Workshop Participants. Priorities for clinical research in intracerebral hemorrhage: report from a National Institute of Neurological Disorders and Stroke workshop. *Stroke* 2005;36:e23-41.
76. Delgado-Mederos R, Molina CA, Ribó M, Rubiera M, Montaner J, Arenillas JF, et al. Transcranial Duplex sonography for monitoring hyperacute intracranial hemorrhage. a computed tomography validation study. *Cerebrovasc Dis* 2004;17:67.

5.2. PLASMA D-DIMER PREDICTS POOR OUTCOME AFTER ACUTE ICH. NEUROLOGY 2006; 67:94-98.

Plasma D-dimer predicts poor outcome after acute intracerebral hemorrhage

P. Delgado, MD; J. Álvarez-Sabín, MD, PhD; S. Abilleira, MD, PhD; E. Santamarina, MD; F. Purroy, MD, PhD; J.F. Arenillas, MD, PhD; C.A. Molina, MD, PhD; I. Fernández-Cadenas, MSc; A. Rosell, PhD; and J. Montaner, MD, PhD

Abstract—Objective: To investigate if systemic D-dimer activation occurs after acute intracerebral hemorrhage (ICH) and to study its influence on clinical outcome. **Methods:** The authors determined plasma baseline D-dimer in 98 consecutive acute (<24 hours) ICH patients. Glasgow Coma Scale and NIH Stroke Scale scores were recorded to assess neurologic status on baseline and follow-up visits (24 hours, 48 hours, 7th day, and 3rd month). They also determined the D-dimer temporal profile at follow-up visits in a subgroup of 21 patients. ICH volume was measured on baseline and follow-up CT scans. Early neurologic deterioration (END) and mortality during the 1st week were recorded. **Results:** ICH patients showed higher plasma D-dimer level than reference laboratory values at baseline (1,780 vs 360 ng/mL; $p = 0.013$) and 3 months after ICH onset (1,530 vs 470 ng/mL; $p = 0.013$). The D-dimer level was related to baseline ICH volume ($r = 0.23$, $p = 0.049$) and to the presence of intraventricular (2,370 vs 1,360 ng/mL; $p = 0.019$) or subarachnoid (4,180 vs 1,520 ng/mL; $p = 0.001$) extension. Nearly one-fourth of patients presented END, and 20% died as a result of ICH. As predictors of END, the authors identified D-dimer level >1,900 ng/mL (odds ratio [OR] 4.5, 95% CI 1.03 to 20.26, $p = 0.045$) and systolic blood pressure >182 mm Hg (OR 6.8, 95% CI 1.25 to 36.9, $p = 0.026$). Moreover, ICH volume >30 mL (OR 19.13, 95% CI 2.06 to 177, $p = 0.009$) and D-dimer levels >1,900 ng/mL (OR 8.75, 95% CI 1.41 to 54.16, $p = 0.020$) emerged as independent predictors of mortality. **Conclusion:** Increased plasma D-dimer level following acute intracerebral hemorrhage is associated with early neurologic deterioration and poor outcome.

NEUROLOGY 2006;67:94–98

Spontaneous intracerebral hemorrhage (ICH) accounts for 10 to 15% of all stroke and exposes patients to high rates of mortality and poor functional outcome.¹

Besides ICH volume, early hematoma growth and perihematomal edema (PE) formation are considered determinants of early neurologic worsening and poor outcome.^{2–4} In this context, biologic markers of these processes may add early prognostic information and be suitable targets for therapeutic research.

Coagulation products generated during hematoma formation may play a deleterious role in processes associated with early neurologic worsening in ICH patients. Among them, thrombin may cause local inflammation, induction of metalloproteinases and changes in blood–brain barrier permeability, contributing to local injury.^{5,6} Moreover, D-dimer, a coagulation end product, has been shown to increase in peripheral blood in CNS diseases such as subarachnoid hemorrhage, ischemic stroke, and trauma, reflecting a systemic activation of coagulation. In addition, an increased D-dimer production has been related to poor clinical outcome in these conditions.^{7–11}

Although systemic hemostatic activation has also

been reported in ICH patients,¹² information about its impact on clinical outcome after ICH is scarce.

Therefore, we investigated the relationship between D-dimer levels determined during the acute phase of spontaneous ICH and the clinical outcome of ICH patients to assess the prognostic influence of systemic hemostatic activation in ICH.

Methods. Study population. Our target group consisted of consecutive patients with spontaneous supratentorial ICH evaluated in the emergency room within the first 24 hours of onset. A detailed history of vascular risk factors, drug abuse, alcoholism, and concomitant medication was obtained from each patient. Between March 2001 and March 2004, a total of 130 patients were initially evaluated; those with ICH related to vascular malformation ($n = 1$), impaired coagulation or oral anticoagulant intake ($n = 20$), head trauma ($n = 2$), hemorrhagic infarction ($n = 1$), tumoral bleedings ($n = 1$), and who underwent a surgical procedure ($n = 6$) were not included in this study. Patients with history of deep venous thrombosis (DVT) were also excluded ($n = 1$). Finally, a total of 98 patients were included after informed consent was obtained from them or their relatives.

The ethics committee approved all aspects of the study protocol.

Clinical assessment. Glasgow Coma Scale (GCS) and NIH Stroke Scale (NIHSS) scores were recorded to assess the level of consciousness and neurologic status on admission (<24 hours), and at follow-up visits (24 hours, 48 hours, 7th day, and 3rd month).

From the Neurovascular Research Laboratory and the Stroke Unit, Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

Disclosure: The authors report no conflicts of interest.

Received October 5, 2005. Accepted in final form March 16, 2006.

Address correspondence and reprint requests to Dr. P. Delgado Martínez, Unitat Neurovascular (Servei de Neurologia), 9^a planta, Hospital General Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebrón 119-129, 08035 Barcelona, Spain; e-mail: 35070pdm@comb.es

All patients were daily monitored to exclude any clinical sign suggestive of DVT or PE potentially responsible for the increase in D-dimer levels during follow-up. The prophylactic treatment used to prevent DVT or PE was the administration of enoxaparin 40 mg once daily according to our institutional treatment protocol.

Early neurologic deterioration, defined as an increase in NIHSS score by ≥ 4 points within the first 48 hours,¹³ was recorded. Mortality during the 1st week was used as a poor outcome measure.

Arterial blood pressure and temperature values were obtained immediately prior to CT scan performance and at follow-up visits. Blood samples were drawn at baseline in all patients ($n = 98$) and also at follow-up visits in a consecutive subgroup of them ($n = 21$).

CT scan protocol. Two cranial CT scans were carried out: at the baseline visit (<24 hours) and at the follow-up visit (72 hours). All cranial CT scans were performed according to the Neuroradiology Department protocol, with an image matrix of 340×340 , 2.5-mm wide slices for posterior fosse and 10 mm wide for next slices.

Investigators who read CT scans were blinded to clinical information. ICH volume was measured in baseline and follow-up cranial CTs, according to the formula $A \times B \times C \times 0.5$,^{14,15} where A and B represent the largest perpendicular diameters through the hyperdense area on CT scan, and C represents the thickness of ICH (the number of 10-mm slices containing hemorrhage).

ICH location was categorized as deep when it was limited to the basal ganglia or the thalamus or lobar when it affected predominantly the subcortical white matter of cerebral lobes. A hematoma growing more than 33% of its initial volume was considered hematoma enlargement.¹⁶

Absolute PE volume was measured on baseline and follow-up CT scans by subtracting hyperdense volume (ICH area) from total lesion area, according to the formula mentioned above.

Intraventricular or subarachnoid extensions of hematoma were also recorded at baseline and follow-up CT, though we considered only their presence or absence, not their volume, because of the difficulty in their measurement.

Immunoassay methods. Venous blood samples were drawn from each patient ($n = 98$) at baseline, when the main hemostatic variables (prothrombin time, thromboplastin partial activated time, platelet count), leukocyte count, and fibrinogen and glucose levels were determined. This initial blood sample was drawn prior to baseline CT scan. For D-dimer measurements, citrate tubes were used to collect the blood, and plasma was immediately separated by centrifugation at 3,000 rpm for 15 minutes and stored at -80°C until analysis was done.

The baseline D-dimer determination was done using two commercially available ELISAs according to the manufacturer instructions, that is, AutoDimerTest (AGEN, Brisbane, Australia) for the whole sample and VIDAS D-dimer (Biomerieux, Lyon, France) for a subgroup of 21 patients. Our laboratory reference range for healthy controls (also obtained from frozen samples) were 360 ± 670 ng/mL for AutoDimerTest and 68 to 490 ng/mL for VIDAS D-dimer. Intraclass correlation coefficient between baseline D-dimer assessments using both ELISA methods was 0.823.

VIDAS D-dimer was also used to determine the temporal profile of D-dimer levels at follow-up visits (24 hours, 48 hours, 7th day, and 3rd month) in the subgroup of 21 patients.

Statistical analysis. Statistical analysis was done using the SPSS 12.0 statistical package. Intraclass correlation coefficient was used to measure the level of agreement between both ELISA methods. Significance for intergroup differences was assessed by Fisher exact test for categorical variables and Mann-Whitney U test for continuous variables. To study correlations between continuous variables, Spearman correlation coefficient was used. A repeated measurement test (Wilcoxon) was used to analyze significant increases/decreases in the temporal profile of D-dimer. Receiver operating characteristic (ROC) curves were configured to establish cutoff points of each continuous variable that optimally predicted neurologic deterioration and death, and two logistic regression analyses were performed to determine factors that could be considered as independent predictors of death and neurologic deterioration, using the forward stepwise method by the likelihood ratio test. Variables showing $p < 0.1$ in univariate analysis were included in the multivariate model. A p value of < 0.05 was considered significant. Finally, to study interactions between both pre-

dictors and to determine the presence of an effect modifier, we used the Mantel-Haenszel method, by applying the Breslow-Day test to detect heterogeneity.

Results. Clinical and neuroimaging findings. Demographic data, risk factor profile, clinical variables, and radiologic data from baseline CT scans are provided in the table.

Nearly one-fourth of our patients presented neurologic deterioration within the first 48 hours. END was associated with mortality (68% patients who deteriorated died; $p < 0.001$). Accordingly, the mortality rate in our patients reached 20.4% in the 1st week.

From the total sample, 55 patients had a follow-up CT scan within the 1st week (mean time 3 days), and hematoma enlargement was present in 16 patients (32.7%).

Hematoma enlargement was not recorded in 20 patients who died within the first days and in 23 patients scanned beyond the 1st week.

Laboratory findings and D-dimer temporal profile. The basic coagulation profile (prothrombin time, thromboplastin partial activated time, platelet count) was in agreement with our reference laboratory values (data not shown).

The baseline D-dimer level was not related to any clinical variable on admission, although we found that the baseline D-dimer level was related to other biologic variables such as leukocyte count ($r = 0.22$, $p = 0.05$) and glucose levels ($r = 0.24$, $p = 0.044$).

Baseline D-dimer level was higher than our laboratory reference values for healthy controls (1,780 vs 360 ng/mL; $p = 0.013$).

Regarding the D-dimer temporal profile, an increase in D-dimer levels was observed during the first 7 days (figure). The D-dimer level was higher at baseline than at the 3rd month control (1,530 vs 470 ng/mL; $p = 0.013$).

Radiologic features related to D-dimer levels. Among baseline radiologic features, higher baseline D-dimer level was found among patients with higher ICH volume. D-Dimer was not related to baseline PE. Patients with intraventricular extension ($n = 26$) showed higher D-dimer levels (2,370 vs 1,360 ng/mL; $p = 0.019$) than those without it, and also patients with subarachnoid extension ($n = 6$) had higher D-dimer levels (4,180 vs 1,520 ng/mL; $p = 0.001$). Moreover, patients with only parenchymal ICH component, thus with absence of subarachnoid or intraventricular extension, showed higher D-dimer levels than controls (1,467 vs 360 ng/mL; $p < 0.001$).

The baseline D-dimer level was not associated with the amount of hematoma enlargement during the 1st week in the whole study sample. However, in a post-hoc subgroup analysis of D-dimer and ICH enlargement in the 24 subjects scanned within 3 hours of onset, a correlation emerged between the baseline D-dimer level and the hematoma enlargement volume ($r = 0.74$, $p = 0.02$). In fact, higher baseline D-dimer levels were found in those patients with hematoma enlargement (1,060 [400 to 1,900] ng/mL) than in those without it (400 [250 to 610] ng/mL) ($p = 0.03$).

Relationship between D-dimer and neurologic outcome. Potential predictors of neurologic deterioration and mortality in the univariate analysis are shown in the table. Patients who deteriorated had lower GCS score and higher

Table Baseline characteristics and potential baseline factors associated with presence (yes) or absence (no) of neurologic deterioration and mortality

	All patients	Neurologic deterioration			Mortality		
		Yes, n = 24	No, n = 74	p	Yes, n = 19	No, n = 79	p
Age, y	74.5 (62–80)	69 (61–78)	76 (62–80)	0.84	71 (66–79)	75 (61–80)	0.10
Gender, male	63 (64)	14 (58)	49 (67)	0.29	10 (52)	53 (68)	0.21
Location (lobar)	24 (25)	8 (35)	18 (22)	0.17	7 (39)	17 (22)	0.14
Antiplatelet therapy	26 (27)	2 (13)	18 (27)	0.21	3 (27)	17 (24)	0.83
NIHSS	10.5 (6–16)	11 (6.5–16)	10 (5.5–15)	0.42	13 (8.5–16)	10 (6–15)	0.38
GCS	15 (14–15)	13.3 (12.7–15)	15 (15–15)	0.047*	13 (11.7–15)	15 (15–15)	0.01*
Systolic BP, mm Hg	176 ± 32	196 ± 40	174 ± 29	0.03*	175 ± 30	176 ± 32	0.92
Diastolic BP, mm Hg	96 ± 22	95 ± 27	95 ± 21	0.87	91 ± 12	96 ± 23	0.5
Leukocyte count	9,655 ± 3,211	11,000 ± 3,250	9,398 ± 3,161	0.071*	12,542 ± 3,200	9,349 ± 3,080	0.011*
Fibrinogen, g/L	3.39 ± 0.58	3.5 ± 0.8	3.3 ± 0.5	0.40	3.5 ± 0.88	3.3 ± 0.5	0.7
Prothrombin time, %	90 ± 22.6	102 ± 49	88 ± 14	0.88	81 ± 12	91 ± 23	0.29
TTPa, s	29.1 ± 3.3	28.6 ± 2.3	29.2 ± 3.5	0.81	29.6 ± 1.3	29.0 ± 3.5	0.69
Platelet count	215,802 ± 75,000	215,000 ± 77,000	222,000 ± 58,000	0.67	253,000 ± 54,200	212,000 ± 76,115	0.17
Glucose, mg/dL	121.5 ± 42	136.7 ± 30.1	131.97 ± 44.8	0.35	136 ± 50.4	129.6 ± 41	0.19
d-Dimer, ng/mL	1,780 (354–2,655)	2,900 (1,900–4,700)	800 (300–2,100)	0.011*	1,950 (280–6,000)	820 (340–3,010)	0.072*
ICH volume, mL	17.18 (4–37.5)	37.5 (14–71.5)	10.7 (4–34.6)	0.008*	50.6 (30.1–115.5)	10.7 (3.9–31.8)	0.003*
PE volume, mL	3.9 (0–14.6)	11.7 (0.3–41)	4.3 (0–14.8)	0.64	5.6 (0–25.2)	3.7 (0–14.6)	0.83
Subarachnoid extension	6 (6.12)	1 (16)	4 (67)	0.9	2 (20)	4 (7)	0.2
Intraventricular extension	26 (26.5)	5 (19)	17 (65)	0.12	8 (80)	18 (27)	0.001*

Data are expressed as n (%), medians (interquartile range), and means ± SD as appropriate.

* $p < 0.1$.

NIHSS = NIH Stroke Scale; GCS = Glasgow Coma Scale; BP = blood pressure; TTPa = thromboplastin partial activated time; ICH = intracerebral hemorrhage; PE = perihematomal edema.

systolic blood pressure, leukocyte count, and D-dimer levels as compared with those who did not.

A ROC curve identified a D-dimer cut-off level of 1,900 ng/mL that predicted neurologic worsening with the highest sensitivity (0.6) and specificity (0.75) values.

Among the radiologic features, higher ICH volume was found to be associated with neurologic deterioration with a cut-off volume of 30 mL as the best predictor.

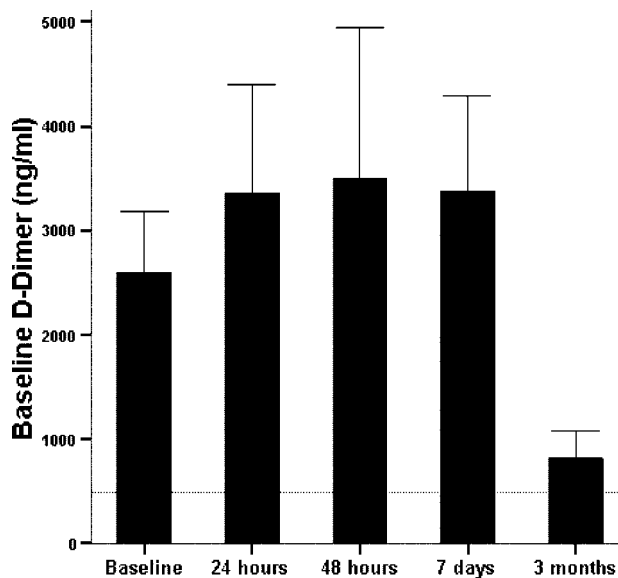


Figure. D-Dimer temporal profile. Dotted line indicates the mean reference laboratory values.

After a logistic regression analysis, both systolic blood pressure >182 mm Hg (odds ratio [OR] 6.82, 95% CI 1.25 to 36.9, $p = 0.026$) and baseline D-dimer level >1,900 ng/mL (OR 4.57, 95% CI 1.03 to 20.26, $p = 0.045$) were independently associated with neurologic deterioration.

Regarding mortality, 20.4% of patients died within the 1st week. Patients who died showed a lower GCS score and higher leukocyte count and D-dimer level at baseline. Finally, intraventricular extension and higher ICH volume were the most common radiologic features among patients who died (table).

From all of these variables, D-dimer level >1,900 ng/mL (OR 8.75, 95% CI 1.41 to 54.16, $p = 0.020$) and ICH volume >30 mL (OR 19.13, 95% CI 2.06 to 177, $p = 0.009$) remained as significant predictors of death during the 1st week in the final logistic regression model, after adjustment by age, gender, and vascular risk factors. D-Dimer level and ICH volume presented an effect-modifying interaction, with D-dimer predictive of mortality for largest ICH. In fact, when only the subgroup of patients with higher ICH volume (>30 mL) was considered, mortality affected 50% of patients with D-dimer >1,900 ng/mL but only 10% of patients with lower D-dimer levels.

Discussion. This study shows an early (<24 hours) D-dimer increase following spontaneous ICH, indicating a systemic activation of the coagulation and fibrinolytic systems that lasts for the 1st week after bleeding. Moreover, a high baseline D-dimer level is associated with poor neurologic outcome and death.

Our observation of a systemic activation of hemostatic systems is in agreement with previous reports.¹² Thrombin–antithrombin complex, plasmin–antiplasmin complex, and D-dimer levels have previously been reported to be higher in ICH patients than in healthy subjects. Increased D-dimer level was found to be related to intraventricular and subarachnoid bleeding.¹² We also identified a link between D-dimer and parenchymal bleeding.

Several hypotheses might explain the activation of hemostatic systems following ICH. The brain contains high concentrations of tissue factor that reaches the systemic circulation following brain injury, triggering the activation of extrinsic coagulation pathway. In addition, several studies in trauma patients have reported D-dimer and other coagulopathy-related serum markers to be indicators of prognosis by reflecting brain injury.¹⁰ Moreover, D-dimer has been also shown to predict poor outcome following ischemic stroke¹¹ or spontaneous subarachnoid hemorrhage (compared with other known prognostic scores such as Hunt–Hess Scale or CT grade).⁸ To our knowledge, we observed for the first time a relationship between D-dimer and CT scan features and outcome in spontaneous ICH.

In our study, a high baseline D-dimer level emerged as a powerful predictor of both early neurologic worsening and mortality. Other known clinical and radiologic features such as ICH volume, GCS, and the presence of intraventricular hemorrhage^{17,18} also predicted mortality in our series. Regarding early neurologic deterioration, we found higher systolic blood pressure and D-dimer to be the main predictors. This finding is in line with previous work.¹⁹

The mechanisms that explain the association of D-dimer with poor outcome are unclear.

We found D-dimer level associated with hematoma growth in patients diagnosed earlier. However, it should be noted that these data were obtained from a subgroup of patients not initially selected for the study, and this fact might have biased the result. Therefore, these data remain to be confirmed in further studies.

D-Dimer, as a marker of fibrin turnover, might reflect an impairment in the coagulation and fibrinolysis pathways. In ICH patients, this abnormal function may lead to greater ICH volume and early hematoma growth, as we observed. However, we may not be able to exclude the possibility of an acute-phase reaction in cases of more severe brain injury and greater ICH.

In addition, when the blood is clotting, thrombin and other intermediate products are generated. Some of these products, and in particular thrombin, can activate the inflammatory cascade.⁶ D-Dimer as an end product of both coagulation and fibrinolysis may trigger some deleterious actions directly. D-Dimer itself may stimulate monocyte synthesis and release of pro-inflammatory cytokines such as interleukin-6,²⁰ which has been related to both development of edema and hematoma enlargement.^{21,22}

Thus, activated inflammation and activated blood coagulation may be related and both contribute to poor outcome in ICH.

Our findings also might have therapeutic implications. Recently, it has been reported that recombinant factor VIIa could be safely administered in hyperacute ICH, limiting the growth of the hematoma, reducing mortality, and improving functional outcome.²³ We suggest that D-dimer or other related biomarkers might help us to monitor this treatment.

Several limitations of this study should be noted. First, the current study involves retrospective analysis of prospectively collected data, so missing data in a number of patients may be a weakness of our study. Second, there is great variability among different D-dimer assays due to the heterogeneity of fibrin degradation products in patient samples, reactivity of antibodies, different calibrators, and different assay formats.²⁴ Thus, data obtained by use of one assay should not be extrapolated to any other method, although the intraclass correlation coefficient between both methods was accurate in our study.

References

1. Qureshi A, Tuhim S, Broderick JP, Hunt H, Hondo-Hanley HD. Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med* 2001;344:1450–1460.
2. Mayer SA, Sacco RL, Shi T, Mohr JP. Neurologic deterioration in non-comatose patients with supratentorial intracerebral hemorrhage. *Neurology* 1994;44:1379–1384.
3. Zazulia AR, Diringer MN, Derdeyn CP, Powers WJ. Progression of mass effect after intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1999;30:1167–1173.
4. Leira R, Davalos A, Silva Y, et al. Early neurologic deterioration in intracerebral hemorrhage. Predictors and associated factors. *Neurology* 2004;63:461–467.
5. Wagner KR, Xi G, Hua Y, et al. Lobar intracerebral hemorrhage model in pigs: rapid edema development in perihematomal white matter. *Stroke* 1996;27:490–497.
6. Lee K, Kawai N, Kim S, Sagher O, Hoff JT. Mechanisms of edema formation after intracerebral hemorrhage: effects on cerebral blood flow, blood-brain barrier permeability, and cell survival in a rat model. *J Neurosurg* 1997;86:272–278.
7. Yukihiko F, Shigekazu T, Osamu S, Takashi M, Tetsuo K, Ryuichi T. Hemostasis in spontaneous subarachnoid hemorrhage. Clinical study. *Neurosurgery* 1995;37:226–234.
8. Nina P, Schisano G, Chiappetta F, et al. A study of blood coagulation and fibrinolytic system in spontaneous subarachnoid hemorrhage. Correlation with Hunt–Hess grade and outcome. *Surg Neurol* 2001;55:197–203.
9. Sanchez CM, Suarez MA, Nebra A, Gutierrez I, Guallart A, Millaste A. Early activation of coagulation and fibrinolysis in traumatic brain injury and spontaneous intracerebral hemorrhage: a comparative study. *Neurologia* 2004;19:44–52.
10. Hoffmann M, Ma OJ, Gaddis G. Utility of an initial D-dimer assay in screening for traumatic or spontaneous intracranial hemorrhage. *Acad Emerg Med* 2001;8:859–865.
11. Barber M, Langhorne P, Rumley A, Lowe G, Stott D. Hemostatic function and progressing ischemic stroke: D-dimer predicts early clinical progression. *Stroke* 2004;35:1421–1425.
12. Fujii Y, Takeuchi S, Harada A, Abe H, Sasaki O, Tanaka R. Hemostatic activation in spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2001;32:883–890.
13. 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.
14. Khotari RU, Brott T, Broderick JP, et al. The ABCs of measuring intracerebral hemorrhage volume. *Stroke* 1996;27:1304–1305.
15. Gebel JM, Sila CA, Sloan MA, et al. Comparison of the ABC/2 estimation technique to computer-assisted volumetric analysis of intraparenchymal and subdural hematomas complicating the GUSTO-1 trial. *Stroke* 1998;29:1799–1801.
16. Brott T, Broderick J, Kothari R, et al. Early hemorrhage growth in patients with intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1997;28:1–5.

17. Hemphill JC, Bonovich DC, Besmertis L, Manley GT, Johnston SC. The ICH score. A simple, reliable grading scale for intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2001;32:891–897.
18. Cheung R, Zou L. Use of the original, modified or new intracerebral hemorrhage score to predict mortality and morbidity after intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2003;34:1717–1722.
19. Ohwaki K, Yano E, Nagashima H, Hirata M, Nakagomi T, Tamura A. Blood pressure management in acute intracerebral hemorrhage. Relationship between elevated blood pressure and hematoma enlargement. *Stroke* 2004;35:1364–1367.
20. Robson SC, Shepard EG, Kirsch RE. Fibrin degradation products D-dimer induces the synthesis and release of biologically active IL-1B, IL-6 and plasminogen activator inhibitors from monocytes in vitro. *Br J Haematol* 1994;86:322–326.
21. Castillo J, Dávalos A, Silva Y, et al. Molecular signatures of brain injury alter intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2002;58:624–629.
22. Silva Y, Leira R, Tejada J, Lainez JM, Castillo J, Dávalos A. Molecular signatures of vascular injury are associated with early growth of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2005;36:86–91.
23. Mayer SA, Brun NC, Begtrup K, et al. Recombinant activated factor VII for acute intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med* 2005;352:777–785.
24. Reber G, de Moorlose P. D-dimer assay for the exclusion of venous thromboembolism. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:619–624.

**5.3. PLASMA S100B LEVEL AFTER ACUTE SPONTANEOUS
ICH. STROKE 2006; EN PRENSA.**

Short Communication

Plasma S100B Level After Acute Spontaneous Intracerebral Hemorrhage

Pilar Delgado, MD; Jose Alvarez Sabin, MD, PhD; Esteban Santamarina, MD; Carlos A Molina, MD, PhD, Manuel Quintana, Anna Rosell, PhD, Joan Montaner, MD, PhD.

Background and purpose---To determine plasma S100B level after acute (<24 hours) spontaneous intracerebral hemorrhage (ICH) and to study its relation with neurological outcome.

Methods---We determined S100B concentration on plasma samples from 78 ICH patients on admission. Clinical (Glasgow Coma Scale (GCS) and NIH Stroke Scale (NIHSS) scores) and radiological information (ICH and perihematomal edema (PE) volumes) were collected at baseline and follow-up visits. Early neurological deterioration (END), defined as the increase of ≥ 4 points in the NIHSS score at 48 hours, and unfavorable outcome at 3 months were also recorded.

Results---The median S100B level was higher than our laboratory reference values for healthy controls (103.63 vs 48.51 pg/mL, $p < 0.001$) and a positive correlation was observed between S100B level and baseline ICH volume ($r = 0.45$, $p < 0.0001$). The median S100B level was higher in patients who deteriorated early (256.8 vs 89.7 pg/mL, $p = 0.001$) and also in patients with unfavorable outcome (136 vs 75.91 pg/mL, $p = 0.003$). Multivariate analysis showed baseline ICH volume as the best predictor for both END (OR 15, 95% CI 2.9 to 76.3) and unfavorable outcome at 3 months (OR 17, 95% CI 2.03 to 142).

Conclusion--- Increased S100B level is found after acute spontaneous ICH, in association with a worse early and late evolution, and closely related to initial hematoma volume. (*Stroke* 2006; in press).

Key Words: Intracerebral Hemorrhages ■ S100B ■ stroke ■ biomarkers ■

S100B is a Ca^{2+} -binding protein found in the CNS, mainly in glial cells. This protein increases in biological fluids of patients with brain injury of different causes, being a consolidated marker of brain damage^{1,2}. In ischemic stroke, high S100B level has been associated with infarct size, with outcome and with the neurovascular status on admission^{3,4}. Moreover, it could be a surrogate marker of successful thrombolysis in t-PA treated patients⁵.

Although the use of brain specific proteins for monitoring cellular reaction during brain pathology is winning an ever increasing importance, information about the role of proteins indicating destruction of glial tissue, as S100B, in spontaneous ICH is lacking. Therefore, we aimed to investigate plasma level of S100B in a group of patients with ICH and its relation to neurological outcome.

From the Neurovascular Research Laboratory and the Stroke Unit. Departament de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona. Hospital General Vall d'Hebron. Barcelona, Spain.

Correspondence to Dr. Pilar Delgado, MD, Neurovascular Research Laboratory, Institut de Recerca, Hospital General Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebrón 119-129, 08035 Barcelona, Spain. E-mail: 35070pdm@comb.es

Patients and Methods

Study population

Our target group consisted of consecutive patients with spontaneous supratentorial ICH evaluated in the emergency room within the first 24 hours from stroke onset. Between January 2003 and March 2004, a total of 100 ICH patients were initially evaluated. Exclusion criteria were the presence of a vascular malformation, impaired coagulation, anticoagulant therapy, head trauma, hemorrhagic infarction or tumoral bleedings. The patients who underwent a surgical procedure were also excluded. Finally, 78 patients were included after informed consent was obtained from them or their relatives. The Ethics Committee approved all aspects of the study protocol.

Clinical and radiological assessment

The median time from symptom onset to hospital admission was 5.7 (2.4-8.8) hours. On arrival to the emergency department, a detailed history of vascular risk factors, concomitant medication, blood pressure, body temperature and blood samples were taken, prior to the baseline CT scan was performed. GCS and NIHSS scores were recorded to assess the level of consciousness and neurological status on admission and at follow-up visits (24 hours, 48 hours, seventh day and third month). Early neurological deterioration (END) was defined as the increase of ≥ 4 points in the NIHSS score at 48 hours and modified Rankin scale at 3 months were used to evaluate functional outcome. Patients that scored >2 on the mRS were considered as having an unfavorable outcome.

A second CT scan was repeated at third day. All CT scans were performed according to the Neuroradiology department protocol. Investigators who read them were blinded to clinical information. ICH volume was measured according to the previously reported formula $A \times B \times C \times 0.5$ ⁶ and perihematomal edema (PE) volume was also measured by subtracting hyperdense volume from the total lesion area. The presence of hematoma or PE enlargement between baseline and follow-up CT scan was also recorded. ICH location was categorized as deep or lobar and the presence of intraventricular (IVE) or subarachnoidal extension (SAE) of hematoma was also assessed at baseline and follow-up CT scans.

Table 1. Factors associated to poor outcome and baseline clinical, laboratory and radiological data.

	All patients (n= 78)	Poor Outcome (mRS>2)		p
		Yes (n=48)	No (n=30)	
Age, years	75 (63-80)	75 (62- 80)	74 (63- 80)	0.76
Gender, male	53 (68%)	33 (68%)	20 (67%)	0.81
Location, lobar	20 (26%)	15 (31%)	5 (17%)	0.12
NIHSS score	11 (6-16)	14 (7-17)	7 (4-9.5)	0.001
GCS	15 (14-15)	15 (14-15)	15 (14-15)	0.19
Systolic BP, mmHg	176+/-29	178 +/- 27	175 +/- 32	0.67
Diastolic BP, mm Hg	95 +/-21	94 +/- 24	97 +/- 19	0.62
Leukocyte count	9.8+/-3.3	10.4 +/- 3.5	8.5 +/-3.0	0.035
Glucose, mmol/L	7.2+/-2.2	7.7 +/- 2.3	6.6+/- 2.2	0.039
S100B, pg/mL	103 (54-194)	136 (88- 297)	75 (0- 138)	0.003
ICH volume, cc	17 (4-38)	29 (9- 46)	4 (1-10)	0.001
PE volume, cc	4 (0.9-15)	10 (1-25)	0.94 (0-5)	0.004
SAE	5 (6%)	4 (8.3%)	1 (3.3%)	0.11
IVE	20 (25%)	17 (35%)	3 (10%)	0.024

Data are expressed as n (%), medians (interquartile range) and means +/- SD as appropriate. SAE: subarachnoidal extension; IVE: intraventricular extension; PE: perihematomal edema; ICH: Intracerebral hemorrhage; BP: Blood Pressure; GCS: Glasgow Coma Scale; NIHSS: National Institutes of Health Stroke Scale.

Inmunoassay methods

For S100B measurements, citrate tubes were used to collect peripheral blood and plasma was immediately obtained by centrifugation and stored at -80°C until analysis was done. S100B determination was done using an enzyme-linked immunosorbent assay- ELISA- according to the manufacturer's instructions (Biosite Inc, San Diego). Blood samples were always drawn prior to baseline CT scan.

Statistical Analysis

Statistical analysis was done using the SPSS 12.0 statistical package. Significance for intergroup differences was assessed by Fisher's exact test for categorical variables and Mann-Whitney U test for continuous variables. To study correlations between continuous variables, Spearman correlation coefficients were used. Receiver operating characteristics (ROC) curves were configured to establish the cut-off points of S100B with the optimal sensitivity and specificity predicting END and unfavorable outcome. Finally, two logistic regression analyses were performed to determine the factors that could be considered as independent predictors of neurological deterioration and unfavorable outcome, using the forward stepwise method by the likelihood ratio test. Variables showing a $p < 0.1$ in univariate analysis were included in the multivariate model. A p -value < 0.05 was considered significant.

Results

Clinical and laboratory findings:

Demographic, clinical and radiological data from baseline CT scans are provided in Table 1. END occurred in 12 patients and 61 % had an unfavorable outcome at 3 months. Mortality affected to 16 patients (20.5%) from all sample. The median S100B level was higher than our laboratory reference value for healthy controls (103.63 (54.6-194.9) vs 48.51 (22.7-76.7) pg/mL, $p < 0.001$) and a significant correlation emerged between S100B level and leukocyte count ($r = 0.3$, $p = 0.015$) and between S100B and glucose level ($r = 0.28$, $p = 0.026$).

Radiological features related to S100B level:

There was a positive correlation between baseline ICH volume and the S100B level ($r = 0.45$, $p < 0.0001$) and also between PE volumes and the S100B levels ($r = 0.27$, $p = 0.033$). Those patients who presented IVE and SAE had higher S100B level than those who did not (186.92 (87.5-457.4) vs. 91.8 (37.3-135.9) pg/mL, $p = 0.002$ and 1203 (316-1602) vs. 96.84 (38.1-155.7) pg/mL, $p < 0.001$, respectively). The patients who presented IVE had larger hematomas than those who did not (43.7 (23-63) cc vs 8.9 (3.7-23.5), $p < 0.001$). Finally, the median S100B level was higher in lobar as compared to deeply located ICH (225 (90.9-423.9) vs 97.5 (43.3-138.7), $p = 0.001$). The median S100B level at baseline was not related to further ICH or PE enlargement.

Neurological outcome and S100B level:

Patients with higher S100B level presented more often with END, which was also associated with lobar location and higher baseline ICH volume. A baseline S100B level > 118 pg/mL predicted END with 0.92 sensitivity and 0.70 specificity.

Moreover, higher S100B level was also associated with unfavorable outcome at 3 months, as well as other variables showed in Table 1. A baseline S100B level > 97 pg/mL predicted unfavorable outcome with 0.74 sensitivity and 0.70 specificity. However, the multivariate analyses selected ICH volume as the only independent predictor for both END (OR 15, 95% CI 2.9 to 76.3) and unfavorable outcome (OR 17, 95% CI 2.03 to 142) in our sample.

DISCUSSION:

This study found increased S100B plasma level after acute (< 24 hours) spontaneous ICH in

association with worse early and late clinical evolution. It is well known that S100B is increased in other CNS diseases such ischemic stroke, anoxic encephalopathy or trauma patients ^{2,4}. S100B is considered a relevant diagnostic tool in perinatal context, particularly by its ability to predict intraventricular hemorrhage in pre-term and asphyxiated full-term infants, when other clinical or radiological assessments are still silent ¹. Moreover, S100B level has been reported to increase over time after MCA ischemic infarction ⁴. In this context, early increases can predict a malignant course of infarction in proximal MCA occlusion ⁷, and late increases (48 to 72 hours after stroke onset) provide the best prediction for unfavorable long-term outcome ³. To our knowledge, this is the first time that S100B blood level has been investigated soon after spontaneous ICH in adults. In our study, the extent of hematoma strongly correlated with S100B level and, although both ICH volume and S100B were associated to early and late clinical evolution, ICH volume was the strongest predictor of outcome in our population. It remains to be investigated whether S100B alone might add some information in small to medium hematomas. We found S100B level related to other biological markers of stress reaction and to other radiological features associated with larger hematomas.

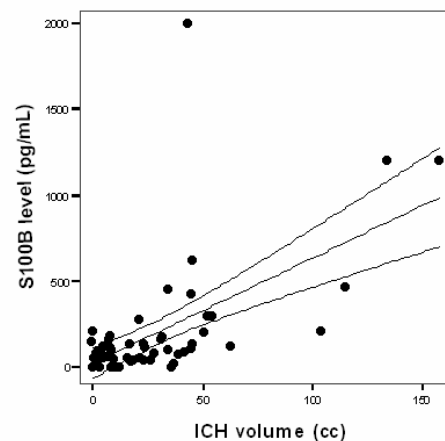


Figure 1. Relationship between ICH volume and S100B level.

Overall, our data suggest that S100B level in this early period might reflect the initial hemorrhagic insult (as demonstrated by the close relation between S100B and ICH volume). Our findings might have some potential clinical applications, such as the use of S100B level as a surrogate marker in future trials testing hemostatic agents or neuroprotective drugs.

Whether serial S100B measurements may add more accurate prognostic information in patients with ICH and the optimal time points for such measurements needs to be further investigated.

REFERENCES

1. Michetti F, Gazzolo D. S100B protein in biological fluids: a tool for perinatal medicine. *Clin Chem* 2002;48:2097-2104.
2. Vos PE, Lamers KJ, Hendriks JC, van Haaren M, Beems T, Zimmerman C, van Geel W, de Reus H, Biert J, Verbeek MM. Glial and neuronal proteins in serum predict outcome after severe traumatic brain injury. *Neurology* 2004;62:1303-1310.
3. Foerch C, Singer OC, Neumann-Haefelin T, du Mesnil dR, Steinmetz H, Sitzer M. Evaluation of serum S100B as a surrogate marker for long-term outcome and infarct volume in acute middle cerebral artery infarction. *Arch Neurol* 2005;62:1130-1134.
4. Wunderlich MT, Wallesch CW, Goertler M. Release of neurobiochemical markers of brain damage is related to the neurovascular status on admission and the site of arterial occlusion in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci* 2004;227:49-53.
5. Foerch C, du Mesnil dR, Singer O, Neumann-Haefelin T, Buchkremer M, Zanella FE, Steinmetz H, Sitzer M. S100B as a surrogate marker for successful clot lysis in hyperacute middle cerebral artery occlusion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003;74:322-325.
6. Gebel JM, Sila CA, Sloan MA, Granger CB, Weisenberger JP, Green CL, Topol EJ, Mahaffey KW. Comparison of the ABC/2 estimation technique to computer-assisted volumetric analysis of intraparenchymal and subdural hematomas complicating the GUSTO-1 trial. *Stroke* 1998;29:1799-1801.
7. Foerch C, Otto B, Singer OC, Neumann-Haefelin T, Yan B, Berkefeld J, Steinmetz H, Sitzer M. Serum S100B predicts a malignant course of infarction in patients with acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 2004;35:2160-2164.

5.4. TEMPORAL PROFILE OF MATRIX METALLOPROTEINASES AND THEIR INHIBITORS AFTER SPONTANEOUS ICH. STROKE 2004; 35:1316-1322.

Temporal Profile of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors After Spontaneous Intracerebral Hemorrhage

Relationship to Clinical and Radiological Outcome

José Alvarez-Sabín, MD, PhD; Pilar Delgado, MD; Sònia Abilleira, MD, PhD;
Carlos A. Molina, MD, PhD; Juan Arenillas, MD; Marc Ribó, MD; Esteban Santamarina, MD;
Manolo Quintana; Jasone Monasterio, MD, PhD; Joan Montaner, MD, PhD

Background and Purpose—Matrix metalloproteinases (MMPs) are related to blood–brain barrier disruption, and some members of this family have been recently involved in brain bleedings. We aimed to investigate the temporal profile of MMPs and their natural inhibitors (TIMPs) after acute intracerebral hemorrhage (ICH) and to study its influence on neuroimaging and clinical outcome.

Methods—MMP-2, MMP-9, and MMP-3, as well as TIMP-1 and TIMP-2, were serially determined by enzyme-linked immunosorbent assay on admission (<12 hours), and at 24 hours, 48 hours, 7 days, and 3 months in 21 ICH patients. ICH and perihematomal edema (PE) volumes were serially measured on baseline and follow-up computed tomography (48 hours, 7 days, and 3 months), just at the time of neurological assessment.

Results—Deep ICH was found in 62% patients. Baseline ICH volume did not influence MMP-TIMP level. Highest levels of MMP-2 and TIMP-2 were found at baseline, for MMP-9 and TIMP-1 at 24 hours, and for MMP-3 at 24 to 48 hours. Baseline MMP-9 was positively correlated to PE volume ($r=0.67$, $P=0.004$) and, conversely, its inhibitor TIMP-1 was negatively correlated to PE ($r=-0.51$, $P=0.04$). Mortality reached 35% and MMP-3 was the only MMP/TIMP related to mortality (7.5 versus 2.4 ng/mL; $P=0.035$) and its most powerful baseline predictor (odds ratio = 22, confidence interval: 1.5 to 314.2). Both MMP-9 and MMP-3 correlated to the residual scar volume at 3 months ($r=0.68$, $P=0.01$ for baseline MMP-9, and $r=0.86$, $P<0.001$ for 24-hour MMP-3).

Conclusions—A characteristic temporal profile of MMP/TIMP release exists in ICH. Increased MMP-9 is associated with PE, and increased MMP-3 is associated with mortality. Both molecules are related to residual cavity volume. (*Stroke*. 2004;35:1316-1322.)

Key Words: brain edema ■ intracerebral hemorrhage ■ metalloproteinases ■ stroke

Intracerebral hemorrhage (ICH) accounts for 10% to 15% of cerebrovascular diseases. Even though it is associated with higher morbidity and mortality than other stroke subtypes, no effective treatment has been developed.¹ Perihematomal edema (PE), together with ICH enlargement, has been shown to be responsible for poor outcome in some patients who survived to early mass effect.^{2,3} Therefore, a better understanding of molecular changes underlying these complications is required.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are involved in extracellular matrix remodeling under normal conditions, although they have also been reported in a wide range of pathological processes. In particular, their ability to disrupt the blood–brain barrier allowing water and some deleterious molecules to get into the cerebral parenchyma is of interest.^{4–5} Despite a growing body of evidence on detrimental effects of the MMP families in ischemic stroke,^{6–7} data on their role in human ICH are still scarce.

Infusion of a bacterial collagenase into the caudate nucleus is a reproducible animal model for intracerebral hemorrhage and brain edema in rats.⁸ In this collagenase-induced ICH model, endogenous MMP-9 is increased when brain edema is maximal.^{9,10} In humans, an increased expression of MMP-9 within the first 24 hours of ICH has been reported,¹¹ and, recently, in a mouse ICH model, the MMP expression profile has been described.¹²

In this study, we sought to investigate the temporal profile of several MMPs and their natural inhibitors (TIMPs) after ICH, together with the influence of these molecules on neuroimaging parameters (PE and residual scar volume) and neurological outcome over the time.

Subjects and Methods

Study Population

Our target population was any patient with confirmed supratentorial spontaneous ICH attended to in the emergency department within the

Received September 3, 2003; final revision received January 14, 2004; accepted February 17, 2004.

From Neurovascular Research Laboratory and the Stroke Unit (J.A.-S., P.D., S.A., C.A.M., J.A., M.R., E.S., M.Q., J. Montaner) and Vascular Biology and Hemostasis Laboratory (J. Monasterio), Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

Correspondence to Dr José Álvarez-Sabín, Unitat Neurovascular (Servei de Neurologia) 9 Planta, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebrón 119-129, 08035 Barcelona, Spain. E-mail josalvar@vhebron.net

© 2004 American Heart Association, Inc.

first 12 hours after onset. A detailed history of vascular risk factors, drug abuse, alcoholism, and concomitant medication was obtained from each patient. Patients were excluded from this study if the hemorrhage was secondary to vascular malformation, impaired coagulation, head trauma, hemorrhagic infarction, or those with ICH caused by bleeding into a tumoral lesion. Thus, a total of 21 patients were included after informed consent was obtained from all patients or relatives. None of these patients underwent a surgical procedure.

Glasgow Coma Scale (GCS) and National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) were recorded to assess level of consciousness and neurological status on admission (<12 hours), and on follow-up visits (24 hours, 48 hours, 7 days, and 3 months). At 3 months, Barthel index and modified Rankin scale (mRS) were obtained. Death and neurological worsening (an increase in NIHSS score by ≥4 points) were also used as poor outcome parameters. Blood samples, arterial blood pressure, and temperature values were obtained on admission and at follow-up visits.

Computed Tomography Scan Protocol

Four cranial computed tomography (CT) scans were performed: at baseline visit (<12 hours) and at follow-up visits (48 hours, 7 days, and 3 months) in those patients who survived. All cranial CT scans were performed according to the protocol of the neuroradiology department, with an image matrix of 340×340, 2.5-mm-wide slices for posterior fosse and 10-mm-wide slices for next slices. Investigators who read CT scans were blinded to biomarker information. ICH volume was measured on baseline and follow-up CTs, according to the formula $A \times B \times C \times 0.5$,^{13,14} where A and B represent the largest perpendicular diameters through the hyperdense area on CT scan, and C represents the thickness of ICH (the number of 10-mm slices containing hemorrhage). PE volume was measured by subtracting hyperdense volume (ICH area) from total lesion area, according to the formula mentioned. This formula was also used to measure the residual cavity volume on CT scans performed at 3 months. PE enlargement at each follow-up CT scan was measured as described for PE, but the clot retraction volume, if any, was subtracted. ICH enlargement was considered whenever initial ICH volume grew beyond 30%. ICH location was categorized as deep when it was limited to the basal ganglia and/or the thalamus or lobar and when it affected predominantly the subcortical white matter of cerebral lobes.

Immunoassay Methods

Venous blood samples were drawn from each patient on admission and follow-up visits. EDTA and citrate 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 was finished. The levels of MMP-9, MMP-3, and MMP-2 and their natural inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) were determined by means of commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to manufacturer’s instructions (Biotrack; Amersham Pharmacia).

Our laboratory reference ranges for healthy controls (mean±2SD) were: 41±55.7 ng/mL for MMP-9 (n=62), 630.8±101.8 ng/mL for MMP-2 (n=40), 2.46±1.34 ng/mL for MMP-3 (n=38), 625.4±152.1 ng/mL for TIMP-1 (n=40), and 37.91±10.074 ng/mL for TIMP-2 (n=40).

Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted using the SPSS 9.0 statistical package. Statistical significance for intergroup differences was assessed by Fisher exact test for categorical variables and Mann-Whitney U test for continuous variables. To study correlations between continuous variables, Spearman coefficients were used. A repeated measurement test (Wilcoxon) was used to analyze significant increases/decreases on the temporal profile of the studied molecules. A logistic regression analysis was performed to determine factors that could be considered as independent predictors of death, using the forward step-wise method by the likelihood ratio test. *P*<0.05 was considered statistically significant.

TABLE 1. Demographic Data, Risk Factor Profile, and Clinical Variables Among the Studied Patients

	ICH (n=21)
Gender, male	14 (66%)
Age, y	69.0±12.92
Previous high blood pressure	11 (53%)
Smokers	1 (5%)
Alcoholism	0 (0%)
Previous stroke	
Ischemic	2 (9.5%)
Hemorrhagic	2 (9.5%)
Diabetes	4 (19%)
Liver disease	2 (10%)
Undergoing antiplatelet therapy	7 (30%)
Baseline GCS	15 (14–15)
Baseline NIHSS	14 (6.5–16.5)
Systolic blood pressure	185±36
Diastolic blood pressure	98±15
Temperature	36.4±0.4

Baseline blood pressure (BP) is expressed as systolic BP/diastolic BP (mm Hg); baseline temperature is given in °C. Data are expressed in n (%), median (interquartile range), and mean±SD.

Results

Clinical and Neuroimaging Findings

Demographic data, risk factor profile, and clinical variables are shown in Table 1, and radiological data from baseline and follow-up CT scans are provided in Table 2.

ICH enlargement was found in 35% of patients within the first 48 hours. PE showed a significant increase (*P*=0.0004) during the first 48 hours and then remained stable during the first week. Neurological worsening appeared in 10 (48%) patients within the first 48 hours, and the mortality rate among our patients reached 9.5% at that time point, 23% during the first week, and 35% of the sample at 3 months. Patients who survived (n=14) were severely disabled at 3 months (median mRS=3).

MMPs and TIMPs Temporal Profile

Mean and median values of MMPs and their natural inhibitors (MMP-2, MMP-3, MMP-9, TIMP-1, and TIMP-2) at each time point are shown in Figure 1. Highest levels for MMP-2 and TIMP-2 were found at baseline, whereas for MMP-9 and TIMP-1 they were higher at 24 hours, and for MMP-3 they were higher at 24 to 48 hours. According to the reference values of our laboratory, all these molecules tended to be overexpressed during the acute phase of ICH (*P*<0.05 for all time points, except for baseline and 3 months for MMP-9 and except for 7 days and 3 months for MMP-3), with the exception of TIMP-2 concentration, which showed very low levels compared with those obtained from healthy controls (*P*<0.05). Regarding the temporal profile of each molecule, MMP-2 was found significantly decreased during the first 24 hours with respect to baseline concentration (901.4 versus 740.1 ng/mL; *P*=0.002). Conversely, TIMP-1 concentration increased during the first 24 hours (1024.4

TABLE 2. Data From Baseline and Follow-up CT Scans

CT Data	All Included Patients (n=21)	Patients Alive at 48 h (n=19)	Patients Alive at Day 7 (n=16)	Patients Alive at 3 mo (n=14)
Time to baseline CT	4.7 (1.8–8.0)	5.1 (2.1–8.2)	5.7 (3.2–8.5)	5.2 (2.7–8.5)
Lobar location (%)	8 (38)	7 (36.8)	4 (25)	4 (28.6)
Presence of early PE (%)	17 (81)	17 (89.5)	14 (87.5)	12 (85.7)
Baseline IV/SA blood (%)	10 (47.6)	8 (42.1)	7 (43.8)	6 (42.9)
Baseline ICH volume	18 (6.3–75.0)	11.2 (5.5–65.7)	10.8 (5.3–40)	10.8 (4.5–29.3)
ICH volume at 48 h	—	12.6 (8.7–62.6)	10.7 (8.1–34.9)	12.1 (7.4–41.6)
ICH volume at day 7	—	—	6.2 (4–48.6)	6.2 (3.9–39.3)
Baseline PE volume	6 (0.4–17.9)	7.5 (0.8–19.5)	6.8 (0.8–18.7)	6.8 (0.7–17.2)
PE volume at 48 h	—	18.6 (5.8–58.8)	15.1 (4.3–44.8)	18.5 (5.2–48.4)
PE volume at day 7	—	—	18.8 (3.8–39.5)	18.8 (8.1–36.5)

Time to baseline CT is the time from stroke onset to baseline CT scan given in hours. Presence of early PE refers to the presence of edema around ICH in the baseline CT scan. All volumes are expressed as mL. Data are percentages or medians (interquartile range) as appropriate.

versus 1189.3 ng/mL; $P=0.036$). Other significant variations are also shown in Figure 1.

We found several links among the studied molecules. MMP-2 was found to be correlated with TIMP-2 at different time points such as baseline ($r=0.516$, $P=0.029$). Furthermore, baseline MMP-9 was related to MMP-3 at 24 hours ($r=0.529$, $P=0.020$). In fact, MMP-2 and TIMP-2 showed a very similar pattern of temporal expression, as well as those observed for MMP-9, MMP-3, and TIMP-1 (Figure 1).

Relationship Between MMPs and TIMPs With Radiological Features

MMP and TIMP release was independent of ICH volume, because we found no correlation between ICH volume and any of the measured molecules. These MMPs were not related to ICH volume increase. Baseline PE volume was positively correlated with baseline MMP-9 ($r=0.673$, $P<0.01$) and inversely correlated with baseline TIMP-1 ($r=-0.518$, $P=0.04$). Because of a possible shift toward proteolysis determined by MMP-9 and TIMP-1 interplay, and because the MMP assay measures MMP-TIMP complex, we analyzed MMP-9/TIMP-1 ratio with respect to PE (Figure 2). We came across an even more significant association between MMP-9/TIMP-1 ratio and PE than the relation found when MMP-9 and TIMP-1 were considered individually ($r=0.73$, $P<0.01$).

Moreover, among baseline concentration of the studied molecules, the only biomarker related to PE enlargement within the first 48 hours was baseline MMP-9 ($r=0.59$, $P=0.015$), and the only one related to day 7 PE enlargement was baseline TIMP-1 ($r=-0.54$, $P=0.045$).

Residual scar volume was related to all previous ICH and PE volumes, with the strongest association for ICH and PE volumes at 48 hours ($r=0.825$, $P=0.002$ and $r=0.973$, $P<0.001$ respectively). Among studied molecules, only baseline MMP-9 ($r=0.688$, $P=0.019$) and MMP-3 ($r=0.864$, $P<0.01$) at 24 hours were associated with residual scar volume.

Relationship Between MMPs and TIMPs With Neurological Outcome

Among baseline factors, only age, ICH volume, and MMP-3 concentration were related to death (Table 3). After a logistic regression analysis, only baseline MMP-3 level remained as an independent predictor of death (OR=22; 95% CI: 1.54 to 314.29, $P=0.023$) using a cutoff of >6 ng/mL for MMP-3 (Figure 3).

However, no data among clinical, laboratory, or radiological findings obtained at patients' arrival could predict neurological worsening in the next days (data not shown).

Discussion

This study shows dynamic changes in blood concentration of some MMPs (MMP-9, MMP-3, and MMP-2) and their natural inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) after a spontaneous supratentorial ICH. At different time points, overexpression of these molecules was found to be related to relevant neuroimaging and clinical endpoints in the setting of ICH. In relation to radiological features, baseline MMP-9 and TIMP-1 were related to PE volume, whereas residual scar volume was related to baseline MMP-9 and 24-hour MMP-3. Interestingly, clinical outcome was influenced by baseline MMP-3, which was a powerful predictor of death.

The temporal profile of some MMPs has been studied in other diseases such as myocardial infarction.¹⁵ Increased MMP-9, MMP-3, and MMP-2 expression was found within the first 24 to 48 hours in ischemic heart regions of a rabbit model of myocardial infarction, contributing to rapid injury and late ventricular dysfunction. In a recent report from Power et al,¹² raised MMP-2, MMP-3, MMP-7, and MMP-9 mRNA levels were found in the periclot area of a rat model of ICH at similar time points as those described in our patients. They found MMP-12, a molecule we did not test, to be the most highly induced MMP in this ICH model. It was expressed in activated monocytoïd cells surrounding the hematoma. In that study, MMP expression suffered a biphasic increase: MMP-3, -7, and -9 increased immediately after

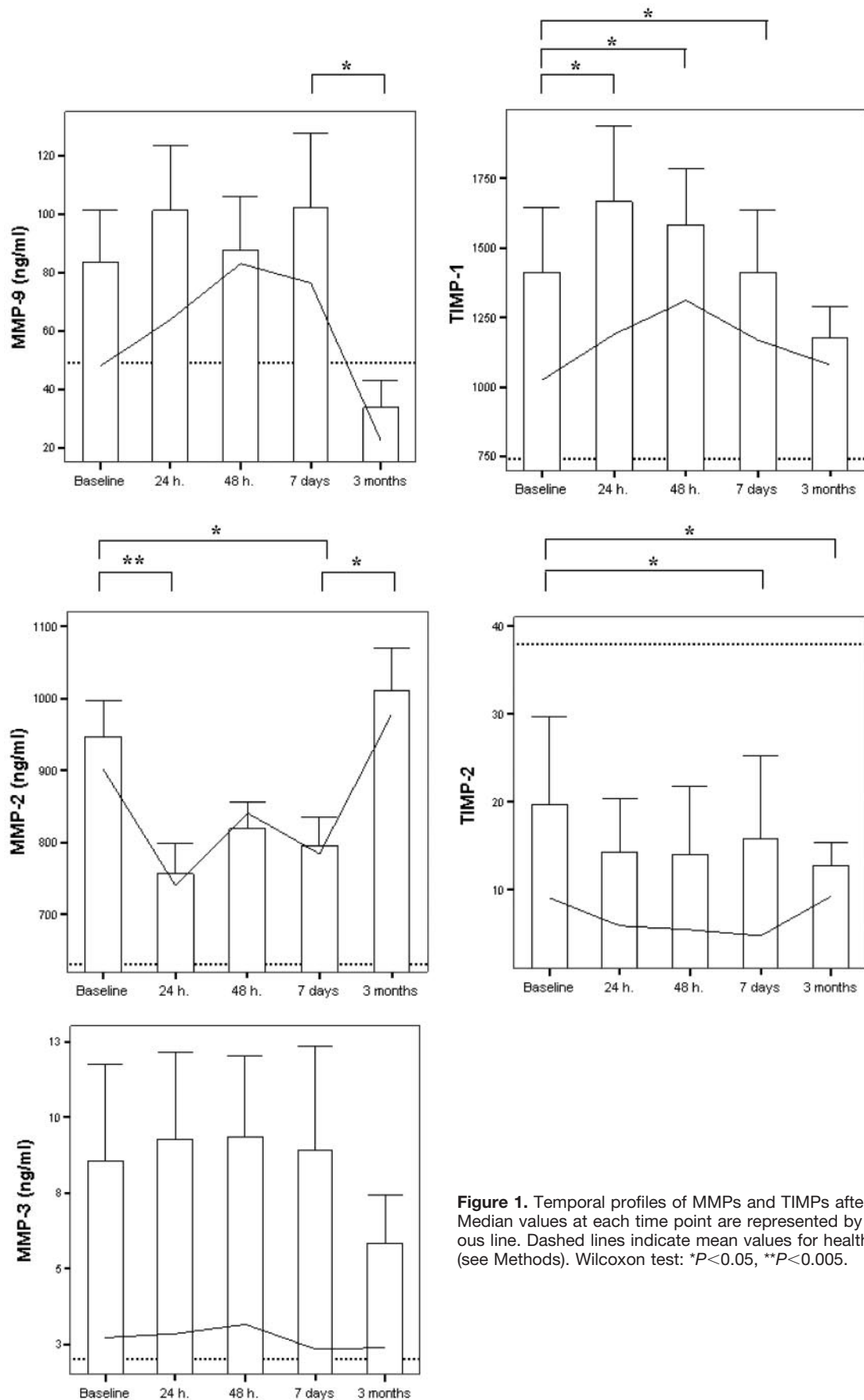


Figure 1. Temporal profiles of MMPs and TIMPs after ICH. Median values at each time point are represented by a continuous line. Dashed lines indicate mean values for healthy controls (see Methods). Wilcoxon test: * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$.

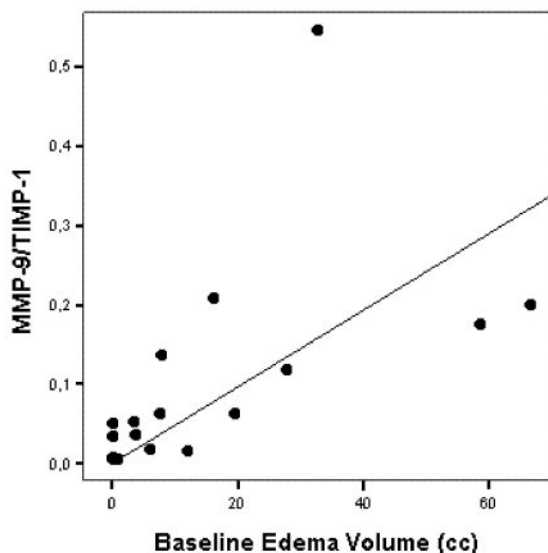


Figure 2. MMP-9/TIMP-1 ratio correlation with PE within 12 hours from symptom onset.

ICH; later, a second peak of these molecules was present on day 7.

A possible explanation for this biphasic pattern in MMP expression would be the contribution of different pathogenic

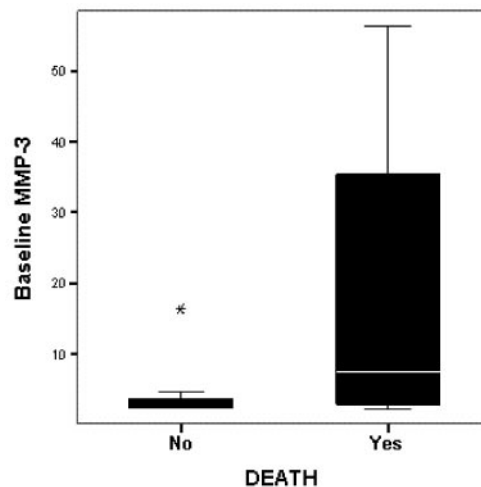


Figure 3. Baseline MMP-3 level in patients who died or survived after ICH.

mechanisms underlying edema formation. Early edema is thought to be the result of release and accumulation of osmotically active serum proteins from the clot,¹⁶ and delayed edema is produced by the blood-brain barrier disruption (vasogenic edema) and cytotoxic edema that follows neuronal death. This late edema peaks between days 5 and 6 after

TABLE 3. Clinical, Radiological, and Laboratory Findings on Arrival Profile at the Emergency Department of Patients Who Died or Survived During the Follow-up Study Period

	Death (n=7)	Survival (n=14)	P
Gender, male	6	8	0.35
Age, y	80 (68–85)	65 (54–74)	0.026*
Previous high blood pressure	3	6	1.0
Diabetes	0	4	0.24
Liver disease	2	0	0.098
Undergoing antiplatelet therapy	0	3	0.51
Baseline GCS	15 (14–15)	15 (14–15)	0.96
Baseline NIHSS	14 (11–18)	13 (4.5–15.5)	0.17
Systolic blood pressure	190 (166–230)	179 (170–210)	0.75
Diastolic blood pressure	90 (81–110)	104 (90–110)	0.41
Temperature	36.5 (36–36.95)	36.4 (36.1–36.7)	0.75
ICH volume	74.3 (8–115.5)	10.3 (3.8–22.8)	0.043*
PE volume	3.7 (0–27.7)	6 (0.6–15.7)	0.968
Leucocyte count	11.9 (9.7–12.4)	10.4 (7.7–11.7)	0.341
Platelet count	226 (100–248)	199 (163.5–245)	0.905
INR	1.18 (1.06–1.20)	1.22 (1.10–1.29)	0.294
Fibrinogen	2.8 (2.4–3.0)	2.8 (2.4–3.9)	0.633
Glucose	132 (114–152)	124 (104–156)	0.428
MMP-2	963.6 (846.0–1248.8)	878.4 (695.1–1043.7)	0.399
MMP-3	7.5 (2.8–40.6)	2.4 (2.4–4.0)	0.035*
MMP-9	131.7 (42.4–165.5)	46.8 (14.0–124.7)	0.190
TIMP-1	1167.5 (854.7–3867.4)	1049.8 (918.0–1329.6)	0.574
TIMP-2	15.5 (4.7–79.7)	7.7 (3.2–11.3)	0.158

For continuous variables, medians are shown.

* $P < 0.05$.

symptom onset.¹⁷ In our study, a relation exists between baseline MMP-9 and early edema, and also with the growth of this edema during the next days.

The presence of ischemia surrounding cerebral bleedings has been largely debated and yet not elucidated. MMP-9 is beginning to be considered as a marker of ischemia in some territories. However, a comparison between those MMP-9 concentrations found among ischemic strokes and those others found among primary ICH reveals a clear difference: mean MMP-9 concentration is higher for those patients with ischemic strokes.⁶ We might therefore hypothesize that the lesser MMP-9 concentrations found among patients in this study would reveal hypoperfusion without ischemia rather than a true ischemia supported by others. Similarly, recent PET and MRI studies have shown that periclot hypoperfusion is a consequence of reduced metabolic demand, ie, diaschisis rather than a sign of ischemia.^{18,19}

In our study, the response of different TIMPs in front of ICH is not homogeneous. TIMP-1 level increases very early after ICH onset; conversely, TIMP-2, which is constitutively expressed in brain parenchyma, decreases. Others have shown that the administration of TIMP-2 results in a reduction of PE by protecting the blood–brain barrier.¹⁰ Whether this is also true in humans and whether the very low TIMP-2 level observed in our study is caused by a TIMP-2 consumption is unknown. However, the role of TIMP-1 has not been properly studied in neurovascular pathologies. It is now assumed that it can exert antiapoptotic properties as well as MMP inhibition.²⁰ In this context, our study would support a protective effect of baseline TIMP-1, particularly by modulating the balance between matrix synthesis and matrix degradation through MMP-9 inhibition.

It is known that hematoma induces 3 pathological changes in its proximity: cell death, vasogenic edema, and breakdown of blood–brain barrier. Histological sections are characterized by the presence of edema, neuronal damage, macrophages, and neutrophils in the region surrounding the hematoma.²¹ In a recent report, Qureshi et al investigated the form of cell death associated with ICH in the perihematomal region of human specimens, showing that apoptosis seems to be a prominent form of cell death during the first days, whereas after 5 days of symptom onset, necrosis with inflammation seemed to be most prominent.²² Previous experimental studies in rats showed that apoptotic changes were mostly identified in neurons and astrocytes.²³ The apoptotic pathway in ICH may involve nuclear factor κ B,²⁴ and it is also known that this transcription factor is implicated in the control of some inducible MMPs such as MMP-3, MMP-7, and MMP-9.²⁵

In our sample, MMP-3 level at 24 hours correlated with residual scar volume at 3 months. One of the substrates degraded by MMP-3 is laminin, whose degradation leads to neuronal death.²⁶ We may therefore speculate that MMP-3 could contribute to cell death by several interrelated mechanisms that would have eventually contributed to the mortality of some ICH patients. Poor neurological outcome and residual cavity volume have also been related to other mechanisms such as increased plasma glutamate concentrations.²⁷

Several limitations should be noted in the present study. First, the small sample size and the high mortality rates in our population reduced the final number of fully available data on studied subjects at 3 months. Second, we studied just those molecules previously related to edema and blood–brain barrier breakdown. To fully elucidate molecular basis of ICH complications, future studies should include some other molecules theoretically more involved in ICH enlargement, such as hemostatic and fibrinolytic factors. Moreover, some of the studied biomarkers might already be elevated before ICH and related to vascular risk factors, because high concentrations are still found several months after the hemorrhagic event.

In conclusion, a characteristic temporal profile of MMP/TIMP release exists in human ICH. Increased MMP-9 is associated with PE and MMP-3 is associated with mortality. Both molecules are related to the residual scar volume. Whether blocking these molecules might be beneficial for ICH patients remains to be demonstrated.

Acknowledgments

This study was supported by a grant from Spain's Fondo de Investigación Sanitaria (FIS 01/1389) awarded by the Ministry of Health and Welfare. We thank Pilar Bermudez, Dorita Quiroga, and the Neuroradiology staff for technical assistance.

References

1. Qureshi AI, Tuhim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, Hanley DF. Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med.* 2001;344:1450–1460.
2. Mayer SA, Sacco RL, Shi T, Mohr JP. Neurologic deterioration in noncomatose patients with supratentorial intracerebral hemorrhage. *Neurology.* 1994;44:1379–1384.
3. Zazulia AR, Diringer MN, Derdeyn CP, Powers WJ. Progression of mass effect after intracerebral hemorrhage. *Stroke.* 1999;30:1167–1173.
4. Rosenberg G. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia.* 2002;39:279–291.
5. Mun-Bryce S, Rosenberg G. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:1163–1172.
6. Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina C, Angles 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;32:1759–1766.
7. Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina CA, Angles A, Abilleira S, Arenillas JF, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke.* 2001;32:2762–2767.
8. Rosenberg G, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke.* 1990;21:801–807.
9. Rosenberg GA, Navratil M. Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology.* 1997;48:921–926.
10. Rosenberg GA, Kornfeld M, Estrada E, Kelley RO, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain barrier by type IV collagenase. *Brain Res.* 1992;576:203–207.
11. Abilleira S, Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Castillo J, Alvarez-Sabín J. Matrix metalloproteinase concentration after spontaneous intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg.* 2003;99:65–70.
12. Power C, Henry S, Del Bigio MR, Larsen PH, Corbett D, Imai Y, Yong VW, Peeling J. Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases. *Ann Neurol.* 2003;53:731–742.
13. Khotari RU, Brott T, Broderick JP, Barsan WG, Sauerbeck LR, Zuccarello M, Khoury J. The ABCs of measuring intracerebral hemorrhage volume. *Stroke.* 1996;27:1304–1305.
14. Gebel JM, Sila CA, Sloan MA, Granger CB, Weisenberger JP, Green CL, Topol EJ, Mahaffey KW. Comparison of the ABC/2 estimation technique to computer-assisted volumetric analysis of intraparenchymal and subdural hematomas complicating the GUSTO-1 trial. *Stroke.* 1998;29:1799–1801.

15. Romanic AM, Burns-Kurtis CL, Gout B, Berrebi-Bertrand I, Ohlstein EH. Matrix metalloproteinase expression in cardiac myocytes following myocardial infarction in the rabbit. *Life Sci*. 2001;68:799–814.
16. Wagner K, Xi G, Hua Y, Kleinholtz M, Courten-Myers G, Myers RE, Broderick JP, Brott T. Lobar intracerebral hemorrhage model in pigs. Rapid edema development in perihematomal white matter. *Stroke*. 1996;27:490–497.
17. Sansing LH, Kaznatcheeva EA, Perkins CJ, Komaroff E, Gutman FB, Newman GC. Edema after intracerebral hemorrhage: correlations with coagulation parameters and treatment. *J Neurosurg*. 2003;98:985–992.
18. Zazulia AR, Diringer MN, Videen TO, Adams RE, Yundt K, Aiyagari V, Grubb RL Jr, Powers WJ. Hypoperfusion without ischemia surrounding acute intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21:804–810.
19. Schellinger PD, Fiebach JB, Hoffmann K, Becker K, Orakcioglu B, Kollmar R, Juttler E, Schramm P, Schwab S, Sartor K, Hacke W. Stroke MRI in intracerebral hemorrhage: is there a perihemorrhagic penumbra? *Stroke*. 2003;34:1674–1679.
20. Baker AH, Zaltsman AB, George SJ, Newby AC. Divergent effects of tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, or -3 overexpression on rat vascular smooth muscle cell invasion, proliferation, and death in vitro. TIMP-3 promotes apoptosis. *J Clin Invest*. 1998;101:1478–1487.
21. Mutlu N, Berry RG, Alpers BJ. Massive cerebral hemorrhages. Clinical and pathological correlations. *Arch Neurol*. 2001;8:644–661.
22. Qureshi A, Suri M, Ostrow P, Kim S, Ali Z, Shatla AA, Guterman LR, Hopkins LN. Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage. *Neurosurgery*. 2003;52:1041–1048.
23. Matshusita K, Mong W, Wang X, Asahi M, Moskowitz MA, Lo EH. Evidence for apoptosis after intracerebral hemorrhage in rat striatum. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20:396–404.
24. Hickenbottom SL, Grotta JC, Strong R, Denner LA, Aronowski J. Nuclear factor-kappaB and cell death after experimental intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke*. 1999;30:2472–2477.
25. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian ML. Matrix metalloproteinases: biological activity and clinical implications. *J Clin Oncol*. 2000;18:1135–1149.
26. Chen ZL, Strickland S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell*. 1997;91:917–925.
27. Castillo J, Davalos A, Alvarez-Sabin J, Pumar JM, Leira R, Silva Y, Montaner J, Kase CS. Molecular signatures of brain injury after intracerebral hemorrhage. *Neurology*. 2002;58:624–629.

**5.5. FAS SYSTEM ACTIVATION IN PERIHEMATOMAL AREAS
AFTER SPONTANEOUS ICH. ARTÍCULO EN PREPARACIÓN.**

Fas system activation in perihematoma areas after spontaneous intracerebral hemorrhage

Delgado P¹, Cuadrado E¹, Rosell A¹, Alvarez-Sabin J¹, Ortega-Aznar A², Hernández M¹, Penalba A¹, Molina CA¹, Montaner J¹.

Neurovascular Research laboratory and Stroke Unit, Neurology Department¹ and Pathology Department². Hospital Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Spain.

Apoptosis has been implicated as a prominent form of cell death in the perihematoma region in animal models and necropsic or post-surgical human studies. Both Fas system and caspase activation play a central role in apoptotic pathways. The aims of this study were to investigate soluble Fas (s-Fas) and caspase-3 plasma level after acute intracerebral hemorrhage (ICH), to determine their influence on clinical and radiological features and to assess caspase-3, Fas receptor and Fas ligand protein expression in the human ICH brain tissue. **Methods:** s-Fas and caspase-3 plasma level were determined on admission (baseline) in 78 consecutive ICH patients and serially in a subgroup of 21 of them (24 h, 48 h, 7th day and 3rd month), just at the time of neurological assessment, by means of ELISA. ICH and Perihematoma Edema (PE) volumes were determined at baseline and follow-up CT scans and ICH and PE growth were calculated. Caspase-3, Fas receptor and Fas ligand presence were assessed in different brain tissue samples by immunoblotting from 4 deceased patients and 2 control subjects. **Results:** Median baseline NIH Stroke Scale Score was 12 and 13 patients presented neurological worsening at 48 hours. Mortality reached 20.5% of patients at the third month and 48% of survivors had an unfavorable outcome (mRS \geq 3). Baseline s-Fas level in ICH patients was significantly lower than in healthy controls [160 (160-245) vs 269 (230-332) pg/mL, $p < 0.001$] returning to normal values on follow-up. We found no differences between baseline nor follow-up caspase-3 level among ICH patients compared to controls. Plasma caspase-3 and s-Fas were not related to any clinical variable on admission nor follow-up. Regarding radiological features, s-Fas was found inversely correlated to perihematoma edema growing at follow-up ($r = -0.33$, $p = 0.041$). In addition, Fas receptor and its ligand were found increased at perihematoma areas in ICH cases, whereas activated caspase-3 was more prominent at contralateral regions. **Conclusions:** Decreased plasma s-Fas level together with increased Fas receptor and Fas ligand presence at perihematoma brain tissue suggest a Fas-mediated apoptosis involvement in this disease.

Intracerebral hemorrhage induces several histopathological changes in its proximity, which beside mass effect, are responsible for brain damage¹. Among them, cellular death has been shown to be caused by either necrosis or apoptosis related mechanisms. Usually, necrosis occurs as a passive process involving a group of cells and produces a significant inflammatory response. In opposition, apoptosis affects actively single cells, with the formation of apoptotic bodies and their phagocytosis by adjacent normal cells. The characterization of cell death associated with ICH has been previously defined in several experimental models^{2,3,4}, which showed that apoptosis mainly occurs in the matrix of the hematoma but also in the tissue surrounding its periphery. In humans, Qureshi et al⁵ also identified the presence of apoptotic cells in the perihematoma region of surgically evacuated hematomas. Apoptosis requires the activation of a cell death gene program, and implies the activation of extracellular signals that can regulate this process which finishes with caspase-3 activation directly related to DNA damage and cell death⁶. Fas (also called Apo-1 or CD95) system is an apoptosis-signalling receptor located in the cell surface that belongs to the tumor necrosis factor (TNF) receptor family⁷. The interaction between Fas and its ligand (Fas-L) leads to apoptosis. However, several Fas variants molecules have been identified, which are generated by alternative splicing and which are expressed as soluble molecules, some of them being able of inhibit induced apoptosis⁸. Although Fas-mediated apoptosis has been described in other central nervous system diseases, such as traumatic brain injury, multiple sclerosis or ischemic stroke^{9,10,11,12,13}, its role in ICH has not been yet defined. Our aim was to investigate the presence of soluble Fas and caspase-3 in plasma samples after acute ICH and to determine its relation with clinical and radiological features. In addition, the presence and activity of caspase-3, Fas receptor and Fas ligand have been also investigated in human ICH brain tissue.

SUBJECTS AND METHODS

Study population

Our target population consisted of consecutive patients with spontaneous supratentorial ICH evaluated in the emergency room within the first 24 hours after onset. A detailed history of vascular

risk factors, drug abuse, alcoholism, liver disease and concomitant medication was obtained from each patient. All patients with ICH related to vascular malformation, impaired coagulation or oral anticoagulant intake, traumatic brain injury, hemorrhagic infarction, tumoral bleedings and those patients who underwent a surgical procedure were excluded for this study. Finally, a total of 78 ICH patients were included after informed consent was obtained from them or their relatives. The Ethics Committee of the hospital approved all aspects of the study protocol.

Clinical assessment

Glasgow Coma Scale (GCS) and NIH Stroke Scale (NIHSS) scores were recorded to assess the level of consciousness and neurological status on admission (<24 hours), and at follow-up (24 hours, 48 hours, seventh day and third month) visits.

Early neurological deterioration (defined as an increase in NIHSS score by ≥ 4 points within the first 48 hours)¹⁴ was recorded. Mortality or a modified Rankin Scale score ≥ 3 among survivors were considered as unfavorable outcome parameter at third month. Arterial blood pressure and temperature values were obtained immediately prior to CT scan performance and at follow-up visits.

CT scan protocol

Two cranial CT scans were carried out: on admission (<24 hours), and at follow-up (mean 3 days). All cranial CT scans were performed according to the Neuroradiology department protocol, with an image matrix of 340x 340, 2.5-mm wide slices for posterior fosse and 10 mm wide for next slices. Investigators who read CT scans were blinded to clinical and laboratory information. ICH volume was measured in baseline and follow-up cranial CT scans, according to the formula $A \times B \times C \times 0.5$ ^{15,16}, where A and B represent the largest perpendicular diameters through the hyperdense area on CT scan, and C represents the thickness of ICH (the number of 10 mm slices containing hemorrhage). ICH location was categorized as deep when it was limited to the basal ganglia and/or the thalamus, or lobar when it affected predominantly the subcortical white matter of cerebral lobes. A hematoma growing more than 33% of its initial volume was considered hematoma enlargement¹⁷. Perihematomal edema volume (PE) was

also measured on baseline and follow-up CT scans by subtracting hyperdense volume (ICH area) from total lesion area, according to the formula mentioned above. PE enlargement at follow-up CT scan was measured as described for PE, but the clot retraction volume, if any, was subtracted. We considered edema enlargement when there was an increase of at least 33% compared to the baseline CT scan. Finally, the presence of intraventricular or subarachnoidal extensions of hematoma were also recorded at baseline and follow-up CT scans.

Immunoassay Methods

Venous blood samples were drawn from each patient on admission (n=78) and at follow-up visits (n=21). Citrate tubes were used to collect the blood and plasma was immediately separated by centrifugation at 3000 rpm for 15 minutes and stored at -80°C until analysis was done. S-Fas and caspase-3 levels were determined using the commercially available Enzyme-linked Immunosorbent Assay-ELISA- according to the manufacturer's instructions (Vienna/Austria/Bender Medsystems). Our laboratory reference range for healthy controls for soluble Fas was 269 (230-332) pg/mL and for caspase-3 was 1.08 (0.76-1.56) ng/mL.

Brain tissue samples

We studied several samples from 4 ICH patients, as well as those obtained from 2 control subjects who died as a consequence of other non-inflammatory diseases. Sampling was done as previously described¹⁸. Briefly, on autopsy, blood mass was removed, and 1 cm³ of adjacent parenchyma was obtained as perihematoma area together with contralateral tissue. We also obtained an additional area remote to ICH and considered healthy in the same hemisphere. Sampling was done within the first six hours after death to avoid tissue degradation. All brain parenchyma was snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

Immunoblotting

Supernatant homogenates were obtained for caspase-3, Fas receptor and Fas ligand Western Blot analysis and protein content was previously determined by bicinchoninic acid (BCA) assay. Briefly, 30 µg of total protein were loaded in SDS-PAGE (10%)

and transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Nonspecific bindings were blocked, and membranes were separately incubated overnight with mouse anti-human caspase-3 (Alexis), rabbit anti-human Fas receptor and rat anti-human Fas ligand at 1:1000. Secondary biotininated antibody (Calbiochem; USA) was diluted 1:1000 and membranes incubated for 1 hour at room temperature following with a final streptavidin-HRP incubation (1:1000) for 1 hour. Before and after membrane incubations, 3 washes (10 min each) in TPBS were done. The substrate reaction was developed with chemiluminescent reagent ECL PLUS (Amersham, UK) and visualized with a luminescent image analyzer (Gel Logic 440 Imaging System, Kodak, USA).

Statistical Analysis

Statistical analysis was done using the SPSS 12.0 statistical package. Statistical significance for intergroup differences was assessed by Fisher's exact test for categorical variables and Mann-Whitney U test for continuous variables. To study correlations between continuous variables, Spearman and Pearson correlation coefficients were used as required. A repeated measurement test (Wilcoxon) was used to analyze significant increases/decreases in the s-Fas and caspase-3 temporal profile.

A logistic regression analysis was performed to adjust factors related with edema enlargement, using the enter method. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Clinical and neuroimaging findings

Demographic data, risk factor profile, and clinical variables are shown in Table 1 and radiological data from baseline and follow-up CT scans are provided in Table 2.

At follow-up, 13 patients presented neurological deterioration, and 16 died as a consequence of ICH at third month. From all survivors, 48% had an unfavourable outcome (mRS≥3).

About 30% of patients with a follow-up CT scan available for analysis presented hematoma enlargement. Edema enlargement was observed up to 51% of patients during the first 3 days. Hematoma or edema enlargement was not recorded in 12 patients who died within the first few days and in 23 patients who were scanned beyond the third day.

Table 1. Demographic data, risk factor profiles, and clinical variables among the studied patients.

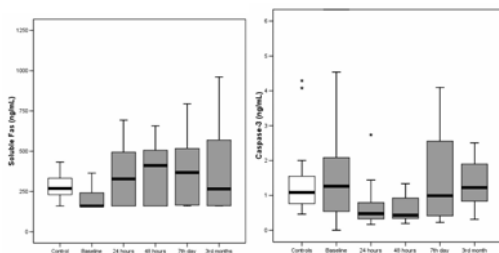
	ICH (n= 78)
Gender, male	53 (68%)
Age, years	75 (63.5-80)
Previous high blood pressure	50 (64%)
Smokers	19 (24%)
Alcohol intake	16 (20%)
Previous stroke	17 (22%)
- Ischemic	11 (14%)
- ICH	6 (7%)
Diabetes	22 (28%)
Liver disease	4 (5%)
Under antiplatelet therapy	26 (33%)
Baseline GCS	15 (14-15)
Baseline NIHSS	12 (6-16)
Systolic Blood Pressure, mmHg	176 ± 29
Dyastolic Blood Pressure, mmHg	95 ± 21
Temperature, °C	36.4 ± 0.4

Data are expressed in n (%), median (interquartile range) or mean +/- SD as appropriate.

Soluble Fas and caspase-3 temporal profile

Baseline s-Fas level in ICH patients was significantly lower than in healthy controls (160 (160-245) vs 269 (230-332) pg/mL, $p < 0.001$) but s-Fas level at 24 hours, 48 hours, 7th day and third month determinations were similar to controls. We found no differences between baseline caspase-3 in ICH patients compared neither to controls or any follow-up determination. The temporal profiles of both molecules are represented in figure 1. The baseline soluble Fas and caspase-3 level were not related to any clinical or biological variable on admission or follow-up.

Figure 1: Plasma soluble Fas and caspase-3 temporal profile following ICH.



Radiological features related to soluble Fas and caspase-3 level

Soluble Fas and caspase-3 levels were not related to initial ICH and PE volumes, neither with the presence of intraventricular or subarchnoidal extension.

However, during follow-up, a correlation emerged between baseline soluble Fas level and the perihematoma edema enlargement during the next days ($r = -0.33$, $p = 0.041$) that was maintained after

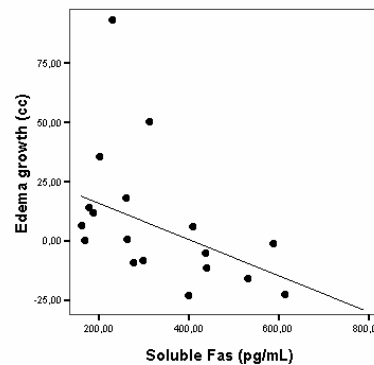
Table 2. Data from baseline and follow-up CT scans.

	Total series (n=78)
Time to baseline CT (hours)	5.2 (2-10)
Location (lobar)	24 (31%)
Baseline ICH volume (cc)	18 (5-39)
Baseline PE volume (cc)	5 (0.4-16)
Presence of IV extension	20 (25%)
Presence of SA extension	5 (6%)
Follow-up ICH volume (cc)	18 (7.5-47)
Follow-up PE volume (cc)	13 (6-37)

Time to baseline CT is the time from stroke onset to baseline CT scan given in hours. All volumes are expressed as cc. Data are expressed in n (%) and median (interquartile range) as appropriate.

adjustment for all vascular risk factors and all possible confounding factors (Figure 2). Baseline caspase-3 level was not related to any radiological feature neither on admission nor follow-up.

Figure 2: Relationship between baseline soluble Fas level and edema growing.

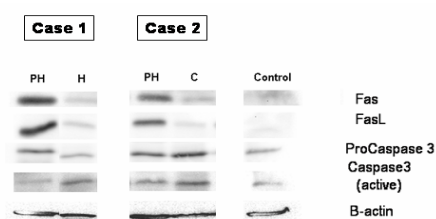


Fas receptor, Fas ligand and caspase-3 immunoblotting

Western blot analyses detected a 37 KDa band corresponding with Fas receptor protein, with the highest intensity at perihematoma area (as compared with a healthy area from the same hemisphere in case 1, with the contralateral hemisphere in case 2 and with control subjects). The same results were observed regarding Fas ligand protein (31 KDa band) as shown in figure 3.

Regarding caspase-3, two bands corresponding with pro-caspase-3 (35 KDa) and cleaved (17 KDa) were observed in all samples studied, although activated caspase-3 seems to be more prominent on contralateral and ipsilateral healthy areas (see Figure 3).

Figure 3: Representative Fas receptor, Fas ligand and caspase-3 immunoblotting from two patients and one control.



PH: Perihematoma area, H: Healthy ipsilateral area
C: Contralateral hemisphere.

DISCUSSION

Although the potential role for apoptosis in cell death after ICH has been suggested, the molecular mechanisms underlying the induction of apoptotic cell death remain to be elucidated. Our results suggest the existence of a Fas-mediated apoptosis involvement after ICH in perihematoma areas.

In our study, soluble Fas, which is thought to inhibit Fas interaction with its ligand¹⁹, was found decreased within the first 24 hours after ICH. This fact is in agreement with other studies involving cerebral ischemia, like that reported by Tarkowski et al¹². In their study, soluble Fas level was found decreased in cerebrospinal fluid from ischemic stroke patients, inversely correlated with the brain infarct volume and neurological deficit after 3 weeks and 3 months from the event. In our case, soluble Fas did not correlate with clinical status of our patients, but an association emerged between soluble Fas and perihematoma edema enlargement in the next days.

Moreover, immunoblotting found increased Fas receptor and Fas ligand expression in the perihematoma areas compared with those samples obtained from a healthy ipsilateral area, from the contralateral hemisphere and also from control subjects. Several hypotheses have been implicated in the edema formation. Most evidences from last years pointed to the existence of a hypoperfused, rather than ischemic, area surrounding the clot^{20,21,22,22}. In this context, apoptosis could be an important mechanism of cell death in the perihematoma area as it happens in the peri-infarct area after ischemic stroke¹³.

Whether soluble Fas decrease is reflecting a decreased production or a rapid consumption remains to be determined, however in our case soluble Fas returned to a normal level after the first 24 hours, so it seems to be a transient phenomenon.

In opposition to soluble Fas, caspase-3 plasma level in our samples did not change during the studied period, being even similar to those obtained from healthy controls. To our knowledge, ELISA methods are not routinely used to determine total caspase-3 plasma levels, therefore we only can compare our results with those obtained from Rosell et al²³ in a t-PA treated ischemic stroke population. They found high plasma caspase-3 at day one, related to poor neurological outcome in this condition.

Finally, as caspase-3 activation is considered an ending step in apoptotic pathways⁶, it would be hard to understand why the active caspase-3 immunoblotting seems to be more prominent in contralateral and healthy ipsilateral areas, which showed minimal amounts of Fas and Fas ligand protein expression. It might be hypothesized that the factors leading to apoptosis in these remote brain regions are quite different from those related to ICH itself.

Overall, our data would suggest a role for Fas system in perihematoma secondary brain damage, possibly related to apoptotic cell death in the tissue surrounding the hematoma.

Our results might have therapeutic applications, since the inhibition of Fas ligand has been shown to reduce secondary brain damage in experimental models of brain ischemia²⁴.

As limitations, it would be interesting to increase our sample size, especially in brain tissue studies, to better define the temporal profile for Fas activation after ICH.

REFERENCE LIST

1. Mutlu N, Berry RG, Alpers BJ. Massive cerebral hemorrhage: clinical and pathological correlations. *Arch Neurol* 1963;8:644-661.
2. Matsushita K, Meng W, Wang X, Asahi M, Asahi K, Moskowitz MA, Lo EH. Evidence for apoptosis after intercerebral hemorrhage in rat striatum. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:396-404.
3. Nakashima K, Yamashita K, Uesugi S, Ito H. Temporal and spatial profile of apoptotic cell death in transient intracerebral mass lesion of the rat. *J Neurotrauma* 1999;16:143-151.
4. Qureshi AI, Ling GS, Khan J, Suri MF, Miskolczi L, Guterman LR, Hopkins LN. Quantitative analysis of injured, necrotic, and apoptotic cells in a new experimental model of intracerebral hemorrhage. *Crit Care Med* 2001;29:152-157.
5. Qureshi AI, Suri MF, Ostrow PT, Kim SH, Ali Z, Shatla AA, Guterman LR, Hopkins LN. Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage. *Neurosurgery* 2003;52:1041-1047.
6. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16.
7. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449-1456.
8. Cascino I, Fiucci G, Papoff G, Ruberti G. Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J Immunol* 1995;154:2706-2713.
9. D'Souza SD, Bonetti B, Balasingam V, Cashman NR, Barker PA, Troutt AB, Raine CS, Antel JP. Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J Exp Med* 1996;184:2361-2370.
10. Dowling P, Shang G, Raval S, Menonna J, Cook S, Husar W. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 1996;184:1513-1518.
11. Beer R, Franz G, Schopf M, Reindl M, Zelger B, Schmutzhard E, Poewe W, Kampfl A. Expression of Fas and Fas ligand after experimental traumatic brain injury in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:669-677.
12. Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A. Intrathecal expression of proteins regulating apoptosis in acute stroke. *Stroke* 1999;30:321-327.
13. Sairanen T, Karjalainen-Lindsberg ML, Paetau A, Ijas P, Lindsberg PJ. Apoptosis dominant in the periinfarct area of human ischaemic stroke--a possible target of antiapoptotic treatments. *Brain* 2006;129:189-199.
14. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1581-1587.
15. Gebel JM, Sila CA, Sloan MA, Granger CB, Weisenberger JP, Green CL, Topol EJ, Mahaffey KW. Comparison of the ABC/2 estimation technique to computer-assisted volumetric analysis of intraparenchymal and subdural hematomas complicating the GUSTO-1 trial. *Stroke* 1998;29:1799-1801.
16. Kothari RU, Brott T, Broderick JP, Barsan WG, Sauerbeck LR, Zuccarello M, Khoury J. The ABCs of measuring intracerebral hemorrhage volumes. *Stroke* 1996;27:1304-1305.
17. Brott T, Broderick J, Kothari R, Barsan W, Tomsick T, Sauerbeck L, Spilker J, Duldner J, Khoury J. Early hemorrhage growth in patients with intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1997;28:1-5.
18. Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabin J, Fernandez-Cadenas I, Ribo M, Molina CA, Lo EH, Montaner J. Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke* 2006;37:1399-1406.
19. Cascino I, Fiucci G, Papoff G, Ruberti G. Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J Immunol* 1995;154:2706-2713.
20. Carhuapoma JR, Wang PY, Beauchamp NJ, Keyl PM, Hanley DF, Barker PB. Diffusion-weighted MRI and proton MR spectroscopic imaging in the study of secondary neuronal injury after intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2000;31:726-732.
21. Orakcioglu B, Fiebach JB, Steiner T, Kollmar R, Juttler E, Becker K, Schwab S, Heiland S, Meyding-Lamade UK, Schellinger PD. Evolution of early perihemorrhagic changes--ischemia vs. edema: an MRI study in rats. *Exp Neurol* 2005;193:369-376.
22. Schellinger PD, Fiebach JB, Hoffmann K, Becker K, Orakcioglu B, Kollmar R, Juttler E, Schramm P, Schwab S, Sartor K, Hacke W. Stroke MRI in intracerebral hemorrhage: is there a perihemorrhagic penumbra? *Stroke* 2003;34:1674-1679.
23. A.Rosell, J.Alvarez-Sabin, A.Ortega-Aznar, P.Delgado, R.Delgado-Mederos, I.Fernandez-Cadenas, E.Cuadrado, M.Ribo, CA Molina, J.Montaner. Deleterious role of apoptosis in human stroke: caspase-3 is related to poor neurological outcome among t-PA treated patients and activated in the ischemic brain. *Cerebrovasc Dis* 2006;21(suppl 4):37-
24. Martin-Villalba A, Hahne M, Kleber S, Vogel J, Falk W, Schenkel J, Krammer PH. Therapeutic neutralization of CD95-ligand and TNF attenuates brain damage in stroke. *Cell Death Differ* 2001;8:679-686.

6. SÍNTESIS DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta tesis se inicia con una revisión extensa y actualizada de los procesos fisiopatológicos, conocidos hasta la fecha, que se desencadenan tras la HIC, y de su contribución a la lesión cerebral secundaria que se produce tras ésta.

Entre dichos procesos adquieren un papel primordial la cascada de la coagulación (sobretudo, la trombina) y los fenómenos de neuroinflamación, pero también influyen el daño producido por los componentes derivados de la lisis de los eritrocitos y diversas proteasas capaces de degradar algunos componentes de la pared de los vasos, entre otros.

En el primer trabajo (apartado 5.1) se revisan también los estudios publicados en cuánto al desarrollo de edema perilesional y crecimiento del hematoma, tanto en modelos animales como en el hombre y las diferencias existentes entre ambos. Y finalmente introduce la utilidad de la determinación de marcadores biológicos de interés en el diagnóstico y monitorización clínico-radiológica de los pacientes con HIC.

En el resto de trabajos que conforman la presente tesis se han analizado varios marcadores biológicos en los pacientes que presentan una HIC, hallándose relaciones importantes entre éstos y la evolución posterior, tanto a nivel clínico como radiológico.

A modo de resumen, sintetizaremos brevemente las características basales de los diferentes grupos de pacientes estudiados, para posteriormente adentrarnos en los resultados obtenidos con cada biomarcador en concreto.

6.1. VARIABLES CLÍNICO-RADIOLÓGICAS Y PRONÓSTICO

El análisis conjunto de nuestros datos en los diferentes trabajos, confirma el conocido mal pronóstico, tanto vital como funcional de la HIC. Así, la presencia de deterioro neurológico y mortalidad en los diferentes trabajos, se ajusta a la publicada en la literatura (Tabla 7).

Tabla 7: Presencia de deterioro neurológico precoz, pronóstico desfavorable y mortalidad en los diferentes trabajos.

	Deterioro Neurológico/%	Pronóstico desfavorable (mRS>2)	Mortalidad/%
D-dímero (n=98)	25	-	20
S100B (n=78)	15	61	20.5
Fas soluble y caspasa-3 (n=78)	20,5	50	20
Metaloproteasas (n=21)	48	50	35

Es necesario remarcar en este apartado, que no se ha excluido a ningún paciente por presentar una pésima situación neurológica a su llegada, aunque este hecho haya podido influir en la pérdida de datos de seguimiento. Como contrapartida, pensamos que esta forma de seleccionar a los pacientes hace que nuestros resultados en cuanto a la evolución y el pronóstico se acerquen más a la realidad.

En cuánto al pronóstico, nuestros trabajos, además de aportar información adicional mediante el uso de marcadores biológicos, confirman como otros factores clásicos que también se asocian como:

- Edad
- Volumen de la HIC
- Baja puntuación en la escala de coma de Glasgow
- Presencia de invasión ventricular
- Recuento leucocitario
- Hipertensión arterial

Con respecto a los datos radiológicos, nuestros trabajos incluyen a pacientes con un rango variable de volumen de hemorragia basal, que se resume a continuación:

- Trabajo de las metaloproteasas: 18 cm³ (6,5-75)
- Trabajo del D-dímero: 17 cm³ (4-37,5)
- Trabajo de S100B: 17 cm³ (4-38)
- Marcadores de apoptosis: 18 cm³ (5-39)

De igual forma, las tasas de crecimiento de la HIC encontradas en el seguimiento a los 2-3 días también pueden compararse a las encontradas en otros estudios, alrededor del 35% (trabajos del D-dímero y de las metaloproteasas).

6.2. EL D-DÍMERO COMO PREDICTOR DE MAL PRONÓSTICO

Nuestro segundo trabajo confirma observaciones previas sobre la activación sistémica de los procesos hemostáticos, reflejados en un incremento del D-dímero plasmático que perdura durante, por lo menos, una semana.

En nuestro caso y a diferencia de estudios anteriores (Fujii et al, Stroke, 2001), la sola presencia de sangre intraparenquimatosa es capaz de activar dichos sistemas, sin que exista contaminación ventricular o subaracnoidea.

Además tal y como ocurre en otras patologías que afectan al sistema nervioso, dicha activación se asocia a una mayor gravedad y peor pronóstico a corto plazo. Pensamos que los motivos por los que el D-dímero está relacionado con una peor evolución pueden ser múltiples. En primer lugar, las concentraciones más elevadas de D-dímero se encuentran en aquellos pacientes con mayores volúmenes iniciales de HIC, en los que puede suponerse una mayor destrucción tisular y liberación de factores que inician la cascada de la coagulación. Pero este no puede ser el único motivo, pues en las hemorragias de gran tamaño ($>30 \text{ cm}^3$), el D-dímero aporta información adicional a la del volumen aisladamente, pues la mortalidad es cinco veces superior si las concentraciones de D-dímero son elevadas que si no lo son, como puede observarse en la siguiente figura (Figura 11).

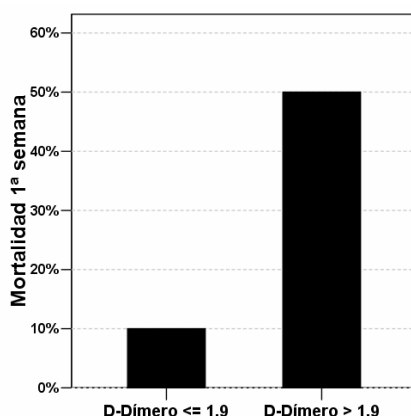


Figura 11: Relación del D-dímero con la mortalidad en pacientes con volúmenes de HIC > 30 cm³.

Otro de los motivos de la relación del D-dímero y el mal pronóstico puede estar en relación al crecimiento de la HIC, cuestión que analizaremos en el siguiente apartado.

Cabe resaltar que nos hemos referido exclusivamente al pronóstico en la fase aguda (deterioro neurológico precoz y mortalidad en la primera semana), pese a que la mayoría de estudios publicados con respecto al pronóstico, lo hacen valorando la mortalidad o el estado funcional al primer o tercer mes. Sin embargo, pensamos que sería útil este enfoque, dado que el estado de los pacientes a largo plazo en muchos casos es un reflejo de lo que sucede durante la primera semana.

6.3. EL CRECIMIENTO DE LA HIC Y EL D-DÍMERO

De especial interés resulta la asociación hallada entre los niveles basales de D-dímero y el crecimiento de la HIC, cuando se diagnostica a los pacientes dentro de las tres primeras horas (Figura 12).

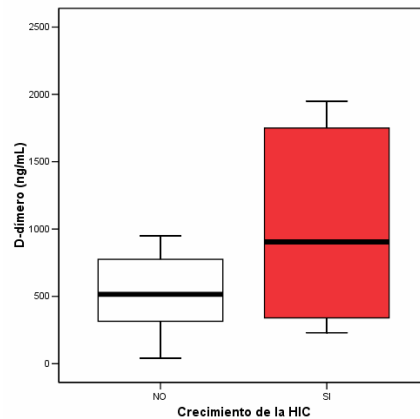


Figura 12: Relación del D-dímero con el crecimiento de la HIC.

En la actualidad, el crecimiento precoz de la hemorragia es una de las complicaciones más temidas, pues se asocia claramente a una mayor mortalidad y peor pronóstico funcional (Davis et al, Neurology, 2006). Sin embargo, la predicción de dicha complicación no está exenta de dificultades, siendo el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas hasta el diagnóstico uno de los predictores más importantes (Fujii et al, J Neurosurg, 1994). En nuestro estudio, hasta un 33% de los pacientes que se diagnostican dentro de las tres primeras horas presentaron crecimiento posterior de la HIC y en esos casos los niveles basales de D-dímero fueron superiores. Es posible, por tanto que este marcador biológico nos aporte mayor información en este sentido. Estos datos deberían confirmarse en estudios prospectivos especialmente diseñados para ello.

Su aplicación práctica puede tener una gran relevancia en el manejo en fase aguda de estos pacientes, sobretodo en aquellos candidatos a recibir tratamientos hemostáticos como el rFVIIa u otros fármacos en desarrollo.

Dado que el D-dímero constituye un producto final de la activación de las vías, tanto de coagulación como de la fibrinólisis, pensamos que sería un buen candidato como marcador global del balance entre ambos procesos. Así, cualquier alteración en el balance entre estos dos procesos, resultaría en unos niveles anormales de D-dímero.

6.4. RELACIÓN DE LA PROTEÍNA S100B CON EL VOLUMEN DE HIC

Como se ha comentado en la introducción de esta tesis, la proteína S100B, combinada con otros biomarcadores (como el RAGE) puede ayudar a diferenciar entre ictus isquémico y hemorrágico, y por tanto resultar de utilidad en el manejo pre-hospitalario del ictus (Delgado P et al, Cerebrovasc Dis, 2005). Este estudio pone de manifiesto además, que esta proteína, de forma basal, se relaciona con el volumen de la HIC y por lo tanto, en un futuro podría ayudar al clínico a tomar decisiones, incluso antes de la realización de la TC craneal.

La elevación en sangre de esta proteína está muy probablemente causada por la destrucción tisular que produce la hemorragia cerebral, que es mayor a mayor volumen extravasado.

Dado que S100B no es exclusiva de las células gliales, sino que se expresa en otros tipos celulares externos al sistema nervioso, algunos trabajos han explorado el valor de este biomarcador como indicador de lesión cerebral en el

contexto de un daño multiorgánico, por ejemplo, en pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos (Kleine et al, Brain Res Bull, 2003). En esos casos, la determinación en el LCR, o la asociación con otros biomarcadores como la NSE aportan una información más fidedigna.

Pese a que no es el propósito de este estudio el determinar el origen o la especificidad de este biomarcador en la HIC, pensamos que puede ser de gran utilidad en el futuro, dada su asociación con el volumen lesional.

Posiblemente, y de forma similar a lo que sucede en el ictus isquémico, los niveles plasmáticos de esta proteína aumenten a medida que va pasando el tiempo a partir de la lesión cerebral inicial; por ello, una única determinación en una fase muy precoz puede no ser capaz de discriminar, de forma independiente al volumen de la HIC, a los pacientes con un peor pronóstico. Teóricamente, su determinación seriada tras la HIC podría aportar una mayor información.

Aún asociándose a destrucción tisular, quedaría por responder si sus niveles pueden variar en relación con la topografía de la HIC, y por tanto con los subtipos celulares afectados, tal como parece desprenderse de nuestros resultados que muestran unos niveles más altos en el subgrupo de pacientes con HIC de localización lobar.

6.5. METALOPROTEASAS Y EDEMA PERIHEMATOMA

En primer lugar, nuestro estudio confirma resultados previos en cuanto a la relación de la MMP-9 y el edema perihematoma (Abilleira et al, J Neurosurg, 2003). Así, dentro de las metaloproteasas estudiadas, la MMP-9 es la que más se asocia al edema perilesional. Nuestro estudio muestra una relación entre dicha molécula y el edema perilesional en el momento basal, pero también su asociación con el crecimiento posterior del edema (en las siguientes 48 horas). De forma inversa, el inhibidor endógeno de esta proteasa o TIMP-1 se relaciona negativamente con el edema y parece existir un balance entre estas dos moléculas cuyo resultado positivo conduce hacia un incremento del edema (Figura 13).

Es importante remarcar en este apartado, que la relación de estas moléculas con el edema no está mediada por el volumen inicial de la hemorragia, sino que se presenta en las HIC de cualquier tamaño, pues no hemos encontrado ninguna relación de estas moléculas con el volumen inicial de la HIC.

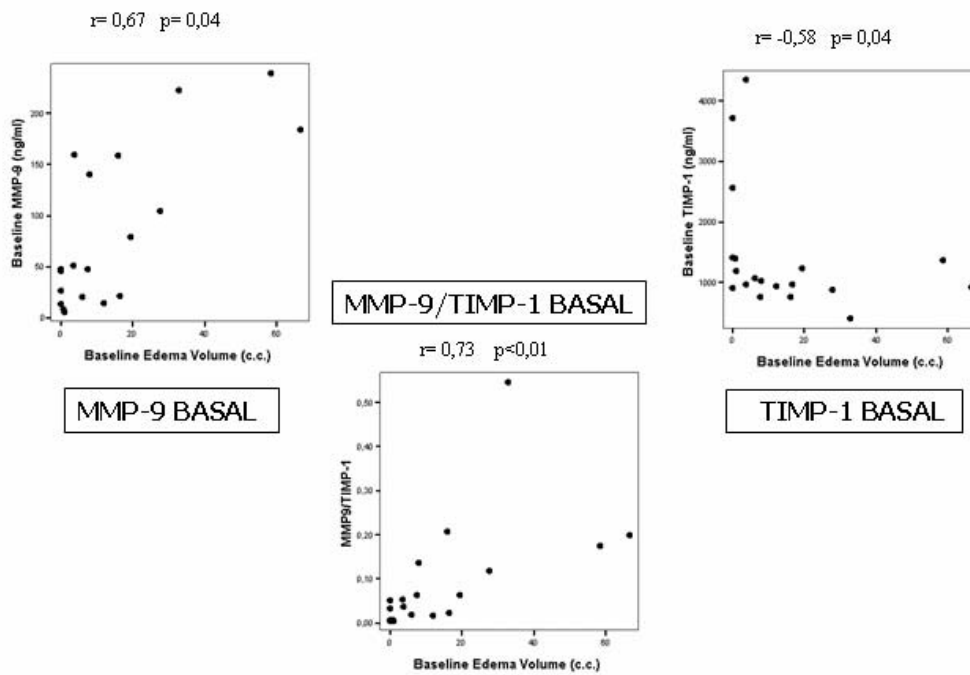


Figura 13: Relación entre MMP-9 y TIMP-1 con el edema perihematoma basal.

Cabe destacar que, tal y como hemos mencionado, todas las moléculas estudiadas están sobreexpresadas, a excepción del TIMP-2, cuyos niveles son significativamente inferiores a los controles durante todo el periodo de estudio.

Esta molécula se ha descrito como capaz de inhibir la proteólisis y por tanto de reducir el edema y la disrupción de la BHE tras la inyección intracerebral a un animal de experimentación de una colagenasa bacteriana (Rosenberg et al, Brain Res, 1992). Los niveles bajos que hemos encontrado en nuestros pacientes podrían pues implicar una tendencia hacia la proteólisis, pese a que no hemos observado que exista una relación entre esta molécula y el edema.

6.6. MMP-3 Y MORTALIDAD

A nuestro entender, este es el primer estudio en que se determinan los niveles de MMP-3 en el plasma de los pacientes tras una HIC. Dicha molécula no sólo está sobreexpresada, sino que se relaciona con algunos parámetros como la cavidad residual al tercer mes y predice, junto a la edad, la mortalidad de los pacientes. Los mecanismos a través de los cuáles esta metaloproteasa puede actuar son aún desconocidos, pero el balance entre esta metaloproteasa y su inhibidor endógeno (TIMP-3) podría estar en relación a fenómenos de apoptosis ligados al receptor de muerte Fas (Wetzel et al, Eur J Neurosci, 2003; Chen ZL, Cell, 1997).

6.7. INHIBICIÓN DE LAS METALOPROTEASAS

La aplicabilidad clínica de los resultados de este estudio es evidente y están en consonancia con el desarrollo y aplicación de fármacos inhibidores de estas metaloproteasas. Así, en estudios experimentales con animales tratados con estos fármacos se ha descrito una reducción en el edema y una mejoría en las escalas neurológicas (Rosenberg et al, Neurology, 1997).

Dada la relación de la MMP-3 con la mortalidad y el volumen residual, cabría esperar que su inhibición también mejorase el pronóstico, por otros mecanismos y de forma independiente a la producción de edema.

6.8. IMPLICACIÓN DEL SISTEMA FAS EN LA HIC

Este estudio describe por primera vez los niveles basales de Fas soluble (molécula con propiedades antiapoptóticas) y de caspasa-3 (molécula con propiedades pro-apoptóticas) en plasma de los pacientes tras una HIC y su perfil temporal. Así como los niveles de caspasa-3 no experimentan ningún cambio en nuestros pacientes, los niveles de Fas soluble sufren un descenso inicial. Dicho descenso se relaciona con la aparición de edema posterior.

Ante la posibilidad de que estos cambios estén reflejando una activación de este sistema, exploramos en el tejido cerebral de pacientes fallecidos tras una HIC, la presencia de las proteínas que conforman este sistema en diversas zonas cerebrales, encontrando que en las regiones del perihematoma es donde más se expresan tanto el Fas receptor como su ligando.

6.9. APLICACIONES PRÁCTICAS DEL USO DE BIOMARCADORES

Si bien muchas de las futuras dianas terapéuticas en la HIC se conocerán a partir del creciente uso de modelos animales en esta patología, pensamos que la determinación plasmática de dichas moléculas en nuestros enfermos y, por tanto, su uso como biomarcadores puede ayudarnos a comprender mejor la fisiopatología y la cronología en el ser humano de estos procesos.

Su aplicación como marcadores de pronóstico o de evolución clínico-radiológica será posible gracias al futuro desarrollo de técnicas de detección más rápidas

que las que existen en la actualidad y/o mediante sistemas que permitan combinar la determinación simultánea de varios biomarcadores en una misma muestra biológica.

7. CONCLUSIONES

En los pacientes que han presentado una HIC:

- 1) Existe un gran número de procesos que se desencadenan y contribuyen a la lesión cerebral secundaria. Las moléculas implicadas en dichos procesos pueden ser utilizadas como marcadores biológicos.

- 2) Existe una activación de los mecanismos hemostáticos a nivel sistémico, que se pone de manifiesto por un aumento del D-dímero en sangre durante la primera semana.

Los niveles basales de la proteína S100B se encuentran elevados tras la HIC.

Existe un incremento en sangre de diversas metaloproteasas (MMP-2, MMP-3, MMP-9) y sus inhibidores endógenos (TIMP-1), con un perfil temporal definido para cada una de ellas.

Las concentraciones de Fas soluble descienden inicialmente, sin observarse cambios en las concentraciones de caspasa-3.

- 3) Las concentraciones basales de D-dímero predicen el deterioro neurológico y la mortalidad precoz.

Las concentraciones basales de proteína S100B están en relación al volumen inicial de la HIC.

La MMP-9 y el TIMP-1 se relacionan con el edema perihematoma.

La MMP-3 predice la mortalidad y se asocia al volumen de la cavidad residual al tercer mes.

Las concentraciones basales de Fas soluble se relacionan inversamente con el desarrollo posterior de edema perihematoma.

- 4) En las áreas del perihematoma existe activación del sistema Fas/Fas ligando tras la HIC, implicados en mecanismos de apoptosis.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A

- Abilleira S, Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Castillo J, Alvarez-Sabin J. Matrix metalloproteinase-9 concentration after spontaneous intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg* 2003 (99):65-70.
- Abou-Chebl A, Yadav JS, Reginelli JP, Bajzer C, Bhatt D, Krieger DW. Intracranial hemorrhage and hyperperfusion syndrome following carotid artery stenting: risk factors, prevention, and treatment. *J Am Coll Cardiol* 2004 (43):1596-1601.
- Acosta S, Nilsson TK, Bjorck M. Preliminary study of D-dimer as a possible marker of acute bowel ischaemia. *Br J Surg* 2001 (88):385-388.
- Al Shahi R, Warlow C. A systematic review of the frequency and prognosis of arteriovenous malformations of the brain in adults. *Brain* 2001 (124):1900-1926.
- Anderson GB, Steinke DE, Petruk KC, Ashforth R, Findlay JM. Computed tomographic angiography versus digital subtraction angiography for the diagnosis and early treatment of ruptured intracranial aneurysms. *Neurosurgery* 1999 (45):1315-1320.
- Asahi M, Asahi K, Jung JC, del Zoppo GJ, Fini ME, Lo EH. Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000 (20):1681-1689.
- Auer LM, Deinsberger W, Niederkorn K, Gell G, Kleinert R, Schneider G, Holzer P, Bone G, Mokry M, Korner E. Endoscopic surgery versus medical treatment for spontaneous intracerebral hematoma: a randomized study. *J Neurosurg* 1989 (70):530-535.

B

- Barber M, Langhorne P, Rumley A, Lowe GD, Stott DJ. Hemostatic function and progressing ischemic stroke: D-dimer predicts early clinical progression. *Stroke* 2004 (35):1421-1425.
- Batjer HH, Reisch JS, Allen BC, Plaizier LJ, Su CJ. Failure of surgery to improve outcome in hypertensive putaminal hemorrhage. A prospective randomized trial. *Arch Neurol* 1990 (47):1103-1106.
- Biomarkers Definition Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001 (69):89-95.
- Broderick J. Intracerebral Hemorrhage. In: Gorelick PB and Alter M, eds. *Handbook of Neuroepidemiology*. New York; 1994: 141-167.
- Broderick J, Brott T, Tomsick T, Leach A. Lobar hemorrhage in the elderly. The undiminishing importance of hypertension. *Stroke* 1993a (24):49-51.
- Broderick JP, Adams HP, Barsan W, Feinberg W, Feldmann E, Grotta J, Kase C, Krieger, D, Mayberg M, Tilley B, Zabramski JM, Zuccarello M. Guidelines for the management of spontaneous intracerebral hemorrhage: A statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke* 1999 (30):905-915.

Broderick JP, Brott T, Tomsick T, Huster G, Miller R. The risk of subarachnoid and intracerebral hemorrhages in blacks as compared with whites. *N Engl J Med* 1992 (326):733-736.

Broderick JP, Brott TG, Duldner JE, Tomsick T, Huster G. Volume of intracerebral hemorrhage. A powerful and easy-to-use predictor of 30-day mortality. *Stroke* 1993b (24):987-993.

Brott T, Broderick J, Kothari R, Barsan W, Tomsick T, Sauerbeck L, Spilker J, Duldner J, Khoury J. Early hemorrhage growth in patients with intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1997 (28):1-5.

Brott T, Marler JR, Olinger CP, Adams HP, Tomsick T, Barsan WG, Biller J, Eberle R, Hertzberg V, Walker M. Measurements of acute cerebral infarction: lesion size by computed tomography. *Stroke* 1989 (20):871-875.

Buttner T, Weyers S, Postert T, Sprengelmeyer R, Kuhn W. S-100 protein: serum marker of focal brain damage after ischemic territorial MCA infarction. *Stroke* 1997 (28):1961-1965.

C

Caplan LR, Neely S, Gorelick P. Cold-related intracerebral hemorrhage. *Arch Neurol* 1984 (41):227-227.

Castellanos M, Leira R, Tejada J, Gil-Peralta A, Davalos A, Castillo J. Predictors of good outcome in medium to large spontaneous supratentorial intracerebral haemorrhages. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2005 (76):691-695.

Charriaut-Marlangue C, Margail I, Represa A, Popovici T, Plotkine M, Ben Ari Y. Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996 (16):186-194.

Chen ZL, Strickland S. Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin. *Cell* 1997 (91):917-925.

Cheung RT, Zou LY. Use of the original, modified, or new intracerebral hemorrhage score to predict mortality and morbidity after intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2003 (34):1717-1722.

Counsell C, Boonyakarnkul S, Dennis M, Sandercock P, Bamford J, Burn J. Primary intracerebral haemorrhage in the Oxfordshire Community Stroke Project, 2: prognosis. In: *Cerebrovascular Diseases* 1995:26-34.

Crassard I, Soria C, Tzourio C, Woimant F, Drouet L, Ducros A, Bousser M. A negative D-dimer assay does not rule out cerebral venous thrombosis. A series of seventy-three patients. *Stroke* 2005 (36): 1716-1719.

D

D'Souza SD, Bonetti B, Balasingam V, Cashman NR, Barker PA, Troutt AB, Raine C S, Antel JP. Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death. *J Exp Med* 1996 (184):2361-2370.

- Davis SM, Broderick J, Hennerici M, Brun NC, Diringer MN, Mayer SA, Begtrup K, Steiner T. Hematoma growth is a determinant of mortality and poor outcome after intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2006 (66):1175-1181.
- Delgado P, Alvarez Sabin J, Ribo M, Purroy F, Rosell A, Penalba A, Fernandez-Cadenas I, Arenillas JF, Molina CA, Montaner J. Differentiating ischemic and hemorrhagic stroke by means of a panel of plasma biomarkers. *Cerebrovasc Dis* 2005 (19):59.
- Diener HC, Bogousslavsky J, Brass LM, Cimminiello C, Csiba L, Kaste M, Leys D, Matias-Guiu J, Rupprecht HJ. Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2004 (364):331-337.
- Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2001 (33):637-668.
- Dowling P, Shang G, Raval S, Menonna J, Cook S, Husar W. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 1996 (184):1513-1518.

F

- Felberg RA, Grotta JC, Shirzadi AL, Strong R, Narayana P, Hill-Felberg SJ, Aronowski J. Cell death in experimental intracerebral hemorrhage: the "black hole" model of hemorrhagic damage. *Ann Neurol* 2002 (51):517-524.
- Felderhoff-Mueser U, Buhner C, Groneck P, Obladen M, Bartmann P, Heep A. Soluble Fas (CD95/Apo-1), soluble Fas ligand, and activated caspase 3 in the cerebrospinal fluid of infants with posthemorrhagic and nonhemorrhagic hydrocephalus. *Pediatr Res* 2003 (54):659-664.
- Felderhoff-Mueser U, Taylor DL, Greenwood K, Kozma M, Stibenz D, Joashi UC, Edwards AD, Mehmet H. Fas/CD95/APO-1 can function as a death receptor for neuronal cells in vitro and in vivo and is upregulated following cerebral hypoxic-ischemic injury to the developing rat brain. *Brain Pathol* 2000 (10):17-29.
- Fisher CM. Pathological observations in hypertensive cerebral hemorrhage. *J Neuropathol Exp Neurol* 1971 (30):536-550.
- Foerch C, du Mesnil de Rochemont R, Singer O, Neumann-Haefelin T, Buchkremer M, Zanella FE, Steinmetz H, Sitzer M. S100B as a surrogate marker for successful clot lysis in hyperacute middle cerebral artery occlusion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2003 (74):322-325.
- Foerch C, Otto B, Singer OC, Neumann-Haefelin T, Yan B, Berkefeld J, Steinmetz H, Sitzer M. Serum S100B predicts a malignant course of infarction in patients with acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 2004 (35):2160-2164.
- Franke CL, van Swieten JC, Algra A, van Gijn J. Prognostic factors in patients with intracerebral haematoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1992 (55):653-657.

Friedlander, R. M. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 2003 (348):1365-1375.

Fujii Y, Takeuchi S, Harada A, Abe H, Sasaki O, Tanaka R. Hemostatic activation in spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2001 (32):883-890.

Fujii Y, Takeuchi S, Sasaki O, Minakawa T, Tanaka R. Multivariate analysis of predictors of hematoma enlargement in spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1998 (29):1160-1166.

Fujii Y, Tanaka R, Takeuchi S, Koike T, Minakawa T, Sasaki O. Hematoma enlargement in spontaneous intracerebral hemorrhage. *J Neurosurg* 1994 (80):51-57.

G

Gazzolo D, Bruschetti M, Lituania M, Serra G, Bonacci W, Michetti F. Increased urinary S100B protein as an early indicator of intraventricular hemorrhage in preterm infants: correlation with the grade of hemorrhage. *Clin Chem* 2001 (47):1836-1838.

Gebel JM, Jauch EC, Brott TG, Khoury J, Sauerbeck L, Salisbury S, Spilker J, Tomsick TA, Duldner J, Broderick JP. Natural history of perihematomal edema in patients with hyperacute spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2002 (33):2631-2635.

Gebel JM, Sila CA, Sloan MA, Granger CB, Weisenberger JP, Green CL, Topol EJ, Mahaffey KW. Comparison of the ABC/2 estimation technique to computer-assisted volumetric analysis of intraparenchymal and subdural hematomas complicating the GUSTO-1 trial. *Stroke* 1998 (29):1799-1801.

Godoy DA, Boccio A. ICH score in a rural village in the Republic of Argentina. *Stroke* 2003 (34):e150-e151.

Goldstein JN, Thomas SH, Frontiero V, Joseph A, Engel C, Snider R, Smith EE, Greenberg SM, Rosand J. Timing of fresh frozen plasma administration and rapid correction of coagulopathy in warfarin-related intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2006 (37):151-155.

Greenberg SM. Cerebral amyloid angiopathy: prospects for clinical diagnosis and treatment. *Neurology* 1998 (51):690-694.

Greenberg SM, Briggs ME, Hyman BT, Kokoris GJ, Takis C, Kanter DS, Kase CS, Pessin MS. Apolipoprotein E epsilon 4 is associated with the presence and earlier onset of hemorrhage in cerebral amyloid angiopathy. *Stroke* 1996 (27):1333-1337.

Greenberg SM, Vonsattel JP. Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy. Sensitivity and specificity of cortical biopsy. *Stroke* 1997 (28):1418-1422.

H

Hack W, Kaste M, Bogousslavsky J, Brainin M, Chamorro A, Lees K, Leys D, Kwiecinski H, Toni P, Langhorne P, Diener C, Hennerici M, Ferro J, Sivenius J, Gunnar N, Bath P, Olsen TS, Gugging M. European Stroke Initiative Recommendations for Stroke Management-update 2003. *Cerebrovasc Dis* 2003 (16):311-337.

Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Davalos A, Meier D, Larrue V, Bluhmki E, Davis S, Donnan G, Schneider D, Diez-Tejedor E, Trouillas P. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet* 1998 (352):1245-1251.

Halpin SF, Britton JA, Byrne JV, Clifton A, Hart G, Moore A. Prospective evaluation of cerebral angiography and computed tomography in cerebral haematoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1994 (57):1180-1186.

Hart RG, Tonarelli SB, Pearce LA. Avoiding central nervous system bleeding during antithrombotic therapy: recent data and ideas. *Stroke* 2005 (36):1588-1593.

Hemphill JC, Bonovich DC, Besmertis L, Manley GT, Johnston SC. The ICH score: a simple, reliable grading scale for intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2001 (32):891-897.

Hoffmann ME, Ma OJ, Gaddis G. Utility of an initial D-dimer assay in screening for traumatic or spontaneous intracranial hemorrhage. *Acad Emerg Med* 2001 (8):859-865.

I

Italian Acute Stroke Study Group. Haemodilution in acute stroke: results of the Italian haemodilution trial. *Lancet* 1988 (1):318-321.

J

Jamora RD, Kishi-Generao EM, Bitanga ES, Gan RN, Apaga NE, San Jose MC. The ICH score: predicting mortality and functional outcome in an Asian population. *Stroke* 2003 (34):6-7.

Jane JA, Kassell NF, Torner JC, Winn HR. The natural history of aneurysms and arteriovenous malformations. *J Neurosurg* 1985 (62):321-323.

Juvela S, Heiskanen O, Poranen A, Valtonen S, Kuurne T, Kaste M, Troupp H. The treatment of spontaneous intracerebral hemorrhage. A prospective randomized trial of surgical and conservative treatment. *J Neurosurg* 1989 (70):755-758.

Juvela S, Hillbom M, Palomaki H. Risk factors for spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1995 (26):1558-1564.

K

Kazui S, Naritomi H, Yamamoto H, Sawada T, Yamaguchi T. Enlargement of spontaneous intracerebral hemorrhage. Incidence and time course. *Stroke* 1996 (27):1783-1787.

Kidwell CS, Chalela JA, Saver JL, Starkman S, Hill MD, Demchuk AM, Butman JA, Patronas N, Alger JR, Latour LL, Luby ML, Baird AE, Leary MC, Tremwel M, Ovbiagele B, Fredieu A, Suzuki S, Villablanca JP, Davis S, Dunn B, Todd JW, Ezzeddine MA, Haymore J, Lynch JK, Davis L, Warach S. Comparison of MRI and CT for detection of acute intracerebral hemorrhage. *JAMA* 2004 (292):1823-1830.

Kleine TO, Benes L, Zofel P. Studies of the brain specificity of S100B and neuron-specific enolase (NSE) in blood serum of acute care patients. *Brain Res Bull* 2003 (61):265-279.

Knudsen KA, Rosand J, Karluk D, Greenberg SM. Clinical diagnosis of cerebral amyloid angiopathy: validation of the Boston criteria. *Neurology* 2001 (56):537-539.

Kondziolka D, Lunsford LD, Kestle JR. The natural history of cerebral cavernous malformations. *J Neurosurg* 1995 (83):820-824.

Kothari RU, Brott T, Broderick JP, Barsan WG, Sauerbeck LR, Zuccarello M, Khoury J. The ABCs of measuring intracerebral hemorrhage volumes. *Stroke* 1996 (27):1304-1305.

L

Lainez JM, Pareja A. The medical treatment of intracerebral hemorrhage. *Rev Neurol* 2000 (31):174-179.

Lalive PH, de Moerloose P, Lovblad K, Sarasin FP, Mermillod B, Sztajzel R. Is measurement of D-dimer useful in the diagnosis of cerebral venous thrombosis? *Neurology* 2003 (61):1057-1060.

Leira R, Davalos A, Silva Y, Gil-Peralta A, Tejada J, Garcia M, Castillo J. Early neurologic deterioration in intracerebral hemorrhage: predictors and associated factors. *Neurology* 2004 (63):461-467.

Lynch JR, Blessing R, White WD, Grocott HP, Newman MF, Laskowitz DT. Novel diagnostic test for acute stroke. *Stroke* 2004 (35):57-63.

M

Martin-Villalba A, Hahne M, Kleber S, Vogel J, Falk W, Schenkel J, Krammer PH. Therapeutic neutralization of CD95-ligand and TNF attenuates brain damage in stroke. *Cell Death Differ* 2001 (8):679-686.

Matsushita K, Meng W, Wang X, Asahi M, Asahi K, Moskowitz MA, Lo EH. Evidence for apoptosis after intracerebral hemorrhage in rat striatum. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000 (20):396-404.

Mayer SA, Brun NC, Begtrup K, Broderick J, Davis S, Diringer MN, Skolnick BE, Steiner T. Recombinant activated factor VII for acute intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med* 2005 (352):777-785.

McKissock W, Richardson A, Taylor J. Primary intracerebral hemorrhage: a controlled trial of surgical and conservative treatment in 180 unselected cases. *Lancet* 1961 (2):221-226.

Mendelow AD, Gregson BA, Fernandes HM, Murray GD, Teasdale GM, Hope DT, Karimi A, Shaw MD, Barer DH. Early surgery versus initial conservative treatment in patients with spontaneous supratentorial intracerebral haematomas in the International Surgical Trial in Intracerebral Haemorrhage (STICH): a randomised trial. *Lancet* 2005 (365):387-397.

Michetti F, Gazzolo D. S100B protein in biological fluids: a tool for perinatal medicine. *Clin Chem* 2002 (48):2097-2104.

Missler U, Wiesmann M, Friedrich C, Kaps M. S-100 protein and neuron-specific enolase concentrations in blood as indicators of infarction volume and prognosis in acute ischemic stroke. *Stroke* 1997 (28):1956-1960.

Montaner J, Delgado P, Ribo M, Rubiera M, Palacios ME, Molina CA, Fernandez-Cadenas I, Rosell A, Chacon P, and Alvarez-Sabin J. Etiologic diagnosis of stroke subtypes using plasma biomarkers. *Cerebrovasc Dis* 2006 (21 suppl):1-151.

Montaner J, Rodríguez-Yañez M, Castellanos M, Alvarez-Sabin J, Castillo J. Molecular signatures of course and prognosis of intracerebral hemorrhage. *Seminars in Cerebrovascular Diseases and Stroke*. "Update in intracerebral hemorrhage" 2005 (5): 178-188.

Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina CA, Angles A, Abilleira S, Arenillas J, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke* 2001 (32):2762-2767.

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

Morgenstern LB, Frankowski RF, Shedden P, Pasteur W, Grotta JC. Surgical treatment for intracerebral hemorrhage (STICH): a single-center, randomized clinical trial. *Neurology* 1998 (51):1359-1363.

N

Nina P, Schisano G, Chiappetta F, Luisa Papa M, Maddaloni E, Brunori A, Capasso F, Corpetti MG, Demurtas F. A study of blood coagulation and fibrinolytic system in spontaneous subarachnoid hemorrhage. Correlation with Hunt-Hess grade and outcome. *Surg Neurol* 2001 (55):197-203.

O

O'Donnell HC, Rosand J, Knudsen KA, Furie KL, Segal AZ, Chiu RI, Ikeda D, Greenberg SM. Apolipoprotein E genotype and the risk of recurrent lobar intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med* 2000 (342):240-245.

P

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

Q

Qureshi AI, Suri MF, Ostrow PT, Kim SH, Ali Z, Shatla AA, Guterman LR, Hopkins LN. Apoptosis as a form of cell death in intracerebral hemorrhage. *Neurosurgery* 2003 (52):1041-1047.

Qureshi AI, Tuhim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, Hanley DF. Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med* 2001 (344):1450-1460.

R

- Rankin J. Cerebral vascular accidents in patients over the age of 60. II. Prognosis. *Scott Med J* 1957 (2):200-215.
- Ritter MA, Droste DW, Hegedus K, Szepesi R, Nabavi DG, Csiba L, Ringelstein EB. Role of cerebral amyloid angiopathy in intracerebral hemorrhage in hypertensive patients. *Neurology* 2005 (64):1233-1237.
- Rosand J, Eckman MH, Knudsen KA, Singer DE, Greenberg SM. The effect of warfarin and intensity of anticoagulation on outcome of intracerebral hemorrhage. *Arch Intern Med* 2004 (164):880-884.
- Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabin J, Fernandez-Cadenas I, Ribo M, Molina CA, Lo EH, Montaner J. Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke* 2006 (37):1399-1406.
- Rosen H, Rosengren L, Herlitz J, Blomstrand C. Increased serum levels of the S-100 protein are associated with hypoxic brain damage after cardiac arrest. *Stroke* 1998 (29):473-477.
- 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. Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 2002 (39):279-291.
- Rosenberg GA, Kornfeld M, Estrada E, Kelley RO, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain barrier by type IV collagenase. *Brain Res* 1992 (576):203-207.
- Rosenberg GA, Navratil M. Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology* 1997 (48):921-926.
- Rothoerl RD, Woertgen C, Brawanski A. S-100 serum levels and outcome after severe head injury. *Acta Neurochir Suppl* 2000 (76:97-100.):97-100.

S

- Saloheimo P, Ahonen M, Juvela S, Pyhtinen J, Savolainen ER, Hillbom M. Regular aspirin-use preceding the onset of primary intracerebral hemorrhage is an independent predictor for death. *Stroke* 2006a (37):129-133.
- Saloheimo P, Lapp TM, Juvela S, Hillbom M. The impact of functional status at three months on long-term survival after spontaneous intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2006b (37):487-491.
- Sanchez CM, Suarez MA, Nebra A, Gutierrez I, Guallart A, Millaste A. Early activation of coagulation and fibrinolysis in traumatic brain injury and spontaneous intracerebral hemorrhage: a comparative study. *Neurología* 2004 (19):44-52.
- Segal AZ, Chiu RI, Eggleston-Sexton PM, Beiser A, Greenberg SM. Low cholesterol as a risk factor for primary intracerebral hemorrhage: A case-control study. *Neuroepidemiology* 1999 (18):185-193.

Silva Y, Leira R, Tejada J, Lainez JM, Castillo J, Davalos, A. Molecular signatures of vascular injury are associated with early growth of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2005 (36):86-91.

T

Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A Intrathecal expression of proteins regulating apoptosis in acute stroke. *Stroke* 1999 (30):321-327.

Teasdale G, Jennett B. Assessment and prognosis of coma after head injury. *Acta Neurochir (Wien)* 1976 (34):45-55.

Teernstra OP, Evers SM, Lodder J, Leffers P, Franke CL, Blaauw G. Stereotactic treatment of intracerebral hematoma by means of a plasminogen activator: a multicenter randomized controlled trial (SICHPA). *Stroke* 2003 (34):968-974.

Tejima E, Zhao BQ, Tsuji K, Rosell A, van Leyen K, Gonzalez RG, Montaner J, Wang X, LoEH. Astrocytic induction of matrix metalloproteinase-9 and edema in brain hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006 (in press).

Tellez H, Bauer RB. Dexamethasone as treatment in cerebrovascular disease. 1. A controlled study in intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1973 (4):541-546.

The GUSTO investigators. An international randomized trial comparing four thrombolytic strategies for acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993 (329):673-682.

The National Institute 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.

V

Vermeer SE, Algra A, Franke CL, Koudstaal PJ, Rinkel GJ. Long-term prognosis after recovery from primary intracerebral hemorrhage. *Neurology* 2002 (59):205-209.

Vreeburg EM, Levi M, Rauws EA, Deventer SJ, Snel P, Bartelsman JW, Ten Cate JW, Tytgat GN. Enhanced mucosal fibrinolytic activity in gastroduodenal ulcer haemorrhage and the beneficial effect of acid suppression. *Aliment Pharmacol Ther* 2001 (15):639-646.

W

Wakai A, Gleeson A, Winter D. Role of fibrin D-dimer testing in emergency medicine. *Emerg Med J* 2003 (20):319-325.

Wakai S, Yamakawa K, Manaka S, Takakura K. Spontaneous intracranial hemorrhage caused by brain tumor: its incidence and clinical significance. *Neurosurgery* 1982 (10):437-444.

Wetzel M, Rosenberg GA, Cunningham LA. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 and matrix metalloproteinase-3 regulate neuronal sensitivity to doxorubicin-induced apoptosis. *Eur J Neurosci* 2003 (18):1050-1060.

Woo D, Sauerbeck LR, Kissela BM, Khoury JC, Szaflarski JP, Gebel J, Shukla R, Pancioli AM, Jauch EC, Menon, AG, Deka R, Carrozzella JA, Moomaw CJ, Fontaine RN, Broderick

JP. Genetic and environmental risk factors for intracerebral hemorrhage: preliminary results of a population-based study. *Stroke* 2002 (33):1190-1195.

Y

Yu YL, Kumana CR, Lauder IJ, Cheung YK, Chan FL, Kou M, Chang CM, Cheung R T, Fong KY. Treatment of acute cerebral hemorrhage with intravenous glycerol. A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Stroke* 1992 (23):967-971.

Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* 2001 (345):494-502.

Z

Zazulia AR, Diringier MN, Derdeyn CP, Powers WJ. Progression of mass effect after intracerebral hemorrhage. *Stroke* 1999 (30):1167-1173.

Zhu XL, Chan MS, Poon WS. Spontaneous intracranial hemorrhage: which patients need diagnostic cerebral angiography? A prospective study of 206 cases and review of the literature. *Stroke* 1997 (28):1406-1409.

Zuccarello M, Brott T, Derex L, Kothari R, Sauerbeck L, Tew J, Van Loveren H, Yeh HS, Tomsick T, Pancioli A, Khoury J, Broderick J. Early surgical treatment for supratentorial intracerebral hemorrhage: a randomized feasibility study. *Stroke* 1999 (30):1833-1839.

9. ANEXOS

ESCALA DE COMA DE GLASGOW

Apertura de los ojos	Espontánea	4 puntos
	Tras estímulo verbal	3 puntos
	Tras estímulo doloroso	2 puntos
	Ausente	1 punto
Reacción verbal	Orientado	5 puntos
	Conversación confusa	4 puntos
	Palabras inapropiadas	3 puntos
	Incomprensible	2 puntos
	Ausente	1 punto
Respuesta motora	Obedece órdenes	6 puntos
	Localiza el dolor	5 puntos
	Flexión al dolor	4 puntos
	Flexión anormal	3 puntos
	Extensión al dolor	2 puntos
	Ausente	1 punto

Número máximo de puntos: 15

Número mínimo de puntos: 3

ESCALA DE RANKIN MODIFICADA

Puntuación	Descripción
0 <input type="checkbox"/>	Ningún tipo de síntomas.
1 <input type="checkbox"/>	Discapacidad no significativa a pesar de los síntomas; capaz de llevar a cabo todas las tareas y actividades habituales.
2 <input type="checkbox"/>	Discapacidad ligera; incapacidad de llevar a cabo todas sus actividades anteriores, pero capaz de cuidar de sus propios asuntos sin ayuda.
3 <input type="checkbox"/>	Discapacidad moderada; requiere alguna asistencia, pero es capaz de andar sin ayuda.
4 <input type="checkbox"/>	Discapacidad moderadamente severa; incapaz de andar y atender satisfactoriamente sus necesidades corporales sin ayuda.
5 <input type="checkbox"/>	Discapacidad severa; confinamiento a la cama, incontinencia y requerimiento de cuidados y atenciones constantes.
6 <input type="checkbox"/>	Muerte.

ESCALA DEL ICTUS DEL NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH (NIH STROKE SCALE)

1a. Nivel de conciencia

0. Alerta
1. No está alerta, pero reacciona con una estimulación mínima
2. No está alerta, precisando una estimulación repetida para reaccionar.
3. Coma

1b. Preguntar al paciente por el mes y la edad

0. Ambas respuestas correctas
1. Una respuesta correcta.
2. Ambas incorrectas.

1c. Pedir al paciente que cierre y abra los ojos y que cierre y abra la mano no parética

0. Ambos movimientos correctos
1. Un movimiento correcto
2. Ambos movimientos incorrectos

2. Movimiento ocular (sólo movimientos horizontal)

0. Normal
1. Parálisis parcial
2. Desviación forzada

3. Test de campo visual

0. Sin pérdida de campo visual
1. Hemianopsia parcial
2. Hemianopsia completa
3. Hemianopsia bilateral (incluye ceguera cortical)

4. Parálisis facial

Pedir al paciente que muestre los dientes o que levante las cejas y cierre los ojos fuertemente

0. Movimientos normales y simétricos
1. Parálisis menor: labio superior flácido, asimetría en la sonrisa
2. Parálisis parcial: parálisis casi total en la parte inferior de la cara
3. Parálisis completa en un lado o en ambos: ausencia de movimiento facial en la parte superior e inferior de la cara

5. Función motora de los brazos (5a derecho, 5b izquierdo)

Se pide al paciente que extienda los brazos al frente, con las palmas hacia abajo (si está sentado) o que los levante en ángulo de 45° (si está tendido) y se valora si mantiene la posición durante 10 segundos

0. No hay caída
1. Caída progresiva durante los 10 segundos sin llegar a caer del todo.
2. Cae del todo pero se observa un cierto esfuerzo contra la gravedad
3. Cae totalmente sin evidencia de esfuerzo contra gravedad
4. No hay movimiento
9. Amputación del miembro o inmovilización de la articulación

6. Función motora de las piernas (6a derecha, 6b izquierda)

Se realiza siempre en posición supina, pidiendo al paciente que levante la pierna en ángulo de 30° y se valora si mantiene la posición durante 5 segundos.

0. No hay caída
1. Caída progresiva durante los 10 segundos sin llegar a caer del todo.
2. Cae del todo pero se observa un cierto esfuerzo contra la gravedad
3. Cae totalmente sin evidencia de esfuerzo contra gravedad
4. No hay movimiento
9. Amputación del miembro o inmovilización de la articulación

7. Ataxia de los miembros

Se pide al paciente que se toque la nariz con la punta del dedo (ambos brazos) y que se toque la rodilla de una pierna con el talón de la otra y lo deslice a lo largo de la espinilla (ambas piernas)

0. No hay ataxia
1. Ataxia en un miembro
2. Ataxia en ambos miembros
9. Amputación del miembro o inmovilización de la articulación

8. Sensibilidad

Valorar la reacción ante el estímulo de un pinchazo con una aguja, en diferentes partes del cuerpo (brazos, pierna, cara)

0. Normal, no hay pérdida de sensibilidad
1. Pérdida de sensibilidad débil o moderada: el paciente nota el contacto pero no percibe si es con la punta o con el lado plano de la aguja
2. Pérdida total de sensibilidad: el paciente no nota el contacto

9. Lenguaje

Valorar la comprensión mostrada en todas las pruebas anteriores, así como la capacidad para leer una frase corta o describir un dibujo simple (los pacientes en coma, ítem 1a=3, se puntúan 3 en esta prueba)

0. Normal, si afasia
1. Afasia leve o moderada: el paciente tiene dificultades de habla y/o comprensión, pero se puede identificar lo que quiere decir
2. Afasia severa: sólo hay una comunicación mínima, y es muy difícil identificar lo que el paciente quiere decir
3. Afasia global, mutismo. No hay posibilidad de hablar ni de comprender

10. Disartria

Valorar la capacidad del paciente para articular correctamente un texto leído o repetir algunas palabras

0. Articulación normal
1. Disartria ligera o moderada. Se pueden entender las palabras pero con dificultad
2. Disartria severa, es casi imposible entender las palabras o el paciente casi no puede hablar
9. El paciente está intubado o tiene otra dificultad física para hablar.

11. Extinción (supresión, inatención) y negligencia

Se valora por la reacción del paciente ante un estímulo doloroso bilateral simultáneo y simétrico (extinción) y por sus reacciones ante los estímulos visuales, táctiles, auditivos, espaciales o personales, en las pruebas anteriores (negligencia)

0. No hay anormalidades
1. Extinción frente a la estimulación bilateral simultánea o negligencia en una de las modalidades sensoriales
2. Hemi-extinción severa o negligencia frente a más de un estímulo

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: REPRESENTACIÓN DE LAS PRINCIPALES LOCALIZACIONES DE LA HIC.....	25
FIGURA 2: EJEMPLO DEL CÁLCULO DEL VOLUMEN DE LA HIC.....	26
FIGURA 3: ICH SCORE.....	39
FIGURA 4: CASCADA DE LA COAGULACIÓN Y FIBRINÓLISIS Y FORMACIÓN DEL D-DÍMERO.....	44
FIGURA 5: ESQUEMA DE LAS VIAS DE APOPTOSIS MEDIADAS POR EL RECEPTOR FAS.....	62
FIGURA 6: ESQUEMA DEL PROTOCOLO EN EL ESTUDIO DEL D-DÍMERO.....	75
FIGURA 7: ESQUEMA DEL PROTOCOLO EN EL ESTUDIO DE LA PROTEINA S100B.....	76
FIGURA 8: ESQUEMA DEL PROTOCOLO EN EL ESTUDIO DE LAS METALOPROTEASAS.....	76
FIGURA 9: ESQUEMA DEL PROTOCOLO DE FAS SOLUBLE Y CASPASA-3 EN SANGRE.....	77
FIGURA 10: ESQUEMA DEL PROTOCOLO DE ESTUDIO DE TEJIDO CEREBRAL.....	79
FIGURA 11: RELACIÓN DEL D-DIMERO CON LA MORTALIDAD EN HIC> 30 CC.....	121
FIGURA 12: RELACIÓN DEL D-DIMERO CON EL CRECIMIENTO DE LA HIC.....	122
FIGURA 13: RELACIÓN DE MMP-9 Y TIMP-1 CON EL EDEMA BASAL.....	126

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: FACTORES ETIOLÓGICOS EN LA HIC.....	16
TABLA 2: ESTUDIOS RANDOMIZADOS PUBLICADOS DE TRATAMIENTO QUIRURGICO EN LA HIC...33	33
TABLA 3: RECOMENDACIONES PARA EL TRATAMIENTO QUIRURGICO DE LA HIC.....	35
TABLA 4: ESCALA PRONOSTICA ICH SCORE.....	38
TABLA 5: CRECIMIENTO DE LA HIC EN LOS DIFERENTES ESTUDIOS RETROSPECTIVOS.....	43
TABLA 6: CLASIFICACIÓN DE LAS METALOPROTEINASAS.....	53
TABLA 7: PRESENCIA DE DETERIORO NEUROLOGICO PRECOZ, PRONOSTICO DESFAVORABLE Y MORTALIDAD EN LOS DIFERENTES TRABAJOS.....	118