

TESI DOCTORAL

LES METAL·LOPROTEÏNASES DE MATRIU
EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL: ORIGEN,
LOCALITZACIÓ CEL·LULAR I CONTRIBUCIÓ
AL DANY TISSULAR

ELOY CUADRADO GODIA

FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE MEDICINA INTERNA
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

DIRECTORS:

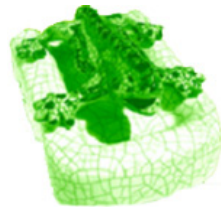
DR. JOAN MONTANER VILLALONGA

DRA. ANNA ROSELL NOVEL

DR. JOSÉ ALVAREZ SABIN

Barcelona, Gener de 2009

Aquesta Tesi Doctoral s'ha realitzat en el Laboratori de Recerca Neurovascular de l'Institut de Recerca de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron amb el suport de les beques FIS (05/322), RENEVAS (RD06/0026/0010) i AGAUR (2005SGR00614).



**LABORATORI
DE RECERCA
NEUROVASCULAR**



**LABORATORI DE RECERCA NEUROVASCULAR
INSTITUT DE RECERCA
HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON
UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE MEDICINA INTERNA**

- AGRAÏMENTS -

No puc creure que ja estigui escrivint aquest apartat de la tesi. Tinc una sensació una mica estranya, crec que tot ha passat molt ràpid i al mateix temps crec que fa mil anys des que vaig començar. La veritat és que tot just acaben de passar 3 anys i ja estic a punt de defensar la tesi. Durant aquests anys he passat de no saber absolutament ni el que significava un ictus, a presentar en congressos i escriure articles sobre el tema. He après, tant, tant, tant no únicament sobre el que és un ictus, sinó de tècniques de laboratori, d'escriure articles, a parlar en públic, a enraonar d'una forma científica i a esforçar-me per un objectiu com mai ho havia fet fins ara.

Si de tot això que he après ho he d'agrair a algú, és com no pot ser d'una altra forma al Dr. Joan Montaner i a la Dra. Anna Rosell. Tot el que he fet, he après, tot el que sóc avui com a científic és tot gràcies a ells. Vull donar les gràcies per l'oportunitat que hem van donar de participar en aquest projecte i vull donar les gràcies també per la confiança que han dipositat sempre en mi, des del primer dia em van donar una independència a l'hora de treballar que ha fet que assumeixi moltes responsabilitats que m'han ensenyat moltes coses, de com s'ha de treballar i al mateix temps han aconseguit ensenyar-me allò de "tot és possible" i que a la ciència no tot surt a la primera, i que és la perseverança el camí fins a l'èxit.

També vull donar les gràcies al Dr. José Alvarez-Sabín, per deixar-me participar també en aquesta aventura, per descobrir-me que és l'ictus i quina és la realitat dels pacients i de les seves famílies. A la vegada vull agrair també a tot el personal de la unitat d'Ictus i les urgències (residents, infermeres, auxiliars,...) a tots perquè és ben cert i just reconèixer que sense la seva col·laboració aquest estudi i tants altres que fem al laboratori no serien possibles. En el mateix sentit, vull agrair a la Dra. Arantxa Ortega la seva immensa col·laboració en el protocol de recollida de teixit, vull agrair la seva disposició, el seu

entusiasme a l'hora d'ensenyar-me tot el que se sobre la neuropatologia de les malalties vasculars cerebrals i pel seu afecte.

Aquesta tesi és el resultat del treball en equip de moltíssima gent, molta. Tots els meus companys del laboratori (Lidia, Mar, Maite, Vicky, Laura, Anita, Cris, Isra, Alberto, Miri, Natalia, Jessi, Sophie, Sandra, Dolors, Pilar, Dani, Mireia, Teresa) tots ells han col·laborat de forma directa o indirecta, més o menys en els resultats que són el cos d'aquesta tesi. Dels 5 que érem quan jo vaig començar als 21 que som ara el laboratori ha canviat molt i segur que per a millor perquè tot aquest gruix de gent són tots uns excel·lents professionals i científics que de ben segur aportaran molts èxits al laboratori. També vull agrair al personal de la UCTS pel seu suport i ajuda en molts experiments i per intentar ajudar sempre que han pogut, en especial a M^a Angeles perquè va ser ella qui em va ensenyar a fer microdissecció amb l'antic microscopi i sempre s'ha preocupat molt per ajudar-me.

Vull agrair també a la gent que em rodeja perquè ells han estat conscients de tot el que implica el procés de fer una tesi. Als meus amics d'aquí perquè ells coneixen millor el que això significa al dia a dia. Als meus amics d'allà perquè per ells sóc "lo metge" i perquè creuen i confien en mi, de la mateixa manera que jo els admiro a ells perquè són tots grans persones i grans amics. Als meus amics de més enllà, perquè ells em van conèixer quan tot just començava en el món de la recerca amb "la meva bacteria" i veien l'esforç i la dedicació que implica treballar en aquest món. A tots, gràcies pel vostre suport i ànim.

Finalment vull agrair a la meva família, a tota, el seu suport i perquè se que se senten molt orgullosos. En especial vull agrair a la meva germana que m'ha ensenyat que el qui s'ho treballa aconsegueix arribar on vol i als meus pares que seguint la mateixa dinàmica han treballat molt perquè tant jo com la meva germana puguem arribar on som, gràcies a l'estudi i al treball com ells sempre ens han ensenyat.

Mil gràcies a tots!

The secret to creativity is knowing how to hide your sources

A. Einstein (1879-1955)

- ÍNDEX -

AGRAÏMENTS

I

ÍNDEX

V

1	INTRODUCCIÓ	1
	1.1. L'ictus	3
	1.1.1. Els subtipus d'ictus	4
	1.1.2. El tractament trombolític amb rt-PA	7
	1.2. Models experimentals de la malaltia	10
	1.2.1. Models <i>in vivo</i>	10
	1.2.2. Models <i>in vitro</i>	12
	1.3. La Cascada isquèmica i la Neuroinflamació en l'àmbit subcel·lular	13
	1.4. Les Metal·loproteïnases de Matriu (MMPs)	17
	1.4.1. L'estructura i classificació	17
	1.4.2. L'activació	18
	1.4.3. La inhibició	20
	1.5. Les Metal·loproteïnases en la isquèmia cerebral	22
	1.5.1. MMPs en la fase aguda de la isquèmia cerebral	23
	1.5.2. MMPs i el trencament de la barrera hematoencefàlica: aparició d'hemorràgies cerebrals	25
	1.5.3. MMPs en fases cròniques de la isquèmia cerebral: la neurorreparació	27
2	OBJECTIUS	33
3	MATERIAL I MÈTODES	37
	3.1. Pacients	39
	3.1.1. Protocols d'estudi clínic	39
	3.1.2. Protocol de recollida de material biològic (necròpsies)	39
	3.2. Animals	40
	3.2.1. Model d'isquèmia cerebral focal en rata	41
	3.2.2. Anàlisi del volum d'infart	42
	3.3. Cultius cel·lulars	42
	3.3.1. Tipus cel·lulars	42
	3.3.1.1. Neutròfils	42
	3.3.1.2. Neurones	43
	3.3.2. Recompte cel·lular	44

3.3.3.	Mètodes de viabilitat cel·lular	44
3.3.3.1.	Mètode d'MTT	44
3.3.3.2.	Mètode de Viabilitat/Citotoxicitat (LIVE/DEAD)	45
3.3.4.	Tractaments dels cultius cel·lulars	45
3.3.4.1.	Deprivació d'oxigen i glucosa (OGD)	45
3.3.4.2.	Tractament amb rt-PA/fMLP	46
3.4.	Mètodes i tècniques generals	46
3.4.1.	Zimografia en gelatina	46
3.4.2.	Zimografia <i>in situ</i>	47
3.4.3.	Western blot	48
3.4.3.1.	Anticossos utilitzats	48
3.4.4.	Immunohistoquímica	49
3.4.4.1.	Procediment general per a mostres parafinades	49
3.4.4.1.1.	Anticossos utilitzats	50
3.4.4.2.	Procediment general per a mostres congelades	50
3.4.4.2.1.	Anticossos utilitzats	50
3.4.5.	Immunocitoquímica	51
3.4.5.1.	Anticossos utilitzats	51
3.4.6.	Tècniques microscòpiques	51
3.4.6.1.	Microscòpia <i>Total Internal Reflexion Fluorescence</i>	52
3.4.6.2.	Microscòpia de Microdissecció Làser	53
3.4.6.2.1.	Preparació de les mostres per microdissecció	53
3.4.7.	Arrays de proteïnes: Searchlight	54

4 RESULTATS

- | | |
|---|----|
| <p>▣ ARTICLE 1: Captura por microdissecció laser: una nueva herramienta para el estudio de la isquemia cerebral (<i>Rev Neurol.</i> 2007. May 1-15;44(9):551-5)</p> | 59 |
| <p>▣ ARTICLE 2: MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke (<i>Stroke.</i> 2008 Apr;39(4):1121-6)</p> | 67 |

	<p>▣ ARTICLE 3: Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release (<i>J Leukoc Biol.</i> 2008;84(1):207-14)</p>	75
	<p>▣ ARTICLE 4: Matrix metalloproteinase-13 is activated and is found in the nucleus of neural cells after cerebral ischemia (<i>J Cereb Blood Flow Metab.</i> 2008. Nov 5. Epub ahead of print)</p>	85
5	DISCUSSIÓ	101
	5.1. La importància dels neutròfils com a font de MMP-9: participació en l'aparició de transformacions hemorràgiques i efecte del rt-PA sobre aquestes cèl·lules	103
	5.2. Les MMPs després de la isquèmia: activació primerenca i localització nuclear	109
	5.3. La MMP-13 augmenta en el parènquima cerebral després de la isquèmia i es localitza al nucli de cèl·lules neurals	113
	5.4. La isquèmia modifica el contingut proteic de MMPs i TIMPs: diferències entre neurones i vasos obtinguts per LMD en parènquima cerebral humà	117
	5.5. Implicacions directes dels resultats	121
6	CONCLUSIONS	125
7	BIBLIOGRAFIA	129
8	ANNEXOS	149
I	ANNEX I	
	<p>▣ ARTICLE 5: Matrix Metalloproteinases in vascular and neuronal components of the human brain after stroke: combining Laser Microdissection and Protein Array (Sotmès a <i>The Journal of Proteome Research</i>)</p>	151
II	ANNEX II	
	Acrònims i Abreviacions	161

INTRODUCCIÓ

1



1.1. L'ictus

L'ictus o infart cerebral es produeix com a conseqüència d'una alteració del flux dels vasos sanguinis cerebrals que pot ser transitori, si aquest es restableix, o permanent, si no s'aconsegueix restablir-lo ja sigui espontàniament o mitjançant l'acció terapèutica. Com a resultat de la manca de reg sanguini al cervell poden aparèixer tota una sèrie de símptomes neurològics com la afàsia, hemiparèsia, pèrdua de visió, vertígen, trastorns del llenguatge, entre d'altres, i l'aparició d'uns o altres dependrà de la zona de l'encèfal que estigui afectada. Aquests dèficits es podran recuperar o no segons l'evolució clínica del pacient i del tipus d'infart.

Aquesta malaltia suposa un càrrega molt important pel sistema sanitari ja que la seva incidència anual és d'uns 200 casos per cada 100.000 habitants el que suposa un cost sanitari que es calcula entre 3-4% del total. L'ictus, tot i no ser tant conegut com l'infart de miocardi o el càncer per la població en general, és la primera causa de mort en dones (19,038 morts, dades INE 2006) i la segona en homes a l'estat espanyol (13,849 morts, dades INE 2006). A més, és la primera causa d'incapacitat i invalidesa a llarg termini degut a les greus seqüeles sensitives i motores que deixa.

Els factors de risc que poden determinar l'aparició de la patologia són comuns amb d'altres malalties vasculares: hipertensió arterial, diabetis, dislipèmia, obesitat, tabaquisme, alcoholisme, sedentarisme, i la presència de malalties cardíaques com la fibril·lació auricular, entre d'altres. A més, també hi ha factors genètics que determinen una major susceptibilitat a patir un ictus. Síndromes com el CADASIL o la malaltia de Fabry representen formes monogèniques d'ictus, la gran majoria però, corresponen a formes poligèniques de la malaltia (Dominiczak and McBride, 2003). Recentment s'acaba de publicar el primer estudi únicament centrat en els infarts cerebrals, on els autors amb una cohort de 114.000 individus als que se'ls ha fet un seguiment durant 20 anys demostren que els participants

que prenen una dieta rica en fruita i verdura, feien exercici diàriament, no fumaven, mantenien un pes adequat i prenen quantitats moderades d'alcohol tenien fins a un 80% menys possibilitat de patir un ictus, sobretot isquèmic, que la resta de participants de l'estudi (Chiave et al., 2008), per tant, els hàbits i factors ambientals són determinants en aquesta malaltia.

1.1.1. Els subtipus d'ictus

Els ictus es poden classificar primerament segons si són el resultat de la interrupció del flux sanguini, sigui per una trombosi o un coàgul (anomenat ictus isquèmic), o bé si són el resultat del trencament d'una artèria cerebral que produeix un sagnat cap al parènquima encefàlic (anomenat ictus hemorràgic, Figura 1). A partir d'aquí els diferents subtipus d'ictus es poden classificar de diverses formes segons el territori vascular afectat, la durada de l'oclusió, l'etiologia i el mecanisme per el que es produeix l'ictus, entre d'altres.

L'ictus hemorràgic o hemorràgia cerebral apareix com a conseqüència del trencament

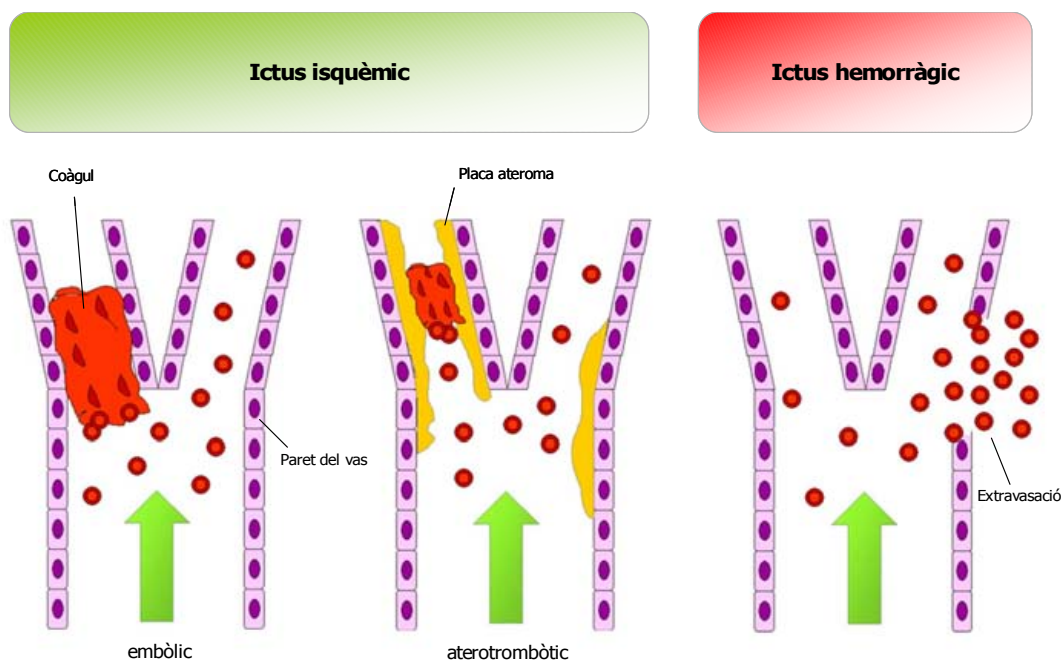


Figura 1. Esquema del mecanisme d'oclusió de l'artèria en l'ictus isquèmic o del trencament del vas en el ictus hemorràgic.

d'un vas sanguini, suposa un 10 - 20% del total dels ictus i té unes taxes de mortalitat molt altes. El seu pronòstic és molt dramàtic i malauradament no hi ha cap tractament farmacològic específic aprovat. El tractament indicat pels malalts que pateixen aquest subtipus d'ictus és el suport vital bàsic i únicament en alguns casos concrets la cirurgia per l'evacuació del coàgul. Tot i la gravetat de l'ictus hemorràgic, aquest subtipus d'ictus és el menys estudiat i es desconeixen molts dels mecanismes moleculars que intervenen en la seva fisiopatologia (Montaner J, 2005).

L'ictus isquèmic suposa aproximadament el 80% del total dels ictus que es produeixen. Aquest apareix com a conseqüència de la oclusió d'una artèria de calibre mitjà o gran mitjançant un mecanisme embòlic (per coàguls, generalment procedents del cor) o trombòtic (per plaques d'ateroma que redueixen la llum del vas i faciliten l'assentament de trombos).

En l'actualitat els ictus isquèmics es classifiquen segons la seva etiologia seguint els criteris TOAST (*Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*)(Adams et al., 1993). Després de l'anamnesi, l'exploració física i les exploracions complementaries necessaries, els ictus isquèmics es classifiquen en 5 subgrups:

1.- Infart aterotrombòtic. Aterosclerosi d'artèria gran. Infarts generalment mitjans o grans, de topografia cortical o subcortical i amb aterosclerosi de localització carotídia o vertebrobasilar.

2.- Infart cardioembòlic. Infarts generalment mitjans o grans, de topografia habitualment cortical i en el que hi ha evidència, en absència d'altra etiologia, d'alguna cardiopatia embolígena.

3.- Infart lacunar. Malaltia oclusiva de vas petit. Infarts petits (menys de 1.5 cm de diàmetre) en el territori d'una artèria perforant cerebral.

4.- Infart cerebral de causa inhabitual. Infarts petits, mitjans o grans, de localització cortical o subcortical, al territori carotidi o vertebrobasilar en un pacient en el que s'ha descartat l'origen aterotrombòtic, cardioembòlic o lacunar. Es solen produir per malalties sistèmiques (neoplàsies, infeccions, de coagulació,...) o per altres malalties (dissecció arterial, aneurismes, malformacions arteriovenoses,...).

5.- Infart cerebral d'origen indeterminat. Infarts petits, mitjans o grans, de localització cortical o subcortical, al territori carotidi o vertebrobasilar en un pacient en el que s'ha descartat (després d'un exhaustiu estudi diagnòstic) l'origen aterotrombòtic, cardioembòlic, lacunar o de causa inhabitual, o bé on hi ha més d'una possible etiologia. En aquest grup també s'inclouen els ictus d'origen indeterminat per estudi incomplet.

Aquesta deprivació del flux sanguini al parènquima cerebral produeix, si no es restableix el flux, que la zona directament irrigada per aquella artèria mori com a resultat de la isquèmia o oligohèmia prolongada. Aquesta zona es coneix com al centre de l'infart (*core* de l'infart). Al voltant d'aquesta zona es crea una zona hipoperfosa que està compromesa metabòlicament però que és potencialment salvable si s'aconsegueix reobrir l'artèria en un període curt; és el que es coneix com a zona de periinfart (per criteris anatòmics) o penombra (per criteris radiològics). Si el flux no es restableix, la zona de la penombra acabarà morint i contribuirà a l'expansió de l'infart. Existeixen uns tipus d'infarts, denominats malignes, en que la zona infartada formada per teixit necròtic provoca un gran edema, augmentant el volum i en conseqüència provocant un efecte de massa que s'associa amb una elevada mortalitat si no es prenen mesures, generalment quirúrgiques, per evitar l'herniació cerebral.

1.1.2. El tractament trombolític amb rt-PA

Actualment l'única opció terapèutica aprovada pel tractament de l'ictus isquèmic en la fase aguda és l'administració de l'activador recombinant del plasminogen tissular, el **rt-PA**. El rt-PA és un fibrinolític que junt amb el plasminogen endogen, forma un complex que s'uneix a la fibrina i la degrada dissolent l'èmbol i produint la recanalització de l'artèria. És important destacar que gairebé 12 anys més tard de que la FDA aprovés el tractament de l'ictus isquèmic menys del 5% del pacients es poden beneficiar de la teràpia en els països desenvolupats. Això es deu en la majoria dels casos als estrictes criteris d'inclusió (menys de 4.5 hores des de l'inici dels símptomes, pacients no tractats amb anticoagulants i sense cap evidència de complicacions hemorràgiques). Degut a aquesta estreta finestra terapèutica, molts pacients no poden ser tractats, en molts casos per problemes amb el transport sanitari i pel temps que es requereix per fer un diagnòstic complet (Hacke *et al.*, 2008). Desgraciadament, el rt-PA apart de dissoldre el coàgul també té efectes adversos com és l'increment del risc de patir transformacions hemorràgiques (TH) i efectes neurotòxics (Adibhatla and Hatcher, 2008). Un altre problema és la curta vida mitja del rt-PA a la sang en humans, que és únicament de 5-10 minuts, ja que el fàrmac s'uneix ràpidament a l'inhibidor de l'activador del plasminogen (PAI-1) i aquests complexos (t-PA/PAI-1) es degraden via hepàtica a través dels receptors *scavenger* LRP (*low-density lipoprotein receptor-related protein 1*) (Gravanis and Tsirka, 2008). Avui en dia s'estan fent esforços per tal de millorar el tractament amb rt-PA dissenyant noves molècules o provant teràpies combinades de rt-PA amb neuroprotectors o antioxidants. Si bé és cert que la majoria d'aquests assaigs clínics no estan tenint molt bons resultats. Un exemple d'això és el **Desmotiplase**, una forma recombinant de l'activador del plasminogen obtingut de saliva del ratpenat *Desmodus rotundus*. Aquest té una vida mitja en sang més llarga que el rt-PA (fins a 4 hores) i no té efectes neurotòxics (Lopez-Atalaya *et al.*, 2007). Tot i el potencial d'aquest fàrmac, l'assaig

clínic en fase III (DIAS-2) s'ha aturat ja que no s'ha demostrat cap benefici en termes de millora neurològica o supervivència. Pel que fa a la neuroprotecció, les conclusions de l'estudi SAINT II, amb un fàrmac antioxidant (NXY-059) tampoc han demostrat cap benefici pels pacients (<http://www.strokecenter.org/trials/>). Per tant, queda molt per fer encara per millorar el tractament trombolític i encara més en l'àmbit de la neuroprotecció.

Les **transformacions hemorràgiques** (TH) són uns dels efectes adversos del tractament trombolític més greus (Figura 2). En els pacients tractats amb rt-PA apareixen complicacions hemorràgiques simptomàtiques al voltant d'un 5% dels casos i això comporta una altíssima taxa de mortalitat.

Les TH apareixen com a conseqüència del debilitament de la paret vascular i de la làmina basal que conforma la BHE. La conseqüència d'aquest fet és la invasió de elements plasmàtics cap al parènquima cerebral. Les TH és detecten mitjançant el TAC i es classifiquen segons la seva extensió com s'explica a l'apartat 3.1.1. Mitjançant tècniques de neuroimatge, Lin i col·laboradors varen descriure que fins al 88% dels ictus isquèmics tenien incrementada la permeabilitat microvascular dins les 3 primeres hores després de l'inici dels símptomes (Lin *et al.*, 2007). A més, aquesta permeabilitat estava augmentada significativament en els pacients que més tard patien una TH, i per tant, això es podia

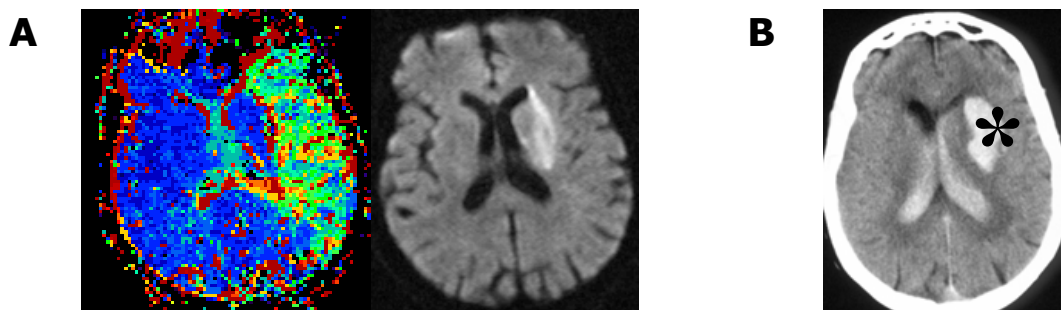


Figura 2. **A)** Imatge de RM amb tècniques de difusió i perfusió en que es mostra un extens defecte de perfusió i una lleugera alteració en la difusió en el territori de l'ACM esquerra abans del tractament trombolític. **B)** Imatge de TAC que mostra l'aparició d'un sagnat (*) després del tractament amb rt-PA.

considerar com un paràmetre predictor de TH tant en els pacients tractats o no amb rt-PA.

L'experiència mostra però que pacients molt semblants, amb el mateix tipus d'oclusió, amb el mateix perfil de factors de risc i que són tractats igualment dintre del període de la finestra terapèutica, alguns pateixen TH i d'altres no. Sembla evident, per tant, que hi ha tot un conjunt de factors individuals que determinen les diferències en la resposta al tractament, l'aparició de TH, el creixement de l'infart o l'evolució neurològica.

La identificació dels patrons moleculars i fisiològics subjacents que determinen aquestes diferències pot contribuir a millorar l'eficàcia i la seguretat en l'administració del tractament trombolític. Aquest és un camp que en l'actualitat està sent objecte de recerca i aquesta Tesi, vol contribuir al millor coneixement tant de la malaltia com de la resposta del malalt al tractament.

1.2. Models experimentals de la malaltia

La major part del coneixement actual de la patologia cerebrovascular es deu als estudis experimentals que han ajudat a entendre millor els mecanismes fisiopatològics que contribueixen al desenvolupament d'aquesta malaltia. En el cas de l'ictus la necessitat d'aquests tipus de models és fonamental degut al caràcter agut de la malaltia i òbviament per la limitada accessibilitat al cervell humà.

Els models experimentals es poden agrupar en dos tipus bàsicament: els models *in vivo* que es fan amb animals i que permeten reproduir d'una forma bastant precisa la patologia humana i per una altra banda existeixen els models *in vitro*, si bé menys semblants a la patologia humana, permeten fer estudis a nivell més molecular de la patologia.

1.2.1. Models *in vivo*

Els models amb animals s'han utilitzat des de fa temps per l'estudi de la isquèmia cerebral. Tot i les diferències evidents entre les espècies, l'anatomia i fisiologia dels vertebrats superiors es prou semblant per poder reproduir en aquests animals condicions de isquèmia cerebral experimental que reproduueixen el procés que succeeix a l'humà. Tot i que s'han fet estudis en tot tipus d'animals com porcs, conills o primats no humans, els més utilitzats són els rosegadors pel seu baix cost, facilitat de maneig i per una millor acceptació ètica. Fonamentalment hi ha dos tipus de models d'isquèmia cerebral segons el territori vascular que s'alteri experimentalment:

- **Isquèmia global.** Aquests models es basen en l'oclusió de les grans artèries que irriguen l'encèfal. Existeixen diversos models per aconseguir aquesta reducció del flux cerebral de forma global (en ambdós hemisferis) tot i que els més utilitzats són el model dels quatre

vasos en el que s'oclouen les artèries vertebrals i les caròtides comuns (Pulsinelli and Brierley, 1979; Pulsinelli and Buchan, 1988) o el model dels dos vasos en el que solament s'oclouen les artèries caròtides comuns (Smith *et al.*, 1984). La isquèmia global provoca un tipus de lesió característica que afecta de forma selectiva principalment a l'hipocamp (a la regió CA1 principalment), caudoputamen i al neocòrtex. Alguns d'aquests tipus de models són quirúrgicament senzills i els animals presenten una mortalitat relativament baixa (McBean and Kelly, 1998).

- **Isquèmia focal.** Aquest model reproduceix millor els accidents cerebrovasculars humans, ja que la major part dels ictus isquèmics es deuen a tromboembolismes intracranials (gairebé el 80%). Existeixen diverses modalitats per aconseguir aquesta isquèmia focal, és a dir, que afecti únicament a un hemisferi cerebral. Tot i la diversitat, la gran majoria de models oclouen l'artèria cerebral mitja (ACM), bé sigui mitjançant lligament, per sutura o filament de niló, amb coàguls, etc (Longa et al., 1989). Cada un d'aquests models té uns avantatges i desavantatges, i l'elecció d'un o altre dependrà del tipus d'estudi que es vulgui realitzar. En general aquests models són més complexos quirúrgicament que els models d'isquèmia global i la mortalitat és més alta ja que és més fàcil l'aparició de complicacions durant la cirurgia. A més el territori afectat per aquest tipus de model correspon al territori vascular de l'ACM que comprén inicialment la zona de l'estriat i en temps d'oclusió més llargs el còrtex arribant finalment a infarts hemisfèrics totals (en el cas d'oclusions proximals) o únicament el còrtex (en el cas d'oclusions distals).

Una característica també important d'ambdós models és el caràcter de la durada de la isquèmia. Així hi haurà models d'**isquèmia permanent** si l'oclusió de les artèries es manté fins el moment del sacrifici dels animals, o els models d'**isquèmia transitòria** si es desfà l'oclusió de les artèries permetent la reperfusió de l'àrea cerebrovascular afectada.

1.2.2. Models *in vitro*

Com ja hem comentat abans, aquest tipus de models difereixen molt de la patologia humana però la utilitat dels mateixos per fer subestudis de tipus molecular com ara estudiar mecanismes de regulació, vies de senyalització i per valorar tractaments sobre la resposta *in vitro* enfront a estímuls isquèmics és notòria.

La isquèmia *in vitro* es simula mitjançant la deprivació d'oxigen i glucosa (**OGD**) (Goldberg and Choi, 1993) tot i que hi ha models on només es depriva d'oxigen o de glucosa. Per aconseguir això, els cultius s'incuben en cambres anaeròbies on es pot eliminar l'oxigen atmosfèric (o mantenir per sota del 0.5%) i on es mantenen els cultius amb una atmosfera generalment del 95% N₂ i 5% CO₂. A més, el medi de cultiu es substitueix per medis basals o tampons sense glucosa ni suplementes.

De la mateixa manera que en el cas dels models en animals, els models *in vitro* presenten un ventall de possibilitats molt gran segons el tipus de cultius utilitzats (cultius primaris, línies cel·lulars, cultius tissulars o organotípics) i els tipus cel·lulars cultivats (neurones, mixte d'astròcits i neurones, astròcits, endotelials, musculars llises, oligodendròcits,...).

Els temps que aquests cultius es mantindran sota condicions anòxiques i sense glucosa dependrà dels tipus de cultius, assegurant sempre unes condicions subletals. De la mateixa manera que en els models animals, aquest models *in vitro* també podran ser permanents, si els cultius s'aturen després d'acabar el període d'hipòxia, o transitoris, si els cultius es retornen a les condicions d'oxigen i nutrients anteriors a la OGD per simular una reperfusió *in vitro*.

Així per tant, qualsevol dels models anteriors és bàsic i imprescindible per l'estudi i el coneixement de la patologia cerebrovascular; si bé és cert que hi ha encara una manca d'estudis que combinin les troballes fetes en els models (*in vivo*, *in vitro* o ambdós) amb estudis en humans i viceversa.

1.3. La Cascada isquèmica i la Neuroinflamació en l'àmbit subcel·lular

La interrupció del flux sanguini al parènquima cerebral provoca una privació de glucosa i oxigen necessaris per a la producció d'energia. Si la situació isquèmica persisteix en el temps, es desencadena una primera mort neuronal massiva en el conegut com a *core* de l'infart que pot acompanyar-se d'una mort secundària en les zones perifèriques a aquest.

Si bé històricament, la neurona ha estat considerada com la cèl·lula més important dintre del SNC, en els últims anys ha crescut el reconeixement de la importància de les interaccions de les múltiples cèl·lules que formen el parènquima cerebral en el concepte que s'ha denominat “**Unitat Neurovascular**”. La unitat neurovascular conceptualment emfatitza les relacions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu dels diferents tipus cel·lulars. La unitat fonamental compren la neurona, l'astròcit i l'endoteli, però també els oligodendròcits i els feixos d'axons de la substància blanca (Hawkins and Davis, 2005; Lo et al., 2004). Tenint en compte aquestes consideracions, durant el procés de la isquèmia cerebral serà important diferenciar i entendre la diferent aportació de les cèl·lules autòctones del propi parènquima cerebral, interconnectades formant la unitat neurovascular, a més de les interaccions amb la matriu extracel·lular i d'una forma determinant amb les cèl·lules que s'infiltraran al teixit des del torrent sanguini durant la fase inflamatòria de la malaltia.

Així, després de l'oclusió d'una artèria cerebral, en primera instància, la impossibilitat de produir ATP comporta la impossibilitat de mantenir la homeòstasi iònica. Les primeres cèl·lules afectades per aquesta manca d'oxigen són les **neurones**. Aquestes, despolaritzen (creen potencials d'acció) en un procés conegut com despolarització anòxica i alliberen glutamat a la sinapsi (Turley et al., 2005). El glutamat s'uneix als seus receptors postsinàptics, com el receptor N-Metil D-Aspartat (NDMA), provocant un increment en el flux de sodi i calci i la corresponent despolarització de les neurones postsinàptiques (Chen et al.,

2002; Ovbiagele et al., 2003). A més, s'interfereix la recuperació del glutamat (principalment per **astròcits**), provocant una acumulació anormal d'aquest en l'espai sinàptic. Això porta a un augment intracel·lular prolongat de Ca^{2+} i com a conseqüència, al catabolisme de molècules imprescindibles per la cèl·lula. En conclusió es produeix la mort irreversible de les neurones per mecanismes que impliquen proteïnes dependents de Ca^{2+} com ara les calpaines, fosfolipasa cel·lular A2, cinases o endonucleases. Aquesta acumulació de Ca^{2+} produeix també radicals lliures mitjançant l'activació de vies pro-oxidatives que condueixen a l'acumulació d'òxid nítric (NO). La combinació de NO en excés amb altres molècules forma radicals lliures secundaris, com l'anió peroxinitrit (ONOO⁻), que actuen inhibint la calci ATPasa i com a resultat, s'incrementa encara més la concentració de Ca^{2+} intracel·lular provocant la mort d'aquestes cèl·lules (Zukin RS, 2004). A més, el calci pot entrar a la mitocòndria i interrompre la cadena de transport d'electrons i col·lapsar el potencial de membrana (Rego et al., 2000; Zhang et al., 1990). Si a més es produeix la reperfusió, els electrons lliures que s'acumulen a la mitocòndria reaccionen amb l'oxigen promovent la producció de més radicals lliures com el superòxid (Zhang et al., 1990) que provoca dany en l'ADN incitant a la cèl·lula a activar les vies d'apoptosi dins l'anomenat dany per reperfusió.

La inflamació és un mecanisme de dany secundari que es produeix també després de la isquèmia (Figura 3). Molts factors de transcripció s'activen per la hipòxia, tals com el factor nuclear κB (NF- κB), el factor induïble per hipòxia (HIF-1), el factor regulador d'interferó, etc. Aquests factors activen citocines com el factor de necrosi tumoral (TNF- α), interleucines o interferons, que indueixen l'expressió d'òxid nítric sintasa en **astròcits** i **micròglia** augmentant la producció de més radicals lliures (Merrill et al., 1997; Murphy et al., 1993). La micròglia, les cèl·lules inflammatòries residents del cervell, s'activa aviat en resposta als atacs isquèmics causant una explosió de citocines pro-inflamatòries. Els

mediadors locals d'inflamació indueixen l'expressió de molècules d'adhesió (VCAM, ICAM, etc.) en la superfície de les **cèl·lules endotelials** que constitueixen, juntament amb la glia, els **perícits** i la làmina basal, la barrera hematoencefàlica (BHE). Al mateix temps, les citocines pro-inflamatòries actuen directament sobre les cèl·lules endotelials provocant un increment de la permeabilitat de la BHE. Aquest procés fa possible que les cèl·lules de la

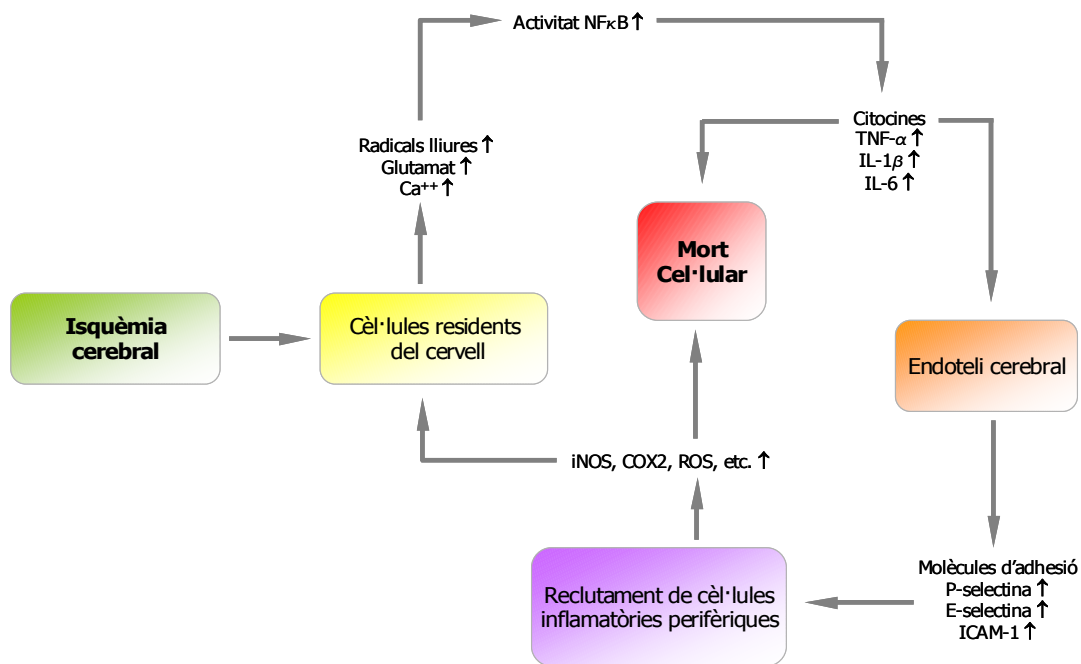


Figura 3. Esquema dels principals canvis cel·lulars i moleculars durant la resposta inflamatòria post-isquèmica. Adaptat de Zheng *et al.* 2004.

sang perifèrica puguin unir-se a l'endoteli, travessar la BHE i finalment migrar cap al teixit cerebral compromès (Zheng and Yenari, 2004). La migració de **leucòcits** (principalment **neutròfils**) a la zona infartada suposa un pas crític en la cascada isquèmica on juguen un paper clau les metal·loproteïnases de matriu (MMPs) com explicarem més detalladament en el següent apartat.

Les primeres cèl·lules en ser reclutades són els neutròfils (ja en les primeres hores post-isquèmica), seguides dels **monòcits**, **macròfags** i **limfòcits**. Diferents estudis demostren com aquesta infiltració de cèl·lules incrementa el dany tissular en la fase aguda i facilita, a més, l'alliberament i producció de més radicals lliures i proteases (MMPs entre d'altres),

tant per part dels leucòcits infiltrants com per part d'algunes cèl·lules del sistema nerviós (Akopov et al., 1996).

Per tant, com a conseqüència de la resposta inflamatòria post-isquèmia, es produeix l'activació d'alguns sistemes de proteòlisi i remodelació de la matriu extracel·lular (Fukuda et al., 2004), un augment de la permeabilitat de la BHE per efecte citotòxic sobre les cèl·lules endotelials i un augment de l'edema cerebral. En conjunt s'agreuja el dany tissular inicial i activa, a més, processos d'apoptosi que condueixen a una mort neuronal secundària (Ferrer et al., 2003).

És important destacar també la diferència entre el nucli isquèmic i la zona al voltant del mateix que es coneix com a **penombra isquèmica**. En la penombra les cèl·lules estan intactes però es troben metabòlicament inactives (Astrup et al., 1981). Els factors que determinaran que la penombra progressi o no cap a l'infart són el grau de circulació col·lateral, la durada de la isquèmia i l'estat funcional i metabòlic previs de les cèl·lules. Des del punt de vista clínic, la penombra és la diana més rellevant ja que és la única zona potencialment salvable a la fase aguda.

En la isquèmia cerebral es produeix la interacció de processos tant importants com la necrosi, apoptosi, angiogènesi, proliferació, inflamació, etc. És per tant un sistema complex en el que el patró de la expressió espai-temporal de les diferents molècules pels diferents tipus cel·lulars determinarà l'evolució de l'infart, i per tant, del pacient. Els mecanismes implicats són tants i tan complexos que cal fer un estudi més detallat a nivell cel·lular/subcel·lular; eines com els **microscopis de microdissecció làser (LMD)** aporten una nova possibilitat per l'estudi de les diferents cèl·lules implicades en la patologia, permetent discernir la producció de cada tipus cel·lular i per tant, la seva rellevància en l'aportació al *pool* molecular que segueix a la isquèmia cerebral.

1.4. Les Metal·loproteïnes de Matriu

Les MMPs són una família d'endopeptidases zinc-dependents que poden degradar diferents substrats que formen part de la matriu extracel·lular. Les MMPs comprenen una família d'uns 25 membres, dels quals se'n han descrit 24 en mamífers (Ra and Parks, 2007) (Taula 1).

1.4.1. L'estructura i classificació de les MMPs

Tot i que estructuralment hi ha diferències entre els diferents membres de la família, totes les MMPs comparteixen una sèrie de dominis (veure Figura 4):

- El **domini propèptid** (N-terminal), d'uns 80 aminoàcids, que té una seqüència d'aminoàcids consens PRCXXPD (menys a la MMP-23). La cisteïna d'aquesta seqüència lliga al zinc catalític per mantenir la latència de pro-MMPs.
- El **domini catalític**, d'uns 170 aminoàcids, que conté el motiu d'unió a zinc HEXXHXXGXXH (MMP-7 i MMP-26 no tenen aquesta estructura) i una metionina conservada que forma una estructura única coneguda com a “*Met-turn*”. El domini catalític conté un ió zinc i 2-3 ions calci que es requereixen per l'estabilitat i l'expressió de l'activitat enzimàtica.
- El **domini hemopexina** (C-terminal), d'uns 210 aminoàcids, connecta amb el domini catalític (menys a MMP-23) a través d'una seqüència frontissa (*hinge*).

Totes les MMPs es sintetitzen com **zimògens** (enzims inactius) i tenen una seqüència senyal (necessària per a la secreció) en el fragment N-terminal i un domini propeptídic que cal eliminar per poder esdevenir actives (Nagase and Woessner, 1999). A més, existeix

també un **domini transmembrana** en un grup de MMPs anomenades MT-MMPs que els serveix per ancorar-se a la membrana plasmàtica. MMP-9 i MMP-2, de les que parlarem extensament més endavant, tenen 3 dominis repetitius tipus fibronectina II rics en cisteïnes dins del domini catalític que permeten la unió i degradació de la gelatina.

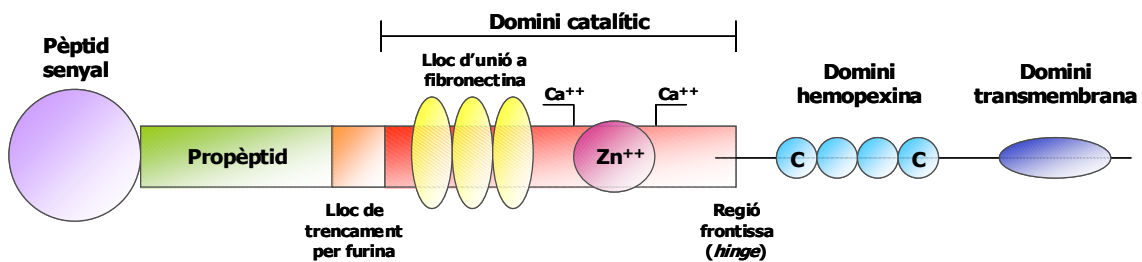


Figura 4. Esquema de l'estructura i dominis d'una MMP arquetípica. Adaptat de Rosenberg, 2002.

Clàssicament les MMPs es van dividir segons l'especificitat de substrat en col·lagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), gelatinases (MMP-2, MMP-9), estromelisines (MMP-3, MMP-10, MMP-11), metal·loelastases (MMP-12) i matrilisines (MMP-7, MMP-26). Però degut a la superposició de funcions i a la creixent descripció de nous substrats, en l'actualitat s'ha adoptat una nova classificació en funció de les característiques estructurals, però es segueix mantenint l'antiga classificació (Overall and Lopez-Otin, 2002).

1.3.2. L'activació de les MMPs

L'activació de les MMPs es produeix pel trencament del pont d'unió entre el domini propèptid i el domini catalític. Aquesta activació es pot produir per diferents mecanismes. D'una forma anàloga a altres pro-proteïnes, la proteòlisi directa es considera la via principal per la que les proMMPs són activades. Una tercera part de les MMPs – incloent les MT-MMPs – contenen una seqüència RXKR o RRKR entre el prodomini i el domini catalític, que serveix com a diana per convertases o furines (Ra and Parks, 2007). Estudis *in vitro* han

Taula 1. Llistat dels membres de la família de les MMPs i els seus principals substrats.

	Nom	Localització	Substrats
MMP1	Col-lagenasa intersticial	secretada	Col-làgens I, II, III, VII i X, gelatina, agrecan, versican, caseïna, MMP-2, MMP-9
MMP2	Gelatinasa-A	secretada	Col-làgens I, IV, V, VII, X, XI i XIV, gelatina, elastina, fibronectina, agrecan, versican, proteoglicans.
MMP3	Estromelisina 1	secretada	Col-làgens III, IV, IX i X, gelatina, agrecan, versican, perlecan, nidògen, proteoglicans, fibronectina, laminina, elastina, caseïna, fibrinogen.
MMP7	Matrilisina, PUMP 1	secretada	Col-làgens IV i X, gelatina, agrecan, proteoglicans, fibronectina, laminina, entactina, elastina, caseïna.
MMP8	Col-lagenasa de neutròfil	secretada	Col-làgens I, II, III, V, VII, VIII i X, gelatina, agrecan, α 2-antiplasmina, fibronectina.
MMP9	Gelatinasa-B	secretada	Col-làgens IV, V, VII, X i XIV, gelatina, elastina, agrecan, versican, proteoglicans, fibronectina, nidògen.
MMP10	Estromelisina 2	secretada	Col-làgens III, IV i V, gelatina, caseïna, agrecan, elastina, proteoglicans, fibronectina.
MMP11	Estromelisina 3	secretada	inhibidor proteïnasa α 1
MMP12	Metal-loeslastasa de macròfag	secretada	Col-lagen IV, gelatina, elastina, inhibidor proteïnasa α 1, fibronectina, vitronectina, laminina.
MMP13	Col-lagenasa 3	secretada	Col-làgens I, II, III i IV, gelatina, PAI 2, agrecan, perlecan, tenascin.
MMP14	MT1-MMP	ancorada a membrana	Col-làgens I, II i III, gelatina, caseïna, elastina, fibronectina, laminina, vitronectina, agrecan.
MMP15	MT2-MMP	ancorada a membrana	MMP-2, gelatina, fibronectina, tenascina, nidògen, laminina.
MMP16	MT3-MMP	ancorada a membrana	MMP-2.
MMP17	MT4-MMP	ancorada a membrana	MMP-2, gelatina
MMP18	Col-lagenasa 4	-	Col-lagen I.
MMP19	RASI-1	-	Col-lagen IV, gelatina, laminina, nidògen, tenascin, fibronectina, agrecan.
MMP20	Enamelisina	secretada	Amelogenina.
MMP21	X-MMP	secretada	Desconeguts.
MMP23A	CA-MMP	ancorada a membrana	Gelatina.
MMP23B	-	ancorada a membrana	Desconegut.
MMP24	MT5-MMP	ancorada a membrana	MMP-2, MMP-9, gelatina.
MMP25	MT6-MMP	ancorada a membrana	Col-lagen IV, gelatina, fibronectina, fibrina.
MMP26	Matrilisina-2	-	Col-lagen IV, fibronectina, fibrinogen, gelatina.
MMP27	MMP-22, C-MMP	-	Gelatina, caseïna.
MMP28	Epilisina	secretada	Caseïna.

demonstrat que un gran nombre de MMPs poden tallar el prodomini d'altres proMMPs i, per tant, activar-les. S'ha suggerit que les MMPs actives poden dirigir el pas proteolític per produir enzims completament actius en molts casos (Nagase, 1997). És ben coneguda l'activació de proMMP-1 o proMMP-7 per MMP-3 (Imai et al., 1995; Ito and Nagase,

1988), o l'activació proteolítica independent de furina de proMMP-2 per part de MMP-14 (Hernandez-Barrantes et al., 2000).

Molts estudis han especulat que les serinproteases, i particularment la plasmina, són activadors de proMMPs *in vivo*, incloses algunes MMPs activades per furina. Hi ha un gran nombre d'estudis sobre el tema, molts d'ells amb resultats contradictoris on hi ha autors que creuen que la plasmina és un activador important de moltes MMPs i d'altres que creuen que la presència d'aquesta és purament circumstancial.

Finalment, també s'ha descrit com algunes proMMPs poden ser activades *in vitro* per espècies reactives d'oxigen, radicals lliures, que poden modificar el grup cisteïna-tiol i activar les proMMPs mitjançant autòlisi (Ra and Parks, 2007), encara que el paper real d'aquestes espècies reactives en l'activació de MMPs *in vivo* encara no s'ha establert.

L'activitat catalítica de les MMPs és regulada basicament a quatre nivells: en l'expressió gènica, en la compartimentalització, en l'activació del zimogen i en la inhibició de l'activitat enzimàtica.

1.3.3. La inhibició de les MMPs

Les MMPs tenen uns inhibidor endògens que es coneixen com a **TIMPs** (*Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteases*). Els TIMPs són una família de 4 proteïnes (TIMP-1, -2, -3, -4) de baix pes molecular (20-29 kDa) secretades per diferents tipus cel·lulars amb una elevada afinitat per les MMPs *in vitro*, que bloquegen la seva capacitat proteolítica (Brew et al., 2000). Hi ha altres proteïnes que es coneix que poden inhibir les MMPs, entre aquestes possiblement la més coneguda és la **α_2 -macroglobulina**. Aquesta és una proteïna inhibidora d'ampli espectre que atrapa els enzims actius de diferents classes de la circulació

i és internalitzada, entre d'altres, pels receptors *scavenger* dels macròfags (Fu et al., 2008). Recentment s'ha descrit una glicoproteïna de membrana, el **RECK**, que s'ha vist que pot inhibir MMP-2, -9 i -14 (Oh et al., 2001). A més, l'endocitosi per part del receptor de lipoproteïnes de baixa densitat (LRP) també es pot considerar un mecanisme de regulació de l'activitat. De fet s'ha descrit com MMP-2, -9, -13 i -14 són endocitades via LRP (Barmina et al., 1999; Hahn-Dantona et al., 2001; Van den Steen et al., 2006; Yang et al., 2001) el que es pot considerar com un mecanisme de silenciament.

Les MMPs participen en una gran varietat de processos fisiològics com són el desenvolupament embrionari, l'ovulació, el remodelament endometrial i ossi o l'angiogènesi entre d'altres. També però, s'ha descrit que juguen un paper clau en patologies com el càncer, l'aterosclerosi, la retinopatia diabètica, l'artritis o la neuroinflamació. És precisament en el camp de l'oncologia on més avenços hi ha hagut i el que més ha contribuït al coneixement d'aquestes proteïnes donada la seva importància en la metastasi.

Des de fa uns 15 anys s'ha descrit també com aquestes MMPs poden ser determinants en malalties neuroinflamatòries com són l'esclerosi múltiple o l'ictus. En el següent apartat aprofundirem sobre la relació entre les MMPs i la isquèmia cerebral.

1.5. Les Metal·loproteïnases en la isquèmia cerebral

Com hem vist, a la fase aguda de la isquèmia cerebral es produeix una davallada energètica per la manca de glucosa i oxigen que provoca l'activació de vies metabòliques i de senyalització que promouran la mort del teixit de l'infart d'una forma ràpida si no s'aconsegueix reestablir el flux sanguini. Aquest conjunt de processos que coneixem com a cascada isquèmica i que van des de l'excitotoxicitat, l'estrés oxidatiu, l'apoptosi, la inflamació i la necrosi conduiran a una mort neuronal primerenca i a un debilitament de la barrera hematoencefàlica (BHE). A més, a la fase crònica de la isquèmia s'activaran tota un sèrie de processos per tal de recuperar aquesta zona de teixit danyat, processos que van des de la cicatrització (gliosi) a la neovascularització (angiogènesi, vasculogènesi) o la neurogènesi. Com veurem aquí, les MMPs juguen un paper fonamental tant a la fase aguda com a la fase crònica de l'ictus. Les MMPs poden contribuir al dany neuronal i vascular, al creixement de l'infart i a l'aparició d'hemorràgies durant la fase hiperaguda, mentre que durant les fases tardanes després d'un ictus podrien ajudar en els processos de reparació i modulació de la plasticitat neurovascular. Quines MMPs participen en cada un d'aquests processos i si tenen diferents funcions en els diferents temps després d'un esdeveniment isquèmic és quelcom que encara es desconeix.

Durant els últims anys els investigadors d'arreu han utilitzat diferents models *in vivo* i *in vitro*, com ja hem comentat anteriorment, per tal d'estudiar la isquèmia cerebral. És clar que aquestes aproximacions difereixen molt de la realitat del pacient amb ictus, però han servit i serveixen per entendre la patologia, i han permès conèixer, almenys en part, la importància d'aquestes proteases en molts dels esdeveniments que succeeixen en un infart cerebral.

1.5.1. MMPs en la fase aguda de la isquèmia cerebral

Neurones, astròcits, oligodendròcits, micròglia i cèl·lules endotelials són totes capaces d'expressar MMPs i TIMPs després d'un dany, tot i que les regions cerebrals, les espècies MMP/TIMP i les fonts cel·lulars de l'expressió podrien variar segons el tipus específic d'infart isquèmic (Rosenberg and Mun-Bryce, 2004).

L'expressió anormal de MMPs s'ha vist en models animals d'isquèmia cerebral en ratolí, rata i babuïns. En aquests models s'ha descrit com s'augmenta l'expressió de **MMP-2** i **MMP-9** al cervell després de la isquèmia (Gasche et al., 1999; Heo et al., 1999; Mun-Bryce and Rosenberg, 1998; Rosenberg et al., 1996). A més, s'ha vist que tant MMP-2 com MMP-9 s'activen després d'una isquèmia tant permanent (Gasche et al., 1999; Romanic et al., 1998) com transitòria (Heo et al., 1999; Planas et al., 2000). Als humans s'ha vist que els nivells plasmàtics de MMP-9 s'associen amb el dèficit neurològic i el volum de l'infart (Montaner et al., 2001). Finalment, estudis en teixit cerebral post-mortem de pacients que han patit un ictus també mostren uns nivells incrementats de MMP-2 i MMP-9 (Clark et al., 1997; Rosell et al., 2006). El increment dels nivells o activitat d'aquestes proteases no demostren cap causalitat ni implicació en la patologia *per se*, però estudis en animals tractats amb anticossos monoclonals contra MMP-9 (Romanic et al., 1998), inhibidors generals de MMPs com BB-94 (batimastat) o l'experimentació amb animals deficients (*knock-out*) per *Mmp-9* (Asahi et al., 2000) mostren com aquests tenen uns volums de lesions isquèmiques inferiors als animals salvatges (*wild type*) o no tractats. A més s'ha arribat a postular, per exemple, que la inhibició de MMP-9 no únicament redueix la mida de l'infart (Figura 5) sinó que a l'inhibir el trencament de la laminina és capaç de rescatar a les neurones de l'apoptosi (Gu et al., 2005).

Si bé el grup de les gelatinases (MMP-2 i MMP-9) és el més estudiat en la isquèmia cerebral, també s'han descrit altres proteases que estan alterades després d'un infart cerebral. La

MMP-3 i la **MMP-13** s'han vist activades en rates en un model transitori després de la reperfusió (Nagel et al., 2005; Rosenberg et al., 2001). La **MMP-7** s'ha detectat en lesions cròniques en estudis post-mortem en pacients d'ictus (Anthony et al., 1997). Tot i així, la família de les MMPs és molt nombrosa (veure apartat 1.3.) i, per tant, n'hi poden haver moltes més d'implicades i que juguin un paper clau.

A nivell cel·lular, la MMP-9 s'ha trobat a l'espai extracel·lular, als vasos, als neutròfils i a algunes neurones dins de l'àrea

infartada. La MMP-2 es troba bàsicament als vasos sanguinis i la

MMP-3 es troba a neurones i micròglia

però també en els perícits al voltant

dels vasos sanguinis (Rosenberg,

2002). La MMP-7 apareix en

cèl·lules inflamatòries (Anthony et al., 1997) i la MMP-13 en neurones (Nagel et al., 2005).

Com ja hem dit, les MMPs es produeixen a les cèl·lules i es secreten o s'ancoren a la membrana d'aquestes. Recentment però, han anat sorgint treballs on es descriu una localització inesperada per les MMPs com és al nucli cel·lular (Amantea et al., 2007; Gasche et al., 2001). Aquest autors veien com després d'una isquèmia focal transitòria en rosegadors es produïa un increment de l'activitat gelatinasa/col·lagenasa *in situ* (atribuïda a les MMPs, veure apartat 3.4.2.) dins del nucli, de cèl·lules majoritàriament identificades com neurones. Si bé encara no s'ha identificat cap MMP responsable per aquesta activitat ni es comprèn quin paper poden jugar les MMPs dins del nucli cel·lular després d'un atac isquèmic.

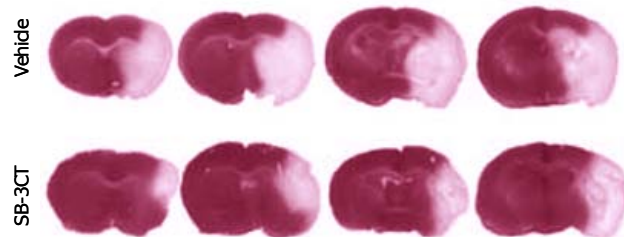


Figura 5. Seccions de cervells de ratolí tenyides en TCC (veure apartat 3.2.2). El tractament amb SB-3CT (un inhibidor de MMP-9) redueix el dany cerebral (infart en blanc) i millora l'evolució neurològica en ratolins sotmesos a una isquèmia cerebral focal transitòria (Gu et al., 2005).

1.5.2. MMPs i el trencament de la BHE: aparició d'hemorràgies cerebrals

Com ja hem explicat anteriorment, una de les complicacions més greus de la isquèmia cerebral és l'aparició d'hemorràgies intracranials. Aquestes poden aparèixer tant de forma espontània com després del tractament trombolític amb rt-PA. Molts estudis bioquímics suggereixen que el trencament de la BHE i les conseqüents transformacions hemorràgiques (TH) poden ser el resultat de l'acció de diferents proteases, entre d'elles les MMPs.

Així, estudis experimentals mostren com la injecció intracranial directa de la MMP-2 s'ha vist que provoca l'obertura de la BHE amb la subseqüent hemorràgia al voltant dels vasos sanguinis i que la co-administració de TIMP-2 però, inhibeix aquesta resposta (Rosenberg et al., 1992). L'elevació de MMP-2 en les etapes primerenques del dany cerebral s'ha descrit en rosegadors i primats no humans (Chang et al., 2003; Yang et al., 2007). En primats s'ha descrit com la permeabilització de la BHE es correlacionava amb l'augment de l'expressió de MMP-2, mentre que l'aparició de THs s'associava a un increment de MMP-9 (Chang et al., 2003; Heo et al., 1999). La segona fase del dany a la BHE s'associa amb una elevació de MMP-9, possiblement per l'acció de gens de resposta immediata o del HIF (Candelario-Jalil et al., 2008). L'activació de MMP-9 produïda per astròcits pot ser facilitada per la MMP-3 produïda per astròcits reactius i micròglia (Cunningham et al., 2005).

L'efecte de l'activació de les MMPs és la degradació de components de la làmina basal que incrementa la permeabilitat vascular. A més, apart de la làmina basal, la integritat de la BHE depèn de proteïnes estructurals que conformen les unions estretes endotelials (*tight junctions*) com són les claudines i les ocludines (Figura 6). La Claudina-5, per exemple, és degradada per MMP-2 i mentre a les 3 hores de la reperfusió encara n'hi ha, 24 hores més tard desapareix completament dels vasos i comença a desaparèixer dels astròcits del voltant. A més, el tractament amb BB-1101 (un inhibidor de MMPs) reverteix aquest efecte (Yang et al., 2007). Diversos estudis han demostrat que el tractament amb inhibidors de MMPs (BB-

94, BB-1101,...) o anticossos neutralitzants de MMPs redueixen el trencament de la BHE (Asahi et al., 2000; Romanic et al., 1998; Rosenberg et al., 1998). Per una altra banda, animals deficients per *Mmp-9*, encara que no els animals deficients per *Mmp-2*, també mostren una atenuació en el trencament de la BHE (Asahi et al., 2000; Asahi et al., 2001a; Asahi et al., 2001b). Apart de les cèl·lules residents del cervell, els neutròfils quan s'infiltra també alliberen MMPs i citocines pro-inflamatòries que amplifiquen la resposta neuroinflamatòria, augmentant el dany a la BHE i promovent l'aparició de THs

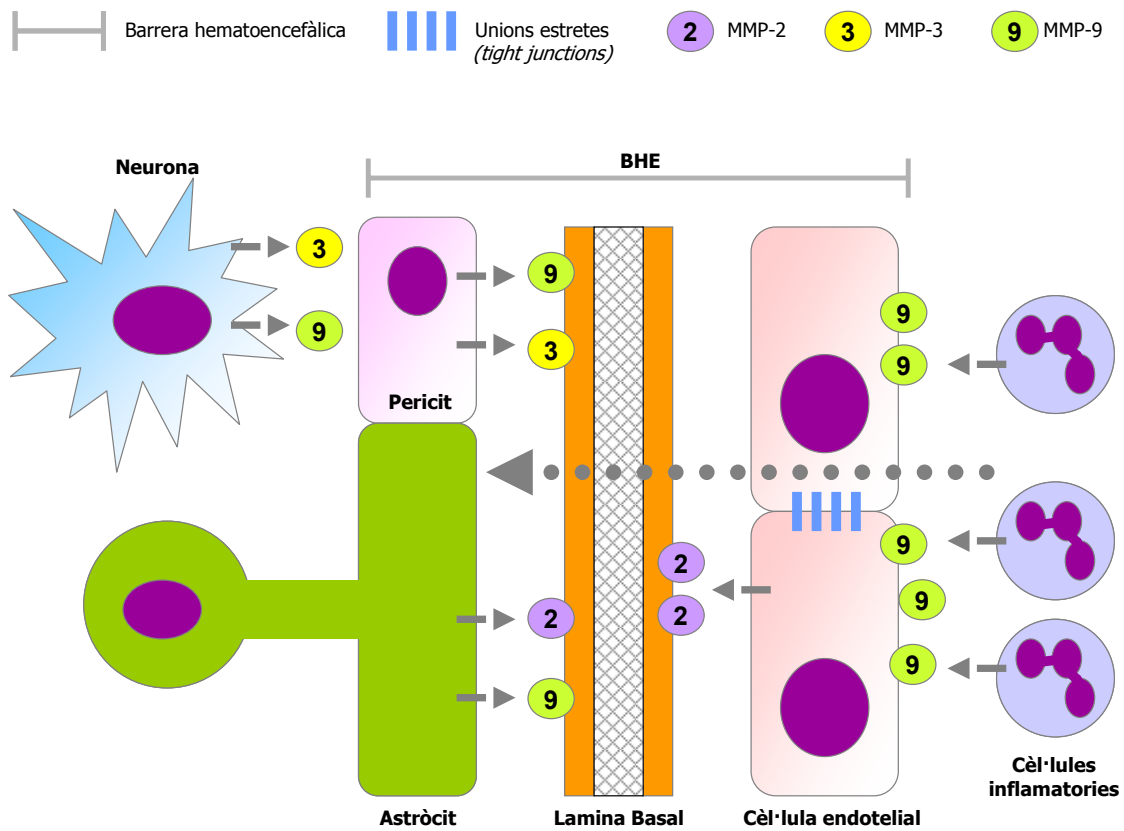


Figura 6. Coneixement actual del paper de les MMPs en la isquèmia cerebral i en la degradació de la BHE. Esquema adaptat i modificat de Rosenberg, 2002.

(Rosenberg, 2002). Estudis en animals han demostrat com la infiltració de neutròfils al cervell isquèmic contribueix a la resposta inflamatòria tissular alliberant MMP-9 (Justicia *et al.*, 2003).

Aquests fenòmens succeeixen de forma natural com a resposta a la isquèmia, però si a més afegim la resposta cel·lular induïda pel tractament amb rt-PA, les conseqüències poden ser

greus. Estudis *in vitro* han demostrat com el rt-PA promou l'increment de MMP-2 i MMP-9 de forma dosi dependent en cultius d'astròcits corticals de rata (Lee et al., 2007) i en cultius de cèl·lules endotelials de la microvasculatura cerebral (Wang *et al.*, 2003). En humans s'ha vist com els pacients que reben rt-PA tenen els nivells de MMP-9 més alts en plasma (Ning et al., 2006). A la vegada s'ha vist com els nivells plasmàtics de MMP-9 es correlacionen amb l'aparició de THs i hemorràgies intracranials a pacients d'ictus tractats amb rt-PA a la fase aguda (Montaner et al., 2003). Un resultat interessant és que animals tractats amb rt-PA després d'una isquèmia cerebral i als quals se'ls co-administrava BB-94 (un inhibidor de MMPs) mostraven uns volums d'hemorràgia inferiors que els animals tractats únicament amb rt-PA (Sumii and Lo, 2002). Recentment s'ha descrit que els animals deficients per *Mmp-3* tenien menys hemorràgies després del tractament amb rt-PA que els animals deficients per *Mmp-9* (Suzuki et al., 2007). Aquests autors postulen que mentre MMP-9 és determinant per l'aparició de THs de forma espontània, MMP-3 jugaria un paper més important en les hemorràgies que apareixen després del tractament trombolític.

Per tant, sembla que trobar un sistema d'inhibició efectiva, específica i no tòxica de les MMPs durant la fase aguda, i a ser possible co-administrat amb el rt-PA, ajudaria a mantenir la integritat de la BHE. A més, això possibilitaria l'extensió del temps de la finestra terapèutica (més enllà de les 3 - 4.5 hores actuals) permetent que més pacients es poguessin beneficiar del tractament i amb més seguretat al reduir el risc d'hemorràgia.

1.5.3. MMPs en fases cròniques de la isquèmia cerebral: la neuroreparació

Contrastant amb tot el que hem vist fins ara, les MMPs també són unes proteïnes importants i beneficioses per la recuperació i la reparació tissular després d'un esdeveniment isquèmic. Aquest camp de la recerca en l'ictus és més recent i per tant menys

extens, és coneix poc sobre el tema però els primers descobriments són prometedors i reforcen la importància d'aquesta família de metal·loproteïnases com a directores importants tant del progrés de la patologia com de la recuperació després d'aquesta.

Al cervell les MMPs s'expressen durant el desenvolupament i contribueixen a la morfogènesi del sistema nerviós central (Kaczmarek et al., 2002). Les MMPs afecten les interaccions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu mitjançant el trencament de proteïnes de la matriu extracel·lular i la regulació del microambient intercel·lular. Les MMPs també modulen la biodisponibilitat de factors de creixement per processament dels precursors o alliberant molècules actives (Zhao et al., 2007). Hi ha evidències que les MMPs participen en dos dels processos més importants de reparació del teixit cerebral: la neurogènesi i l'angiogènesi.

La zona subventricular (SVZ) dels ventricles laterals i la zona subgranular de l'hipocamp són les estructures més importants per la **neurogènesi** al cervell adult. Hi ha evidències que recolzen la idea que les MMPs ajuden a la migració dels neuroblasts (Figura 7). Durant el desenvolupament post-natal, la MMP-9 s'associa a la migració de cèl·lules granulars al cerebel (Vaillant et al., 2003) i MMP-9 i MMP-12 s'ha vist que participen en el procés de

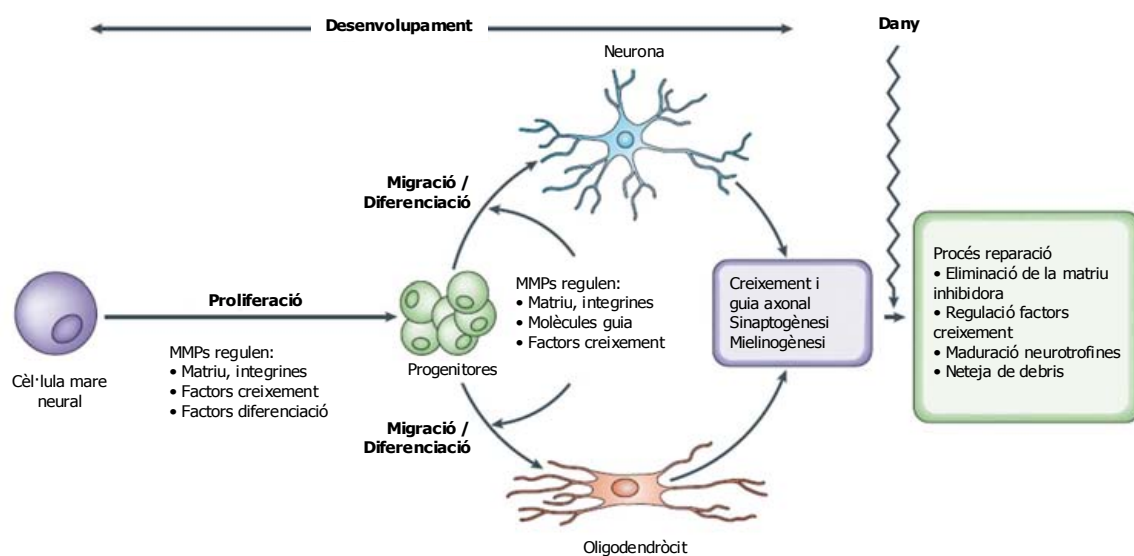


Figura 7. Esquema del paper de les metal·loproteïnases durant el desenvolupament embrionari i en processos de regeneració després d'un dany al sistema nerviós central. Adaptat de Yong, 2005.

maduració d'oligodendròcits i en la formació de la mielina (Yong, 2005). En el cervell adult la MMP-9 està implicada en la plasticitat sinàptica a l'hipocamp (Nagy et al., 2006). De fet, els animals tractats amb un inhibidor de MMPs, el GM6001, o els animals deficients per *mmp-9* mostren problemes en l'aprenentatge i en la potenciació a llarg termini. En el cas de l'ictus, en animals sotmesos a una isquèmia cerebral després de 2 setmanes s'ha vist que presentaven nivells més alts de MMP-9 a la SVZ i que aquesta col·localitzava amb neuroblasts positius per BrdU (un marcador de proliferació) (Lee et al., 2006). A més, la inhibició de MMPs redueix l'extensió de la senyal dels neuroblasts que s'extén de la SVZ a l'estriat danyat. Un altre estudi mostra que la MMP-2 també està implicada en la mobilització d'aquestes cèl·lules progenitores neurals després d'una isquèmia, ja que la secreció de MMP-2 i MMP-9 per part de les cèl·lules endotelials, activades per eritropoietina, promou la migració dels neuroblasts. (Wang et al., 2006).

Adicionalment, les MMPs també s'han vist implicades en la regulació de l'**angiogènesi**. La relació de les MMPs en el procés angiogènic s'ha estudiat més extensament en el camp de l'oncologia. Es coneix des de fa temps que les MMPs afavoreixen els processos de progressió i metastasi al càncer. Les MMPs afavoreixen l'angiogènesi ajudant als vasos a desenganxar-se dels perícits, alliberant factors pro-angiogènics units a la matriu extracel·lular i trencant les adhesions cèl·lula-cèl·lula endotelials entre d'altres mecanismes (Raffetto and Khalil, 2008). Es coneix que la MT1-MMP és important per l'angiogènesi (Pepper, 2001) i s'ha descrit l'elevació de MMP-2, -7, -9 i -11 en la invasió tumoral i metastasi (Handsley and Edwards, 2005). En models d'isquèmia cerebral en rosegadors s'ha descrit que el procés angiogènic comença dintre dels 3 primers dies després de la isquèmia cerebral i que s'allarga durant varies setmanes donant lloc a la formació de nous vasos sanguinis a la zona infartada i a la penombra (Lin et al., 2008; Lin et al., 2002). En el cas de l'ésser humà, la formació de nous vasos a la penombra es correlaciona amb una major

supervivència suggerint que la resposta angiogènica és important per a una recuperació òptima de l'ictus (Krupinski et al., 1994). En ratolins s'ha vist que l'activació de MMP-9 incrementa el reclutament de cèl·lules mare endotelials i hematopoètiques per l'alliberament de la citocina *Kit lligand* (Heissig et al., 2002). A més, els animals deficients per *mmp-9* alliberen menys *Kit lligand* i la diferenciació de les cèl·lules mare hematopoètiques és deficient, el que resulta en una fallada en la neovascularització. Per tant, sembla que MMP-9 es requereix per la mobilització de les cèl·lules hematopoètiques. També s'ha descrit que la inhibició de MMPs 7 dies després de la isquèmia resulta en la reducció de la plasticitat neuronal i el remodelament vascular a més d'augmentar el dany a la zona del córtex que rodeja l'infart (Zhao et al., 2006).

A més de remodelar pròpiament la matriu extracel·lular per permetre la mobilització, el creixement i la migració de cèl·lules, les MMPs també participen en el procés angiogènic ajudant en l'alliberació de factors tròfics i pro-angiogènics creant un microambient favorable per aquest procés. Així, s'ha vist que poden trencar molècules de la matriu o de la superfície cel·lular, com el factor de creixement endotelial vascular (VEGF), que s'allibera

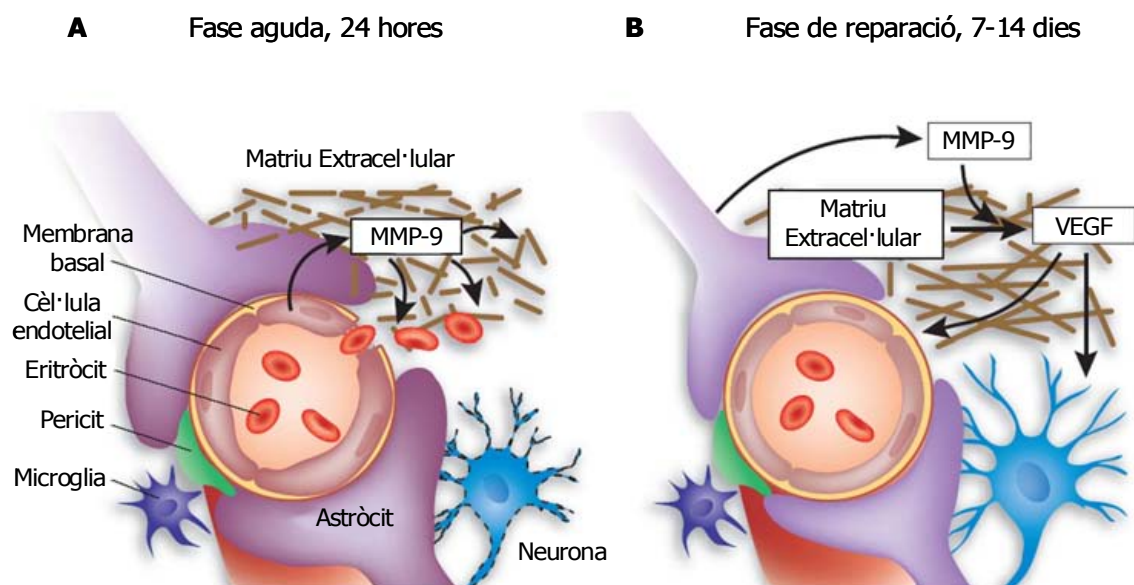


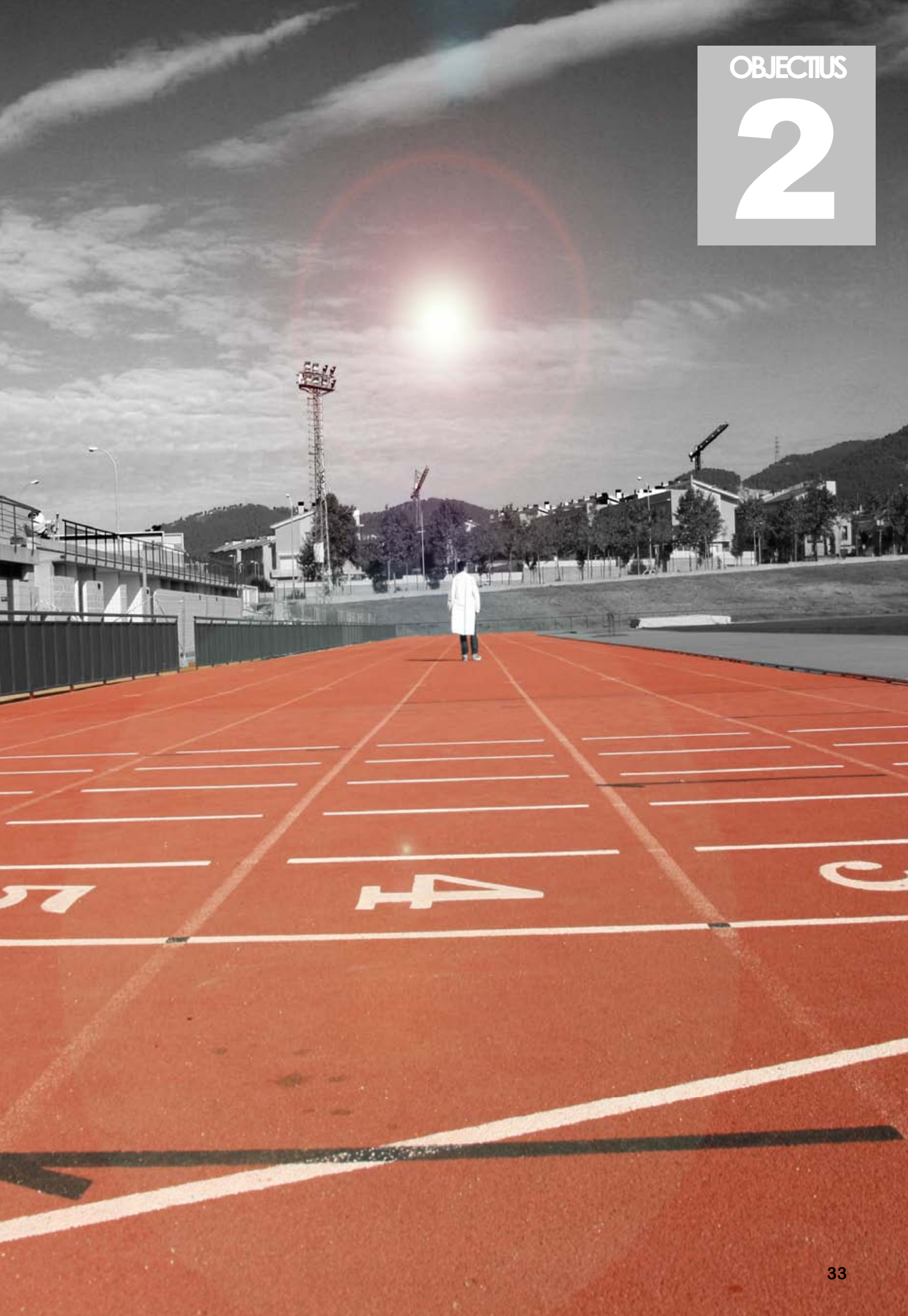
Figura 8. Redistribució de la MMP-9 a l'unitat neurovascular després d'un ictus. **A)** A la fase aguda contribueix a la degradació de la BHE, l'apoptosi neuronal i l'hemorràgia. **B)** A la fase subaguda MMP-9 es requereix per alliberar VEGF biològicament actiu que contribueix a la regeneració vascular (Zlokovic, 2006).

en la seva forma bioactiva (Bergers et al., 2000)(Figura 8). S'ha demostrat a més que el VEGF, apart de les propietats angiogèniques, té propietats neurotròfiques i neuroprotectores (Sondell et al., 2000; Zhang et al., 2000).

Com hem vist, hi ha un gran nombre de treballs que recolzen la idea que les MMPs juguen un paper molt important en la fisiopatologia de l'ictus sobretot durant la fase aguda. A la vegada estan apareixent treballs on es destaca també el paper que aquestes mateixes MMPs poden tenir a la fase subaguda o crònica de la malaltia ajudant a la reparació del teixit danyat. Les implicacions terapèutiques d'aquest fet són grans i el repte és trobar una teràpia efectiva i segura per tractar d'inhibir la desregulació de les MMPs a la fase hiperaguda de l'ictus, per millorar l'evolució del pacient i administrar el tractament trombolític amb més seguretat, a la vegada que potenciar o no interferir en el paper tardà d'aquestes MMPs en la neurovasculogènesi i la reparació del teixit cerebral danyat.

OBJECTIUS

2



Els objectius principals d'aquesta tesi doctoral són:

- I. Realitzar una revisió sistemàtica de la literatura sobre l'ús de la microdissecció làser en l'estudi del teixit cerebral i la seva possible aplicació en la investigació de patologies vasculars cerebrals.
- II. Investigar l'expressió de la MMP-2 i la MMP-9 al cervell isquèmic, l'origen cel·lular i la seva distribució en relació amb el trencament de la barrera hematoencefàlica i l'aparició de transformacions hemorràgiques en humans.
- III. Investigar l'efecte del tractament amb rt-PA sobre la degranulació de neutròfils humans *ex vivo*. Específicament, determinar el contingut i alliberació de MMP-9 i d'altres MMPs/TIMPs per part dels neutròfils.
- IV. Determinar el patró temporal d'activació de MMPs i la seva distribució subcel·lular en un model animal d'isquèmia cerebral focal permanent.
- V. Investigar l'expressió de MMP-13 al parènquima cerebral humà després d'un ictus així com en el model animal d'isquèmia focal permanent i determinar-ne l'origen cel·lular.
- VI. Estudiar mitjançant arrays de proteïnes la producció de MMP/TIMPs en el cervell humà després de l'ictus i determinar-ne la contribució específica endotelial i neuronal.



3.1. Pacients

3.1.1. Protocols d'estudi clínic

En els estudis d'aquesta Tesi es van incloure pacients atesos a les Urgències o a l'Unitat d'Ictus de l'Hospital Vall d'Hebron de Barcelona. Tots ells van patir un ictus isquèmic i van morir en les hores o dies següents d'haver-lo patit. Els estudis que es detallen a continuació van ser aprovats pel comitè ètic de l'Institut de Recerca de l'Hospital Vall d'Hebron i en tots el casos es va demanar un consentiment informat als familiars dels pacients.

L'estudi de neuroimatge per RM o TAC cranial realitzada de forma rutinària a l'arribada a urgències es va emprar per incloure als pacients en el protocol d'estudi, així com per ajudar a la localització de les lesions en els posteriors estudis necròpsics. Mitjançant el TAC, es van valorar, a més a més, l'evolució de l'infart i la presència de transformacions hemorràgiques. Aquestes es van classificar segons els criteris de Pessin (Pessin *et al.*, 1990) i l'estudi ECASS-1 (Hacke *et al.*, 1995). **HI-1** (infart hemorràgic de tipus 1): amb puntejat hemorràgic al voltant del marge de l'infart; **HI-2** (infart hemorràgic de tipus 2): amb puntejat dins l'infart però sense efecte de massa; **PH-1** (hemorràgia parenquimatosa de tipus 1): no superior al 30% de l'àrea de l'infart i **PH-2** (hemorràgia parenquimatosa de tipus 2): superior al 30% de l'àrea de l'infart amb un efecte de massa significatiu.

3.1.2. Protocol de recollida de material biològic (necròpsies)

Les mostres per l'estudi es van obtenir d'acord amb el protocol d'obtenció de teixit cerebral després d'un ictus del Laboratori d'Investigació Neurovascular i la Unitat de Neuropatologia del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Vall d'Hebron.

En tots els casos el teixit es va obtenir en un curt període de temps, dins de les 6 primeres hores després de l'èxitus, per tal de preservar al màxim tant l'expressió gènica com la

proteica. Amb l'ajut de l'últim TAC realitzat al pacient, la neuropatòloga va obtenir mostres de teixit de l'infart (*core*), de l'àrea al voltant del mateix (periinfart), així com mostres de l'hemisferi contralateral a la lesió. En els casos en que hi havia transformacions hemorràgiques també es van agafar mostres d'aquestes àrees de sagnat (Figura 9). En tots els casos es van realitzar talls coronals de l'encèfal i sobre cada un d'ells es van identificar les zones desitjades i es va obtenir el teixit corresponent. El teixit obtingut es va congelar ràpidament en nitrogen líquid (per tècniques de biologia molecular) o bé es va fixar en paraformaldehid (per histologia i immunohistoquímica) al 4% i es va deshidratar en sucrosa al 30% abans de congelar-lo a -80°C pel seu emmagatzematge.

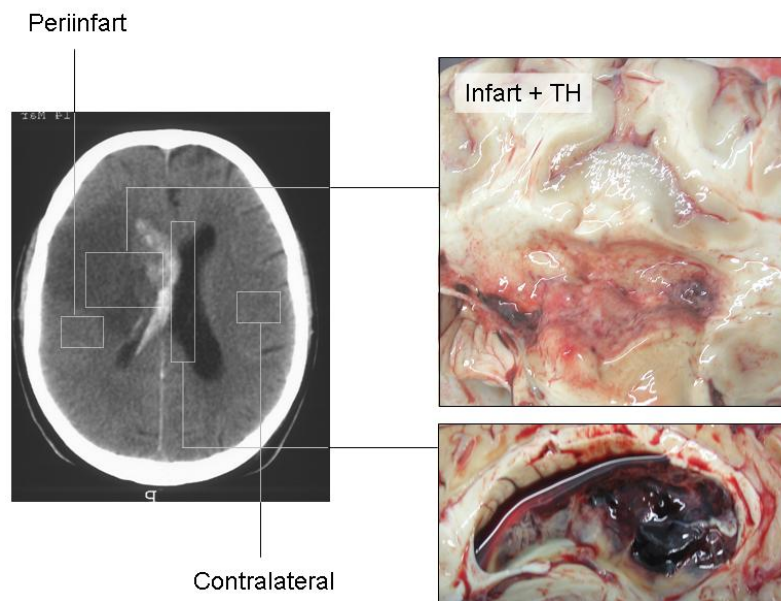


Figura 9. Imatge de TAC on es mostren les diferents zones d'estudi. A la dreta imatges del teixit d'una zona d'infart amb dues visions d'una zona on hi ha una TH.

3.2. Animals

Tots els experiments amb animals van ser aprovats pel comitè ètic de l'Institut de Recerca de l'Hospital Vall d'Hebron i es van dur a terme en conformitat a la legislació espanyola i a les directives de la Unió Europea.

3.2.1. Model d'isquèmia cerebral focal en rata

L'infart al territori de l'artèria cerebral mitja (ACM) es va induir per l'oclusió d'aquesta a rates Sprague-Dawley (SD) (Charles

River Laboratories, Wilmington, MA,

USA) que pesaven 280-310 g tal i

com s'havia descrit prèviament (Longa

et al., 1989). Breument, els animals es

van anestesiari amb isoflurà 2-2.5%

sota respiració espontània. La

temperatura corporal es va mantenir a

37°C utilitzant un coixinet que

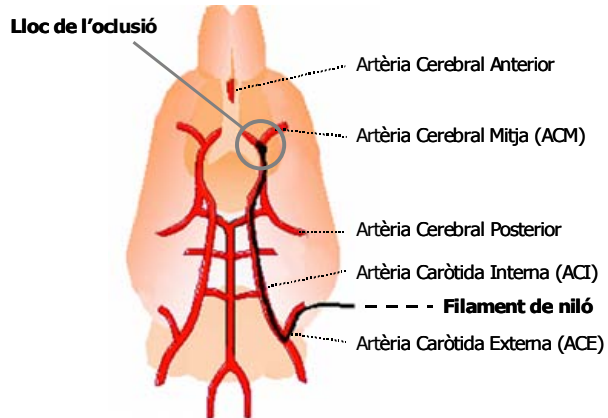


Figura 10. Esquema del cervell d'una rata on es destaca la circulació major per mostrar el recorregut del filament de niló (en negre) fins que oclou l'ACM.

controla la temperatura. L'artèria caròtida comú (ACC) dreta es va exposar mitjançant una

incisió al coll i va ser cuidadosament disseccionada del teixit. Les branques occipital i tiroïdal

superior de l'artèria caròtida externa (ACE) es van cauteritzar i la branca pterigopalatina de

l'artèria caròtida interna (ACI) es va ocloure irreversiblement. L'ACE es va lligar i tallar,

després, un monofilament de niló 4/0 es va fer passar via l'ACE fins a dalt per la ACI (uns

18 a 20mm), bloquejant l'ACM (Figura 10). Per determinar que l'ACM estava ben oclosa, el

flux sanguini cerebral regional (rCBF) es va mesurar al còrtex mitjançant làser-Doppler

(LDF) (Moor Instruments, Devon, UK). Un dia abans de l'operació es va trepanar un petit

forat a l'os parietal dret (2mm posterior i 3.5mm lateral del bregma) deixant la duramàter

intacta i es va fixar una cànula al crani amb cianacrilat i ciment dental. Abans de la cirurgia,

la sonda LDF (0.5mm de diàmetre) es va posar sobre la dura mitjançant la cànula i el rCBF

es va monitoritzar durant tota l'operació per assegurar la correcta oclusió de l'ACM.

Únicament els animals amb una reducció del rCBF de més del 75% es van incloure a

l'estudi. Als animals control (*sham*) se'ls va realitzar el mateix protocol quirúrgic excepte

l'oclusió de l'ACM. Els animals es van sacrificar a diferents temps d'oclusió de l'ACM (30, 60, 90, 120 minuts o 48 hores). Finalment, les rates es van anestesiari profundament i es van perfondre transcàrdiacament amb salí fred. Per acabar, els hemisferis ipsilateral i contralateral es van disseccionar, es van congelar immediatament en nitrogen líquid i es van emmagatzemar a -80°C fins al moment d'utilitzar-los.

3.2.2. Anàlisi del volum d'infart

Per mesurar el volum d'infart, els animals es van sacrificar i es van treure els cervells després de 30, 60, 90, 120 minuts o 48 hores d'oclusió de l'ACM. L'extensió de la lesió es va determinar utilitzant *2,3,5-triphenyltetrazolium chloride* (**TTC**) (Bederson et al., 1986). Seguidament, els cervells es van tallar en seccions de 2mm d'ample i es van tenyir amb TTC al 2% durant 30 minuts a temperatura ambient, seguit d'una fixació *overnight* amb paraformaldehid al 4%. Les imatges de les seccions tenyides es van capturar utilitzant un escàner CanoScan 4200F (Canon, Inc, Lake Success, NY, USA) i el contorn de l'àrea infartada (coloració blanca) i no infartada (coloració vermella) es va dibuixar i quantificar utilitzant un sistema d'anàlisi d'imatge (Scion Image v4.02, Scion Corporation, Frederick, MD, USA). El volum de l'infart (corregit per el volum de l'edema) es va calcular per la integració de les àrees lesionades i es va expressar com a percentatge lesionat de l'hemisferi ipsilateral.

3.3. Cultius Cel·lulars

3.3.1. Tipus cel·lulars

3.3.1.1. Neutròfils

Per obtenir neutròfils en suspensió, els granulòcits es van aïllar de la sang d'individus sans mitjançant el protocol estàndard de gradient de densitat en PercollTM (GE Healthcare,

USA) com s'havia descrit prèviament (Schleimer and Rutledge, 1986). Seguint el protocol, es van utilitzar tubs K₂EDTA (BD Vacutainer®) per recollir la sang. Els gradients de Percoll™ amb una densitat de 1.088 es van preparar barrejant 9.5 mL Percoll™ amb 1.5 mL PBS (10x) i 4 mL H₂O. La suspensió cel·lular es va diluir 1:5 amb PBS (1x). Immediatament, el gradient de Percoll i la suspensió cel·lular es van ajuntar sense barrejar les fases i es va centrifugar a 400g durant 30 minuts a 20°C. Després, la capa de cèl·lules blanques es va recollir i transferir a un nou tub i es va diluir una altra vegada 1:5 amb PBS (1x).

La suspensió cel·lular diluïda es va centrifugar un altre cop a 300g durant 15 minuts a 20°C. El sobrenedant es va descartar amb cura i el pellet es va resuspendre en 2 mL de PBS i les cèl·lules vermelles romanents es van incubar en 50 mL de tampó de lisi (155 mM NH₄Cl; 10 mM KHCO₃; 0.1 mM EDTA) durant 5 min a temperatura ambient. Aleshores, els tubs es van centrifugar a 300g durant 10 minuts a 20°C, el sobrenedant es va descartar i les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS.

Finalment, el pellet es va resuspendre en 4 mL de medi de cultiu RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA) que contenia 50 µg/mL estreptomycina i 50 U/mL penicil·lina (Gibco BRL, USA).

3.3.1.2. Neurones

Per obtenir el cultiu primari de neurones corticals de rata (*Rattus norvegicus*) es va seguir un mètode prèviament descrit (Goldberg and Choi, 1993). Les cèl·lules corticals es van obtenir de rates SD a dia 17 de gestació. Després de treure amb cura les meninges, els còrtex cerebrals es van dissociar enzimàtica i mecànicament. Les cèl·lules es van resuspendre en Medi Basal Eagle (BME, Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) complementat amb 10% FBS (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA), 10% FHS (Pan Biotech GmbH, Aidenbach,

Germany), 50 U/ml penicil·lina, 50 µg/ml estreptomina (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA), 2 mM glutamina i 30 % glucosa (BME complert). Les cèl·lules dissociades es van sembrar a una concentració de 2.5×10^5 cells/ml en plaques de 24 pouets precotinades prèviament amb poly-L-lisina. Els cultius es van mantenir a 37 °C en un incubador humit amb 5% CO₂ i oxigen atmosfèric. Dues hores després de la sembra, el medi es va canviar per un medi Neurobasal (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA) complementat amb 50 U/ml penicil·lina, 50 µg/ml estreptomina, 2 mM glutamina i 2% de suplement B27 (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA). Seguint aquest protocol es van arribar a obtenir cultius cel·lulars pràcticament purs de neurones tal i com s'havia descrit prèviament (Estus et al., 1997).

3.3.2. Recompte cel·lular

El recompte cel·lular es va fer mitjançant la tinció amb blau de tripà. Es dilueix una mostra de la suspensió cel·lular amb blau de tripà 1:1. Es vorteja la solució i es fan entrar per capil·laritat uns 20 µl de la solució a un dels costats de la cambra. Es compten les cèl·lules viables (cèl·lules amb la membrana plasmàtica intacta i, per tant, no tenyides) dels quatre quadrants externs de la cambra de Neubauer. El nombre de cèl·lules per mL s'obté en multiplicar per 10^4 la mitjana de cèl·lules comptades per cada quadrant. Llavors, s'ha de tenir en compte la dilució inicial realitzada (del volum de suspensió i el colorant) per determinar el nombre de cèl·lules per mL de la mostra i el nombre total de cèl·lules obtingudes.

3.3.3. Mètodes de viabilitat cel·lular

3.3.3.1. Mètode d'MTT

Aquest assaig es basa en la conversió de l'MTT (*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*, Sigma-Aldrich) en sals de formazà mitjançant les deshidrogenases mitocondrials de les cèl·lules. La formació d'aquest precipitat insoluble és una mesura

indirecta de la proliferació/mort cel·lular (Hansen et al., 1989). El MTT es dissol a una concentració estoc de 2.5 mg/mL en aigua destil·lada, s'esterilitza per filtració i s'emmagatzema a -20°C protegit de la llum.

Per mesurar la formació de formazà es va temperar la solució i es va afegir a cada pouet de la placa de cultiu a una concentració final de 0.5 mg/mL i es va incubar durant 90 minuts a 37°C . Passat aquest temps, es va aspirar el medi i el precipitat es va dissoldre en DMSO. L'absorbància del precipitat blau es va mesurar en un lector de plaques ELISA (Elx800, BioTek, USA) a 560 nm. Les unitats d'absorbància obtingudes es van expressar en tant per cent respecte la viabilitat del control (cèl·lules sense tractar).

3.3.3.2. Mètode de Viabilitat/Citotoxicitat (LIVE/DEAD[®])

La viabilitat dels cultius es va mesurar utilitzant l'assaig fluorescent LIVE/DEAD[®] Viability/Cytotoxicity seguint les instruccions del fabricant (Molecular Probes - Invitrogen, Paisley, UK). Després dels tractaments, les cèl·lules es van exposar a la **calceïna AM** i a l'**homodimer d'etidi-1 (EthD-1)** i es van observar sota un microscopi de fluorescència invertit Olympus IX71. La calceïna AM és absorbida per les cèl·lules vives i és convertida per les esterases citosòliques en un substrat verd fluorescent (emet a 515 nm). L'EthD-1, en canvi, pot entrar únicament a les cèl·lules que tenen compromesa la integritat de la membrana i es torna vermell fluorescent quan s'uneix als àcids nucleics (emet a 635 nm).

3.3.4. Tractaments dels cultius cel·lulars

3.3.4.1. Deprivació d'oxigen i glucosa (OGD)

Els cultius neuronals madurs (DIV 11-13) es van sotmetre a una deprivació d'oxigen i glucosa (*oxygen and glucose deprivation*, OGD) col·locant-los en una cambra anaeròbia (Invivo₂, Ruskinn, Percoed, UK) amb 5% CO₂ i 95 N₂ a 37°C durant 3 hores amb solució

salina balancejada *Earle's* desoxigenada sense glucosa que contenia 116 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 0.8 mmol/L MgSO₄·7H₂O, 1.0 mmol/L NaH₂PO₄·2H₂O, 26.2 mmol/L NaHCO₃, 1.8 mmol/L CaCl₂·2H₂O, 0.01 mmol/L glicina, pH 7.4. La OGD es va finalitzar reincubant les cèl·lules amb el medi anterior a la OGD i a les condicions de normòxia. La reoxigenació es va fer durant 24 hores. Les neurones control es van tractar amb la solució salina balancejada però amb 5.5 mmol/L de glucosa i es van mantenir a l'incubador estàndard el mateix temps que les cèl·lules sotmeses a OGD.

3.3.4.2. Tractament amb t-PA/fMLP

Després de l'aïllament dels neutròfils, 400.000 cèl·lules/mL es van sembrar en plaques precotinades amb poly-L-lisina de 24 pouets amb medi RPMI 1640 sense FBS. Després de 2 hores a l'incubador a 37°C i 5% CO₂, les cèl·lules es van tractar amb 6.2 µM (0.3 mg/mL) rt-PA (Boehringer Ingelheim, Germany) o 10⁻⁷ M *formyl-Met-Leu-Phe* (fMLP) (Sigma-Aldrich, USA) durant diferents períodes de temps (10, 15 o 30 mins). Les cèl·lules no tractades es van utilitzar com a controls.

3.4. Mètodes i tècniques generals

3.4.1. Zimografia en gelatina

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

Es va realitzar una electroforesi en gels d'acrilamida (SDS-PAGE), als quals abans de polimeritzar se'ls afegia 0.1% de gelatina (Invitrogen, USA). Les mostres es barrejaven 1:1 amb buffer de carrega (80 mmol/L Tris-HCl [pH 6.8], 4% SDS, 10% glicerol, 0.01% blau

de bromofenol), es carregaven al gel i es feien corren a 100 V. Com a control positiu també vàrem carregar les proteïnes MMP9/2 recombinants (Chemicon, USA). Després de l'electroforesi els gels es van rentar amb SDS amb 2.5% Tritó X-100 durant 1 hora. Tot seguit, els gels s'incubaven amb 50 mmol/L Tris-HCl [pH 7.5], 10 mmol/L CaCl₂, 0.02% NaN₃ (*developing buffer*) a 37°C durant períodes variables segons les mostres.

Les bandes enzimàtiques es van visualitzar després de tenyir 1 hora amb negre d'amida 0.1% i destenyir durant 30 minuts amb una solució de 30% (v/v) metanol i 10% (v/v) d'àcid acètic glacial.

Per mesurar les activitats, els gels es van llegir utilitzant un software Gel Logic 440 Imaging System (Kodak) i la densitat de les bandes (unitats arbitràries) es va normalitzar respecte el control de la proteïna recombinant per permetre comparacions entre els diferents gels.

3.4.2. Zimografia *in situ*

Aquesta tècnica permet localitzar l'activitat de les gelatinases sobre un tall histològic. És una tècnica útil i complementària a la zimografia en gelatina ja que ens permet valorar el grau d'activitat així com localitzar en el teixit les zones més actives.

Aquesta tècnica no permet que el teixit estigui fixat químicament, per tant vàrem treballar amb teixit fixat en nitrogen líquid. En un criòstat, es van fer talls d'uns 12 µm de gruix que es van muntar sobre portaobjectes, prèviament banyats en poly-L-lisina. Les preparacions es van cobrir amb una solució que contenia el substrat fluorogènic DQ-gelatin-FITC (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), aquest en presència de gelatinases es degradat i emet fluorescència. Les preparacions es van deixar amb aquest reactiu en una cambra humida entre 15 i 22 hores protegides de la llum a temperatura ambient. Algunes preparacions es van tractar conjuntament amb un inhibidor general de les MMPs, *1,10-phenanthroline* (10 mmol/L), per assegurar-nos de l'especificitat de la senyal.

Finalment les mostres es van cobrir amb un medi de muntatge aquós (*Vectashield with DAPI*, Vector Laboratories, USA) que les protegeix de la pèrdua de fluorescència i que porta DAPI (*46-diamidino-2-phenyl indole*) que ens va permetre localitzar els nuclis cel·lulars. L'anàlisi i valoració de les preparacions es va fer amb un un microscopi confocal espectral (Olympus FV-1000).

3.4.3. Western Blot

Per determinar els nivells de proteïnes en el teixit es va utilitzar la tècnica del western blot. El contingut de proteïna total es va determinar mitjançant l'assaig del BCA (*bicinchoninic acid assay*, Pierce, USA). Es va carregar la mateixa quantitat de proteïna a un gel d'electroforesi (SDS-PAGE) en un sistema de minigel vertical Mini-protean II Dual Slab Cell (Bio-Rad, USA) i es va córrer l'electroforesi a 100 V. Les proteïnes separades es van transferir a una membrana de PVDF utilitzant un sistema Transblot Cell (Bio-Rad, USA) durant 1 hora a 100V. Les unions inespecífiques es van bloquejar amb llet desnatada al 10% i les membranes es van incubar *overnight* a 4°C amb els anticossos primaris adients. Tot seguit les membranes es van rentar 3 vegades durant 10 minuts en TPBS. Després es van incubar amb els anticossos secundaris conjugats amb peroxidasa adients per cada cas durant una hora a temperatura ambient. Les membranes es van rentar amb TPBS 3 cops durant 5 minuts i finalment es va procedir al revelat de les membranes amb el reactiu quimioluminiscent Immobilon (Millipore, USA). La reacció de luminescència es va captar amb una càmera d'anàlisi de luminescència Las-3000 (Fujifilm, USA).

3.4.3.1. Anticossos utilitzats

Els anticossos primaris comercials utilitzats per realitzar la tècnica del western blot han estat: mouse anti-human MMP-9 (Chemicon, USA), mouse anti-human GAPDH (Ambion, USA), mouse anti-human MMP-13 (Calbiochem, USA), mouse anti-human β -actin (Sigma-

Aldrich, USA), rabbit anti-human Histone H3 (Cell Signalling, USA), mouse anti-human NeuN (Chemicon, USA), rabbit anti-human GFAP (DAKO, USA), mouse anti-human CD31 (DAKO, USA).

Els anticossos secundaris utilitzats han estat: goat anti-mouse HRP (Chemicon, USA) i donkey anti-rabbit HRP (GE Healthcare, UK).

3.4.4. Immunohistoquímica

Per detectar les diferents proteïnes en preparacions histològiques de teixit es van utilitzar diferents protocols segons si les mostres estaven fixades en formalina o congelades en nitrogen líquid.

3.4.4.1. Procediment general per a mostres parafinades

Les mostres fixades amb formalina al 10% es van incloure en parafina i es van tallar en seccions de 8 µm utilitzant un micròtom. Les preparacions es van desparafinar i les peroxidases endògenes es van bloquejar amb metanol-H₂O₂. A més, els llocs d'unió inespecífics es van bloquejar amb 10% de sèrum normal de cabra durant 2 hores. Les seccions es van incubar durant una hora a temperatura ambient amb els anticossos primaris, es van rentar i es van incubar amb els anticossos secundaris adients durant 30 minuts a temperatura ambient. Les preparacions es van revelar amb diaminobenzidina (DAB), la qual dona lloc a un precipitat marronós en els llocs immunoreactius, i es van contratenyir amb hematoxilina de Mayer. Tot seguit es va procedir a la deshidratació de les preparacions amb etanol (70, 95 i 100%) 2 minuts cadascun i amb xilè durant 5 minuts. Finalment les preparacions es van muntar amb cobreobjectes amb la reïna DPX (*dibutyl polystyrene xylene*, MERCK, USA).

3.4.4.1.1. Anticossos utilitzats

Els anticossos utilitzats per aquest tipus de seccions han estat: mouse anti-human MMP-9 (Chemicon, USA), mouse anti-human Collagen IV (Masterdiagnostica, Spain) i mouse anti-human myeloperoxidase (Masterdiagnostica, Spain). L'anticòs secundari utilitzat en tots aquests casos ha estat un goat anti-mouse HRP (Amersham, UK).

3.4.4.2. Procediment general per a mostres congelades

Per aquest tipus d'assaig es van fer talls de 12 µm utilitzant un criòstat. Les seccions es van fixar amb acetona freda durant 15 minuts i es van rentar amb TPBS durant 5 minuts més. Els llocs d'unió inespecífics es van bloquejar amb 1% BSA 0.3% Tritó X-100 preparat en TPBS (solució de bloqueig) durant 30 minuts a temperatura ambient. Tot seguit es van incubar les preparacions amb els anticossos primaris diluïts a la solució de bloqueig *overnight* a 4°C. Després dels rentats en TPBS les seccions es van incubar amb els anticossos secundaris durant una hora a temperatura ambient. Finalment les seccions es van rentar i es van muntar amb els cobreobjectes utilitzant el medi de muntatge Vectashield amb DAPI (Vector Laboratories, USA).

3.4.4.2.1. Anticossos utilitzats

Els anticossos primaris utilitzats en les preparacions de teixit congelades han estat: rabbit anti-human MMP-13 (Sigma-Aldrich, USA), mouse anti-human NeuN (Chemicon, USA), mouse anti-human GFAP (Sigma-Aldrich, USA), mouse anti-Iba1 (Abcam,UK), mouse anti-human CNPase (AbD Serotec, UK). Els anticossos secundaris utilitzats han estat: goat Alexa-Fluor 488 anti-mouse IgG (Invitrogen, USA) i goat Alexa-Fluor 568 anti-rabbit IgG (Invitrogen, USA).

3.4.5. Immunocitoquímica

Per aquesta tècnica les cèl·lules es van sembrar sobre cobreobjectes de vidre. La fixació es va fer amb paraformaldehid fred al 4% durant 20 minuts. Les cèl·lules es van rentar amb TPBS 3 cops durant 5 minuts i els llocs d'unió inespecífics es van bloquejar amb solució de bloqueig (descrita anteriorment al apartat 3.4.4.2.) durant 30 minuts a temperatura ambient. Tot seguit es van incubar les cèl·lules amb els anticossos primaris diluïts a la solució de bloqueig *overnight* a 4°C. Després dels rentats en TPBS les seccions es van incubar amb els anticossos secundaris durant una hora a temperatura ambient. Finalment les preparacions es van rentar i es van muntar amb els portaobjectes utilitzant el medi de muntatge Vectashield amb DAPI (Vector Laboratories, USA).

3.4.5.1. Anticossos utilitzats

Per els experiments d'immunocitoquímica s'han utilitzat els següent anticossos primaris: rabbit anti-human MMP-13 (Sigma-Aldrich, USA) i mouse anti-human MAP2 (Sigma-Aldrich, USA). Els anticossos secundaris utilitzats han estat: goat Alexa-Fluor 488 anti-mouse IgG (Invitrogen, USA) i goat Alexa-Fluor 568 anti-rabbit IgG (Invitrogen, USA).

3.4.6. Tècniques microscòpiques

L'estudi de les mostres parafinades es va fer amb un microscopi de camp clar Leica DM1000. Els estudis d'immunofluorescència es van fer amb un microscopi de fluorescència invertit Olympus IX71. Els estudis de col·localització es van fer amb un microscopi confocal espectral Olympus FV1000.

3.4.6.1. Microscòpia TIRF

Els estudis d'*imaging* de la degranulació dels neutròfils després del tractament amb rt-PA es

van fer mitjançant la tècnica microscòpica

TIRF (*Total Internal Reflexion Fluorescence*,

Figura 11). Aquesta tècnica permet l'estudi

de processos dinàmics que tenen lloc en la

membrana cel·lular, com és la fusió de les

vesícules. La tècnica es basa en que quan

s'inclina l'angle d'il·luminació del làser fins

un angle específic es crea una reflexió

entre la interfase vidre-aigua que crea una

ona d'evanescència. Aquesta il·lumina i

excita únicament els espècimens que hi ha

adjacents a aquesta interfase, penetrant fins a una profunditat d'uns 100 nm, el que permet

il·luminar gairebé exclusivament zones superficials com la membrana plasmàtica (que té

uns 7.5 nm d'ample).

L'estudi es va fer utilitzant el microscopi Olympus multidimensional-TIRFM cell-R IX81

invertit amb un objectiu Planapo 100xO/TIRFM NA 1.45 amb un làser d'argó multilane

de 25 mW. Els experiments de *time lapse* es van realitzar amb una càmera CCD Hamamatsu

C91000-02 monocroma. El processament de les imatges es va fer amb el software ImageJ

(NIH, Bethesda, MD, USA).

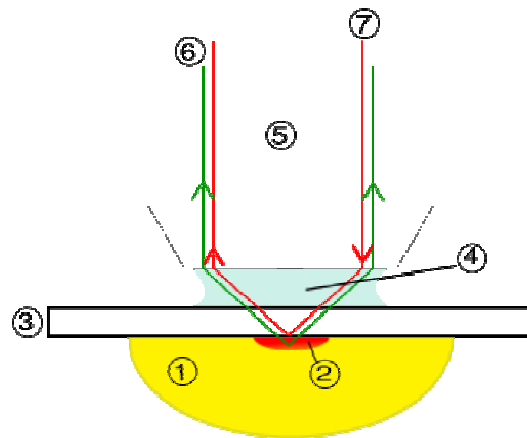


Figura 11. Diagrama dels diferents components de la microscòpia TIRF. (<http://en.wikipedia.org>)

- 1.- Espècimen
- 2.- Rang de l'ona d'evanescència
- 3.- Portaobjectes
- 4.- Oli d'immersió
- 5.- Objectiu
- 6.- Senyal emesa
- 7.- Laser d'excitació

3.4.6.2. Microscòpia de Microdissecció Làser

Per obtenir les diferents poblacions cel·lulars del parènquima cerebral es va utilitzar la microdissecció làser. Aquesta aplicació permet disseccionar cèl·lules de preparacions histològiques mitjançant una font làser que les retalla i les aïlla en tubs estèrils.

La primera part d'aquest treball (article 2) es va fer utilitzant un microscopi de microdissecció làser per catapultatje (UV-Laser MicroBeam Technology, Palm Microsystems). Seccions de 8 μm es tenien amb BCIP/NBT (Chemicon) per detectar vasos sanguinis, tal i com s'havia descrit amb anterioritat (Ball et al., 2002).

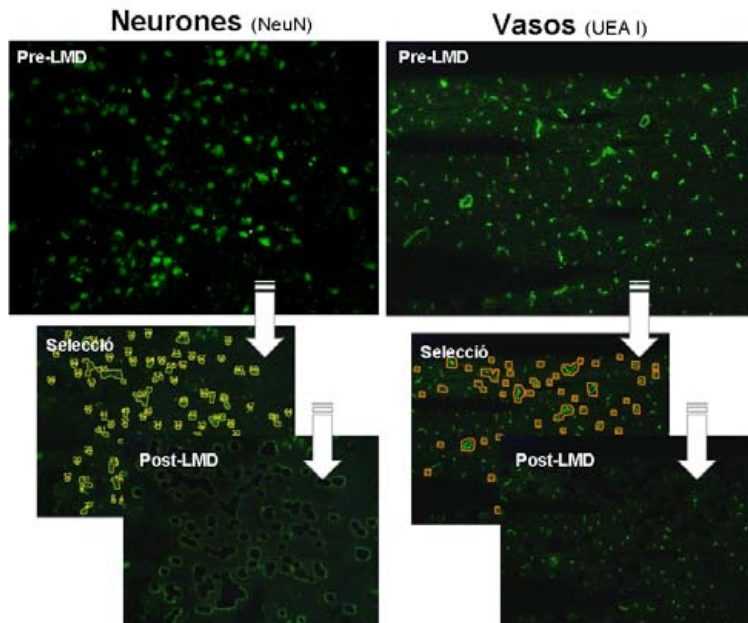


Figura 12. Exemple de LMD de neurones i vasos, les imatges corresponen a les preparacions abans de la LMD, la selecció de les cèl·lules i després de la LMD.

La segona part del treball (article 4) es va dur a terme amb un nou microscopi de microdissecció làser amb fluorescència (Leica LMD6000, Leica) que permetia la detecció de múltiples tipus cel·lulars per immunofluorescència, així vàrem aconseguir tenyir i aïllar neurones i vasos sanguinis cerebrals tal i com descrivim a continuació (Figura 12).

3.4.6.2.1. Preparació de les mostres per microdissecció

Les mostres de cervell es van tallar en un criòstat a un gruix de 10 μm i els talls es van muntar sobre un portaobjectes amb una membrana de poliestiré de 2 μm (MicroDissect GmdH, Germany) i es van guardar a -80°C fins el moment d'utilitzar-les.

Per tenir les neurones les seccions es van fixar amb acetona freda durant 30 segons i després es van deixar assecar durant 5 minuts a 37°C. Els talls es van bloquejar amb la solució de bloqueig (descrita anteriorment al apartat 3.4.4.2.) durant 3 minuts a temperatura ambient i després es van incubar 10 minuts a 37°C amb l'anticòs mouse anti-human NeuN (1:50, Chemicon, USA). Tot seguit es van rentar i les seccions es van incubar amb l'anticòs secundari goat Alexa-Fluor 488 anti-mouse IgG (1:50, Invitrogen, USA) durant 10 minuts a 37°C. Finalment les seccions es van rentar amb TPBS durant 1 minut i es van deixar assecar durant 10 minuts a 37°C abans de procedir a la microdissecció.

El microvasos cerebrals es van tenir utilitzant una lectina de *Ulex europeus* Agglutinin I (UEA I, 1:20, Sigma-Aldrich, USA) conjugada amb FITC tal i com ja s'havia descrit amb anterioritat (Mojsilovic-Petrovic et al., 2004).

3.4.7. Array de proteïnes: SearchLight ®

Aquest sistema es basa en un sistema d'ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) múltiple on tenim en el fons d'una placa d'ELISA diferents anticossos precotinats. Per mesurar el contingut de MMPs vàrem utilitzar el

SearchLight Human MMP Array 1 (Pierce, USA). Aquesta placa ens permet detectar fins a 9 proteïnes de la nostra mostra al mateix temps: gelatinases (MMP-2 and MMP-9), col·lagenases (MMP-1, MMP-8, i MMP-13), estromelisines (MMP-3 and MMP-10), i els inhibidors endògens de les MMP,

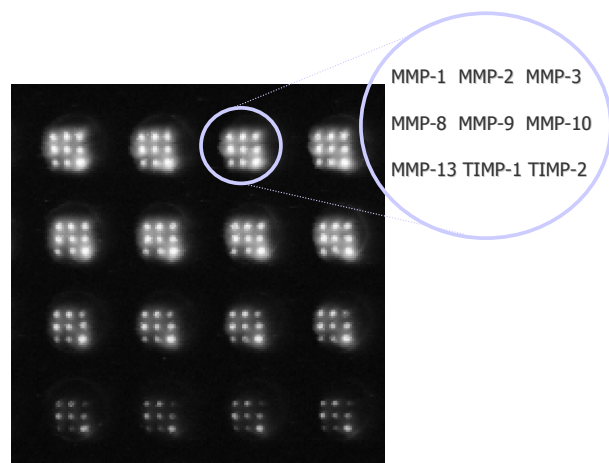


Figura 13. Fotografia d'una placa de Searchlight corresponent a un array de MMPs. A la part superior, esquema de la configuració dels anticossos precotinats als punts.

el TIMP-1 i el TIMP-2 (Figura 13). Cada mostra es carrega i s'analitza per duplicat i es segueix el protocol recomanat pel fabricant que és molt semblant a qualsevol ELISA

sandvitx amb la diferència que la reacció enzimàtica final no és colorimètrica sinó quimioluminiscent. La senyal quimioluminiscent és captada amb una càmera freda (CCD, Pierce, USA). Les imatges obtingudes s'analitzen amb el software Array Vision v8.0 (Imaging Research, Canada).



ARTICLE 1

Captura por microdissección laser: una nueva herramienta para el estudio de la
isquemia cerebral

(*Rev Neurol.* 2007 May 1-15;44(9):551-5)

Captura por microdissección láser: una nueva herramienta para el estudio de la isquemia cerebral

E. Cuadrado, A. Rosell, J. Álvarez-Sabín, J. Montaner

CAPTURA POR MICRODISECCIÓN LÁSER:
UNA NUEVA HERRAMIENTA PARA EL ESTUDIO DE LA ISQUEMIA CEREBRAL

Resumen. Objetivo. Revisar los trabajos realizados con microscopía de captura láser en el tejido cerebral y sus posibles aplicaciones en el estudio de la isquemia cerebral. Desarrollo. El ictus isquémico produce la muerte neuronal tras la oclusión de una arteria cerebral. En este sentido, la fibrinólisis y la neuroprotección han sido las únicas estrategias terapéuticas empleadas. Sin embargo, hoy en día también sabemos que el papel de células como astrocitos, oligodendrocitos, así como de células de la microglía, del endotelio e incluso de la propia matriz extracelular es fundamental en el desarrollo de la isquemia cerebral. Parece, por tanto, que la complejidad de la respuesta isquémica requiere una aproximación menos simplista que obligará al estudio de cada una de las poblaciones celulares implicadas. La microdissección por captura láser aparece como una técnica rápida, eficiente y precisa en el aislamiento de poblaciones celulares puras, lo cual permitiría la obtención de muestras de subpoblaciones celulares o células individuales para su posterior estudio genético, de expresión o proteómico. Conclusiones. La microdissección por captura láser es una técnica práctica y fiable para conseguir grupos celulares específicos que nos permitirá discernir el origen celular de las principales moléculas implicadas en los diferentes pasos de la cascada isquémica. [REV NEUROL 2007; 44: 551-5]

Palabras clave. Captura por microdissección láser. Cascada isquémica. Expresión génica. Ictus. Isquemia cerebral. Proteómica.

INTRODUCCIÓN

El ictus es un trastorno agudo ocasionado por la oclusión o ruptura de los vasos sanguíneos cerebrales, lo que condiciona la muerte de las áreas del sistema nervioso sometidas a los fenómenos de isquemia o hemorragia. Actualmente, en el Estado español, es la primera causa de muerte en mujeres, la segunda en hombres y, además, la causa más importante de incapacidad e invalidez a largo plazo debido a las secuelas motoras y sensitivas que genera.

Para el tratamiento del ictus isquémico la única terapia aprobada es el tratamiento trombolítico con rt-PA, que sólo puede administrarse en la fase hiperaguda. Para los pacientes con ictus hemorrágicos no existe en la actualidad un tratamiento farmacológico específico, si bien los ensayos clínicos con moléculas como el factor VII recombinante activado (rFVIIa) han mostrado resultados esperanzadores [1].

Tras la isquemia cerebral se sucede una serie de procesos biológicos conocidos como 'cascada isquémica'. Se trata de un proceso fisiopatológico complejo que conduce a la muerte neuronal por diferentes vías en las que participan mecanismos de daño como la excitotoxicidad, el estrés oxidativo y la apoptosis, entre otros. Durante las últimas décadas, el estudio de la isquemia cerebral se ha focalizado en el flujo sanguíneo y en las neuronas. En este sentido, la fibrinólisis y la neuroprotección han sido las únicas estrategias terapéuticas empleadas. Sin embargo,

hoy en día también sabemos que el papel de células como astrocitos, oligodendrocitos, así como células de la microglía, del endotelio e incluso la propia matriz extracelular es fundamental en la isquemia cerebral. Parece, por tanto, que la complejidad de la respuesta isquémica requiere una aproximación menos simplista que obligará al estudio de cada una de las poblaciones celulares implicadas.

La microdissección por captura láser (*laser-capture microdissection* (LCM)) aparece como una herramienta excelente ya que permitirá analizar la respuesta subcelular que ocurre en los diferentes tipos celulares en las diferentes áreas cerebrales afectadas. Todo ello contribuirá a un mejor entendimiento de la enfermedad que en un futuro permita identificar posibles nuevas dianas terapéuticas.

CASCADA ISQUÉMICA EN EL ÁMBITO SUBCELULAR

La interrupción del flujo sanguíneo al parénquima cerebral provoca una privación de glucosa y oxígeno necesaria para la producción de energía. Si la situación isquémica persiste en el tiempo, se desencadena una primera muerte neuronal masiva en el llamado *core* del infarto, que puede acompañarse de una muerte secundaria en las zonas periféricas a éste.

En primera instancia, la imposibilidad de producir adenosintrifosfato (ATP) conlleva la imposibilidad de mantener la homeostasis iónica. Las primeras células afectadas por esta falta de aporte de oxígeno son las neuronas. Éstas despolarizan en un proceso conocido como despolarización anóxica, con la resultante liberación de glutamato a la hendidura sináptica [2]. El glutamato se une a sus receptores postsinápticos, como el receptor N-metil-D-aspartato (NDMA), lo que provoca un creciente flujo de sodio y calcio, y la correspondiente despolarización de las neuronas postsinápticas [3,4]. Además, se interfiere la recuperación del glutamato (principalmente por astrocitos), lo que provoca una acumulación anormal de glutamato sináptico. Esto lleva a una elevación intracelular prolongada de Ca^{2+} y, como consecuencia, al catabolismo de moléculas imprescindibles para la

Aceptado tras revisión externa: 02.04.07.

Laboratorio de Investigación Neurovascular. Unidad Neurovascular. Servicio de Neurología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Departamento de Medicina Interna. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona, España.

Correspondencia: Dr. Joan Montaner. Laboratorio de Investigación Neurovascular. Institut de Recerca. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Passeig Vall d'Hebron, 119-129. E-08035 Barcelona. Fax: +34 934 894 032. E-mail: jmontane@ir.vhebron.net

Financiado por el proyecto FIS 05/322 y la red de investigación RENEVAS del Ministerio de Sanidad y Consumo.

© 2007, REVISTA DE NEUROLOGÍA

célula y a la muerte irreversible de las neuronas por mecanismos que implican proteínas dependientes de Ca^{2+} como calpaínas, cPLA2, cinasas o endonucleasas. Esta acumulación de Ca^{2+} produce radicales libres a través de la activación de vías prooxidativas que llevan a la acumulación de óxido nítrico. La combinación de óxido nítrico en exceso con otras moléculas forma radicales libres secundarios, como el peroxinitrito, que actúan inhibiendo la calcioATPasa y, como resultado, se incrementa más la concentración de Ca^{2+} intracelular, lo que provoca la muerte de estas células [5]. Además, el calcio puede entrar en la mitocondria e interrumpir la cadena de transporte de electrones y colapsar el potencial de membrana [6,7]. Si se produce la reperfusión, los electrones libres que se acumulan en la mitocondria reaccionan con el oxígeno y promueven la producción de más radicales libres como el superóxido [6], que provoca daños en el ADN e incita a la célula a activar las vías de apoptosis dentro del llamado daño por reperfusión.

La inflamación es un mecanismo de daño secundario que se produce también tras la isquemia. Muchos factores de transcripción se activan por la hipoxia, tales como el factor nuclear κB (NF- κB), factor inducible por hipoxia (HIF-1), factor regulador de interferón, etc. Estos factores activan citocinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), interleucinas o el interferón, que inducen la expresión de la óxido nítrico sintasa en astrocitos y microglía, lo que genera aún más radicales libres [8,9]. La microglía, las células inflamatorias residentes en el cerebro, se activa pronto en respuesta a los ataques isquémicos y causa una explosión de citocinas proinflamatorias. Los mediadores locales de inflamación inducen la expresión de moléculas de adhesión (VCAM, ICAM, etc.) en la superficie de las células endoteliales que constituyen en parte la barrera hematoencefálica (BHE). Al mismo tiempo, las citocinas proinflamatorias actúan directamente sobre las células endoteliales y provocan un incremento de la permeabilidad de la BHE. Este proceso hace posible que las células de la sangre periférica puedan unirse al endotelio, atravesar la BHE y finalmente migrar al tejido cerebral afectado [10]. La migración de leucocitos (principalmente neutrófilos) a la zona infartada supone un paso crítico en la cascada isquémica, donde desempeñan un papel clave las metaloproteinasas de matriz (MMP). Estas constituyen una familia de proteasas, libres o unidas a membrana, que pueden degradar o modificar proteolíticamente los componentes principales de la matriz extracelular y de la lámina basal (colágenos, laminina, proteoglicanos, etc.) [11]. Las MMP parecen desempeñar un papel en la patogénesis de muchos trastornos neurológicos, incluyendo el ictus, en particular la MMP-9 [12,13]. Se ha descrito en modelos animales que, durante la reperfusión, la MMP-9 causa una rotura secundaria de la BHE debido a la degradación del colágeno IV y otras moléculas de la matriz; en consecuencia, la MMP-9 contribuye a incrementar el área de infarto [14]. En pacientes también se ha observado una correlación positiva entre la concentración de MMP-9 en sangre y el volumen del infarto [15]. Algunas evidencias inmunohistoquímicas en modelos animales sugieren que la expresión postisquémica de MMP-9 se incrementa en neuronas, glía y células endoteliales [16], así como en los neutrófilos reclutados en el área de infarto [17]. Además existen evidencias de que las células gliales, y en particular los astrocitos, pueden desempeñar un importante papel en la patofisiología de la isquemia cerebral [18]. De todas formas, las fuentes celulares de MMP-9 responsables del daño vascular y del parénquima requieren todavía un estudio mayor y más preciso.

En la isquemia cerebral se produce la interacción de procesos tan importantes como necrosis, apoptosis, angiogénesis, proliferación, inflamación, etc. Es por tanto un sistema complejo en el que el patrón de la expresión espaciotemporal de las diferentes moléculas determinará la evolución del infarto y finalmente del paciente. El conocimiento de los diferentes procesos moleculares y celulares posibilitaría el desarrollo de nuevos fármacos que ayudarán a mejorar el pronóstico de los pacientes.

NECESIDAD DE NUEVAS HERRAMIENTAS: EL NACIMIENTO DE LA LCM

Hasta el momento, una limitación para el entendimiento celular de la enfermedad ha sido la imposibilidad de aislar poblaciones puras de células patológicas. A principios de los años noventa aparecieron las primeras técnicas de microdissección en un intento por solventar esta dificultad. El primer tipo de microdissección usaba una jeringuilla estándar para diseccionar células tumorales bajo la visualización directa a través del microscopio. A pesar de su sencillez y facilidad metodológica, esta técnica permitió el estudio genético de muchos tumores [19], pero tenía a su vez inconvenientes ya que la delimitación del grupo de células a estudiar era bastante inexacta, lo que hacía que las muestras fueran poco puras [20].

El primer avance en la microdissección fue el procedimiento de Shibata et al [21] de fraccionamiento selectivo con radiación ultravioleta. Esta técnica se basa en una selección negativa: ablación de las áreas sin interés de un tejido en un portaobjetos. Primero se seleccionan las células de interés por examen microscópico y se aplica un pigmento sobre estas áreas que aporta un escudo protector contra la radiación ultravioleta que destruye las áreas no protegidas.

Las técnicas de microdissección progresaron y resultaron en la LCM. Esta técnica nació con la intención de aislar poblaciones puras dentro del tejido tumoral, normal y displásico para el Cancer Genome Anatomy Project del Instituto Nacional de Salud (NIH) estadounidense [20-24].

La técnica consiste en aplicar una membrana termoplástica transparente sobre un corte histológico montado en un portaobjetos de cristal. El sándwich entre el tejido y la membrana se observa directamente bajo un microscopio. Las células de interés se posicionan en el centro del campo de observación. Entonces se selecciona el área de corte a través de un software informático y un pulso láser activa la membrana, lo que provoca la adhesión de las células, que quedan englobadas por la matriz termoplástica. Cuando la membrana se retira, las células seleccionadas permanecen adheridas a su superficie (Figs. 1 y 2). La membrana se coloca directamente en un tubo que contenga un *buffer* adecuado, donde las células aisladas se liberan de la membrana y quedan listas para los posteriores análisis (ADN, ARN o proteínas) [25].

Así, la LCM aparece como una técnica rápida, eficiente y precisa en el aislamiento de poblaciones celulares puras que permite la obtención de muestras de subpoblaciones celulares o células individuales para su posterior estudio genético, de expresión o proteómico.

LCM Y ESTUDIO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La LCM se diseñó para aislar poblaciones homogéneas de células de secciones histológicas de tejidos complejos. El parénquima cerebral es un tejido heterogéneo donde aparecen tipos celu-

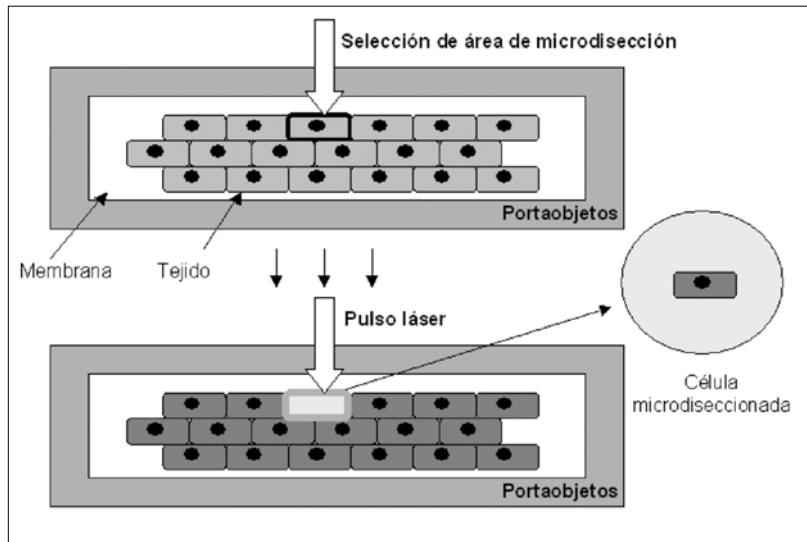


Figura 1. Esquema del proceso de microdissección. El tejido a estudiar se monta sobre un portaobjetos con membrana termoplástica. El corte histológico se observa bajo el microscopio situando las células de interés en el centro del campo. Se seleccionan las células mediante el *software* informático y un pulso láser provoca la adhesión de las células a la membrana; cuando ésta se retira, las células se mantienen adheridas y listas para los siguientes análisis.

lares con funciones muy diversas (neuronas, glía, células endoteliales, etc.) en las diferentes regiones anatómicas e incluso dentro de éstas. Las técnicas tradicionales para determinar diferencias de expresión génica y proteica en diferentes zonas del parénquima como la hibridación *in situ* o la inmunohistoquímica, aunque son útiles, tienen sus limitaciones. La hibridación *in situ* puede ser costosa, la localización celular pobre y los pequeños cambios de expresión, difíciles de detectar. La inmunohistoquímica depende de la disponibilidad de anticuerpos, y la intensidad de señal puede ser débil y difícil de identificar.

Con la obtención de muestras mediante LCM podemos realizar técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), que permite cuantificar la expresión de cualquier gen de secuencia conocida [26]. Además, se ha abierto también la puerta al estudio proteómico de las muestras microdisseccionadas con una resolución mayor a la de los clásicos geles de dos dimensiones, gracias a las nuevas técnicas de purificación e identificación de proteínas.

Se han hecho ya varios estudios para mejorar la técnica y para adaptar los protocolos de la LCM al estudio del tejido cerebral. En estos trabajos se muestran nuevos tipos de tinciones específicas para discernir grupos celulares o se analizan las diferencias que existen entre las muestras fijadas y congeladas [26-29].

Existen ya publicaciones en las que se estudia el sistema nervioso central (SNC) mediante el uso de la LCM. El primero de los estudios fue el realizado por Watanabe et al [30]. Estos autores estudiaron la atrofia dentatorrubropalidoluisiana (DRLPA), que es una enfermedad neurodegenerativa poco frecuente con un patrón de herencia autosómica dominante. La DRLPA tiene como defecto genético la presencia del trinucleótido CAG expandido en un gen del cromosoma 12. Mediante el uso de la LCM con tejido cerebral de pacientes obtenido en necropsias, se pudieron aislar diferentes tipos celulares del cerebelo y del cerebro, y se consiguió determinar que el rango de repeticiones CAG en las neuronas del cerebelo era inferior al de las células gliales del cerebelo. Aún más, dentro del grupo de células neu-

ronales se observó que las células granulares tienen menos repeticiones que las células de Purkinje o las neuronas cerebrales.

Otro estudio fue el realizado por Fassunke et al [31], en el que hicieron análisis de ARNm de células obtenidas de gangliomas de pacientes con epilepsia resistente a fármacos. El objetivo era caracterizar las células que expresan el epítipo CD34, característico de las células madre. Los investigadores observaron que estas células coexpresaban CD34 con neurofilamento (NFM), que es una proteína típica neuronal, lo que confirmaría la hipótesis de que los gangliomas contienen elementos neuronales con una diferenciación afectada o atípica.

Recientemente se ha publicado un estudio en el que se analizaba el patrón de expresión regional y celular del receptor de melatonina 1 (MT1) en el sistema dopaminérgico central. En este trabajo, publicado por Uz et al [32], se consiguió demostrar mediante el uso de la LCM la presencia de MT1 en áreas relacionadas con comportamientos dopaminérgicos, como el área 10 de Brodmann (córtex prefrontal), el putamen, el núcleo caudado, el núcleo *accumbens*, la sustancia

negra, la amígdala y el hipocampo tanto en humanos como en roedores. Además, se demostró la variación circadiana de la expresión del receptor MT1 en el núcleo *accumbens* y el área tegmental ventral en ratón. Así, se vio que la expresión del ARNm de MT1 es baja durante la noche y alta durante el día.

Hellencourt et al [33] utilizaron un modelo murino de muerte celular inducida químicamente con trimetilestano, que produce daño neuronal con inflamación celular y necrosis. Mediante LCM capturaron células del giro dentado hipocampal y de la capa de células piramidales. Mediante análisis por *microarrays* de ADNc detectaron cambios en 115 genes en el hipocampo, que incluían genes asociados con respuesta inmediata, homeostasis del calcio, señalización celular, ciclo celular, inmunomodulación y reparación del ADN.

El último de los estudios es el realizado por Pérez-Manso et al [34]. Su intención era desarrollar un protocolo para estudiar los cambios en la expresión génica en circuitos cerebrales de interés. Utilizaron un modelo murino al que se le provocaba una lesión unilateral de la vía talamoestriatal con la neurotoxina 6-OHDA. Mediante LCM, capturaron neuronas talámicas positivas para vGLUT2, marcadas por hibridación *in situ*. Los investigadores observaron que los niveles de ARNm de vGLUT2 de las neuronas lesionadas eran tres veces superiores respecto al de las células no lesionadas.

LCM Y ESTUDIO LA ISQUEMIA CEREBRAL

Aunque todavía son pocos los trabajos publicados en neurobiología en los que se hace uso de esta nueva tecnología, los resultados comentados parecen prometedores. En lo referente a isquemia cerebral, tan sólo se han publicado dos estudios en los que se ha utilizado la LCM, si bien ninguno de ellos con tejido cerebral humano.

El primero de ellos es el realizado por Liu et al [35]. Estos investigadores pretendían analizar la influencia de un tratamiento combinado de atorvastatina con rt-PA tras la isquemia

cerebral. Para ello utilizaron un modelo murino de isquemia cerebral transitoria, en el que las ratas fueron tratadas con rt-PA, atorvastatina o con una combinación de los dos. Capturaron mediante LCM células endoteliales de las regiones infartadas. Analizaron la expresión de genes relacionados con la trombosis y la permeabilidad de la BHE, como el receptor activado por proteasas 1 (*protease-activated receptor 1*, PAR-1), el factor tisular, la MMP-2 o la MMP-9. El resultado fue que el tratamiento de la isquemia con atorvastatina en combinación con rt-PA reducía significativamente los niveles de PAR-1 y factor tisular, que son moduladores clave en la formación de trombos. Además, la expresión tanto de MMP-2 como MMP-9 también se veía reducida en el tratamiento combinado, cosa que no sucedía con la monoterapia. En consecuencia, las ratas tratadas con tratamiento combinado reducían el volumen del infarto al tiempo que mejoraba la permeabilidad de la microvasculatura cerebral.

El segundo de los trabajos es el publicado por Haqqani et al [36]. El objetivo del estudio era caracterizar el patrón de expresión proteica de los vasos cerebrales en un modelo murino de isquemia cerebral bilateral transitoria. Los investigadores sometieron las ratas a una isquemia bilateral clampando las dos carótidas durante 20 minutos. Luego las ratas fueron sacrificadas tras 1, 6 o 24 horas de reperusión y se analizaron los vasos sanguíneos cerebrales capturados mediante LCM. Se consiguió identificar un total de 57 proteínas que se expresaban diferencialmente después de una isquemia global. El análisis de estas proteínas expresadas diferencialmente demostró un programa secuencial y ordenado en la regulación de proteínas de la microvasculatura en el curso de la reperusión postisquémica que se correlacionaba temporalmente con la aparición de una mayor patología vascular, incluyendo la disrupción de la BHE. Así, una hora después de la reperusión, descendía la expresión de proteínas transportadoras y canales iónicos, pero aumentaban las señales de transducción, de factores de transcripción y de proteínas implicadas en el metabolismo de carbohidratos. Sin embargo, a las 24 horas, aumentaba la expresión de proteínas implicadas en la remodelación de la matriz extracelular, proteínas inflamatorias y proteínas de defensa celular.

En ambos estudios los autores nos recuerdan que la microdissección que realizan del endotelio de la microvasculatura, pese a la contaminación inevitable de pies astrocitarios, supone el aislamiento físico de la BHE con el gran potencial diagnóstico que supone el estudio exclusivo de dicha estructura.

CONCLUSIONES

El estudio de los procesos fisiopatológicos ligados a la isquemia cerebral, dada su complejidad, requiere de una mayor precisión y de abordajes metodológicos celulares y subcelulares. Con la aparición de la LCM, la posibilidad de estudiar un tejido a este nivel es una realidad. Esta herramienta se utiliza ya extensamente en otros campos, como la oncología, con resultados muy satisfactorios. Además, esta nueva tecnología está experimentando un gran auge con la aparición de nuevos complementos comerciales exclusivos que hacen más sencillo el manejo de la técnica e incrementan de forma sustancial su eficiencia en la captura y en el umbral de la concentración de ADN, ARN o proteínas.

Así, podemos decir que la LCM es una técnica práctica y fiable para conseguir grupos celulares específicos. Además, el

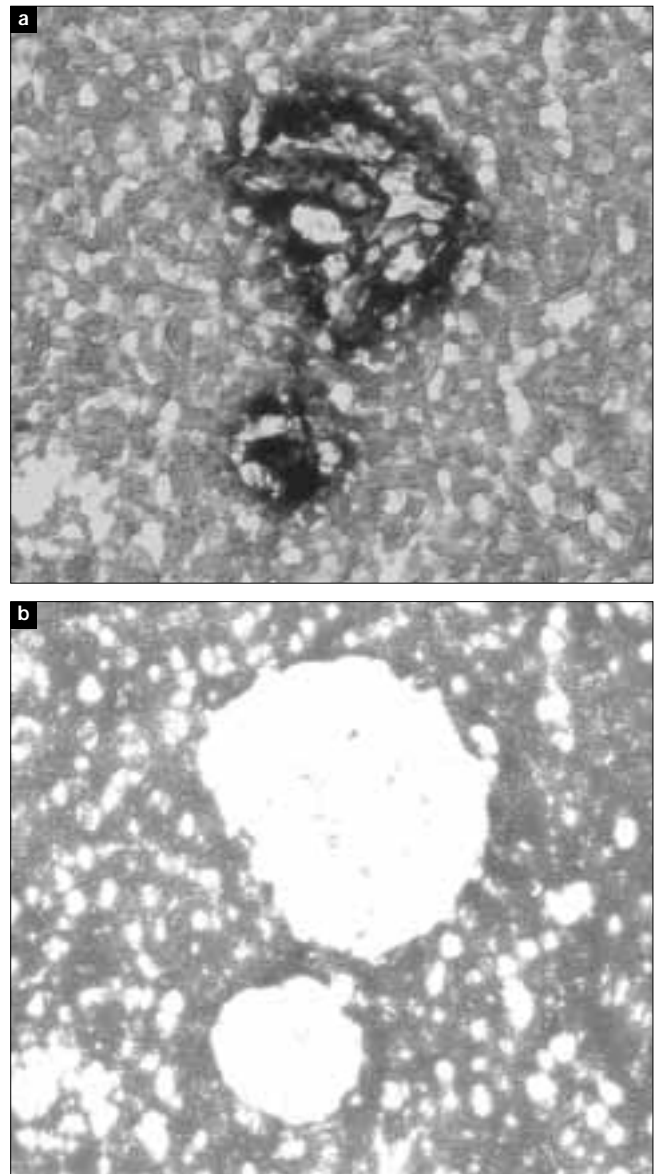


Figura 2. Ejemplo de microdissección: capilares en tejido cerebral humano antes (a) y después (b) de la captura por microdissección láser.

tejido transferido en la membrana mantiene la morfología original y el uso de estas membranas termoplásticas estériles y desechables minimiza la contaminación potencial, lo cual es muy importante para el análisis de expresión génica.

Actualmente todavía hay que mejorar la técnica y los protocolos debido a la complejidad y las características del tejido cerebral, que dificulta la fácil y rápida identificación de las células de interés, evitando posibles contaminaciones entre grupos celulares.

Por tanto, el estudio de la isquemia cerebral en humanos mediante las ventajas y oportunidades que brinda esta técnica nos permitirá discernir el origen celular de las principales moléculas implicadas en los diferentes pasos de la cascada isquémica. Esperamos que estos avances permitan, en un futuro, la identificación de nuevas dianas terapéuticas que podrán mejorar los tratamientos actuales para así mejorar la evolución de nuestros pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. 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; 24: 777-85.
2. Turley KR, Toledo-Pereyra LH, Kothari RU. Molecular mechanisms in the pathogenesis and treatment of acute ischemic stroke. *J Invest Surg* 2005; 18: 207-18.
3. Ovbiagle B, Kidwell C, Starkman S, Saver JL. Neuroprotective agents for the treatment of acute ischemic stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2003; 3: 9-30.
4. Chen SD, Lee JM, Yang DI, Nassief A, Hsu CY. Combination therapy for ischemic stroke: Potential of neuroprotectants plus thrombolytics. *Am J Cardiovasc Drugs* 2002; 5: 303-13.
5. Zukin RS, Jover T, Yokota H, Cappuccio I, Calderone A, Tanaka H, et al. Molecular and cellular mechanisms of ischemia-induced neuronal death. In Mohr JP, ed. *Stroke: pathogenesis, diagnosis, and management*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2004. p. 829-54.
6. Zhang Y, Marcillat O, Giulivi C, Ernster L, Davies KJ. The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem* 1990; 265: 16330-6.
7. Rego AC, Santos MS, Oliveira CR. Glutamate mediated inhibition of oxidative phosphorylation in cultured retinal cells. *Neurochem Int* 2000; 36: 159-66.
8. Murphy S, Simmons ML, Agullo L, García A, Feinstein DL, Galea E, et al. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci* 1993; 16: 323-8.
9. Merrill JE, Murphy SP, Mitrovic B, Mackenzie-Graham A, Dopp JC, Ding M, et al. Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production by oligodendrocytes. *J Neurosci Res* 1997; 48: 372-84.
10. Zheng Z, Yenari MA. Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurol Res* 2004 26: 884-92.
11. Gu Z, Cui J, Brown S, Fridman R, Mobashery S, Strogan AY, et al. A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 2005; 27: 6401-8.
12. 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: 360-6.
13. Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 502-11.
14. Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, et al. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: 558-68.
15. Montaner J, Álvarez-Sabín J, Molina C, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, et al. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke. Temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* 2001; 32: 1759-66.
16. Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, et al. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* 2001; 21: 7724-32.
17. Anthony DC, Ferguson B, Matyszak MK, Miller KM, Esiri MM, Perry VH. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997; 23: 406-15.
18. Nedergaard M, Dirnagl U. Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia* 2005; 50: 281-6.
19. Going JJ, Lamb RF. Practical histological microdissection for PCR analysis. *J Pathol* 1996; 179: 121-4.
20. Rubin MA. Understanding disease cell by cell. *Science* 2002; 296: 1329-30.
21. Shibata D, Hawes D, Li ZH, Hernández AM, Spruck CH, Nichols PW. Specific genetic analysis of microscopic tissue after selective ultraviolet radiation fractionation and the polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 1992; 141: 539-43.
22. Simone NL, Bonner RF, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Liotta LA. Laser-capture microdissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis. *Trends Genet* 1998; 14: 272-6.
23. Strausberg RL. The cancer genome anatomy project: new resources for reading the molecular signatures of cancer. *J Pathol* 2001; 195: 31-40.
24. Bonner RF, Emmert-Buck ME, Cole K, Pohida T, Chuaqui R, Goldstein S, et al. Laser capture microdissection: molecular analysis of tissue. *Science* 1997; 278: 1481-3.
25. Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RD, Zhuang Z, Goldstein SR, et al. Laser capture microdissection. *Science* 1996; 274: 998-1001.
26. Vincent VAM, De Voss JJ, Ryan HS, Murphy GM Jr. Analysis of neuronal gene expression with laser capture microdissection. *J Neurosci Res* 2002; 69: 578-86.
27. Moulédous L, Hunt S, Harcourt R, Harry J, Williams KL, Gutstein HB. Navigated laser capture microdissection as an alternative to direct histological staining for proteomic analysis of brain samples. *Proteomics* 2003; 3: 610-5.
28. Moulédous L, Hunt S, Harcourt R, Harry J, Williams KL, Gutstein HB. Proteomic analysis of immunostained, laser-capture microdissected brain samples. *Electrophoresis* 2003; 24: 296-302.
29. Kamme F, Salunga R, Yu J, Tran DT, Zhu J, Lou L, et al. Single-cell microarray analysis in hippocampus CA1: Demonstration and validation of cellular heterogeneity. *J Neurosci* 2003; 23: 3607-15.
30. Watanabe H, Tanaka F, Doyu M, Riku S, Yoshida M, Hashizume Y, et al. Differential somatic CAG repeat instability in variable brain cell lineage in dentatorubral pallidolysian atrophy (DRPLA): a laser-captured microdissection (LCM)-based analysis. *Hum Genet* 2000; 107: 452-7.
31. Fassunke J, Majores M, Ullmann C, Elger CE, Schramm J, Wiestler OD, et al. In situ-RT and immunolaser microdissection for mRNA analysis of individual cells isolated from epilepsy-associated glioneuronal tumors. *Lab Invest* 2004; 84: 1520-5.
32. Uz T, Arslan AD, Kurtuncu M, Imbesi M, Akhisaroglu M, Dwivedi Y, et al. The regional and cellular expression profile of the melatonin receptor MT1 in the central dopaminergic system. *Brain Res Mol Brain Res* 2005; 136: 45-53.
33. Hellencourt CL, Harry GJ. Molecular profiles of mRNA levels in laser capture microdissected murine hippocampal regions differentially responsive to TMT-induced cell death. *J Neurochem* 2005; 93: 206-20.
34. Pérez-Manso M, Barroso-Chinea P, Aymerich MS, Lanciego JL. 'Functional' neuroanatomical tract tracing: analysis of changes in gene expression of brain circuits of interest. *Brain Res* 2006; 1072: 91-8.
35. Liu XS, Zhang ZG, Zhang L, Morris DC, Kapke A, Lu M, et al. Atorvastatin downregulates tissue plasminogen activator-aggravated genes mediating coagulation and vascular permeability in single cerebral endothelial cells captured by laser microdissection. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006; 26: 787-96.
36. Haqqani AS, Nesic M, Preston E, Baumann E, Kelly J, Stanimirovic D. Characterization of vascular protein expression patterns in cerebral ischemia/reperfusion using laser capture microdissection and ICAT-nanoLC-MS/MS. *FASEB J* 2005; 19: 1809-21.

LASER CAPTURE MICRODISSECTION: A NEW TOOL FOR THE STUDY OF CEREBRAL ISCHEMIA

Summary. Aim. To review studies using microscopy techniques of laser capture microdissection on cerebral tissue and the possible applications of this methodology for the study of cerebral ischemia. Development. Since ischemic stroke induces neuronal death following the occlusion of a brain artery, reperfusion and neuroprotective treatments are the only therapeutic strategies used so far. However, the relevant role of other brain cells such as astrocytes, oligodendrocytes, microglial and endothelial cells, or even the extracellular matrix itself, in several steps of the ischemic cascade, adds a huge complexity to stroke. In this scenario lesser simplistic approaches will be required. Therefore, the individual study of all cellular populations involved in cerebral ischemia seems mandatory to determine the cellular source of all participant molecules. Laser capture microdissection appears as a rapid, efficient and precise technique to isolate cell populations for further analysis of gene expression or proteomics. Conclusions. Laser capture microdissection is a useful and reliable technique to obtain specific cell groups that might guide us to distinguish the cellular origin of the main molecules that are involved in the different steps of the ischemic cascade. [REV NEUROL 2007; 44: 551-5]

Key words. Cerebral ischemia. Gene expression. Ischemic cascade. Laser capture microdissection. Proteomics. Stroke.

ARTICLE 2

MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke

(Stroke. 2008 Apr;39(4):1121-6)

MMP-9–Positive Neutrophil Infiltration Is Associated to Blood–Brain Barrier Breakdown and Basal Lamina Type IV Collagen Degradation During Hemorrhagic Transformation After Human Ischemic Stroke

Anna Rosell, PhD; Eloy Cuadrado, MSc; Arantxa Ortega-Aznar, MD; Mar Hernández-Guillamon, PhD; Eng H. Lo, PhD; Joan Montaner, MD, PhD

Background and Purpose—An abnormal expression of some matrix metalloproteinases (MMPs) is related with hemorrhagic transformation events after stroke. Our aim was to investigate MMP-2 and MMP-9 in the ischemic brain and its relation with blood–brain barrier breakdown after hemorrhagic transformation in human stroke.

Methods—We assessed 5 cases of fatal ischemic strokes with hemorrhagic complications; brain samples were obtained from infarct, hemorrhagic, and contralateral tissue. MMP-9 and MMP-2 content was analyzed by zymography and immunohistochemistry was performed to localize MMP-9 and to assess collagen IV integrity in the basal lamina. Laser capture microdissection was performed to isolate blood–brain barrier vessels to study these MMPs.

Results—Overall, MMP-9 levels were higher both in hemorrhagic and nonhemorrhagic infarcted tissue compared to contralateral areas ($P < 0.0001$ and $P < 0.05$). Moreover, levels of the cleaved MMP-9 85kDa-form were significantly elevated in the hemorrhagic compared to nonhemorrhagic and contralateral areas ($P = 0.033$ and $P < 0.0001$). No changes were found for MMP-2 content. Immunostaining revealed a strong MMP-9–positive neutrophil infiltration surrounding brain microvessels associated with severe basal lamina type IV collagen degradation and blood extravasation. Microdissection confirmed that content of MMP-9 was similarly high in microvessel endothelium from hemorrhagic and infarcted areas compared to contralateral hemisphere vessels ($P < 0.05$), pointing to neutrophils surrounding dissected microvessels as the main source of MMP-9 in hemorrhagic areas.

Conclusions—Our results show a strong neutrophil infiltration in the infarcted and hemorrhagic areas with local high MMP-9 content closely related to basal lamina collagen IV degradation and blood–brain barrier breakdown. Microvessel and inflammatory MMP-9 response are associated with hemorrhagic complications after stroke. (*Stroke*. 2008;39:1121-1126.)

Key Words: blood–brain barrier ■ collagen IV ■ hemorrhagic transformation ■ MMP-9 ■ neutrophil ■ stroke

Ischemic stroke is a leading cause of death and disability worldwide that occurs mainly because of occlusion of a cerebral artery by a thrombus. Unless there is an early restoration of blood flow, the brain parenchyma can suffer irreversible damage because of neuronal death, blood–brain barrier (BBB) breakdown, and cellular edema.

The BBB protects the brain against molecules and pathogens circulating through the blood stream. This specialized neurovascular interface functionally comprises the endothelial tight junction, basal lamina, and astrocytic end feet. BBB leakage and the extravasation of blood constituents to the brain parenchyma are highly correlated with loss of basal lamina antigens.¹ Thus, maintaining basal lamina integrity is

a key challenge to prevent hemorrhagic complications and brain damage induced by this phenomenon.

Recently, there has been an emphasis on investigating the role of matrix metalloproteinases (MMP) which can degrade almost all components of the extracellular matrix and basal lamina such as laminins, fibronectin, or type IV collagen, weakening brain microvessels and predisposing them to rupture and increasing the risk of cerebral hemorrhage.^{2,3} These previous investigations demonstrated that an abnormal expression of MMP-2 (gelatinase A) or MMP-9 (gelatinase B) appears after cerebral ischemia^{4–6} and in lipopolysaccharide-injured brains,⁷ contributing to brain injury and BBB breakdown. Pharmacological or genetic inhibition of MMP-9

Received August 3, 2007; final revision received September 3, 2007; accepted September 19, 2007.

From Neurovascular Research Laboratory (A.R., E.C., M.H.-G., J.M.), Neurovascular Unit, Department of Neurology, Universitat Autònoma de Barcelona, Institut de Recerca, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; Neuropathology Unit (A.O.-A.), Department of Pathology, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; Neuroprotection Research Laboratory (A.R., E.H.L.), Department of Radiology, Massachusetts General Hospital, and Program in Neuroscience, Harvard Medical School, Charlestown, Mass.

Correspondence to Joan Montaner, Neurovascular Research Laboratory, Institut de Recerca, Hospital Vall d'Hebron, Pg Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. E-mail 31862jmv@comb.es

© 2008 American Heart Association, Inc.

Stroke is available at <http://stroke.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/STROKEAHA.107.500868

significantly decreases infarct size and the risk of hemorrhagic complications,^{8,9} whereas tissue plasminogen activator-associated hemorrhage and edema appear to be correlated to MMP-9 dysregulation.^{10,11}

In humans, investigations in peripheral blood have shown high MMP-9 levels in patients with ischemic stroke and, more importantly, that MMP-9 levels are related to poor neurological outcome, infarct growth, and hemorrhagic transformation (HT) events.^{12,13} We recently reported evidence that neutrophil brain recruitment occurs in the perivascular ischemic areas after human stroke.¹⁴ However, the precise relationship between dysregulated MMP, inflammatory cell responses, and the concomitant hemorrhagic conversion in stroke remains to be fully elucidated.

In the present study we aimed to investigate in human brain samples, the relationships between MMP-9 protein expression, basal lamina degradation, inflammatory neutrophil infiltration, and the presence of hemorrhage after ischemic stroke.

Materials and Methods

Brain Tissue Samples

Five deceased patients who had an ischemic stroke within the previous 4 days were included in the study (3 women and 2 men). All selected cases had a hemorrhagic transformation of the infarcted area. One case received thrombolytic treatment 3 days before death and all other cases experienced spontaneous hemorrhagic transformations. On autopsy and during macroscopic examination, infarcted area was delimited by an experienced neuropathologist (mainly through consistence and color of the parenchyma) and neuroradiology images were used to help in obtaining brain tissue from ipsilateral (infarct [I] or HT) and contralateral (C) hemisphere. All samples were obtained within the first 6 hours after death and snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for gelatin zymographies, or fixed with formalin for immunohistochemistry techniques. This study was approved by the Ethics Committee of the hospital and informed consent was acquired from all relatives before the autopsy.

Frozen samples were homogenated for gelatin zymography. Brain tissue (0.2 g) was mixed with 0.7 mL of cold lysis buffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mmol/L CaCl_2 , 0.05% Brij-35, 0.02% NaN_3 , and 1% Triton X-100) containing protease inhibitors (phenylmethanesulfonyl fluoride [PMSF] and aprotinin) and centrifuged at 12 000g for 10 minutes. Total protein concentrations were determined by bicinchoninic acid assay (Pierce).

Laser Capture Microdissection

Fresh-frozen human brain sections embedded in OCT were cut 8 μm thick. Sections were mounted on nonadhesive glass slides, fixed 1 minute in 70% ethanol, and stained with the Alkaline Phosphatase chromogen (BCIP/NBT, Chemicon) as described elsewhere.¹⁵ UV-Laser MicroBeam technology (Palm) was applied for microdissection. The tissue was catapulted into polymerase chain reaction adhesive caps (MicroDissect). Protein was extracted from the tissues procured by laser capture microdissection (LCM) by vortexing the cap for 5 minutes in 15 μL of lysis buffer.

Gelatin Zymography

Substrate-specific zymography for determination of gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9 was performed on brain homogenates and microdissected microvessels. For whole tissue, samples were adjusted to equal protein (10 μg) and for microdissection samples, equal areas of microdissected vessels were loaded (500 000 μm^2). Then, samples were mixed 1:1 with loading buffer (80 mmol/L Tris-HCl [pH 6.8], 4% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue). Proteins were separated by electrophoresis in a SDS-PAGE gels containing 0.1% gelatin (Invitrogen) at 100 Volts constant current. Prestained molecular weight standard (Bio-Rad) and gelatinase recombinant proteins including MMP-2 and

MMP-9 (Chemicon) were also performed with samples. After electrophoresis, gels were washed to remove SDS with 2.5% Triton X-100 for 1 hour and incubated at 37°C with incubation buffer containing (50 mmol/L Tris-HCl [pH 7.5], 10 mmol/L CaCl_2 , 0.02% NaN_3). Enzymatic bands were visualized after staining for 1 hour with amido black 0.1% and destained for 30 minutes with a solution of 30% (v/v) methanol and 10% (v/v) glacial acetic acid. To measure gelatinase activities, gels were read using Gel Logic 440 Imaging System (Kodak) and the density of the bands (arbitrary units) was normalized to human gelatinase control (pro-MMP-9 band) to allow comparisons between gels.

Immunohistochemistry

Brain samples were fixed 48 hours with formalin 10%, embedded in paraffin, and cut into 8- μm sections using a microtome. Paraffin was removed, endogenous peroxidases were blocked with methanol- H_2O_2 , and unspecific binding sites were blocked with 10% normal goat serum for 2 hours. Sections were incubated with a mouse antihuman MMP-9 1:50 (Chemicon) and a mouse antihuman collagen IV 1:10 (Masterdiagnostica) or mouse antihuman myeloperoxidase, myeloperoxidase, (Masterdiagnostica) for 1 hour at room temperature. Secondary antibody (goat antimouse horseradish peroxidase, 1:500) was applied during 30 minutes. Immunoreactive sites were developed with DAB solution and sections counterstained with Mayer hematoxylin.

Number of MMP-9⁺ neutrophils, number of microvessels with peripheral MMP-9⁺ neutrophils, and number of microvessels presenting erythrocyte extravasation (named disrupted microvessels) were counted in 20 random fields at 10 \times magnification per area and subject.

Statistical Analyses

SPSS 12.0 package was used for statistical analyses. Statistical significance was assessed by ANOVA followed by Bonferroni tests for intergroup comparisons. The Spearman coefficient was used to study correlations between continuous variables. Values are given in mean \pm SEM. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

High Content of MMP-9 in the Hemorrhagic Infarcted Brain

Our zymography data shows that whole brain homogenates displayed a wide variability in total MMP-9 levels (HT, 2.27 ± 0.21 ; I, 1.82 ± 0.22 ; and C, 0.71 ± 0.04 band density) but a narrow difference for MMP-2 (HT, 0.44 ± 0.08 ; I, 0.44 ± 0.05 ; and C, 0.29 ± 0.04 band density) was found, as Figure 1A represents. Because two clear bands could be detected for MMP-9 corresponding to pro-MMP-9 at 95kDa and a cleaved form at 85kDa, further analysis of these 2 proteins was performed (HT, 1.60 ± 0.16 ; I, 1.34 ± 0.18 ; and C, 0.43 ± 0.02 for pro-MMP-9 band density and HT, 0.67 ± 0.07 ; I, 0.48 ± 0.04 ; and C, 0.27 ± 0.02 for cleaved MMP-9 band density).

As Figure 1B shows, total MMP-9 levels (including MMP-9 form at 95kDa and cleaved form at 85kDa) peaked in areas of hemorrhagic transformation that contained significantly higher levels than in the contralateral hemisphere ($P < 0.0001$). Similarly, infarct areas also demonstrated elevated MMP-9 levels when compared with contralateral tissue ($P = 0.001$). No statistically significant difference was reached when comparing hemorrhagic versus nonhemorrhagic areas within the ischemic territory. However, a detailed analysis of the content of proband cleaved MMP-9 forms showed significantly higher levels of cleaved MMP-9 in the hemorrhagic areas compared to nonhemorrhagic and contralateral tissue ($P = 0.033$ and $P < 0.0001$, respectively) and in nonhemorrhagic infarcts compared to contralaterals ($P = 0.012$; Figure 1C,D). No significant differences were found for MMP-2 content.

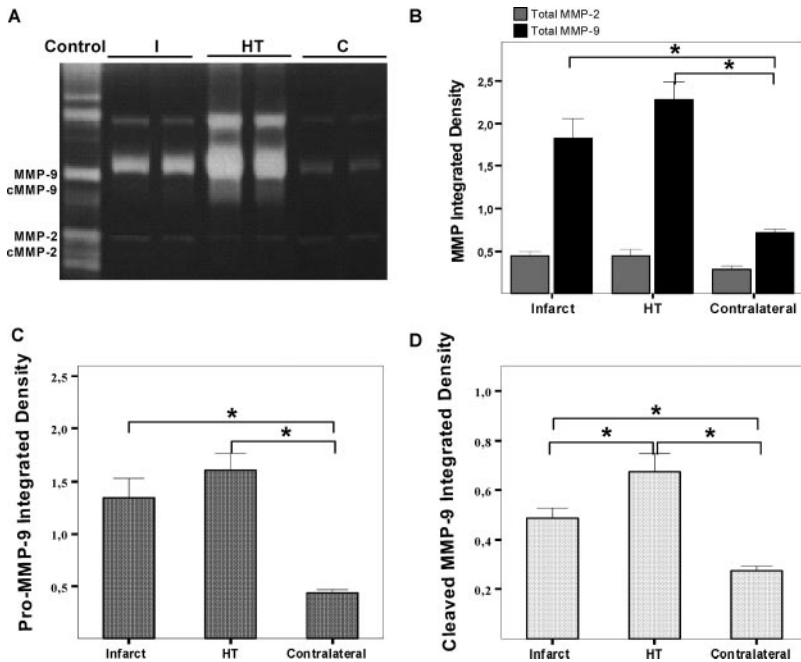


Figure 1. MMP-2 and MMP-9 levels. A, Representative gelatin zymography showing differences in MMP-9 and cleaved MMP-9 (cMMP-9) levels but not in MMP-2 nor cleaved MMP-2 (cMMP-2) among the studied areas in brain homogenates. B, Bar graphs represent mean values and standard error of mean (SEM) of total MMP-9 (in black) and total MMP-2 (in gray) of each studied area. C and D, Bar graphs represent specific contribution of pro-MMP-9 and cleaved MMP-9 showing significant differences between hemorrhagic and nonhemorrhagic infarcted areas only for cleaved MMP-9. Normalized band density was calculated as a ratio of the bands to human control (pro-MMP-9 band) loaded in each gel. * $P < 0.05$.

Endothelial MMP-9 Content

In microdissected microvessels, only MMP-9 was observed in the zymograms and no MMP-2 could be detected. Again, our results showed higher MMP-9 levels in the microvessels within areas of hemorrhagic transformation compared to the contralateral hemisphere ($P = 0.012$), but no statistically significant differences were detectable between hemorrhagic and nonhemorrhagic areas within the infarct itself ($P = 0.51$). Overall, MMP-9 content in infarcted areas was increased when compared to the contralateral hemisphere ($P = 0.043$), as Figure 2 shows.

MMP-9⁺ Neutrophil Infiltration Is Associated With Basal Lamina Leakage

Histological studies and immunostaining performed to localize MMP-9 (Figure 3A) showed that an important source of MMP-9 were perivascular infiltrated neutrophils, as MPO immunostaining demonstrates (Figure 3B).

The number of MMP-9⁺ neutrophils was significantly higher in the hemorrhagic transformation and infarct areas when compared to the contralateral site ($P < 0.0001$), peaking in those hemorrhagic areas when compared to the infarcts ($P < 0.0001$). The number of capillaries that presented neutrophil infiltration and the number of disrupted microvessels were increased in infarcted areas compared with contralateral ($P < 0.0001$), with the highest counts occurring in the hemorrhagic transformation areas ($P < 0.0001$); Figure 3C).

A regression analysis showed that total MMP-9 levels detected in whole brain by zymography were positively correlated with the number of MMP-9⁺ neutrophils ($r = 0.808$, $P = 0.001$), the number of microvessels presenting MMP-9⁺ neutrophils ($r = 0.632$, $P = 0.028$), and microvessels associated with erythrocyte extravasation ($r = 0.673$, $P = 0.016$).

To assess the involvement of basal lamina integrity, we stained the brain samples for type IV collagen. Our results

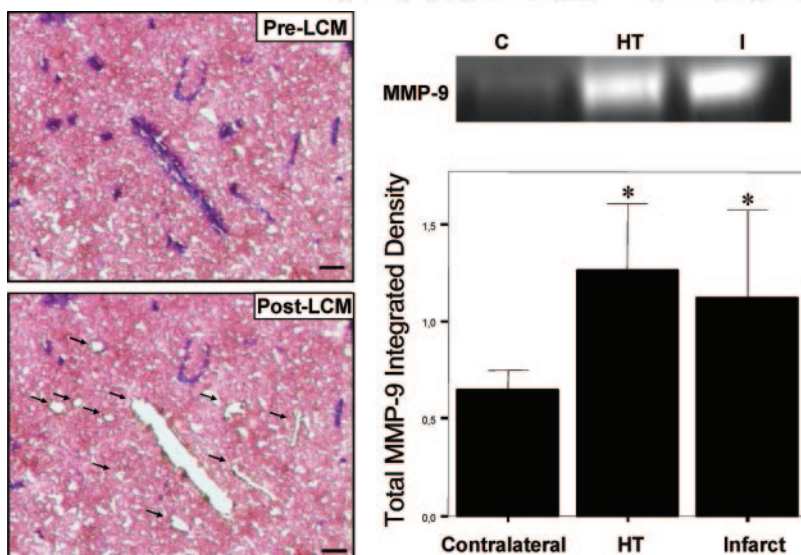


Figure 2. Laser capture microdissection on brain tissue. Images show stained microvessels with BCIP/NBT before and after microdissection (arrows). Representative zymogram from microdissected vessels and bar graph quantifications showing important differences in endothelial MMP-9 content between infarct and contralateral samples but not between hemorrhagic and nonhemorrhagic infarcted areas. * $P < 0.05$ vs contralateral. Bars = 50 μm .

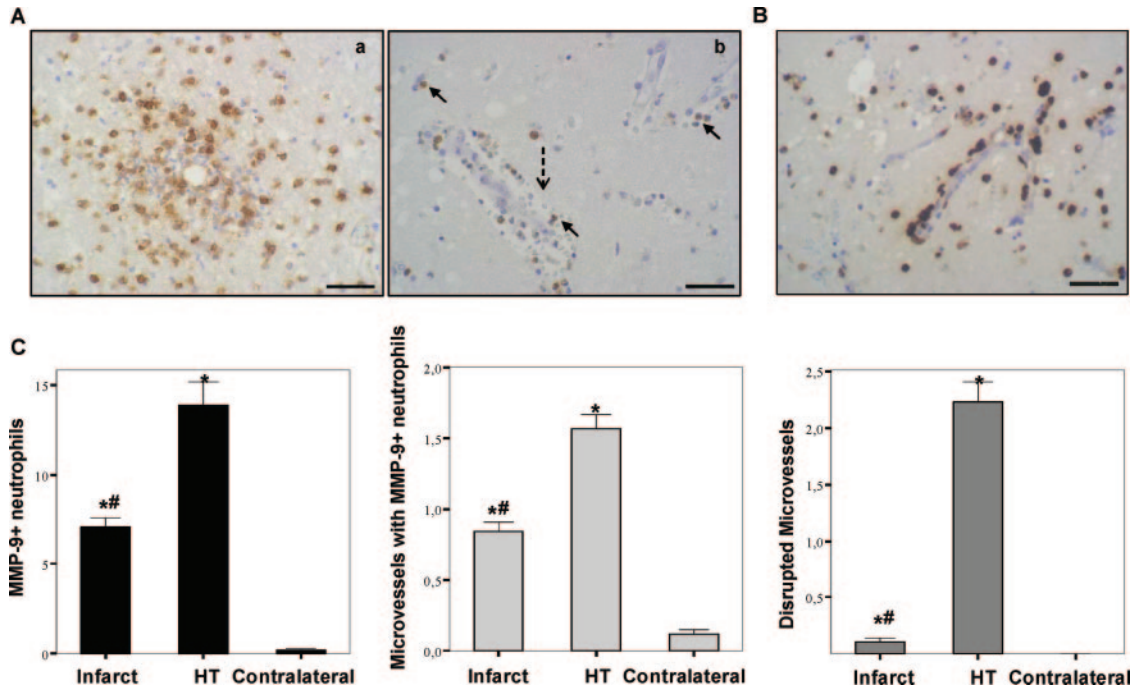


Figure 3. MMP-9 (A) and MPO (B) immunostaining confirming that most of the infiltrated cells are MMP-9⁺ neutrophils. This neutrophil infiltration (a) surrounding the microvascular vessels (head arrows in b) is associated with erythrocyte extravasation and microvascular disruption (dashed arrow in b). C, bar graph representation showing increased number of neutrophils MMP-9⁺, microvessels with MMP-9⁺ infiltrated neutrophils and microvessel disruption in the infarct and HT areas. Graphs represent means and SEM per 10× field of the whole group of subjects and bars=50 μm. *P*<0.0001 compared to contralateral* and to HT#.

showed a strong immunoreaction in the contralateral vessels, whereas a weaker signal was observed in the infarct and hemorrhagic areas. Moreover, as Figure 4A demonstrates, we found a weaker collagen IV signal in vessels of both ischemic areas clearly associated with the presence of perivascular neutrophils in relation with collagen IV degradation. In fact, some capillaries demonstrated a complete disappearance of collagen IV immunoreaction associated with massive neutrophil

MMP-9⁺ infiltration together with the appearance of blood erythrocytes in the parenchyma (Figure 4A). Finally, MMP-9⁺ neutrophils were colocalized with type IV collagen degradation in infarct and hemorrhagic microvessels, as Figure 4B shows.

Discussion

The present investigation demonstrates that in hemorrhagic complications that occur after human ischemic stroke, the

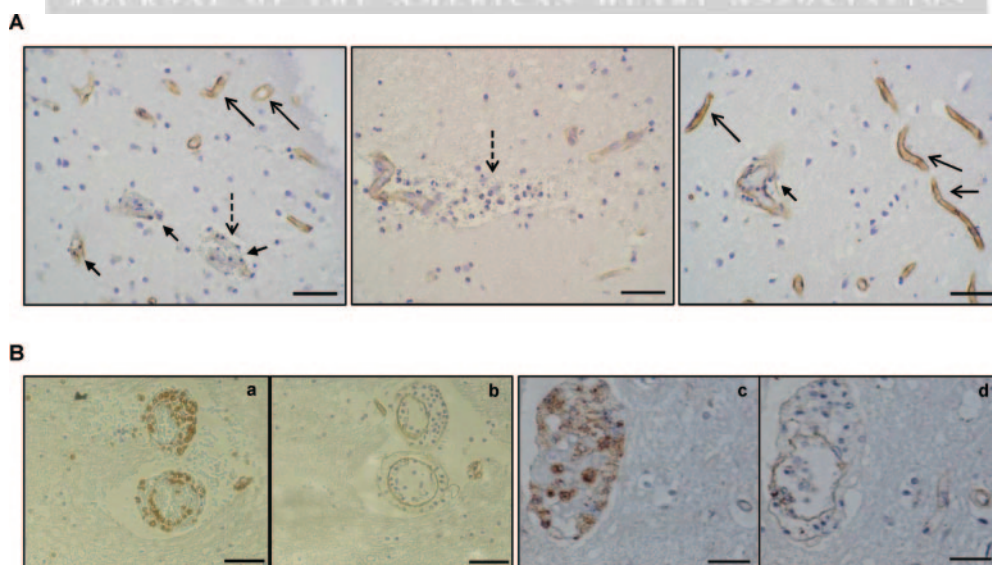


Figure 4. A, Collagen IV immunostaining showing a strong collagen degradation in microvessels with neutrophil infiltration (head arrows) followed by basal lamina disruption and blood extravasation (dashed arrows). The vessels without neutrophils preserve intact collagen in the basal lamina (arrows). Bars=50 μm. B, Colocalization of MMP-9⁺ neutrophils (a and c) with type IV collagen degradation (b and d) in 2 different microvessels; a and b bars=50 μm and c and d bars=25 μm.

infiltration to the ischemic tissue by peripheral blood neutrophils filled of MMP-9 is related to the basal lamina degradation compromising BBB integrity that precedes massive blood extravasation.

HT are the most threatening complications that follow ischemic stroke, impairing the prognosis and increasing the mortality rates. At the present time, the best treatment for stroke patients is the intravenous administration of recombinant tissue plasminogen activator for the lyses of the clot at brain vessels.¹⁶ Nevertheless, side effects on the brain parenchyma such as hemorrhagic complications might also appear after tissue plasminogen activator administration, limiting the benefits of the thrombolytic therapy. An understanding of the mechanisms responsible for both spontaneous and thrombolysis-associated hemorrhagic events could improve actual stroke therapy but, unfortunately, this phenomenon remains to be fully elucidated. Previously, several investigations have demonstrated the partial importance of free radical generation and oxidative stress that occurs after reperfusion and damages the blood vessels wall.¹⁷ However, in the past years the additional role of proteases has been emphasized as another mechanism causing cerebrovascular damage, such as the MMP family.^{4–6}

The objective of the present study was to determine the possible contribution of MMP-9 to BBB breakdown and further hemorrhagic transformation events that sometimes occur after ischemic stroke and to identify its source in the human brain. Our results support the hypothesis of a direct role for MMP-9 in hemorrhagic transformation events because: (1) zymography shows increased levels of MMP-9 in the infarct and hemorrhagic transformation areas; (2) the content of cleaved MMP-9 (known as an active form) was particularly high in hemorrhagic areas; (3) LCM clearly demonstrates that the microvascular endothelium that form the BBB contain high levels of MMP-9 in the mentioned ischemic areas; (4) perivascular neutrophils are an important source of MMP-9 and (5) a severe degradation of a basic BBB component such as collagen IV occurs in those vessels presenting an important infiltration of MMP-9⁺ neutrophils and erythrocyte extravasation.

The present findings confirm that increased MMP-9 is located in the vascular/perivascular vicinity of infarct and hemorrhagic transformation areas. These findings are sustained by other studies that previously showed a primary MMP-9 increase in infarct areas both in animal models¹⁸ and human ischemic brain.^{14,19,20} More novel are those studies using LCM techniques. An expression analysis from blood brain vessels in a middle cerebral artery occlusion model was recently performed in rats showing MMP-2 and MMP-9 mRNA upregulation in endothelial cells from the ischemic core and boundary regions.²¹ To our knowledge, the present study is the first using LCM in human brain tissue in a cerebrovascular disease, confirming the utility of the LCM. Microdissection confirms that content of MMP-9 was similarly high in endothelium from hemorrhagic and infarcted microvessels compared to contralateral hemisphere, pointing to neutrophils surrounding dissected microvessels as a significant source of MMP-9 in hemorrhagic areas.

Classically, animal studies have mainly focused their efforts in assessing MMP-9 expression in the brain after ischemia, but several studies in humans have demonstrated that this MMP-9 increase after ischemia also occurs at blood

level closely related with cerebral parameters such as infarct size or cerebrovascular events as the appearance of hemorrhagic complications after tissue plasminogen activator administration.^{12,13} Whether the main source of this protease is resident brain cells or circulating blood cells remains unknown. Whereas few studies could not identify neutrophils as a primary source of MMP-9 protein in animal models of cerebral ischemia,^{22,23} other studies strongly suggest and demonstrate the implication of recruited leukocytes as a significant source of MMP-9 causing basal lamina degradation and BBB breakdown after transient ischemia in rodents. These studies have demonstrated in mouse and rat models the neutrophil infiltration to the ischemic brain contributing to the tissue inflammatory response by releasing MMP-9,²⁴ and causing BBB breakdown secondary to basal lamina degradation.³ In fact, chimeric mice lacking leukocytic MMP-9 present similar lesions than MMP-9 knockouts but not those chimeric animals lacking MMP-9 in brain cells.³

Our results showing that infiltrated blood neutrophils are an important source of MMP-9 in the ischemic areas are supported by these previous investigations. Besides, it is important to highlight that our immunostaining study shows that, in the infarct areas, there is significant vascular MMP-9⁺ neutrophil concentration but just few disrupted vessels, which suggests that the infiltration occurs previously to the BBB leakage.

Our group has recently reported a MMP-9⁺ neutrophil infiltration in the infarct areas after human stroke,¹⁴ but this is the first time that this MMP-9 is described to be associated to collagen IV degradation in human ischemic brain after hemorrhagic transformation episodes. The loss of basal lamina integrity has been postulated to be the primary cause of hemorrhage after ischemic event because MMP-9 can degrade the main components of the basal lamina such as laminin, fibronectin, and collagen IV. Other authors have demonstrated the implication of this protease in hemorrhagic events and basal lamina destruction in rat models of cerebral ischemia.^{1,25,26} Furthermore, those studies have also shown a partial protection of hypothermic treatments through the inhibition of different proteases including MMP-9,²⁷ and that tissue plasminogen activator-induced MMP-9 activation is related to the destruction of basal lamina components,²⁵ suggesting that its early inhibition could reduce hemorrhagic transformation events. Our results also demonstrate the association between MMP-9 and collagen IV degradation in the human brain related to hemorrhagic events.

Finally, an issue that requires further analysis is the mechanistic relationship between MMP-9 and neutrophils in our hemorrhage hypothesis. Although our results clearly show significant elevations in MMP-9–positive neutrophils in hemorrhagic versus nonhemorrhagic areas in ischemic brain territory, clearly supported by the upregulation of cleaved MMP-9 in hemorrhagic areas, is known that other brain cell types, such as neurons, glial, or endothelial cells, are partially contributing to MMP-9.^{14,18} Furthermore, the precise timing of neutrophil accumulation, MMP-9 secretion, basal lamina degradation, and subsequent hemorrhagic conversion is difficult to quantify. However, we demonstrate a good correlation between MMP-9 content, neutrophil infiltration, and microvessel disruption.

Despite the new findings presented in this study, it presents few limitations that should be discussed. Perhaps the main

caveat is the small number of cases, although we want to emphasize the importance of studying brain samples from strokes involving hemorrhagic events and the lack of other investigations with this kind of samples. Also, the fact that we could not perfuse the cerebral vessels with a saline solution to eliminate peripheral blood could be confusing because some MMPs are known to circulate in the blood stream. However, we believe that this contribution might be small because MMP-2 remains constitutively expressed.

Summary

Our investigation reveals for the first time the destruction of a structural component of the BBB associated to the infiltration of MMP-9⁺ neutrophils in the ischemic brain after human stroke. Then, MMP-9 is confirmed to be a key protease interfering with BBB leakage and natural evolution of cerebral ischemia. We believe that modulate MMP-9 or neutrophil infiltration processes could be a target for future investigations to improve the present thrombolytic therapy for ischemic stroke. It would be particularly helpful in patients with salvageable tissue where exists an increased risk of hemorrhagic transformations that limits the time window for the treatment within the first 3 hours after stroke onset.

Acknowledgments

We are grateful to Manolo Quintana for statistical advice, to Maria Angeles Artaza for her always kind assistance in laser capture microdissection, and to all neurologists and residents from the Neurovascular Unit and technical staff from the Neuropathology Department who helped in performing this study.

Sources of Funding

Anna Rosell is the recipient of a postdoctoral grant from Ministerio de Educacion y Ciencia (EXT2006/766) and Eloy Cuadrado is supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 05/322). Neurovascular Research Laboratory takes part into the Spanish stroke research network RENEVAS.

References

- Hamann GF, Okada Y, del Zoppo GJ. Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Cerebral Blood Flow Metab.* 1996;16:1373–1378.
- Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin JC, Kawase M, Massengale J, Chan PH. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:1020–1028.
- Giddy JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, Chan PH, Park TS. Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289:558–568.
- Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:624–633.
- Romanic AM, White RF, Arlath AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke.* 1998;29:1020–1030.
- Rosenberg GA, 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.
- Mun-Bryce S, Rosenberg GA. Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. *Am J Physiol.* 1998;274(5 Pt 2):R1203–1211.
- Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci.* 2001;21:7724–7732.
- Sumii T, Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke.* 2002;33:831–836.
- Wang X, Lee SR, Arai K, Lee SR, Tsuji K, Rebeck GW, Lo EH. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med.* 2003;9:1313–1317.
- Tsuji K, Aoki T, Tejima E, Arai K, Lee SR, Atochin DN, Huang PL, Wang X, Montaner J, Lo EH. Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2005;36:1954–1959.
- 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.
- 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 following ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke.* 2006;37:1399–1406.
- Ball HJ, McParland B, Driussi C, Hunt NH. Isolating vessels from the mouse brain for gene expression analysis using laser capture microdissection. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2002;9:206–213.
- 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.
- Love S. Related. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol.* 1999;9:119–131.
- Planas AM, Sole S, Justicia C. Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis.* 2001;8:834–846.
- Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miller KM, Esiri MM, Perry VH. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1997;23:406–415.
- Clark AW, Kerkoski CA, Bou SS, Chapman KR, Edwards DR. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett.* 1997;238:53–56.
- Liu XS, Zhang ZG, Zhang L, Morris DC, Kapke A, Lu M, Chopp M. Atorvastatin downregulates tissue plasminogen activator-aggravated genes mediating coagulation and vascular permeability in single cerebral endothelial cells captured by laser microdissection. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006;26:787–796.
- Maier CM, Hsieh L, Yu F, Bracci P, Chan PH. Matrix metalloproteinase-9 and myeloperoxidase expression: quantitative analysis by antigen immunohistochemistry in a model of transient focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2004;35:1169–1174.
- Harris AK, Ergul A, Kozak A, Machado LS, Johnson MH, Fagan SC. Effect of neutrophil depletion on gelatinase expression, edema formation and hemorrhagic transformation after focal ischemic stroke. *BMC Neurosci.* 2005;6:49.
- Justicia C, Panes J, Sole S, Cervera A, Deulofeu R, Chamorro A, Planas AM. Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003;23:1430–1440.
- Kelly MA, Shuaib A, Todd KG. Matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier breakdown following thrombolysis. *Exp Neuro.* 2006;200:V38–49.
- Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, Goussev A, Powers C, Ho KL, Morris D, Smyth SS, Coller BS, Chopp M. Dynamic platelet accumulation at the site of the occluded middle cerebral artery and in downstream microvessels is associated with loss of microvascular integrity after embolic middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* 2001;912:181–194.
- Hamann GF, Burggraf D, Martens HK, Liebetrau M, Jager G, Wunderlich N, DeGeorgia M, Krieger DW. Mild to moderate hypothermia prevents microvascular basal lamina antigen loss in experimental focal cerebral ischemia. *Stroke.* 2004;35:764–769.

ARTICLE 3

Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and
MMP-9 release

(J Leukoc Biol. 2008 Jul;84(1):207-14)

Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release

Eloy Cuadrado,^{*,1} Laura Ortega,^{*,1} Mar Hernández-Guillamon,^{*} Anna Penalba,^{*} Israel Fernández-Cadenas,^{*} Anna Rosell,^{*,†} and Joan Montaner^{*,2}

^{*}Neurovascular Research Laboratory, Neurovascular Unit, Department of Neurology, Universitat Autònoma de Barcelona, Institut de Recerca, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain; and [†]Neuroprotection Research Laboratory, Department of Radiology, Massachusetts General Hospital, and Program in Neuroscience, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA

Abstract: Recombinant tissue plasminogen activator (t-PA), the only approved stroke treatment, is used for clot lysis within the occluded brain artery. Unfortunately, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) concentration increases after t-PA treatment and has been related to hemorrhagic transformation after ischemic stroke. Although the exact cellular source of brain MMP-9 remains unknown, invading, inflammatory cells, such as neutrophils, release MMP-9 to cross the blood brain barrier. Therefore, we hypothesize that the most feared side effect of stroke reperfusion therapy, brain hemorrhage, is related to t-PA-induced MMP-9 release by neutrophils. We show by means of ELISA that t-PA treatment promotes MMP-9, MMP-8, and tissue inhibitor metalloproteinase-2 release from human neutrophils *ex vivo* within 10 and 30 min. Moreover, by zymography and Western blot, we observed that neutrophils are emptied of MMP-9 content after t-PA treatment at those times. Finally, total internal reflection fluorescent imaging allowed us to observe the t-PA effect on neutrophils, showing the promotion of degranulation on these cells *in vivo*. Our data suggest that neutrophils are good candidates to be the main source of MMP-9 following t-PA stroke treatment and in consequence, partially responsible for thrombolysis-related brain bleedings. *J. Leukoc. Biol.* 84: 207–214; 2008.

Key Words: stroke · hemorrhage · TIRF · TIMP-2 · plasmin

INTRODUCTION

Matrix metalloproteinases (MMPs) constitute a family of extracellular soluble or membrane-bound proteases that can degrade or proteolytically modify all the extracellular matrix main components, including collagens, laminin, and proteoglycans, all them relevant pieces of the blood brain barrier (BBB).

MMP-9, or gelatinase-B, has been suggested to play a role in the pathogenesis of neurological disorders, including cerebral ischemia [1]. MMP-9 is elevated in humans after stroke in plasma [2] and in the brain infarction [3–5]. The exact cellular

source of MMP-9 remains unknown, and although brain endothelium, astrocytes, and neurons may release MMP-9 [5], the invading, inflammatory-activated cells, such as neutrophils, can also release MMP-9 to cross the BBB [5, 6] after brain ischemia. In fact, leukocyte-derived MMP-9 mediates BBB breakdown after transient focal cerebral ischemia [7] and other neuroinflammatory conditions [8].

Recombinant tissue plasminogen activator (t-PA) is the only drug approved for stroke treatment that promotes clot lysis within the occluded brain artery. However, t-PA may also have other signaling properties that would increase risks of cell death, BBB leakage, edema, and hemorrhage [9]. Actually, brain bleedings are the most feared side effect of thrombolytic therapy, occurring in 5–10% of cases with high mortality rates [10].

MMP-9 expression has been related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke [11], and its blood concentration increased after t-PA treatment [12]. Interestingly, pharmacological or genetic inhibition of MMP-9 significantly decreases infarct size and the risk of hemorrhagic complications [13, 14].

Recently, in human post-mortem brain studies, neutrophil infiltration in the infarct areas has been reported to increase local MMP-9 levels closely related to basal lamina collagen IV degradation and BBB breakdown associated to hemorrhagic complications after stroke [15].

Hence, it is possible that deleterious induction of hemorrhage after t-PA reperfusion is related to release of MMP-9 stored in neutrophils. Therefore, in the present study, we aimed to investigate the effect of t-PA treatment *ex vivo* on human neutrophil degranulation and MMP-9 release.

MATERIALS AND METHODS

Neutrophil isolation and cell culture

Human granulocytes were isolated using a standard protocol from the blood of nine healthy subjects (five females, four males; mean age, 30.3 years; range,

¹ These authors contributed equally to this work.

² Correspondence: Neurovascular Research Laboratory, Neurovascular Unit, Institut de Recerca, Hospital Vall d'Hebron, Pg Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. E-mail: 31862jmv@comb.es

Received September 6, 2007; revised February 18, 2008; accepted March 5, 2008.

doi: 10.1189/jlb.0907606

24–47) by Percoll (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) density gradient centrifugation [16]. Briefly, K₂EDTA (BD Vacutainer®) tubes were used to collect the blood. Percoll gradients with a density of 1.083 were prepared by mixing 9.5 mL Percoll™ with 1.5 mL PBS (10×) and 4 mL H₂O. Cell suspension was diluted 1:5 with PBS buffer. Immediately, Percoll gradient and cell suspension were overlaid without mixing phases and centrifuged at 400 g for 30 min at 20°C. Then, white cell layer was collected, transferred to a new tube, and diluted again 1:5 with PBS (1×).

Diluted cell suspension was centrifuged again at 300 g for 15 min at 20°C. Supernatant was carefully removed, the cell pellet was resuspended in 2 mL PBS, and remaining RBCs were lysed by adding 50 mL lysis buffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA) for 5 min at room temperature. Then, tubes were centrifuged at 300 g for 10 min at 20°C, supernatant was carefully removed, and cells were washed twice with PBS.

Finally, cell pellet was resuspended in 4 mL RPMI-1640 cell culture medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) containing 50 µg/mL streptomycin and 50 U/mL penicillin (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). Cell counting was performed using the trypan blue exclusion assay.

Cell treatments

After isolation, 400,000 cells/mL were plated onto 24 poly-L-lysine-precoated wells in RPMI-1640 media without FBS. After 2 h in an incubator at 37°C and 5% CO₂, cells were treated with 6.2 µM (0.3 mg/mL) t-PA (Boehringer Ingelheim, Germany) or 10⁻⁷ M fMLP (Sigma-Aldrich) for different periods of time (10, 15, or 30 min). Nontreated cells were used as controls.

After treatment, supernatant was removed and centrifuged at 12,000 g for 12 min at 4°C and transferred to a new tube and kept at -80°C.

Remaining cells were lysed with 100 µL lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.05% Brij-35, 0.02% NaN₃, and 1% Triton X-100) containing protease inhibitors (1 mM PMSF and 7 µg/ml aprotinin) for 12 min at 4°C. Finally, tubes were centrifuged at 12,000 g for 12 min at 4°C, and supernatant was transferred to a new tube and kept frozen at -80°C.

Cell viability

Cell viability was assessed using a fluorescent live/dead cell assay following the manufacturer's protocol (Molecular Probes-Invitrogen, Paisley, UK). After treatment with t-PA, cells were exposed to calcein/AM and ethidium homodimer-1 (EthD-1) and viewed using an Olympus IX71 fluorescence microscope. Calcein/AM is adsorbed by living cells and becomes a substrate for cytosolic esterases, which convert it into a green fluorescent product, whereas EthD-1 is able to enter only in cells with compromised cell membrane integrity and becomes red fluorescent after its attachment to nucleic acids.

Gelatin zymography

Substrate-specific zymography for determination of gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9 was performed on cell supernatants (*n*=9 per time-point). Equal volumes mixed 1:1 with loading buffer [80 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromphenol blue] were loaded. Proteins were separated by electrophoresis in SDS-PAGE gels containing 0.1% gelatin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) at 100 V constant current. Following electrophoresis, gels were washed to remove SDS with 2.5% Triton X-100 for 1 h and incubated 48 h at 37°C with incubation buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM CaCl₂, and 0.02% NaN₃. Enzymatic bands were visualized after staining for 1 h with amido black 0.1% and destained for 30 min with a solution of 30% (v/v) methanol and 10% (v/v) glacial acetic acid. To measure gelatinase activities, gels were read using the Gel Logic 440 imaging system (Kodak, Rochester, NY, USA), and the intensity of the bands (arbitrary units) was normalized to the untreated control sample in each experimental set (ID Image Analysis software, Kodak).

Immunoblotting

MMP-9 protein content was detected by Western blot in cell lysates (*n*=3 per time-point). Briefly, an equal protein amount (3 µg) was loaded in Laemmli buffer with SDS-PAGE (12%) at 100 V. Separated proteins were transferred to a polyvinylidene difluoride membrane using a Transblot cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) during 1 h at 100 V. Nonspecific bindings were blocked with 10% milk before membranes were incubated overnight at 4°C with mouse anti-human MMP-9 antibody (Chemicon, El Segundo, CA, USA) at 1:500

dilution. Secondary antibody goat anti-mouse HRP (Chemicon) was diluted 1:1000 and incubated at room temperature for 1 h. Before and after incubations, membranes were washed three times (10 min each) with Tween-TBS. The substrate reaction was developed with the chemiluminescent reagent Immobilon (Millipore, UK) and visualized with a luminescent image analyzer (Las-3000, Fujifilm, Valhalla, NY, USA). Immunodetection of GAPDH (Ambion, Austin, TX, USA) was performed to verify that equal amounts of total protein were loaded for each sample.

Multiplexed MMP array

SearchLight® human MMP Array 1 (Pierce, Rockford, IL, USA) was used to measure supernatant MMP content (*n*=4 per time-point); this assay consists of multiplexed sandwich ELISA, which is permitted to assess up to nine proteins at the same time: gelatinases (MMP-2 and MMP-9), collagenases (MMP-1, MMP-8, and MMP-13), stromelysins (MMP-3 and MMP-10), and MMP endogenous inhibitors [tissue inhibitor metalloproteinase-1 (TIMP-1) and TIMP-2]. Each sample was assayed in duplicate, and data are expressed as the mean value of both measurements. The mean intra-assay coefficients of variation were <15% for all measurements. The enzyme-substrate reaction produces a chemiluminescent signal detected with a cooled charged-coupled device (CCD) camera (Pierce). The images were analyzed by ArrayVision Version 8.0 software (Imaging Research, Ontario, Canada). Standard curves and all results are expressed in pg/mL units.

Total internal reflection fluorescent (TIRF) microscopy

Neutrophils (1.5×10⁵ cells/mL) were plated on 35 × 10 mm glass-bottom (12 mm) WillCo-dish™ plates (GWS-3512, WillCo Wells B.V., The Netherlands). Cells were maintained in RPMI-1640 medium (R7509, Sigma-Aldrich) without bromophenol red at 37°C.

Neutrophils were incubated with 2.5 µM acridine orange for 10 min at room temperature as described elsewhere [17]. Immediately, prior to TIRF imaging, cells were treated with or without 9.3 µM t-PA.

Imaging was carried out using an Olympus multidimensional-TIRFM cell-R IX81-inverted microscope with a Planapo 100×0/TIRFM NA 1.45 objective and through-the-objective TIRF illumination using a 488-nm argon multi-lane 25 mW laser. During all time imaging, cells were maintained at 37°C and 5% CO₂.

Time-lapse sequences were acquired at a continuous rate of 12.5 frames/s with a 46-ms exposure per frame in a 300-times cycle. Time-lapse acquisition was done with a Hamamatsu C9100-02 digital monochrome electron multiplying CCD camera. All TIRF image processing was performed with ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Statistics

Statistical analyses were performed by use of the SPSS 12.0 package. The Kolmogorov-Smirnov test was used to determine variable distribution. The Kruskal-Wallis test was used to assess intergroup differences. A value of *P* < 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

t-PA treatment promotes MMP-9 release in neutrophils ex vivo

After treatment, neutrophil cell suspensions were centrifuged, and supernatants were analyzed by gelatin zymography.

MMP-9 monomer was detected at the expected molecular weight of 92 kDa, but also, the MMP-9/neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) heterodimer was detected at 130 kDa as described by others [18] (**Fig. 1A**). Gelatin zymography showed no MMP-2 band in any sample.

In all cases, MMP-9 intensity increased in supernatants of t-PA-treated cells at 10 (*P*=0.04) and 30 (*P*<0.01) min after treatment when compared with control, nontreated cells. How-

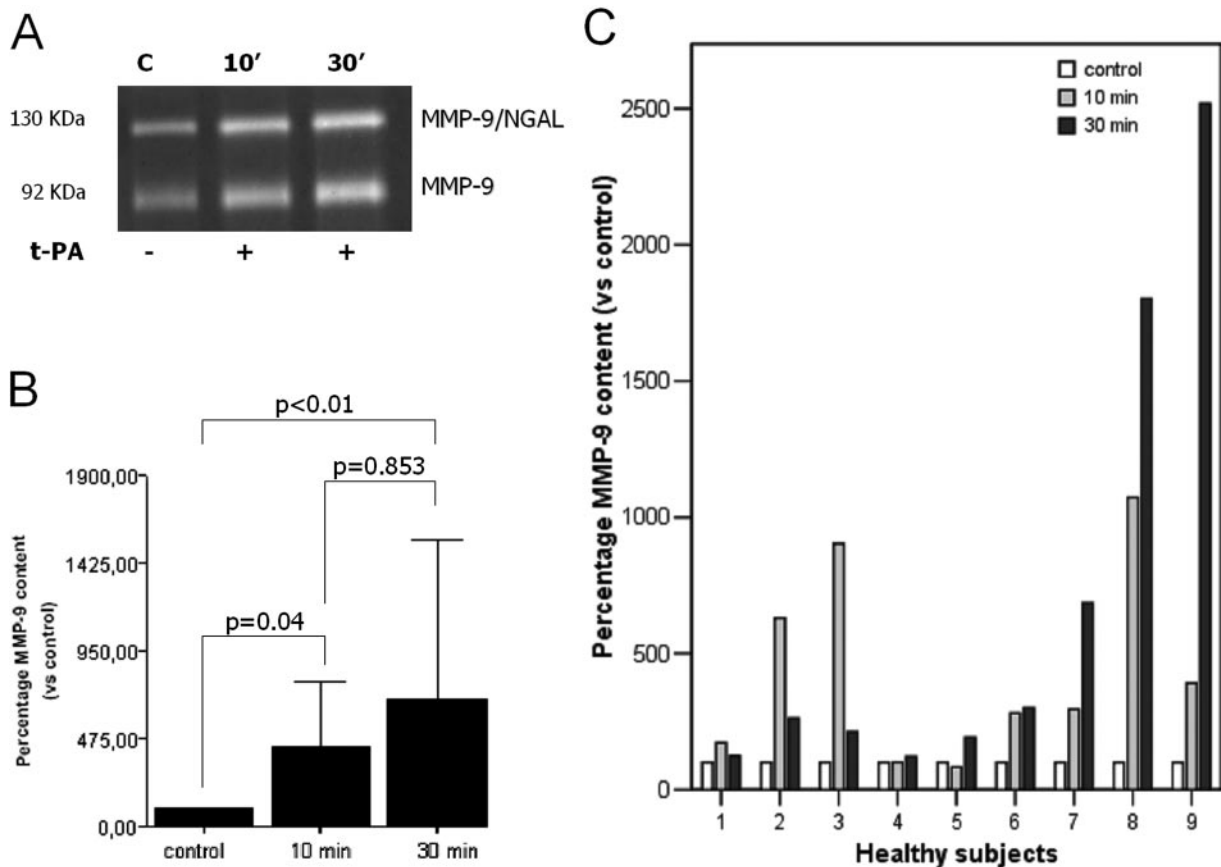


Fig. 1. t-PA treatment promotes neutrophil MMP-9 release in vitro. (A) Representative gelatin zymography showing MMP-9 release in supernatants of controls (C) and treated neutrophils at 10 or 30 min after t-PA addition. (B) Bar graph represents mean values and SEM of MMP-9 content. (C) Bar graph showing percentage of MMP-9 in all studied cases at each time-point to represent the differences between individuals. Normalized band intensity was calculated as a percentage of the untreated controls.

ever, no differences were found between the two treatment time-points ($P=0.853$; Fig. 1B). We identified individual differences in the MMP-9 release by neutrophils after t-PA exposition. In fact, five cases showed a MMP-9 release peak at 30 min after treatment, and three cases showed a “fast release” of MMP-9 already at 10 min after t-PA addition (Fig. 1C). Demographic data (age, sex, habits) of all subjects were studied, but no feature was related to this characteristic pattern (data not shown).

Neutrophils “emptied” of MMP-9 content after t-PA treatment

MMP-9 content from cell lysates was studied by means of Western blotting using a mAb against human MMP-9.

Results showed that t-PA stimulation produces a gradual reduction of MMP-9 content in cell lysates ($P=0.024$; Fig. 2A). MMP-9 band intensity decreased at 10 ($P=0.037$) and 30 ($P=0.037$) min after t-PA addition when compared with non-treated control, opposite and complementary to the pattern observed in supernatants (Fig. 2B). These data suggest that these neutrophils had been emptied of MMP-9 by t-PA stimulation. No t-PA toxic effect was observed on cells at any time, as confirmed by fluorescent cell viability assay (Fig. 4).

t-PA treatment also promotes MMP-9 release in fMLP-preactivated neutrophils

Next, to determine whether activated neutrophils also responded to t-PA treatment, they were exposed to fMLP. It has been widely described that the formyl peptide (fMLP), a bacterial chemoattractant, is able to stimulate neutrophils in vitro [19, 20].

Cells were preincubated for 15 min with 10^{-7} M fMLP before t-PA stimulation during 15 min. Gelatinase activity was measured in supernatants by zymography (Fig. 3A). When cells were treated only with fMLP for 15 min, we observed an increase in MMP-9 release, as described previously [20], although the obtained values ($n=4$) were not significantly different to control samples ($P=0.343$; empty column, Fig. 3B). As expected, 15 min t-PA treatment induced the secretion of MMP-9 ($P=0.029$; gray column, Fig. 3B). When activated neutrophils, prestimulated with fMLP for 15 min, were rinsed and treated with t-PA in fresh medium for another 15 min, they still promoted an important and significant MMP-9 release compared with untreated cells ($P=0.029$; black column, Fig. 3B).

Neutrophil MMP release pattern after t-PA exposition in vitro

SearchLight® human MMP array was used to measure supernatant MMP levels. This array allowed us to detect nine

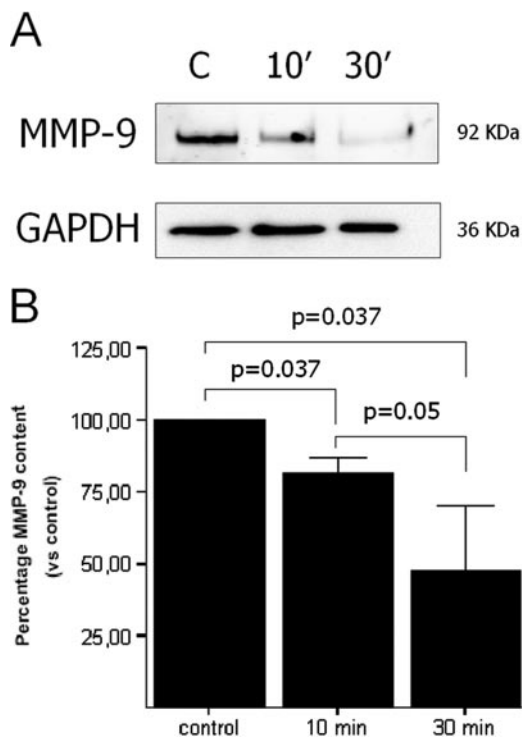


Fig. 2. t-PA stimulation produces a gradual reduction of neutrophil MMP-9 content in vitro. (A) Representative Western blot showing the MMP-9 band in untreated controls and treated cells at 10 or 30 min after t-PA treatment. GAPDH was used as loading control. (B) Bar graph represents mean values and SEM of total MMP-9. Normalized band intensity was calculated as a percentage of the untreated controls.

different molecules per assay (**Fig. 5, A and B**). Supernatants from nontreated or t-PA-treated cells were measured using this technique. Three molecules increased their levels in a time-dependent manner after t-PA addition when compared with nontreated supernatants.

MMP-8 ($P=0.049$), MMP-9 ($P=0.018$), and TIMP-2 ($P=0.01$) appeared to be released to media after 30 min of treatment. All time-points were statistically significant when compared with its nontreated control (Fig. 5C). No statistical differences were found between 10- and 30-min time-points for MMP-8 or MMP-9, although there was a significant difference in TIMP-2 levels between 10 and 30 min ($P=0.043$).

All other molecules were undetectable or showed invariable levels in cell supernatants after t-PA treatment.

TIRF analysis of neutrophil degranulation after t-PA treatment

The pretreatment staining with acridine orange allowed us to observe fluorescent granules in live cells within the evanescent wave by TIRF microscopy (**Fig. 6A**).

Cells were monitored by TIRF microscopy for real-time images of fusion granules with sequential images acquired every 80 ms. All images were obtained during the first 15–20 min after t-PA addition to media.

We found that t-PA treatment stimulates neutrophil degranulation. Fusion was observed as a suddenly brightening and vanishing fluorescent spot as described previously for other

cells types [21] (Fig. 6B). Sequential images of single granule docking and fusion with the plasma membrane under t-PA stimulation are presented. No granule fusion events were observed in nontreated cells.

DISCUSSION

This study demonstrates that t-PA promotes neutrophil MMP-9 degranulation. Four subsets of membrane-bound compartments exist in neutrophils: secretory vesicles, gelatinase (tertiary) granules, specific (secondary) granules, and azurophil (primary) granules [22, 23]. MMP-9 has been described to be in at least three of these granules; a proteomic study of human neutrophil granules reported the presence of MMP-9 in gelatinase, specific, and azurophil granules [24].

Our results confirm neutrophils as an important source of extracellular MMP-9 and demonstrate release of neutrophil MMP-9 after t-PA treatment. In cerebral ischemia, MMP-9 brain production is enhanced by t-PA [25], and plasma level is also increased in patients who receive t-PA [12]. Moreover, patients with higher plasma MMP-9 levels are more prone to suffer brain bleedings after t-PA [26]. Extrapolating our ex vivo data to the in vivo situation, we might explain those results as a degranulation of MMP-9 into the bloodstream following t-PA

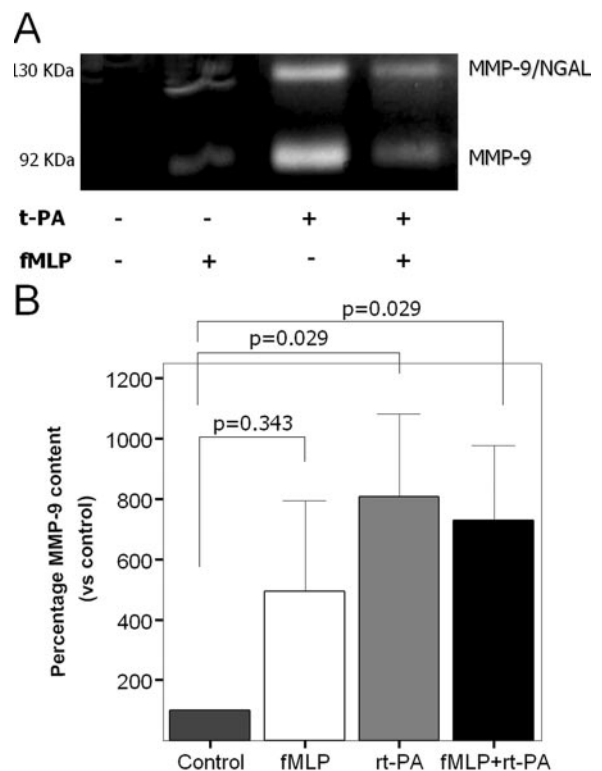


Fig. 3. t-PA treatment promotes MMP-9 release in fMLP-pretreated neutrophils. (A) Representative gelatin zymography showing MMP-9 release in supernatants of control, fMLP-treated neutrophils for 15 min (empty column, B), tPA-treated neutrophils for 15 min (gray column, B), and activated neutrophils prestimulated with fMLP for 15 min and treated with t-PA in fresh medium for the other 15 min (black column, B). (B) Bar graph represents mean values and SEM of MMP-9 content. Normalized band intensity was calculated as a percentage of the untreated controls. rt-PA, Recombinant t-PA.

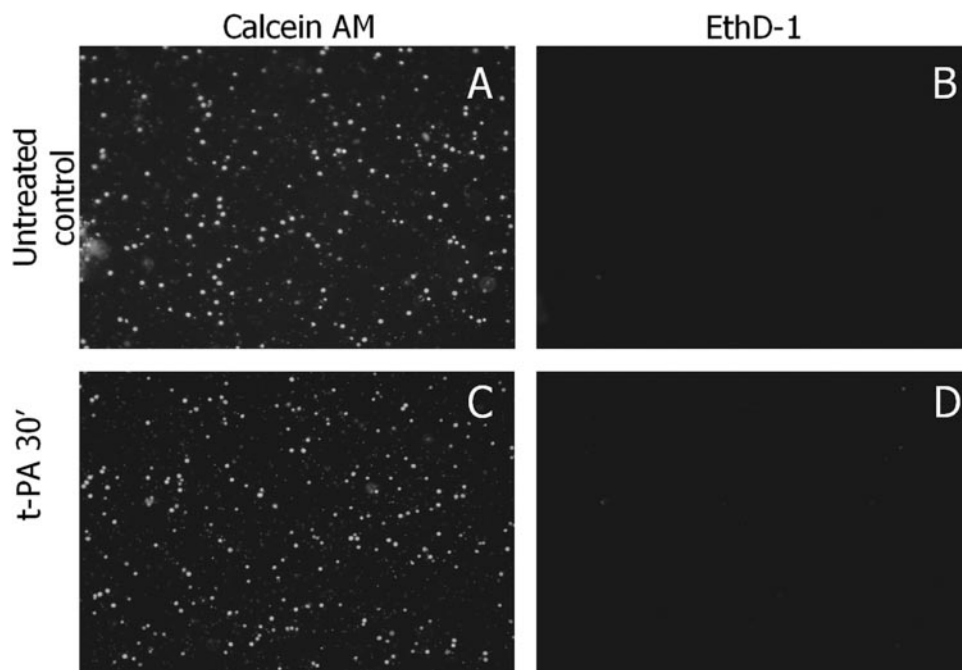


Fig. 4. t-PA administration to human neutrophils for 30 min does not induce cytotoxicity. Representative images from an untreated, control sample and neutrophils treated with t-PA for 30 min. (A and C) Correspond to the calcein/AM signal, which is adsorbed by living cells. (B and D) Correspond to the EthD-1 signal, which only produces fluorescence after its attachment to nucleic acids in death cells (original magnification, 10 \times).

treatment. Recently, mast cell degranulation has also been linked with t-PA-related hemorrhagic transformation in experimental ischemic stroke [27].

A study from our group, analyzing human brain infarct samples, showed a neutrophil infiltration in the infarct areas

increasing local MMP-9 levels around the microvessels as well as basal lamina collagen IV degradation and BBB disruption [15]. Again, we may hypothesize that if t-PA is administered when neutrophils are transigrating across the BBB, a t-PA-induced degranulation at that site would induce an important

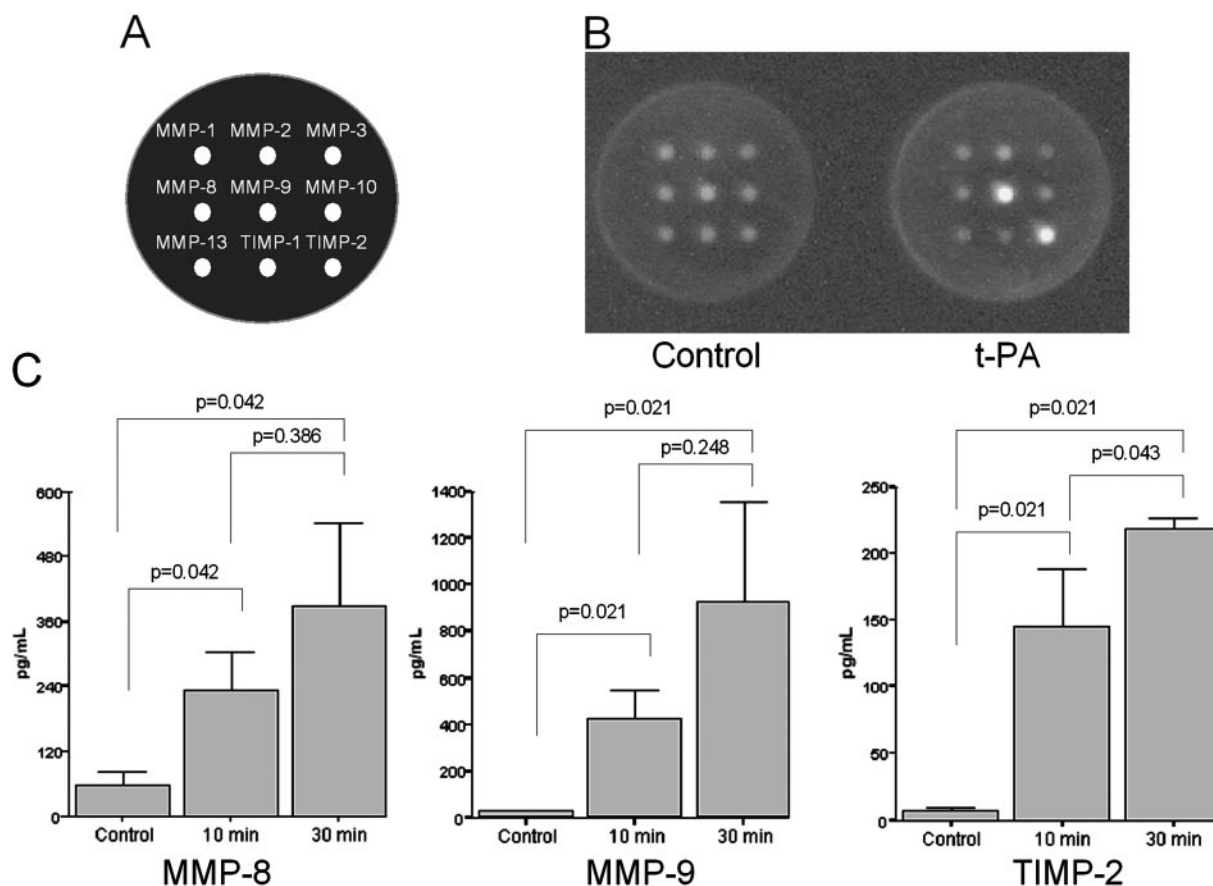


Fig. 5. Increased MMP-8, MMP-9, and TIMP-2 levels in neutrophils after t-PA exposition in vitro. (A) Schematic figure representing a Searchlight[®] protein array well. (B) Two wells corresponding to a representative case of supernatant from an untreated control and a t-PA-treated sample at 30 min. (C) Bar graphs represent mean values and SEM of different MMPs. All data are expressed in pg protein per mL. Unchanged proteins are not shown.

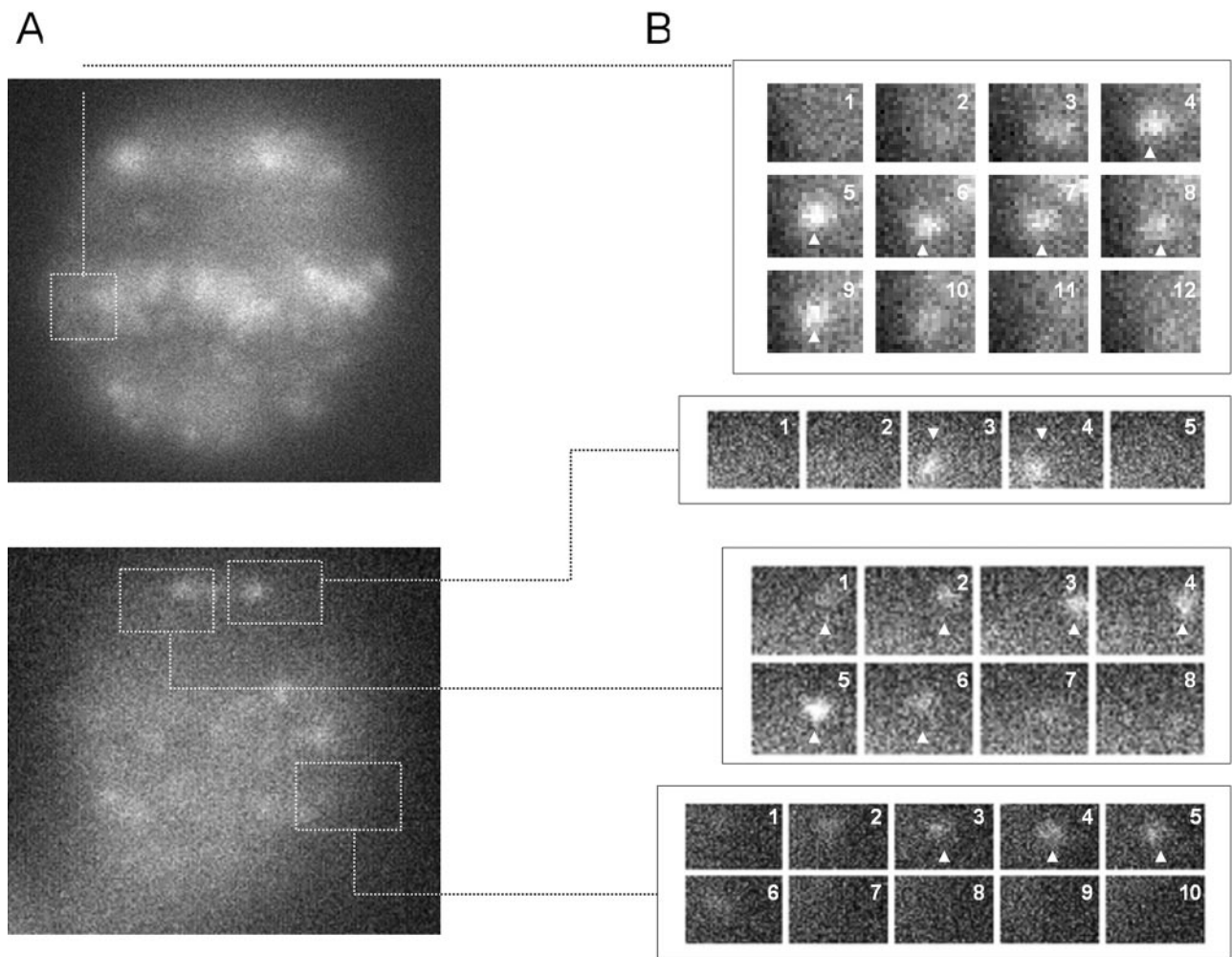


Fig. 6. t-PA treatment causes fusion of neutrophil granules with the plasma membrane. (A) Neutrophils observed under TIRF microscopy. Granules are seen as bright spots as a result of acridine orange staining. (B) Sequential images obtained every 80 ms from amplified fields corresponding to squares in A. Arrowheads show the spot corresponding to an individual granule fusion seen as a brightening and vanishing of fluorescence.

disruption of the BBB and might be responsible for dramatic bleedings occurring among t-PA-treated stroke patients. Moreover, this might also explain the increased risk of bleeding in other territories, in that fibrinolytic drugs are also used, especially when an inflammatory milieu is present [28].

Neutrophil-derived MMP-9 differs from MMP-9 expressed by other cell types in two major ways [29]. First, mature neutrophils do not synthesize MMP-9 *de novo*. Rather, MMP-9 is produced during the late stages of maturation of neutrophil precursors in the bone marrow and stored in its latent form before its release into the extracellular space following neutrophil activation [30]. Second, pro-MMP-9 is not released from activated human neutrophils complexed to TIMP-1. Rather, MMP-9 is released from neutrophils in three different forms: 92 kDa monomers, 200 kDa homodimers, and 130 kDa complexes of MMP-9 covalently bound to NGAL [31]. Taking together our results of MMP-9 levels assessed by gelatin zymography and Western blot, we are able to describe the reduction of intracellular MMP-9 and the increase of extracellular MMP-9, monomer- and NGAL-complexed, after t-PA stimulation. These features are also occurring in neutrophils

preactivated with fMLP, mimicking the neutrophil state in diseased situations.

These data suggest a strong relation between t-PA treatment and MMP-9 release, but to confirm that this degranulation effect was actually happening, we performed TIRF microscopy imaging *ex vivo*. TIRF imaging clearly revealed that t-PA is a degranulation promoter, as vesicles fusion was only observed after t-PA addition to media.

Mechanisms of t-PA-induced degranulation have never been studied. Others have suggested that MMP-9 release from tertiary granules uses β 2-integrin-independent signaling pathways, and in fact, protein kinase C isoforms play a critical role in regulating tertiary granule release [32]. Whether this is a common pathway for MMP-9 neutrophil release needs to be studied further to increase t-PA safety.

Another interesting point of our study is the different MMP-9 release behavior in the studied healthy control cases. Although in most of the cases, the highest MMP-9 release peak occurred at 30 min after treatment, others showed an earlier release of MMP-9 at 10 min after t-PA addition. It would be interesting in a future study to focus on this issue to try to unravel any

relationship between this interindividual variability in neutrophil degranulation and the patient's clinical outcome after t-PA infusion.

Regarding MMP family expression, we have observed that not only MMP-9 is increased in cell medium after treatment, as confirmed previously by zymography, but also, MMP-8 and TIMP-2. MMP-8 is a well-known neutrophil collagenase that is stored, like MMP-9, as an inactive proenzyme in secondary granules of mature neutrophils [33]. Interestingly, MMP-8 follows the same release pattern than MMP-9. So, from our findings, future studies investigating the role of MMP-8 in brain infarct progression and BBB disruption might be carried out.

Regarding TIMPs, there is controversy about its presence in neutrophils [31]. Whereas we did not detect TIMP-1 in our samples, we were able to identify TIMP-2 as others did before [34, 35], and interestingly, its level increased after t-PA treatment.

Although our study is the first to demonstrate that t-PA administration promotes MMP-9 release by neutrophils, indirect data from t-PA knockout mice also support the crosstalk between t-PA and neutrophil proteases. In fact, t-PA^{-/-} mice displayed significantly less neutrophil influx into the interstitial area compared with wild-type mice in a model of renal ischemia reperfusion injury [36] and also a reduced neutrophil influx into the peritoneal cavity in a model of abdominal sepsis [37]. In both cases, the lack of t-PA-induced MMP-9 release necessary for transmigration might explain the reduced migratory response.

Although our results might have therapeutic value, the presence of neutrophils in vascular domains is highly cumulative and inherently time-dependent; therefore, its relevance in the ultra-acute phase of cerebral ischemia might be discussed (t-PA time window of 3 h). Given also that t-PA is eliminated fast from circulation, and the timing of neutrophil transmigration and the hemorrhage formation might not overlap well in most of the cases, the suggested major role of neutrophils in the early t-PA-related hemorrhage formation in ischemic stroke needs to be demonstrated, and the evidence shown in our study is far from making the main point in vivo. For that reason, targeting neutrophils in embolic animal stroke models treated with tPA to explore if that approach confers protection from thrombolysis-related bleedings seems mandatory to confirm in vivo our hypothesis.

In conclusion, our data suggest that neutrophils are good candidates to be the main source of MMP-9 following t-PA stroke treatment and a potential mediator of brain bleedings by excessive disruption of BBB when exaggerated, neutrophil tPA-induced degranulation occurs. We firmly believe that a combined therapy of t-PA with a MMP-9 or a neutrophil degranulation inhibitor might improve safety and efficacy of thrombolytic therapy in the acute phase of stroke.

ACKNOWLEDGMENTS

E. C. is the recipient of a grant from the Fondo de Investigación Sanitaria (FIS; 05/322) from the Spanish Ministry of Health. We are grateful to Marta Valeri for excellent technical assistance during TIRF microscopy imaging and Manolo Quintana for statistical advice. Neurovascular Research Laboratory is

part of the Spanish Stroke Research Network (RENEVAS) funded by the Instituto de Salud Carlos III, RETICS-RD 06/0026.

REFERENCES

1. Rosenberg, G. A., Navratil, M., Barone, F., Feuerstein, G. (1996) Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **16**, 360–366.
2. Montaner, J., Alvarez-Sabín, J., Molina, C., Anglés, A., Abilleira, S., Arenillas, J., González, M. A., Monasterio, J. (2001) Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* **32**, 1759–1766.
3. Clark, A. W., Krekoski, C. A., Bou, S.-S., Chapman, K. R., Edwards, D. R. (1997) Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci. Lett.* **238**, 53–56.
4. Anthony, D. C., Ferguson, B., Matyzak, M. K., Miler, K. M., Esiri, M. M., Perry, V. H. (1997) Differential matrix metalloproteinases expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **23**, 406–415.
5. Rosell, A., Ortega-Aznar, A., Alvarez-Sabin, J., Fernandez-Cadenas, I., Ribo, M., Molina, C. A., Lo, E. H., Montaner, J. (2006) Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke* **37**, 1399–1406.
6. Justicia, C., Panes, J., Sole, S., Cervera, A., Deulofeu, R., Chamorro, A., Planas, A. M. (2003) Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **23**, 1430–1440.
7. Gidday, J. M., Gasche, Y. G., Copin, J. C., Shah, A. R., Perez, R. S., Shapiro, S. D., Chan, P. H., Park, T. S. (2005) Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **289**, H558–H568.
8. Agrawal, S., Anderson, P., Durbeek, M., van Rooijen, N., Ivars, F., Opendakker, G., Sorokin, L. M. (2006) Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **203**, 1007–1019.
9. Wang, X., Tsuji, K., Lee, S. R., Ning, M., Furie, K. L., Buchan, A. M., Lo, E. H. (2004) Mechanisms of hemorrhagic transformation after tissue plasminogen activator reperfusion therapy for ischemic stroke. *Stroke* **35**, 2726–2730.
10. Wahlgren, N., Ahmed, N., Davalos, A., Ford, G. A., Grond, M., Hacke, W., Hennerici, M. G., Kaste, M., Kuelkens, S., Larrue, V., Lees, K. R., Roine, R. O., Soisson, L., Toni, D., Vanhooren, G., SITS-MOST Investigators (2007) Thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. *Lancet* **369**, 275–282.
11. Montaner, J., Alvarez-Sabin, J., Molina, C. A., Angles, A., Abilleira, S., Arenillas, J., Monasterio, J. (2001) Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke* **32**, 2762–2767.
12. Ning, M., Furie, K. L., Koroshetz, W. J., Lee, H., Barron, M., Lederer, M., Wang, X., Zhu, M., Sorensen, A. G., Lo, E. H., Kelly, P. J. (2006) Association between tPA therapy and raised early matrix metalloproteinase-9 in acute stroke. *Neurology* **66**, 1550–1555.
13. Asahi, M., Asahi, K., Jung, J. C., del Zoppo, G. J., Fini, M. E., Lo, E. H. (2000) Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **20**, 1681–1689.
14. Sumii, T., Lo, E. H. (2002) Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* **33**, 831–836.
15. Rosell, A., Cuadrado, E., Ortega-Aznar, A., Hernández-Guillamon, M., Lo, E. H., Montaner, J. (2007) MMP-9-positive neutrophil infiltration is strongly associated to BBB breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke*, in press.
16. Schleimer, R. P., Rutledge, B. K. (1986) Cultured human vascular endothelial cells acquire adhesiveness for neutrophils after stimulation with interleukin 1, endotoxin, and tumor-promoting phorbol diesters. *J. Immunol.* **136**, 649–654.
17. Nanda, A., Brumell, J. H., Nordstrom, T., Kjeldsen, L., Sengelov, H., Borregaard, N., Rotstein, O. D., Grinstein, S. (1996) Activation of proton pumping in human neutrophils occurs by exocytosis of vesicles bearing vacuolar-type H⁺-ATPases. *J. Biol. Chem.* **271**, 15963–15970.

18. Yan, L., Borregaard, N., Kjeldsen, L., Moses, M. A. (2001) The high molecular weight urinary matrix metalloproteinase (MMP) activity is a complex of gelatinase B/MMP-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Modulation of MMP-9 activity by NGAL. *J. Biol. Chem.* **276**, 37258–37265.
19. Crossley, L. J. (2003) Neutrophil activation by fMLP regulates FOXO (forkhead) transcription factors by multiple pathways, one of which includes the binding of FOXO to the survival factor Mcl-1. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 583–592.
20. Ernens, I., Rouy, D., Velot, E., Devaux, Y., Wagner, D. R. (2006) Adenosine inhibits matrix metalloproteinase-9 secretion by neutrophils: implication of A2a receptor and cAMP/PKA/Ca²⁺ pathway. *Circ. Res.* **99**, 590–597.
21. Nagamatsu, S., Ohara-Imaizumi, M., Nakamichi, Y., Kikuta, T., Nishiwaki, C. (2006) Imaging docking and fusion of insulin granules induced by antidiabetes agents: sulfonylurea and glinide drugs preferentially mediate the fusion of newcomer, but not previously docked, insulin granules. *Diabetes* **55**, 2819–2825.
22. Faurschou, M., Borregaard, N. (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* **5**, 1317–1327.
23. Borregaard, N., Cowland, J. B. (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* **89**, 3503–3521.
24. Lominadze, G., Powell, D. W., Luerman, G. C., Link, A. J., Ward, R. A., McLeish, K. R. (2005) Proteomic analysis of human neutrophil granules. *Mol. Cell. Proteomics* **4**, 1503–1521.
25. Tsuji, K., Aoki, T., Tejima, E., Arai, K., Lee, S. R., Atochin, D. N., Huang, P. L., Wang, X., Montaner, J., Lo, E. H. (2005) Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia. *Stroke* **36**, 1954–1959.
26. Montaner, J., Molina, C. A., Monasterio, J., Abilleira, S., Arenillas, J. F., Ribo, M., Quintana, M., Alvarez-Sabin, J. (2003) Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* **107**, 598–603.
27. Strbian, D., Karjalainen-Lindsberg, M. L., Kovanen, P. T., Tatlisumak, T., Lindsberg, P. J. (2007) Mast cell stabilization reduces hemorrhage formation and mortality after administration of thrombolytics in experimental ischemic stroke. *Circulation* **116**, 411–418.
28. Weinstein, M., Restrepo, R., Chait, P. G., Connolly, B., Temple, M., Macarthur, C. (2004) Effectiveness and safety of tissue plasminogen activator in the management of complicated parapneumonic effusions. *Pediatrics* **113**, e182–e185.
29. Owen, C. A., Hu, Z., Barrick, B., Shapiro, S. D. (2003) Inducible expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-resistant matrix metalloproteinase-9 on the cell surface of neutrophils. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **29**, 283–294.
30. Pugin, J., Widmer, M. C., Kossodo, S., Liang, C. M., Preas, H. L., Suffredini, A. F. (1999) Human neutrophils secrete gelatinase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **20**, 458–464.
31. Opdenakker, G., Van den Steen, P. E., Dubois, B., Nelissen, I., Van Coillie, E., Masure, S., Proost, P., Van Damme, J. (2001) Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 851–859.
32. Chakrabarti, S., Zee, J. M., Patel, K. D. (2006) Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release. *J. Leukoc. Biol.* **79**, 214–222.
33. Van Lint, P., Libert, C. (2006) Matrix metalloproteinase-8: cleavage can be decisive. *Cytokine Growth Factor Rev.* **17**, 217–223.
34. Zebrowska, A., Narbutt, J., Sysa-Jedrzejowka, A., Kobos, J., Waszczybowska, E. (2005) The imbalance between metalloproteinases and their tissue inhibitors is involved in the pathogenesis of dermatitis herpetiformis. *Mediators Inflamm.* **2005**, 373–379.
35. Schrufer, R., Sulyok, S., Schymeinsky, J., Peters, T., Scharffetter-Kochanek, K., Walzok, B. (2006) The proangiogenic capacity of polymorphonuclear neutrophils delineated by microarray technique and by measurement of neovascularization in wounded skin of CD-18-deficient mice. *J. Vasc. Res.* **43**, 1–11.
36. Roelofs, J. J., Rouschop, K. M., Leemans, J. C., Claessen, N., de Boer, A. M., Frederiks, W. M., Lijnen, H. R., Weening, J. J., Florquin, S. (2006) Tissue-type plasminogen activator modulates inflammatory responses and renal function in ischemia reperfusion injury. *J. Am. Soc. Nephrol.* **17**, 131–140.
37. Renckens, R., Roelofs, J. J., Florquin, S., de Vos, A. F., Pater, J. M., Lijnen, H. R., Carmeliet, P., van't Veer, C., van der Poll, T. (2006) Endogenous tissue-type plasminogen activator is protective during *Escherichia coli*-induced abdominal sepsis in mice. *J. Immunol.* **177**, 1189–1196.

ARTICLE 4

Matrix metalloproteinase-13 is activated and is found in the nucleus of neural cells after cerebral ischemia

(*J Cereb Blood Flow Metab.* 2008 Nov 5. [Epub ahead of print])

Matrix metalloproteinase-13 is activated and is found in the nucleus of neural cells after cerebral ischemia

Eloy Cuadrado^{1,2}, Anna Rosell^{1,2}, Maria Borrell-Pagès^{1,2}, Lidia García-Bonilla^{1,2}, Mar Hernández-Guillamon^{1,2}, Arantxa Ortega-Aznar³ and Joan Montaner¹

¹Department of Neurology, Neurovascular Research Laboratory, Neurovascular Unit, Institut de Recerca, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ²Department of Internal Medicine, Institut de Recerca, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; ³Department of Pathology, Neuropathology Unit, Institut de Recerca, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Matrix metalloproteinases (MMPs) have been implicated in the pathophysiology of ischemic stroke. In this study, we investigated the time course of gelatinolytic activation in a rat model of permanent ischemia. We observed an activation of MMPs as early as 30 mins after the ischemic insult, mainly in the nuclei of brain cells. Besides, we explored MMP-13 expression in brain samples of the animal model and stroke deceased patients. We observed an upregulation of active MMP-13 in rat brains ($P < 0.05$) after 90 mins of cerebral ischemia. Human infarct/perinfarct samples also showed higher levels of active MMP-13 ($P < 0.05$) compared with contralateral ones. Interestingly, we found that MMP-13 colocalized with 46-diamidino-2-phenyl indole signal by immunohistochemistry in both humans and rats, suggesting an intranuclear localization for MMP-13. Immunohistochemistry also revealed that MMP-13 was mainly produced by neurons, in both species, but also by oligodendrocytes in rats, and by astrocytes in humans. Finally we subjected a rat primary neuronal culture to oxygen and glucose deprivation (OGD) and we reproduced the nuclear translocation of MMP-13 *in vitro*. Nuclear extracts from cells confirmed upregulation of active MMP-13 after OGD ($P < 0.05$). These results suggest that MMP-13 activation and its nuclear translocation is an early consequence of an ischemic stimulus.

Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism advance online publication, 5 November 2008; doi:10.1038/jcbfm.2008.130

Keywords: MMP-13; neuron; nucleus; stroke

Introduction

Experimental and clinical studies have shown that ischemic brain injury after stroke is a dynamic process that evolves a period of hours to several days (Dirnagl *et al*, 1999; Sharp *et al*, 2000). This process includes several events such as oxidative stress, cell death, inflammation, as well as activation of endogenous adaptive and regenerative mechanisms (Baranova *et al*, 2007).

Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of zinc-binding proteolytic enzymes that normally remodel the extracellular matrix and pathologically degrade substrates as part of the neuroinflammatory response (Matrisian, 1990). Collagen and gelatin, as well as other extracellular molecules such as fibronectin, laminin, and a variety of proteoglycans can be degraded by MMPs (Yong *et al*, 1998). MMPs are either transmembrane or secreted proteins essential in the breakdown of the extracellular matrix around cerebral blood vessels and neurons. Thus, their action might lead to opening of the blood–brain barrier, brain edema, hemorrhage, and cell death (Jian Liu and Rosenberg, 2005).

Animal models of cerebral ischemia have reported that MMP-9 and also MMP-2 are abnormally expressed after an ischemic insult (Planas *et al*, 2001; Rosenberg *et al*, 1996). Indeed an increased *in situ* gelatinase/collagenase activity in brain

Correspondence: Dr J Montaner, Department of Neurology, Neurovascular Research Laboratory, Neurovascular Unit, Institut de Recerca, Hospital Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Pg Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain.

E-mail: 31862jmv@comb.es

Received 5 August 2008; revised 3 October 2008; accepted 8 October 2008

samples from mice (Lee *et al*, 2004), rats (Justicia *et al*, 2003; Loy *et al*, 2002; Rivera *et al*, 2002), and humans (Rosell *et al*, 2006) has been reported after cerebral ischemia. Interestingly, mice lacking MMP-9 gene or treated with broad-spectrum MMP inhibitors exhibit diminished cerebral damage after stroke (Asahi *et al*, 2000).

A recent study reported by Amantea *et al* (2008), described an increased nuclear MMP-derived gelatinolytic activity in brain cells after reperfusion injury in a transient model of cerebral ischemia in rat, although their nuclear function remains unexplained yet.

Matrix metalloproteinase-13 (or collagenase-3) is a member of the collagenase subfamily of MMPs and has a central position in the MMP activation cascade. Its activation can be autoproteolytic or catalyzed by several MMPs (Leeman *et al*, 2002) and MMP-13 can degrade collagens but it also shows the highest gelatinase activity among collagenases (Knauper *et al*, 1996). Although MMP-9 has been widely studied in many animal models of cerebral ischemia as well as in human stroke, only a few investigations have reported the role of MMP-13 in the pathogenesis of brain ischemia.

To our knowledge, only a previous study has investigated MMP-13 after focal ischemia in rats reporting an increase in neurons, peaking at day 7 after reperfusion (Nagel *et al*, 2005). Besides, previous results from our group showed that high levels of MMP-13 are involved in infarct growth suggesting an early role in brain injury in stroke patients (Rosell *et al*, 2005).

The aim of the present study was to examine the time course of MMP-proteolytic activation and to determine MMP-13 expression after stroke. We observe an activation of MMPs as early as 30 mins after the ischemic insult in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion (pMCAO). Furthermore, among all the proteases involved in the process, we report evidence that active MMP-13 is upregulated in rats as well as in human postmortem brain after cerebral ischemia, mainly in neurons and oligodendrocytes. Interestingly, we observe that MMP-13 appears within the cell nuclei and that this effect is reproduced *in vitro* in rat cortical neuron cultures exposed to oxygen and glucose deprivation (OGD). The data presented suggest that MMP-13 activation and its nuclear translocation is an early consequence of an ischemic stimulus.

Materials and methods

Brain Tissue Samples

A total of 10 deceased patients (7 women and 3 men) who had an ischemic stroke within the previous 4 days (range, 12 to 96 h) were included in the study, demographic data are listed in Supplementary Table 1 online. On autopsy and during macroscopic exam, infarcted area was delimited by an experienced neuropathologist (mainly through consistence and color of the parenchyma) and

neuroradiology images were used to obtain brain tissue from ipsilateral, infarction ($n=10$) or periinfarction ($n=7$), and contralateral hemisphere ($n=10$). All samples were obtained within the first 6 h after death and snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for Western blot or fixed with formalin for immunohistochemistry techniques. This study was approved by the Ethics Committee of the hospital and informed consent was acquired from relatives before the autopsy.

Experimental Stroke Model

All animal experiments were approved by the Ethics Committee of the Research Institute of the Vall d'Hebron Hospital and were conducted in compliance with the Spanish legislation and in accordance with the Directives of the European Union.

Infarction in the territory of the MCA was induced by vascular occlusion in Sprague–Dawley rats (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) weighing 280 to 310 g as described previously (Longa *et al*, 1989). Briefly, animals were anesthetized with isoflurane under spontaneous respiration. Body temperature was maintained at 37°C using a temperature controlled heating pad. The right common carotid artery was exposed through a midline incision in the neck and it was carefully dissected from the tissue using microsurgical technique. The occipital and superior thyroid branches of the external carotid artery were cauterized and the pterygo-palatine branch of the internal carotid artery was irreversibly occluded. The external carotid artery was tied and cut and then, a 4/0 nylon monofilament was passed via the external carotid artery and up the internal carotid artery 18 to 20 mm, blocking the MCA. To determine that the MCA was successful occluded, regional cerebral blood flow was measured in the cortex supplied by the MCA by continuous laser-Doppler flowmetry (Moor Instruments, Devon, England). At 1 day before stroke induction, a small burr hole in the right parietal bone (2 mm posterior and 3.5 mm lateral to bregma) was drilled leaving the dura intact, and a cannula was fixed to the skull with cyanoacrylate and dental cement. Laser-Doppler flowmetry probe (0.5 mm diameter) was placed on the dura using the cannula and cortical regional cerebral blood flow was assessed during all surgery time to ensure MCA occlusion. Only animals with a regional cerebral blood flow reduction of more than 75% were included ($n=46$). Sham-operated rats were subjected to the same surgical procedure without the occlusion of the MCA. Animals were killed at different times after artery occlusion (30, 60, 90, 120 mins or 48 h; $n=5$ per group). One animal of the 48 h group died during the process. Finally, rats were deeply anesthetized and transcardially perfused with ice-cold saline. Afterward, both ipsilateral and contralateral brain hemispheres were rapidly dissected and kept frozen (-80°C) until use.

Analysis of Infarct Volume

To measure the infarct volume, animals were killed and brains were removed at 30, 60, 90, 120 mins or 48 h after

MCAO and evaluated using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride staining (Bederson *et al*, 1986; $n=4$ per group). The brain was sliced in 2-mm-thick sections and stained with 2% 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride for 30 mins at room temperature followed by an overnight fixation with 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/L phosphate-buffered saline. The image of the stained slices was captured using a CanoScan 4200F (Canon Inc., Lake Success, NY, USA) and the area of infarction and noninfarction tissue was outlined and quantified using an image analysis system (Scion Image version 4.02, Scion Corporation, Frederick, MD, USA). The infarct volume (corrected for edema) was calculated by integration of the lesion areas and expressed as a percentage of ipsilateral hemisphere.

Cell Culture

Cerebral cortical cells were obtained from fetal Sprague-Dawley rats at 17 days of gestation. After the meninges were carefully removed, cortices were enzymatically and mechanically dissociated as previously reported (Goldberg and Choi, 1993). Cells were resuspended in Basal Medium Eagle (Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA), 10% FHS (Pan Biotech GmbH), 50 U/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin (Gibco BRL), 2 mmol/L glutamine, and 30 mmol/L glucose (complete Basal Medium Eagle). Dissociated cells were seeded to 2.5×10^5 cells per milliliter and plated into poly-L-lysine precoated 24-well plates. Cultures were kept at 37°C in a humidified incubator containing 5% CO₂ and atmospheric oxygen. At 2 h after seeding, medium was replaced by Neurobasal medium (Gibco BRL) supplemented with 50 U/mL penicillin, 50 μ g/mL streptomycin, 2 mmol/L glutamine, and 2% B27 supplement (Gibco BRL). After these procedures, cell cultures yielded nearly pure neuronal cultures as described previously (Estus *et al*, 1997).

Oxygen and Glucose Deprivation

Mature neuronal cultures (11 to 13 DIV, $n=10$) were OGD by placing them in an anaerobic chamber (Invivo₂, Ruskinn, Pencoed, UK), containing 5% CO₂, 95% N₂ at 37°C for 3 h with deoxygenated glucose-free Earle's balanced salt solution, containing 116 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 0.8 mmol/L MgSO₄·7H₂O, 1.0 mmol/L NaH₂PO₄·2H₂O, 26.2 mmol/L NaHCO₃, 1.8 mmol/L CaCl₂·2H₂O, 0.01 mmol/L glycine, pH 7.4. OGD was terminated by returning the cultures to the pre-OGD culture medium and normoxic conditions. Reoxygenation was performed for 24 h. Control neuronal cultures were exposed to balanced salt solution containing 5.5 mmol/L glucose, and kept in the standard incubator during the same time as OGD cultures. Cell viability was measured by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay. After treatments, MTT (0.5 mg/mL) was added to cells and after 90 mins incubation at 37°C, the medium was replaced by dimethyl sulfoxide. The amount of formazan blue formed after

MTT reduction was quantified spectrophotometrically at 560 nm (Plumb *et al*, 1989).

Nuclear Extraction

Cell pellets were recovered with a rubber policeman in 0.5 mL of cell lysis buffer 1 containing: 50 mmol/L Tris HCl, pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂, 0.05% BRIJ-35, 0.02% NaN₃, and 1% Triton X-100, 0.2 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride, and 10 μ g/mL aprotinin. Pellets were homogenized using a Dounce Homogenizer and centrifuged at 240g for 5 mins at 4°C. After 15 mins on ice, pellets were resuspended in 0.5 mL 0.6% Nonidet P-40 lysis buffer. The homogenate was vortexed for 10 secs and centrifuged at 240g for 5 mins at 4°C. The supernatant was kept for analysis of the cytoplasmic fraction. Pellet was resuspended on 0.2 mL of lysis buffer 2 containing: 20 mmol/L Tris HCl, pH 7.5, 125 mmol/L NaCl, 5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L EDTA, 12% glycerol, and 0.1% NP-40, sonicated and centrifuged at 20,000g for 15 mins at 4°C and the supernatant was kept for nuclear extract analysis.

To assess the purity of nuclear extracts, Western blots with anti-GAPDH as cytoplasm marker (1:1000, mouse, Ambion, Foster City, CA, USA) and anti-Histone H3 as nuclear marker (1:500, rabbit, Cell Signaling, Boston, MA, USA) were performed on 15% acrylamide gels.

Western Blot

Frozen samples were homogenized for Western blotting. Brain tissue (0.2 g) was mixed with 0.7 mL of cold lysis buffer (50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, 5 mmol/L CaCl₂, 0.05% Brij-35, 0.02% NaN₃, and 1% Triton X-100), containing protease inhibitors (1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride and 7 μ g/mL aprotinin) and centrifuged at 12,000g for 10 mins. Total protein content was determined by bicinchoninic acid assay (Pierce, Rockford, IL, USA). MMP-13 protein content was detected by Western blot in brain homogenates from rats ($n=25$, 5 per group) and humans ($n=27$, 7 to 10 per study area) as well as in the cell extracts ($n=5$). Briefly, equal protein amount (30 μ g in brain homogenates and 50 μ g in cell extracts) was loaded in Laemmli buffer with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (12%) at 100 V. Separated proteins were transferred onto a PVDF membrane using a Transblot Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) during 1 h at 100 V. Nonspecific bindings were blocked with 10% nonfat milk before membranes were incubated overnight at 4°C with mouse anti-MMP-13 antibody (Calbiochem, Gibbstown, NJ, USA) at 1:300 dilution. Secondary antibody goat anti-mouse-HRP (Chemicon, Billerica, MA, USA) was diluted 1:2000 and incubated at room temperature for 1 h. Before and after incubations, membranes were washed three times (10 mins each) with 0.05% Tween-phosphate buffer saline. The substrate reaction was developed with chemiluminescent reagent Immobilon (Millipore, Billerica, MA, USA) and visualized with a luminescent image analyzer (Las-3000, Fujifilm, USA).

Immunodetection of β -actin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was performed to verify that equal amounts of total protein were loaded for each brain sample.

In Situ Zymography

Brain frozen sections (12 μ m) from rats were prepared using a cryostat (Leica CM3050S, Leica, Germany). Preparations were treated with the MMP fluorogenic substrate DQ-gelatin-FITC (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) as described previously (Justicia *et al*, 2003). Some sections were treated with broad-spectrum MMP inhibitor 1,10-phenanthroline (10 mmol/L) to ensure specificity. Tissues were analyzed with laser confocal spectral microscope (Olympus FV-1000) and images were processed with Olympus Fluoview software (version 1.7a).

Immunohistochemistry/Immunocytochemistry

For immunohistochemistry assays, frozen sections (12 μ m) were prepared using a cryostat. The following antibodies were used: rabbit anti-MMP-13 antibody (1:100; Sigma-Aldrich), mouse anti-NeuN antibody (1:100; Chemicon), mouse anti-gial fibrillary acid protein antibody (1:100; Sigma-Aldrich), mouse anti-Iba1 antibody (1:20; Abcam, Cambridge, UK), mouse anti-CNPase (1:200; AbD Serotec, Kidlington, UK). Briefly, sections were fixed in ice-cold acetone for 15 mins and then washed in Tween-phosphate buffer saline for 5 mins. The sections were then blocked with 10% bovine serum albumin (w/v)/0.3% Triton X-100 (v/v) in phosphate-buffered saline (blocking buffer) for 30 mins at room temperature, and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies diluted in blocking buffer. After washing in Tween-phosphate buffer saline (3 \times 5 mins), the sections were incubated with goat Alexa-Fluor 488 anti-mouse IgG or goat Alexa-Fluor 568 anti-rabbit IgG antibodies (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) diluted 1:500 in blocking buffer for 1 h at room temperature. Finally, the sections were thoroughly washed (3 \times 5 mins) and then mounted on coverslips using Vectashield with 46-diamidino-2-phenyl indole (DAPI; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

For immunocytochemistry assay, cells were seeded and grown on glass coverslips. Fixation was performed with 4% paraformaldehyde for 20 mins and finally washed with Tween-phosphate buffer saline (3 \times 5 mins). Blocking and antibody incubations were performed as described above.

Negative control sections received identical treatment except for the primary antibody. Tissues were analyzed with a fluorescence microscope (Olympus IX71) interfaced with an image analysis system. For colocalization studies, laser confocal spectral microscope (Olympus FV-1000) was used. Tissue images were processed with Olympus Fluoview version 1.7a software (Olympus, Japan). Three-dimensional reconstruction of tissue sections was performed using Imaris 4.5.2 (Bitplane AG, Switzerland).

Statistical Analysis

Data were analyzed using GraphPad Prism version 4.0 software. Kruskal–Wallis test was used followed by Dunn's Multiple Comparison test to assess intergroup differences. A *P*-value < 0.05 was considered statistically significant at a 95% confidence level. Error bars in figures represent s.e.m.

Results

Gelatinase Activity Appears in Cell Nucleus as Early as 30 mins After Cerebral Ischemia

We assessed whether gelatinase proteolytic activity increased in brain parenchyma of rats that underwent a permanent focal cerebral ischemia by MCAO at short times (30, 60, 90 and 120 mins) and also 48 h after the ischemic insult.

Infarct size was measured to evaluate the intensity of ischemic injury of this model. 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride staining (Supplementary Figure 1 online) showed no lesion at 30 mins and a progressive increase of the infarcted tissue at longer times of ischemia yielding an extent infarction at 48 h after the occlusion ($35.3 \pm 15.6\%$, *P* < 0.01 versus 30 mins group; Supplementary Figure 1b online).

During short times of ischemia (30 to 120 mins), gelatinase activation was detected mostly in the striatum (Figure 1) whereas at 48 h of brain ischemia gelatinolytic activity appeared also in the cortex.

With regard to the subcellular localization, gelatinase activity was already found in cell nucleus at 30 mins of brain ischemia (Figure 1) whereas at 90 and 120 mins after artery occlusion the gelatinolytic activity increased and appeared also in the cell cytoplasm. Gelatinase signal yielded the highest intensity at 48 h after MCA occlusion and could be found both in cell nucleus and cytosolic compartment (Figure 1). No proteolytic signal was found in sham-operated animals; however, a weak signal appeared in some nuclei in contralateral hemisphere at 48 h of cerebral ischemia. Sections treated with broad-spectrum MMP inhibitor 1,10-phenanthroline did not show any proteolytic activity (data not shown).

Active MMP-13 Protein Increases at Short Times of Cerebral Ischemia

Western blot experiments of rat brain homogenates showed an active MMP-13 form (MMP-13a) of 45 kDa (Figure 2A); however, no proMMP-13 form could be detected with this antibody. These experiments showed that MMP-13 protein level is elevated at all occlusion times when compared with sham animals. Furthermore, MMP-13a levels peaked in the 90 mins occlusion group (*P* < 0.05) and its presence remained overexpressed in the 48 h of permanent ischemia group (Figure 2B), although significant differences were not found.

The immunohistochemical analysis of rat brain preparations showed consistent results because MMP-13 reactivity slightly increased in the ischemic tissue already after 30 mins of cerebral ischemia (Figure 2C) and peaked at 90 mins. Besides, the MMP-13 signal was mainly detected in the ipsilateral hemisphere whereas hardly any signal was discerned in the contralateral hemisphere (Figure 2D). It is worth noting that MMP-13 signal colocalized

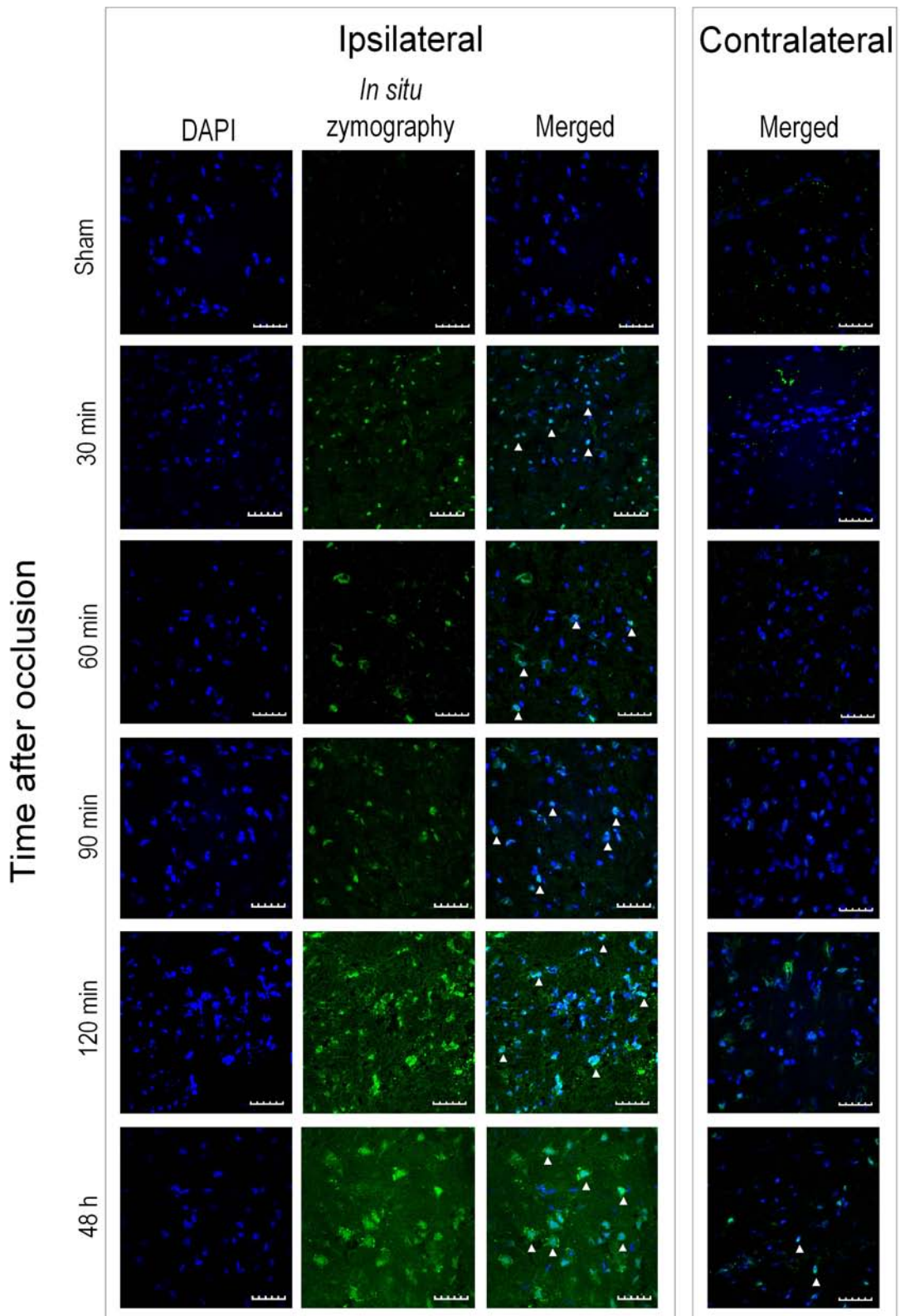


Figure 1 Images showing *in situ* zymography assay in striatum of rat brain preparations. Nuclei are stained with DAPI. In ipsilateral hemispheres proteolytic activity appears in nucleus (arrowheads) as early as 30 mins after MCA occlusion as seen in merged images. Contralateral hemisphere (merged images) only shows colocalization in few cells after 48 h of pMCAO. Scale bar = 40 μ m.

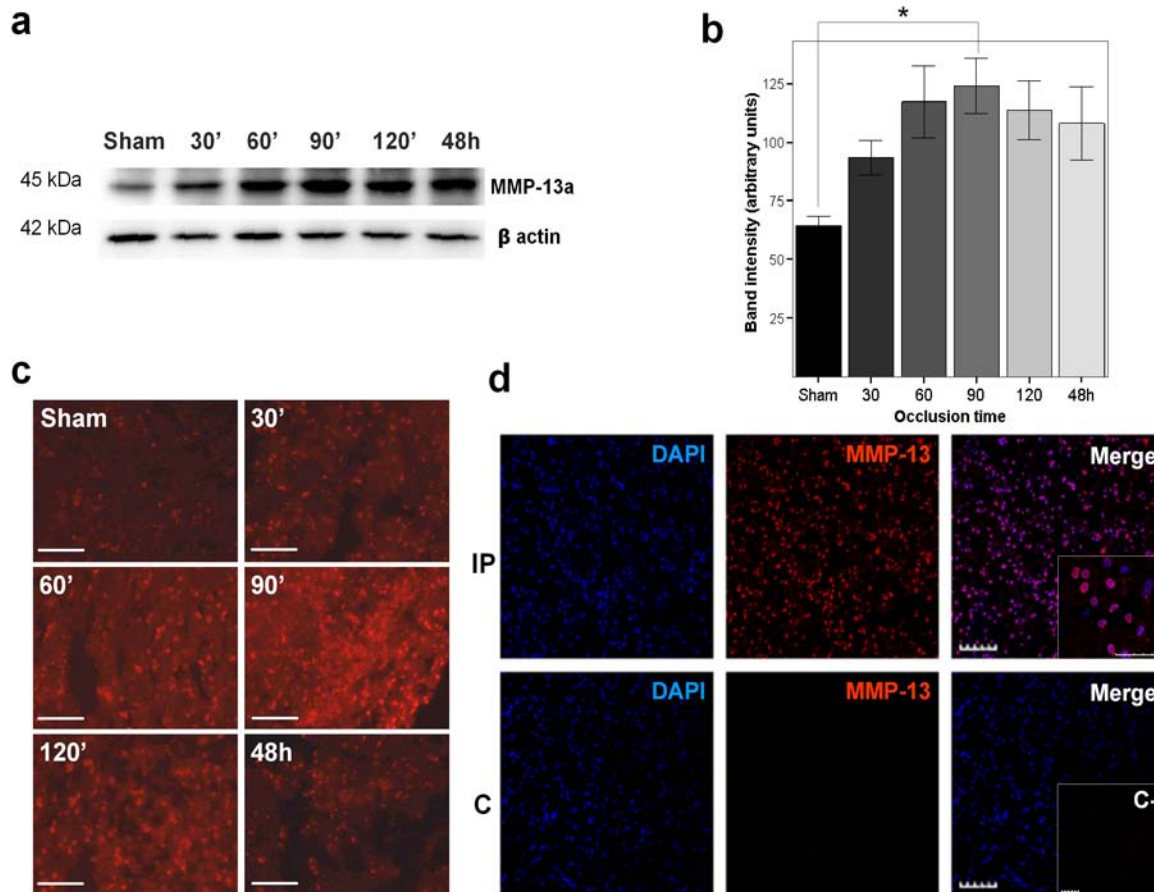


Figure 2 Changes in the expression of MMP-13 in rat brain after MCA occlusion. **(A)** Representative MMP-13a Western blot from pMCAO rats. **(B)** Bar graph densitometry of Western blot bands expressed in arbitrary units ($n = 5$ per group). MMP-13 is increased in all animals when compared with sham-operated rats and reached statistical significance after 90 mins of pMCAO compared with shams. **(C)** Immunofluorescence analysis of rat infarct brain preparations. The highest MMP-13 intensity was found in preparations of rats after 90 mins of cerebral ischemia. **(D)** Immunohistochemistry against MMP-13 in ipsilateral (IP) and contralateral (C) hemispheres after 90 mins pMCAO. Confocal microscopy showed that MMP-13 was only found in the IP hemisphere and colocalize with nuclear DAPI stain (see amplified field). Negative control (C-) section from IP hemisphere received identical treatment except for the primary antibody. $*P < 0.05$; scale bar = 100 μm . Bar in insert = 50 μm .

with DAPI signal within the infarcted hemisphere in many cells (Figure 2D insert).

Active MMP-13 Protein Level Increases in Human Brain After Stroke

We then examined MMP-13 protein expression in the brain tissue from deceased patients after an ischemic stroke. By Western blot, we were able to detect the MMP-13 proform (60 kDa, proMMP-13) as well as the cleaved active form of MMP-13 (48 kDa, MMP-13a; Figure 3A). Western blot analysis showed no differences for proMMP-13 among studied areas (Figure 3B). However, the infarct core, together with the periinfarct, showed the highest levels of MMP-13 active form ($P < 0.05$, Figure 3C) compared with contralateral areas. Immunohistochemistry confirmed that MMP-13 was upregulated within the infarction as well as in the periinfarct area (Figure

3D) and a low signal was displayed by the contralateral hemisphere preparations. Similarly to our observations in rats, human MMP-13 signal also colocalized with DAPI signal in both infarct and periinfarct areas in some cells (Figure 3D insert).

MMP-13 is Found in Cell Nucleus After Stroke

To verify a possible nuclear localization of MMP-13, we performed a confocal analysis of both human and rat brain preparations. As in both set of samples, this colocalization could be neatly observed, we chose a rat brain preparation to illustrate this phenomenon because we were especially interested in early times of ischemia.

Confocal analysis showed colocalization of MMP-13 signal (in red, 568 nm laser excitation) with DAPI nuclear staining (in blue, 405 nm laser excitation) in rat preparations (Figure 4A). Further analysis from an

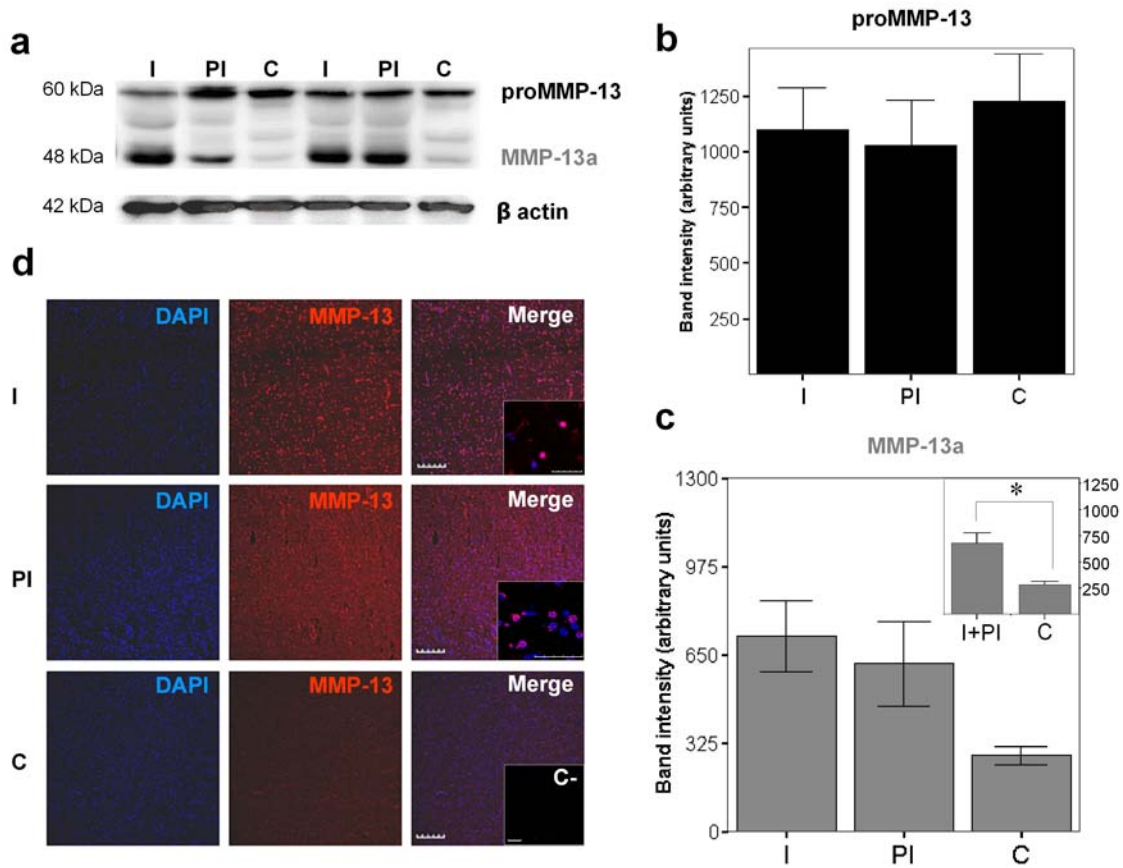


Figure 3 MMP-13 is upregulated in infarction/periinfarction of human stroke samples. (A) Representative Western blot analysis of human brain homogenates. Both proMMP-13 (60 kDa) and active form (48 kDa) were detected. Although no differences regarding proMMP-13 were found (B), the active form was found to be increased in infarct/periinfarct samples (C) as shown in densitometry bar graphs (infarct $n = 10$, periinfarct $n = 7$, contralateral $n = 10$). (D) Immunohistochemistry against MMP-13 in infarct (I), periinfarct (PI), and contralateral (C) samples from human brain. MMP-13 reactivity is high in infarcted and periinfarcted regions and colocalize with nuclear DAPI signal (see inserts). Negative control (C-) section from the infarction received identical treatment except for the primary antibody. $*P < 0.05$; scale bar = 100 μm . Bar in inserts = 50 μm .

amplified field in Figure 4A obtained with optical section separation of 1 μm (z interval) showed how MMP-13 immunoreactivity co-migrates with DAPI signal along the z interval (Figure 4B). Imaris software allowed us to create a three-dimensional reconstruction using the stack of 12 optical sections from the tissue. This rendition helped us to observe how the MMP-13 signal colocalize spatially with the DAPI signal in the infarcted brain tissue (Figures 4C and 4D).

MMP-13 is Found in Neurons and Oligodendrocytes in Rats

As MMP-13 appeared upregulated in rats after cerebral ischemia, we decided to investigate by immunohistochemistry which cell types were the main source of this MMP-13 after an ischemic insult.

In brain preparations from rats after 90 mins of MCA occlusion, we observed that the main source of MMP-13 in the ischemic tissue were NeuN-positive neurons (Figure 5A), showing a strong nuclear and cytoplasmic signal. Neither glial fibrillary acid

protein-positive astrocytes nor Iba-1-positive microglia/inflammatory cells showed any significant staining (Figures 5B and 5C). Some CNPase-positive oligodendrocytes, however, also presented nuclear stain for MMP-13 (Figure 5D).

Rat brain preparations from animals subjected to 48 h of ischemia showed a strong nuclear and cytoplasmic MMP-13 immunoreactivity in neurons (Figure 5E), not only in the striatum but also in the ischemic cortex (data not shown). No astrocytes were found to produce MMP-13 at this time (Figure 5F) and few isolated inflammatory cells colocalized with MMP-13 signal (Figure 5G). Nevertheless, some oligodendrocytes also appeared stained for MMP-13 in their nucleus (Figure 5H).

MMP-13 is Found Mainly in Neurons of Humans After Stroke

We also analyzed the subcellular localization of MMP-13 in samples from cortical infarctions and periinfarction regions in human brain samples.

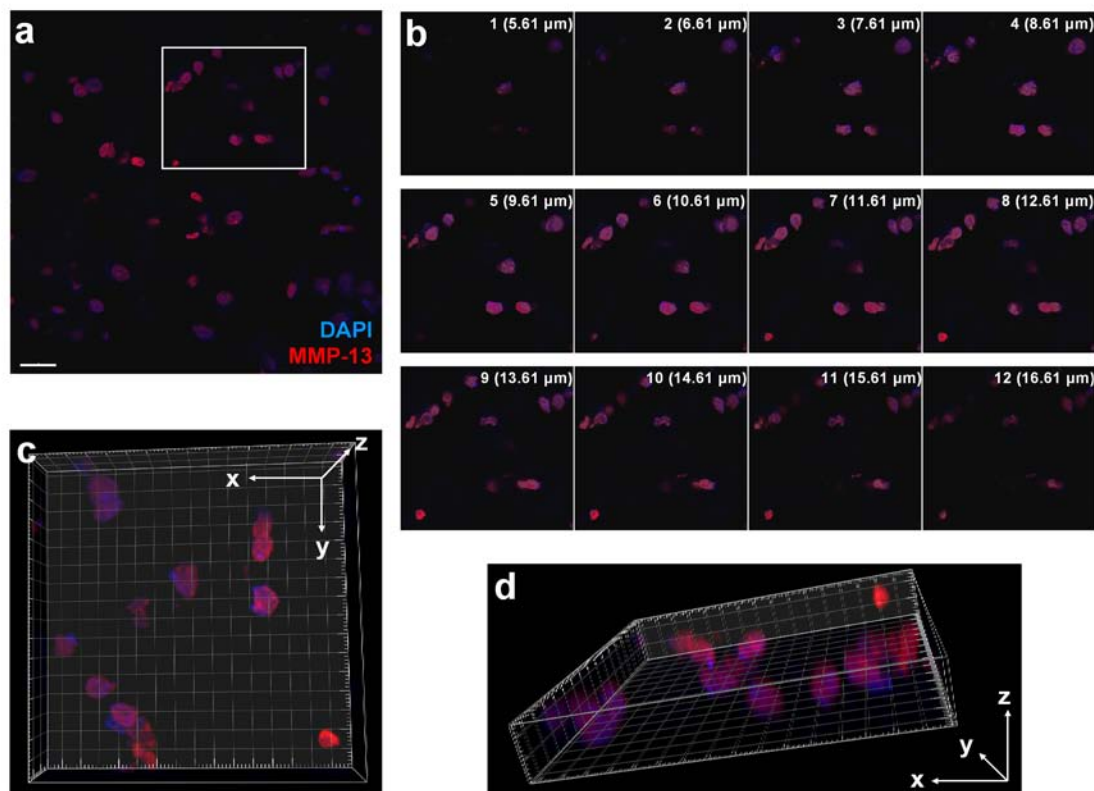


Figure 4 Confocal analysis in a preparation of rat brain submitted to 90 mins of cerebral ischemia. **(A)** Merged image of nuclear DAPI and MMP-13 staining in a rat brain preparation. **(B)** Image from gate in **(A)** corresponding to z axis consecutive images with a optical separation (z interval) of $1\ \mu\text{m}$. **(C)** Top view of three-dimensional reconstruction from the stack of 12 optical sections from brain tissue. **(D)** Lateral view of the stack. In all cases MMP-13 signal co-migrates with nuclear DAPI stain. Axis (x, y, z) are plotted for a better interpretation. Scale bar = $20\ \mu\text{m}$.

Within the infarction, MMP-13 was found to be mainly produced by NeuN-positive neurons (Figure 6A) and glial fibrillary acid protein-positive astroglia (Figure 6B), in both cases nuclear and cytoplasmic staining was found. Some isolated inflammatory cells were also found positive for MMP-13 (Figure 6C). However, in this case, no CNPase-positive oligodendrocytes were found stained for MMP-13 (Figure 6D).

In the infarct boundary, MMP-13 was found mainly in neurons (Figure 6E) and no relevant signal was found in astrocytes (Figure 6F), inflammatory cells (Figure 6G), or oligodendrocytes (Figure 6H).

Oxygen and Glucose Deprivation Promotes Neuron Nuclear Translocation of MMP-13 *In Vitro*

We hypothesized that MMP-13 partially switch its distribution from cytoplasm to cell nucleus after an ischemic stimulus. In an attempt to show this, primary cortical neurons from rats were cultured and subjected to oxygen and glucose deprivation (3 h), followed by a reoxygenation for 24 h. In OGD-

treated cells, viability was reduced by $21.55 \pm 3.95\%$ measured by MTT reduction ($P < 0.001$, Figure 7A) compared with controls. Control neurons, kept in the standard incubator with balanced salt solution medium supplemented with $5.5\ \text{mmol/L}$ glucose, showed low MMP-13 reactivity restricted to cytoplasm only (Figure 7B). However, cells subjected to OGD, showed high immunoreactivity against MMP-13 in the cell nucleus (Figure 7C). Besides, cytoplasm from hypoxic cells also showed slightly more metalloproteinase signal than cells kept in normoxic conditions. MAP-2, a commonly used neuronal marker, showed intact neurite extensions in normoxic condition, although this staining became discontinuous along the axons of cortical neurons submitted to hypoxia (Figures 7B and 7C).

To semiquantify this nuclear shift, cytosolic and nuclear extracts were obtained. By Western blot, nuclear extracts were found to be uncontaminated by cytosolic fractions, as no positive GAPDH band was found (Figure 7D). Similarly, cytosolic extracts were found to be free of histone H3, a typical nuclear marker. MMP-13 immunoblot showed that while no differences in cytosolic extract were detected, the

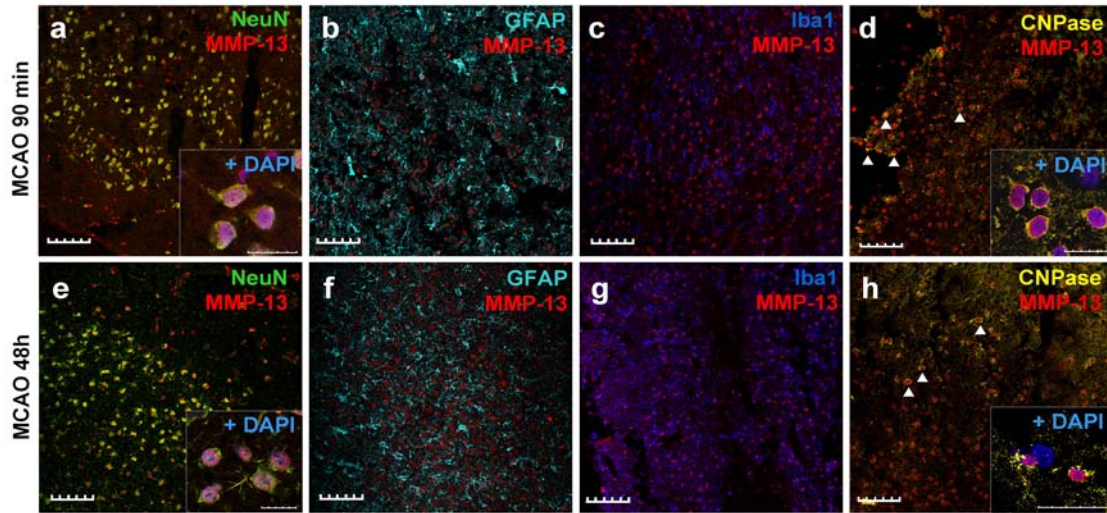


Figure 5 MMP-13 immunohistochemical analysis in rat brains after 90 mins and 48 h of pMCAO. MMP-13 reactivity was basically found in neurons at both time points (**A**, **E**; see inserts). Also some oligodendrocytes appeared stained for MMP-13 (**D**, **H**; see arrowheads and inserts). However, no astrocytes (**B**, **F**) neither inflammatory cells (**C**, **G**) appeared stained for MMP-13 at any time. Nuclei were stained with DAPI for nuclear localization. Scale bar = 100 μm . Bar in inserts = 20 μm .

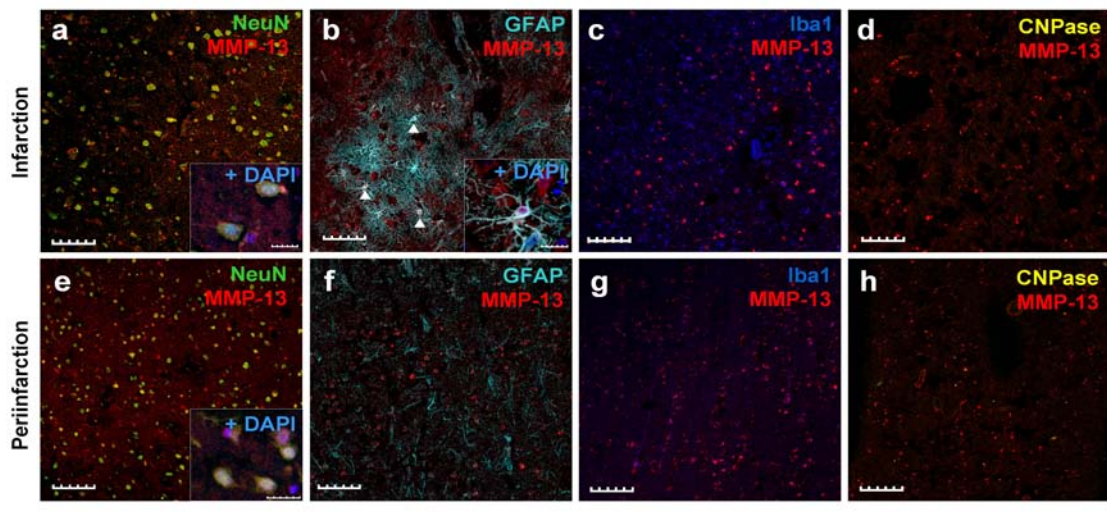


Figure 6 MMP-13 immunohistochemical analysis of human brain samples from the infarct core and the periinfarct area. MMP-13 reactivity was mainly found in neurons in both areas (**A**, **E**; see inserts). Also some astrocytes appeared stained for MMP-13 in the infarction (**B**) but no signal was detected in the periinfarct (**F**) (see arrowheads and inserts). However, few inflammatory cells (**C**, **G**) and no oligodendrocytes (**D**, **H**) appeared stained for MMP-13. Nuclei were stained with DAPI for nuclear localization. Scale bar = 100 μm . Bar in inserts = 20 μm .

nuclear extract displayed a slight but significant increase of MMP-13 in cells subjected to OGD ($P < 0.05$, Figures 7D and 7E).

Discussion

In this study, we characterized a part of the MMPs proteolytic activation after ischemic stroke. First, we observe an increased gelatinolytic activity in a rat

model of permanent focal ischemia as early as 30 mins after the MCA occlusion. Moreover, we show how this gelatinase activity was first and foremost detected in cell nuclei of brain cells and how, after 2 h of permanent ischemia, began to increase in cytoplasm. Besides, among all MMPs, we report that active MMP-13 is upregulated in rats and humans after stroke, mostly in neurons and oligodendrocytes. Finally, we describe that MMP-13 appears within the cell nuclei in brain tissue after

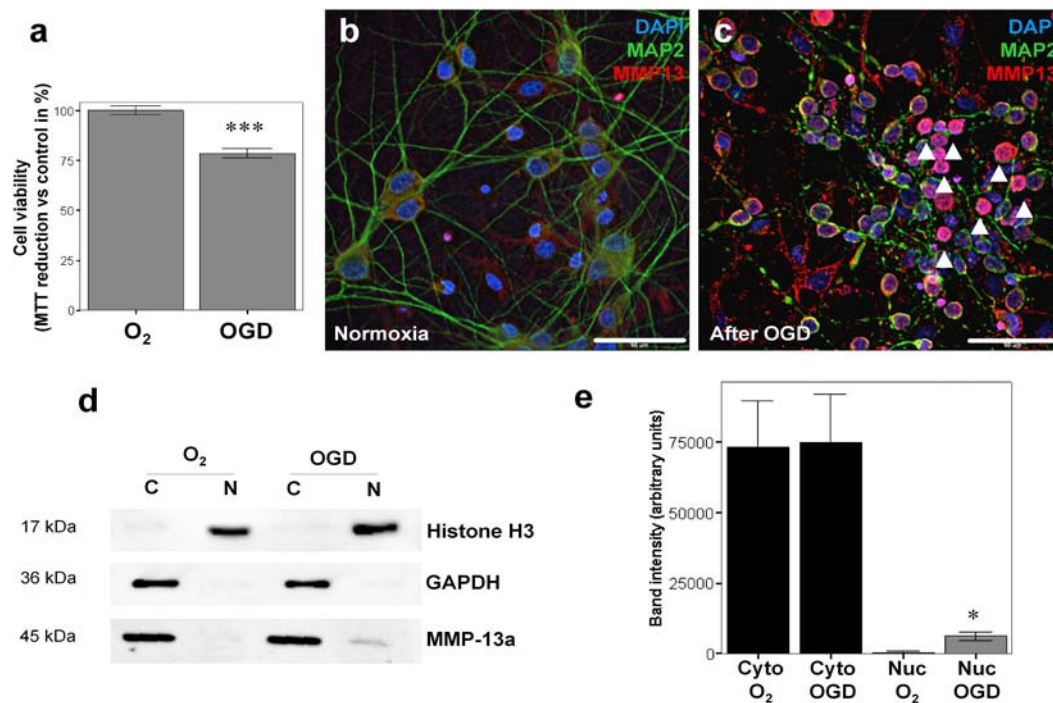


Figure 7 MMP-13 analysis in rat cultured neurons after OGD treatment. **(A)** Bar graph showing MTT reduction values in normoxic and OGD-treated cells expressed as percentage versus normoxic control ($n = 5$). Immunohistochemical analysis of cell cultures in normoxia **(B)** or after OGD **(C)**. Although almost no MMP-13 reactivity is found under normoxic condition, neurons stained with MAP2 showed a strong nuclear signal for MMP-13 after OGD (arrowheads). **(D)** Western blot to control the purity of the nuclear (N) and cytoplasmic (C) fractions. MMP-13a increases in nuclear extracts after OGD compared with normoxic extracts as shown in densitometry bar graph ($n = 5$; **E**). Scale bar = 50 μm . *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$.

ischemia and we reproduce this effect *in vitro* in a neuronal culture submitted to oxygen and glucose deprivation.

Our gelatinase *in situ* results showed an early activation of MMPs after an ischemic insult in rats. The fluorescent substrate used in this assay is efficiently digested by most, if not all, gelatinases and collagenases such as MMP-2, -9, -1, -8, and -13. Previous results from our laboratory revealed a relationship between high plasmatic levels of MMPs-9 and -13 and brain lesion growth in stroke patients (Rosell *et al*, 2005). Also, we described that MMP-9 is elevated in brain tissue after both hemorrhagic and ischemic stroke in humans (Rosell *et al*, 2006). For this reason in this study, we aimed to study MMP-13 expression in brain ischemic tissue.

The present study shows that MMP-13 is induced and is activated in rat and, for the first time, in human brain after cerebral ischemia. Previous studies have shown how MMP-13 production is increased after transient cerebral ischemia at delayed times of reperfusion (from 3 to 14 days) in rats (Nagel *et al*, 2005). Here, we describe that MMP-13 is activated as early as 30 mins of cerebral ischemia in our pMCAO rat model. This is particularly interesting because MMP-13 has a central position in the MMP activation cascade and, for instance, MMPs-2

and -9 are activated by MMP-13 (Leeman *et al*, 2002). MMPs-9 and -2 activity have been detected in a permanent model of cerebral ischemia at 6 and 24 h after stroke, respectively (Romanic *et al*, 1998). In a transient focal ischemia rat model, both MMPs-9 and -2 were increased at 4 h post-ischemia (Planas *et al*, 2001). Likewise, in humans, an increased brain expression of MMP-9 has been described (Rosell *et al*, 2006). Taken as a whole, these results sketch a temporal profile of MMP activation after an ischemic insult, being MMP-13 one of the first activated MMP based on our results. Contrarily to what we found in the *in situ* gelatinase assay where the maximum activity is reached at 48 h of ischemia in our model, MMP-13 activation peaked 90 mins after MCA occlusion. These results suggest that, although MMP-13 may have a role in early times of ischemia, other MMPs might be activated at latter times. Despite all these data, there are still many MMPs that have not been studied at this early time of ischemia and that might also play a role in the MMPs cascade activation.

Previous investigations have reported nuclear gelatinolytic activity in models of transient focal ischemia (Amantea *et al*, 2007; Gasche *et al*, 2001) but, to our knowledge, this is the first time that nuclear proteolytic activity is reported in a model of pMCAO at these brief periods of ischemia. It is

worth noting that a study performed with a tMCAO mice model showed how apoptotic terminal transferase dUTP nick-end labeling-positive cells had nuclear gelatinolytic activity (Gu *et al*, 2005). In another study, using a tMCAO rat model, the authors suggested that nuclear neuronal protease activation occurs during reperfusion injury (Amantea *et al*, 2008). On the basis of our results with the rat model, we suggest that nuclear protease activation may occur after an ischemic insult independently of blood supply restoration, something that may be critical in the human setting as stroke patients remain with artery occlusion for long periods unless spontaneous or therapeutic reperfusion occurs.

Human studies of brain parenchyma from strokes are scarce probably because of the difficulty to obtain these samples. There is a report by Anthony *et al* (1997) in which they describe the presence of MMPs-2, -3, -7, and -9 in ischemic brain, mainly in inflammatory cuffs around vessels. Our study provides new information as we describe the presence of active MMP-13 in the infarct core and in the periinfarction in human brain after stroke.

A striking result is that MMP-13 was present in the cell nucleus after cerebral ischemia, and that we were able to reproduce this peculiar effect *in vitro*. To our knowledge, this is the first time that an MMP is described to be within the nuclear compartment in brain tissue. Supporting the presence of nuclear MMPs, other studies have described MMPs within cell nucleus in other organs or tissues, that is, MMP-2 has been found in the cell nucleus of cardiac myocytes (Kwan *et al*, 2004), MMP-3 has been detected in the nucleus of hepatocytes (Si-Tayeb *et al*, 2006) and MT1-MMP has been isolated in nuclear fractions of hepatocellular carcinoma cells (Ip *et al*, 2007). Bearing in mind these results, a question arising is what would be the function of nuclear MMPs after stroke? There are few studies that suggest a role for MMPs in cell death pathways. An important work revealed that MMP inhibition after cerebral ischemia reduced DNA fragmentation by 51%, infarct size by 60%, and increased poly-(ADP-ribose) polymerase, a protein involved in DNA repair, by 84%, even in MMP-9-deficient mice (Copin *et al*, 2005). These authors suggest that MMPs other than MMP-9 are actively involved in ischemia-induced apoptosis. Furthermore, it has been described that MMP-2 is capable of cleaving poly-(ADP-ribose) polymerase *in vitro* (Kwan *et al*, 2004).

Another interesting point is how these MMPs can enter in the nucleus, as they are synthesized in the cytoplasm and normally are secreted or membrane anchored (Nagase and Woessner, 1999). With regard to this issue, Si-Tayeb *et al* revealed interesting data showing that MMP-3 has a nuclear localization signal (NLS), a tag attached to proteins destined for import to the nucleus and that is recognized by receptors termed karyopherins or importins (Lange *et al*, 2008). Also, they analyzed other MMPs

sequences and found that, besides MMPs-2 and -3, MMPs-1, -8, -10, -13, -14, -16, -17, -19, -20, -23A, and -24 carry some type of putative NLS (Si-Tayeb *et al*, 2006). Considering all these data, it is conceivable that after ischemia and as part of the apoptotic cascade, DNA fragmentation occurs while poly-(ADP-ribose) polymerase that repair DNA nicks, may be cleaved by MMPs, besides caspase-3, contributing to apoptosis.

In our experiments, we found that MMP-13 is mainly produced in neurons and it is clearly seen in rats and humans. However, we found some differences between our rat model and human samples. Although rat oligodendrocytes showed high reactivity for MMP-13, in humans we were not able to detect them. This could be explained by the different cytoarchitecture of rats and humans and by the different localization of ischemic lesions. Although in rats, neurons and oligodendrocytes are found together especially in striatum (Irvin *et al*, 2008), in human these cells are more abundantly found in white-matter areas (Segal *et al*, 2007). Besides, we also found an astrogliosis in human infarction that we did not find in rats at 48 h after ischemia. This glia produces MMP-13 in humans but this effect is less clear in our model. This difference could be explained because brain samples correspond to patients that had suffered longer periods of ischemia enabling glia cicatrization to occur.

Our study presents some limitations such as the fact that rat and human ischemia periods are different; however, because of the difficulty to obtain human samples, we believe that these offers a valuable novel information for MMP-13. Another issue is that we do not know the artery perfusion status at the death for human brain samples. This fact might influence the results as ischemia-reperfusion situations might extent the initial ischemic injury. Likewise, in rat experiments, we did not measure regional cerebral blood flow before killing so we could not guarantee that the artery was occluded at that time. Besides, in human studies we only reach significance when we compare infarct and periinfarct samples together against contralateral ones, we firmly believe that this is because of the variability of patients and the small sample size used. Finally, our work only describes the presence of MMP-13 in nuclei but we do not go into the molecular mechanisms for this nuclear translocation nor the MMP-13 function within cell nucleus. Both issues are interesting enough to be investigated in future studies.

Collectively, the present study shows that MMP-13 is increased in the very acute phase of cerebral ischemia both in human stroke and animal models. Furthermore, MMP-13 appears in nuclei of, mainly but not only, neurons after an ischemic stimulus. These experiments indicate a novel intranuclear role for MMP-13 that should be further studied, together with other potential nuclear-MMPs, to understand their contribution in the pathophysiology of cerebral ischemia.

Acknowledgements

We are grateful to Manolo Quintana for statistical advice and to all neurologists and residents from the Neurovascular Unit and technical staff from the Neuropathology Department who helped in performing this study. EC is supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 05/322). AR is supported by a Beatriu Pinós Fellowship and MB-P by Juan de la Cierva Program. LG-B and MH-G are both supported by Post-Doctoral Fellowship from the FIS. Neurovascular Research Laboratory takes part into the Spanish stroke research network RENEVAS.

References

- Amantea D, Corasaniti MT, Mercuri NB, Bernardi G, Bagetta G (2008) Brain regional and cellular localization of gelatinase activity in rat that have undergone transient middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience* 152:8–17
- Amantea D, Russo R, Gliozzi M, Fratto V, Berliocchi L, Bagetta G, Bernardi G, Corasaniti MT (2007) Early upregulation of matrix metalloproteinases following reperfusion triggers neuroinflammatory mediators in brain ischemia in rat. *Int Rev Neurobiol* 82:149–69
- Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miller KM, Esiri MM, Perry VH (1997) Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23:406–15
- Asahi M, Asahi K, Jung JC, del Zoppo GJ, Fini ME, Lo EH (2000) Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1681–9
- Baranova O, Miranda LF, Pichiule P, Dragatsis I, Johnson RS, Chavez JC (2007) Neuron-specific inactivation of the hypoxia inducible factor 1 alpha increases brain injury in a mouse model of transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 27:6320–32
- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM (1986) Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17:1304–8
- Copin JC, Goodyear MC, Gidday JM, Shah AR, Gascon E, Dayer A, Morel DM, Gasche Y (2005) Role of matrix metalloproteinases in apoptosis after transient focal cerebral ischemia in rats and mice. *Eur J Neurosci* 22:1597–608
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391–7
- Estus S, Tucker HM, van Rooyen C, Wright S, Brigham EF, Wogulis M, Rydel RE (1997) Aggregated amyloid-beta protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant “apoptotic” pattern of gene induction. *J Neurosci* 17:7736–45
- Gasche Y, Copin JC, Sugawara T, Fujimura M, Chan PH (2001) Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1393–400
- Goldberg MP, Choi DW (1993) Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* 13:3510–24
- Gu Z, Cui J, Brown S, Fridman R, Mobashery S, Strongin AY, Lipton SA (2005) A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* 25:6401–8
- Ip YC, Cheung ST, Fan ST (2007) Atypical localization of membrane type 1-matrix metalloproteinase in the nucleus is associated with aggressive features of hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* 46:225–30
- Irvin DK, Kirik D, Bjorklund A, Thompson LH (2008) *In vivo* gene delivery to proliferating cells in the striatum generated in response to a 6-hydroxydopamine lesion of the nigro-striatal dopamine pathway. *Neurobiol Dis* 30:343–52
- Jian Liu K, Rosenberg GA (2005) Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* 39:71–80
- Justicia C, Panes J, Sole S, Cervera A, Deulofeu R, Chamorro A, Planas AM (2003) Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:1430–40
- Knauper V, Lopez-Otin C, Smith B, Knight G, Murphy G (1996) Biochemical characterization of human collagenase-3. *J Biol Chem* 271:1544–50
- Kwan JA, Schulze CJ, Wang W, Leon H, Sariahmetoglu M, Sung M, Sawicka J, Sims DE, Sawicki G, Schulz R (2004) Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) *in vitro*. *FASEB J* 18:690–2
- Lange A, Mills RE, Devine SE, Corbett AH (2008) A PY-NLS nuclear targeting signal is required for nuclear localization and function of the *Saccharomyces cerevisiae* mRNA-binding protein Hrp1. *J Biol Chem* 283:12926–34
- Lee SR, Tsuji K, Lee SR, Lo EH (2004) Role of matrix metalloproteinases in delayed neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *J Neurosci* 24:671–8
- Leeman MF, Curran S, Murray GI (2002) The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37:149–66
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* 20:84–91
- Loy M, Burggraf D, Martens KH, Liebetrau M, Wunderlich N, Bultemeier G, Nemori R, Hamann GF (2002) A gelatin *in situ*-overlay technique localizes brain matrix metalloproteinase activity in experimental focal cerebral ischemia. *J Neurosci Methods* 116:125–33
- Matrisian LM (1990) Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* 6:121–5
- Nagase H, Woessner JF, Jr (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274:21491–4
- Nagel S, Sandy JD, Meyding-Lamade U, Schwark C, Bartsch JW, Wagner S (2005) Focal cerebral ischemia induces changes in both MMP-13 and aggrecan around individual neurons. *Brain Res* 1056:43–50
- Planas AM, Sole S, Justicia C (2001) Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 8:834–46

- Plumb JA, Milroy R, Kaye SB (1989) Effects of the pH dependence of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide-formazan absorption on chemosensitivity determined by a novel tetrazolium-based assay. *Cancer Res* 49:4435–40
- Rivera S, Ogier C, Jourquin J, Timsit S, Szklarczyk AW, Miller K, Gearing AJ, Kaczmarek L, Khrestchatisky M (2002) Gelatinase B and TIMP-1 are regulated in a cell- and time-dependent manner in association with neuronal death and glial reactivity after global forebrain ischemia. *Eur J Neurosci* 15:19–32
- Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC (1998) Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 29:1020–30
- Rosell A, Alvarez-Sabin J, Arenillas JF, Rovira A, Delgado P, Fernandez-Cadenas I, Penalba A, Molina CA, Montaner J (2005) A matrix metalloproteinase protein array reveals a strong relation between MMP-9 and MMP-13 with diffusion-weighted image lesion increase in human stroke. *Stroke* 36:1415–20
- Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabin J, Fernandez-Cadenas I, Ribo M, Molina CA, Lo EH, Montaner J (2006) Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke* 37:1399–406
- Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G (1996) Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:360–6
- Segal D, Koschnick JR, Slegers LH, Hof PR (2007) Oligodendrocyte pathophysiology: a new view of schizophrenia. *Int J Neuropsychopharmacol* 10:503–11
- Sharp FR, Lu A, Tang Y, Millhorn DE (2000) Multiple molecular penumbras after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1011–32
- Si-Tayeb K, Monvoisin A, Mazzocco C, Lepreux S, Decossas M, Cubel G, Taras D, Blanc JF, Robinson DR, Rosenbaum J (2006) Matrix metalloproteinase 3 is present in the cell nucleus and is involved in apoptosis. *Am J Pathol* 169:1390–401
- Yong VW, Krekoski CA, Forsyth PA, Bell R, Edwards DR (1998) Matrix metalloproteinases and diseases of the CNS. *Trends Neurosci* 21:75–80

Supplementary Information accompanies the paper on the Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism website (<http://www.nature.com/jcbfm>)

5.1. La importància dels neutròfils com a font de MMP-9: participació en l'aparició de transformacions hemorràgiques i efecte del rt-PA sobre aquestes cèl·lules

En aquesta Tesi hem demostrat que, en humans, les transformacions hemorràgiques que segueixen a un ictus isquèmic la infiltració al teixit infartat de neutròfils circulants carregats de MMP-9 es relaciona amb la degradació d'alguns components de la làmina basal com el col·lagen de tipus IV. Aquesta infiltració i l'alteració d'estructures de suport de la matriu extracel·lular es relaciona amb la pèrdua d'integritat de la BHE i facilita, per tant, l'extravasació de sang al parènquima. A més, hem vist que el fàrmac trombolític rt-PA, promou la degranulació dels neutròfils *in vitro* i, per tant, l'alliberament de MMP-9, a més de MMP-8 i TIMP-2.

Les TH simptomàtiques són els fenòmens adversos més greus que poden seguir a un ictus isquèmic, complicant el pronòstic i augmentant la taxa de mortalitat. Avui en dia sabem que el millor tractament pels pacients que pateixen un ictus isquèmic és l'administració intravenosa del rt-PA per lisar els coàguls que oclouen els vasos cerebrals (NINDS, 1995). No obstant, després de l'administració del fàrmac poden aparèixer efectes secundaris al parènquima cerebral com són les TH, limitant els beneficis de la teràpia trombolítica. Aprofundir en els mecanismes responsables de les TH tant espontànies com associades a la trombòlisi podrien millorar l'actual teràpia trombolítica.

Prèviament, diversos investigadors han demostrat la importància parcial de la generació de radicals lliures i l'estrès oxidatiu que segueixen a la reperfusió com mecanismes que poden malmetre la paret dels vasos sanguinis (Adams *et al.*, 1993; Love, 1999). Tanmateix, en els últims anys s'ha vist com proteases de la família de les MMPs també poden formar part del mecanisme que causa el dany cerebrovascular en models animals de la malaltia (Heo *et al.*, 1999; Romanic *et al.*, 1998; Rosenberg *et al.*, 1996).

L'objectiu d'aquest estudi (article 2) ha estat determinar la possible contribució de la MMP-9 al trencament de la BHE que es dona en les complicacions hemorràgiques i determinar-ne l'origen cel·lular al cervell humà. Els nostres resultats mostren nivells tissulars més elevats de MMP-9 a l'infart i a les zones amb TH, essent aquestes últimes zones les que presenten els nivells més alts. A més, demostrem que al voltant de la microvasculatura es concentren nivells més elevats de MMP-9 i que a les àrees de TH hi ha una severa degradació d'un component bàsic de la BHE com és el col·lagen IV. Els vasos que presenten una important infiltració de neutròfils MMP-9+ mostren una important degradació de col·lagen IV i una clara extravasació d'eritròcits.

Aquests resultats confirmen que l'augment de MMP-9 es localitza als voltants dels vasos sanguinis a les zones d'infart i TH. Aquests resultats es sustenten en estudis previs que han demostrat que MMP-9 augmenta a les zones d'infart tant en models animals (Planas *et al.*, 2001) com en el cervell isquèmic humà (Anthony *et al.*, 1997; Clark *et al.*, 1997; Rosell *et al.*, 2006). A més, un estudi fet amb microdissecció laser (LMD) de vasos sanguinis de la BHE en un model d'isquèmia cerebral en rata ha demostrat l'augment de l'expressió del mRNA de MMP-2 i MMP-9 a les cèl·lules endotelials tant al *core* de l'infart com a les zones del voltant (Liu *et al.*, 2006).

En aquest sentit, el nostre és el primer estudi que utilitza la LMD en teixit cerebral humà per l'estudi d'una patologia cerebrovascular, el que confirma la utilitat d'aquesta tècnica per aquest tipus d'estudis. La LMD demostra que l'alt contingut de MMP-9 és semblant a l'endoteli tant dels microvasos de la zona infartada com de la zona hemorràgica comparats amb els vasos del hemisferi contralateral. Això senyala de forma indirecta que els neutròfils que envolten aquests microvasos disseccionats són la font principal de MMP-9 a les àrees hemorràgiques.

En aquesta línia, hi ha altres estudis que suggereixen i demostren la implicació dels leucòcits reclutats cap al teixit com a font significativa de MMP-9 i causa de la degradació de la làmina basal i, per tant, de la BHE després d'una isquèmia cerebral transitòria en rosegadors. Aquests estudis han demostrat com la infiltració de neutròfils al cervell isquèmic contribueix a la resposta inflamatòria tissular alliberant MMP-9 (Justicia *et al.*, 2003) i causant el trencament de la BHE. De fet, ratolins quimèrics sense MMP-9 leucocitària presenten lesions similars als *knockouts* complets però menors que els animals quimèrics mancats de MMP-9 a les cèl·lules cerebrals (Gidday *et al.*, 2005).

A més, és important remarcar que els nostres estudis d'immunohistoquímica mostren que a les zones d'infart hi ha significativament més neutròfils MMP-9+ però pocs vasos trencats, el que suggereix que la infiltració succeeix prèviament al trencament de la BHE. Aquest tipus d'estudi *a priori* no pot definir si els nivells elevats de MMP-9 a les zones d'infart i TH són causa o conseqüència del trencament de la BHE. Tanmateix el nostre estudi revela que en les zones d'infart on encara no hi ha una extravasació d'eritròcits al parènquima, ja veiem aquesta associació de MMP-9 i degradació de col·lagen IV i, per tant, aquesta seqüència temporal pot ser indicativa de que la MMP-9 és causa i no conseqüència de la degradació de la BHE.

En treballs previs del nostre grup ja havíem descrit la infiltració de neutròfils MMP-9+ a les àrees d'infart a l'ictus en humans (Rosell *et al.*, 2006), però aquest és el primer cop que això es relaciona amb la degradació de col·lagen IV al cervell isquèmic humà després d'un episodi de transformació hemorràgica tant espontània com induïda pel tractament trombolític. Recolzant aquest resultat hi ha dos estudis publicats en models animals que també relacionen la MMP-9 amb la pèrdua de la integritat de la BHE (Hamann *et al.*, 2004; Hamann *et al.*, 1996).

D'una forma complementària volíem comprovar si el rt-PA tenia un efecte directe sobre l'alliberació de MMPs per part dels neutròfils, i per tant, podria explicar l'aparició d'hemorràgies cerebrals en pacients d'ictus tractats amb aquest trombolític.

Els nostres resultats *in vitro* (article 3) identifiquen als neutròfils com a font secretora de MMP-9 extracel·lular i demostren l'alliberament de MMP-9, però també de MMP-8 i TIMP-2, per part dels neutròfils després del tractament amb rt-PA. En la isquèmia cerebral, la producció tissular de MMP-9 augmenta després del tractament amb rt-PA en animals (Tsuji *et al.*, 2005), i els nivells plasmàtics de MMP-9 també són més alts als pacients que reben rt-PA respecte els no tractats (Ning *et al.*, 2006). A més, en el nostre grup també hem descrit que els pacients que tenen nivells plasmàtics més alts de MMP-9 tenen més risc de patir una hemorràgia cerebral després del tractament trombolític (Montaner *et al.*, 2003). Recentment, també s'ha relacionat la degranulació dels mastòcits amb la TH induïda per rt-PA en un model d'isquèmia cerebral experimental (Strbian *et al.*, 2007).

Els experiments confirmen que el rt-PA és un promotor directe de la degranulació dels neutròfils tal i com veiem per microscòpia TIRF on la fusió de vesícules amb la membrana únicament s'observa després d'addicionar el fàrmac al medi. Els neutròfils tenen 4 tipus de grànuls: vesícules de secreció, grànuls terciaris (gelatinases), secundaris (específics) i primaris (atzuròfils) (Borregaard and Cowland, 1997; Faurschou and Borregaard, 2003). A més, s'ha descrit que la MMP-9 és present almenys en els grànuls terciaris, secundaris i primaris (Lominadze *et al.*, 2005).

El mecanisme pel qual té lloc aquesta degranulació per efecte del rt-PA es desconeix. Alguns autors han suggerit que l'alliberació de MMP-9 dels grànuls terciaris després de l'estimulació amb TNF (*tumor necrosis factor*) utilitza una via de senyalització per la proteïna cinasa C (PKC), sobretot PKC α i PKC δ (Chakrabarti *et al.*, 2006). Si aquesta via

d'alliberament dels grànuls es dona també després del tractament amb rt-PA, i és per tant comú en ambdós tractaments, és quelcom que s'ha d'estudiar.

En aquest estudi (article 3) a més, no tan sols trobem que el rt-PA promou l'alliberació de MMP-9, sinó que també la de MMP-8 i TIMP-2. MMP-8, que també es coneix com la col·lagenasa dels neutròfils, es sabut que s'emmagatzema, igual que la MMP-9, com a proenzim als grànuls secundaris (Van Lint and Libert, 2006). Respecte a l'increment de TIMP-2 hi ha certa discussió sobre la presència o no dels TIMPs als neutròfils. Igual que en d'altres estudis, nosaltres trobem TIMP-2 en els neutròfils (Schrufer *et al.*, 2006; Zebrowska *et al.*, 2005) però, a més, demostrem que s'allibera després del tractament amb rt-PA.

Tot i que aquest estudi és el primer en demostrar l'alliberament de MMP-9 per part dels neutròfils després de l'administració de rt-PA, treballs amb animals deficients per *t-PA* (-/-) recolzen aquesta relació (*crossstalk*) entre el t-PA i les proteases dels neutròfils (Renckens *et al.*, 2006; Roelofs *et al.*, 2006). En ambdós treballs veuen com la manca de t-PA, redueix la MMP-9 necessària per a la transmigració als teixits inflamats, i en conseqüència, redueix la resposta migratòria.

Prenent en conjunt els resultats d'aquests primers treballs (article 2 i 3) demostrem la importància dels neutròfils, i específicament de les MMPs que aquests alliberen, en el context de les transformacions hemorràgiques que poden seguir a un ictus, bé sigui de forma espontània o bé induïdes pel tractament trombolític amb rt-PA (Figura 14).

Per tant podríem hipotetitzar que quan hi ha un fenomen isquèmic al cervell es produeixen una sèrie de senyals inflamatòries en la fase aguda que promouen la migració de cèl·lules circulants, bàsicament neutròfils, cap al parènquima cerebral i que aquests per travessar la BHE alliberen una sèrie de proteases, MMP-9 però molt probablement MMP-8 i potser

d'altres, que debiliten la làmina basal facilitant l'extravasació dels components plasmàtics cap al parènquima. Si a més hi ha una administració de rt-PA, els neutròfils que es troben transmigrant a través de la BHE rebran un nou estímul per alliberar els grànuls que contenen MMP-9 i MMP-8 i contribuiran encara més a la degradació de components fonamentals de la làmina basal facilitant, per tant, l'aparició d'hemorràgies intracranials.

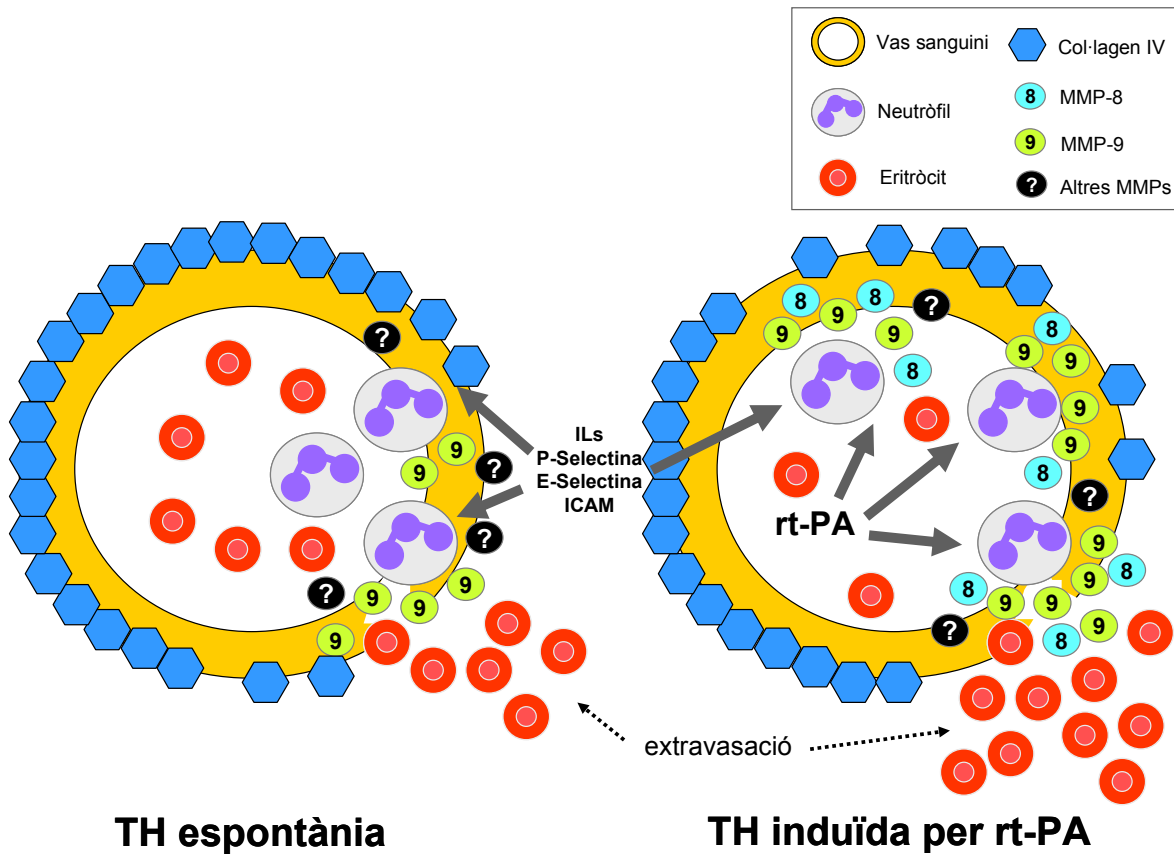


Figura 14. Esquema del possible paper dels neutròfils i les MMPs en el context de la degradació de la BHE i l'aparició de THs, espontànies o induïdes per el tractament trombolític amb rt-PA.

5.2. Les MMPs després de la isquèmia: activació primerenca i localització nuclear

En el quart treball (article 4) estudiem el patró temporal d'activació de les MMPs després d'una isquèmia cerebral focal en rata. El nostre objectiu era determinar el moment en el que es produïa l'activació de les MMPs i determinar-ne la distribució en el parènquima cerebral.

Tot i que existeixen nombrosos estudis focalitzats en determinar la variació de les MMPs en diferents models d'isquèmia cerebral, la majoria d'ells estudien únicament la producció de MMP-2 i MMP-9 i, a més, a temps relativament tardans (més enllà de 3 hores postisquèmia). Com ja hem dit, l'única oportunitat terapèutica que tenen aquests pacients és el tractament amb rt-PA i sempre dins de les 3–4.5 primeres hores des de l'inici dels símptomes. Creiem per tant, que és dins d'aquesta finestra terapèutica on hem d'enfocar els esforços per conèixer que succeeix amb aquestes proteases donat el seu paper tan important en fenòmens com són el trencament de la BHE i la transformació hemorràgica.

És per això que vàrem estudiar l'evolució d'aquestes proteases a temps curts d'isquèmia. Els resultats obtinguts de la zimografia *in situ* demostren que a 30 minuts després d'un fenomen isquèmic ja es pot detectar activitat proteolítica nuclear i que aquesta activitat augmenta al llarg del temps. Aquesta activitat es focalitza al nucli de cèl·lules, fonamentalment neurones, i no és fins 2 hores d'isquèmia que comença a augmentar també a nivell del citoplasma. El substrat fluorescent utilitzat en la tècnica de la zimografia *in situ* pot ser degradat per la majoria, si no totes les col·lagenases i gelatinases com MMP-1, -2, -8, -9, i -13. Per tant les MMPs responsables d'aquesta activitat poden ser varies.

L'augment de l'activitat gelatinasa/col·lagenasa cerebral identificada per nosaltres (mitjançant zimografia *in situ*) és quelcom que s'ha descrit prèviament en models

experimentals d'isquèmia cerebral, tant permanent (Lee *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2008) com transitòria (Amantea *et al.*, 2008; Amantea *et al.*, 2007; Gu *et al.*, 2005; Justicia *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2008), tot i que a temps més tardans que els estudiats per nosaltres (a partir de les 3 hores postisquèmia). En humans, en estudis necròpsics, també s'ha vist com hi ha un augment d'aquesta activitat a la zona cerebral infartada (Rosell *et al.*, 2006). Basant-nos en els nostres resultats, podem dir que l'activitat proteolítica augmenta a temps molt primerencs després d'un fenòmen isquèmic, tot i que hi ha autors que postulen que aquesta activitat es podria veure incrementada si es reperfon la zona del parènquima infartada en els animals (Amantea *et al.*, 2008).

Després de la isquèmia cerebral si hi ha una reperfusió es produeixen tota una sèrie de fenòmens d'estrès oxidatiu i alliberament de radicals lliures que es creu poden incrementar el dany isquèmic (Jian Liu and Rosenberg, 2005). Es coneix que les MMPs es poden activar per mecanismes d'oxidació com

ja hem exposat anteriorment (veure apartat 1.3.2). Per tant, és lògic pensar que quan es produeix un increment de les espècies reactives d'oxigen, aquestes activen les MMPs per diferents mecanismes (via

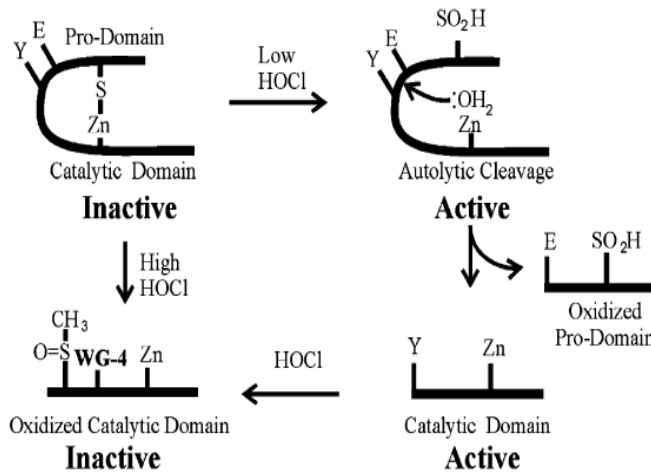


Figura 15. Exemple de l'activació de MMP-7 per part de HOCl, producte resultant de l'acció de la mieloperoxidasa leucocitària sobre el peròxid de dihidrogen (H₂O₂). (Fu *et al.*, 2008)

residus tiol entre d'altres possibles) i que tot això es vegi reflectit en un increment de la senyal proteolítica que mostra la zimografia *in situ*. Es coneix que oxidants derivats de leucòcits poden activar MMP-1, -7 i -9 (Figura 15) i que el peroxinitrit, un producte

resultant de la interacció entre l'òxid nítric i el superòxid, activa proMMP-1, -2 i -9 (Fu *et al.*, 2008).

Com ja hem dit abans, hi ha varies MMPs que poden ser responsables d'aquesta activitat gelatinasa/col·lagenasa. Quines són les possibles MMPs i quina funció poden tenir dintre del nucli de les cèl·lules després d'una isquèmia cerebral ho discutirem tot seguit en el següent apartat.

5.3. La MMP-13 augmenta en el parènquima cerebral després de la isquèmia i es localitza al nucli de cèl·lules neurals

En el quart treball demostrem que MMP-13 s'activa en el teixit cerebral en un model experimental en rates, i per primer cop en humans, després d'una isquèmia cerebral focal. Estudis previs ja havien mostrat com la producció de MMP-13 augmenta després d'una isquèmia transitòria a temps tardans després de la reperfusió (entre 3 i 14 dies) en rates (Nagel *et al.*, 2005). Nosaltres, en aquest treball, demostrem que la MMP-13 s'activa tan aviat com 30 minuts després de la isquèmia en el nostre model en rata. Aquest fet és particularment rellevant ja que la MMP-13 té un lloc central en la cascada d'activació de les MMPs i, per exemple, la MMP-2 i la MMP-9 poden ser activades per la MMP-13 (Leeman *et al.*, 2002). La MMP-9 i la MMP-2 tissulars s'han detectat en un model permanent d'isquèmia cerebral a les 6 i 24 hores després de l'oclusió arterial, respectivament (Romanic *et al.*, 1998). A més, en un model transitori en rata s'ha vist com la MMP-9 i la MMP-2 augmenten a les 4 hores post-isquèmia (Planas *et al.*, 2001).

Així, basant-nos en els nostres resultats es dibuixa un perfil temporal de l'activació de les MMPs després de la isquèmia cerebral en que MMP-13 seria una de les primeres en activar-se. De fet el pic on hi ha més MMP-13 activa en el nostre estudi és a 90 minuts post-isquèmia. Tot i això, existeixen moltes altres MMPs que encara no s'han estudiat i que també podrien activar-se i tenir un paper clau en la cascada d'activació d'altres MMPs a temps primerencs d'isquèmia cerebral.

En els nostres experiments trobem que la MMP-13 es produïda principalment per neurones tant en humans com en rates però també veiem que hi ha algunes diferències entre els dos tipus de mostres. Mentre que en rates els oligodendròcits apareixen molt reactius per MMP-13, en humans no apareix aquesta immunoreactivitat. Això s'explica

probablement per les diferències en la citoarquitectura d'ambdues espècies i per la diferent localització de les lesions isquèmiques. Així, en rates les lesions apareixen primer i principalment a l'estriat a temps curts, en humans les lesions analitzades pertanyien a zones corticals on l'abundància d'oligodendròcits és mínima. Contràriament, en humans MMP-13 apareix en astròcits però no en el model animal. Això podria explicar-se perquè en els humans trobem una astrogliosi a la zona infartada que no trobem a les rates ni a les 48 hores post-isquèmia. Això es podria explicar també perquè les mostres cerebrals humanes pertanyen a pacients que han patit períodes més llargs d'isquèmia permetent l'aparició de la cicatrització glial. Així, quan hi ha una isquèmia cerebral s'activen una sèrie de vies de senyalització activades per hipòxia (com hem vist en els experiments en cèl·lules en cultiu) que promouran l'augment de la producció de MMP-13 a temps molt primerencs.

Un resultat sobtat va ésser el fet de trobar MMP-13 al nucli de les cèl·lules després de la isquèmia i el fet de que vàrem poder reproduir aquest efecte *in vitro* mitjançant una privació d'oxigen i glucosa sobre un cultiu primari de neurones. Fins on sabem, aquest és el primer cop que s'aconsegueix identificar una MMP present en el nucli del teixit cerebral. En altres teixits però s'ha descrit també la presència d'algunes MMPs dintre del embolcall nuclear. La MMP-2 s'ha trobat al nucli de cardiomiòcits (Kwan *et al.*, 2004), la MMP-3 s'ha trobat al nucli d'hepatòcits (Ip *et al.*, 2007; Si-Tayeb *et al.*, 2006) i la MT1-MMP s'ha trobat al nucli de cèl·lules de carcinoma hepatocel·lular (Ip *et al.*, 2007). És especialment destacable també la presència de MMP-9, o alguna proteïna amb característiques semblants a MMP-9, al nucli de cèl·lules de neuroblastoma humà mitòtiques en cultiu (Solé *et al.*, 2005. Tesi doctoral).

Un dubte que sorgeix és com aquestes MMPs, que normalment es sintetitzen al citoplasma i es secreten o s'ancoren a la membrana poden migrar i entrar dins del nucli. En aquest sentit hi ha un treball molt interessant fet per Si-Tayeb i col·laboradors on, analitzant les

seqüències peptídiques d'algunes MMPs, troben que MMP-1, -2, -3, -8, -10, -13, -14, -16, -17, -19, -20, -23A i -24 posseeixen algun tipus de senyal NLS (*nuclear localization signal*) putativa (Si-Tayeb *et al.*, 2006). Les senyals NLS són unes seqüències que posseeixen algunes proteïnes que fan que aquestes puguin ser reconegudes per receptors d'importació nuclear com les importines o les carioferines (Lange *et al.*, 2008). Creiem, per tant, que el mecanisme pel qual la MMP-13 es transloca a dins del nucli mereix èsser estudiat en el futur.

La segona qüestió que sorgeix és saber què fan aquestes MMPs dins del nucli després d'una isquèmia cerebral. En referència a aquest punt hi ha pocs treballs publicats però tots ells suggereixen que les MMPs podrien participar en vies de mort cel·lular. Entre aquests, un treball destacable revela que la inhibició de les MMPs després de la isquèmia cerebral redueix la fragmentació de l'ADN a la meitat i redueix la mida de l'infart un 60%, inclòs en ratolins deficients per *Mmp-9* (Copin *et al.*, 2005). A més veuen com s'incrementen els nivells de poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP), una proteïna encarregada de reparar l'ADN, en un 84%. Aquests autors suggereixen que alguna o algunes MMPs, apart de la MMP-9, estan activament relacionades amb l'apoptosi induïda per isquèmia. A més, hi ha un altre treball que descriu que MMP-2 pot proteolitzar PARP *in vitro* (Kwan *et al.*, 2004). Així, quan hi ha una isquèmia cerebral s'activen tota una sèrie de mecanismes que formen part de la cascada apoptòtica i que conduiran finalment a una fragmentació de l'ADN. Llavors, per evitar que PARP intenti reparar els talls de l'ADN, aquesta proteïna podria ser degradada per proteïnases com les MMPs, a més a més de caspasa-3, tot plegat contribuint a la mort cel·lular.

5.4. La isquèmia modifica el contingut proteic de MMPs i TIMPs: diferències entre neurones i vasos obtinguts per LMD en parènquima cerebral humà

En aquest darrer treball utilitzant tècniques de LMD i Searchlight® (veure annex I) demostrem que MMP-1, -2, -3, -8, -9, -10, -13 i TIMP-1 es sobreexpressen a l'infart en humans comparat amb les àrees no isquèmiques. A més, demostrem que el teixit vascular cerebral és una important font de MMP-9 i TIMP-2 i que les neurones, en canvi, produeixen per exemple més MMP-10 que els microvasos. Fins on sabem, aquest és el primer cop que mostres de microdissecció de cervell humà s'han analitzat per quantificar proteïnes amb un array. En aquest sentit, els nostres resultats demostren el que ja havíem apuntat a la revisió presentada anteriorment (veure article 1): la utilitat de la LMD per l'estudi de patologies vasculars cerebrals. Aquests resultats confirmen, a més, els *arrays* de proteïnes com a eines útils i ràpides per l'anàlisi de famílies proteòmiques i vies, tant metabòliques com de senyalització, en homogenats de teixit però també en mostres amb baixa concentració de proteïnes com són les mostres obtingudes per LMD.

Els nostres resultats mostren per primer cop que MMP-1, MMP-8 i MMP-10 es troben elevades al cervell després d'un ictus isquèmic. La MMP-2 ja s'havia demostrat que es trobava sobreexpressada en models animals d'isquèmia cerebral (Chang *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2007) i en humans després d'un ictus (Clark *et al.*, 1997). Així també, altres autors han descrit com MMP-3 s'activa després de la isquèmia/reperfusió en rates (Sole *et al.*, 2004). D'altra banda, i com hem comentat extensament, MMP-9 s'ha estudiat tant en models animals de la malaltia (Asahi *et al.*, 2000; Asahi *et al.*, 2001b; Heo *et al.*, 1999; Planas *et al.*, 2001; Romanic *et al.*, 1998; Rosenberg *et al.*, 1996) com en mostres humanes (Clark *et al.*, 1997; Rosell *et al.*, 2006). MMP-13, com ja hem descrit en l'apartat anterior també es troba activada a l'infart en humans. Els nostres resultats per tant són consistents amb les

investigacions prèviament publicades i a més demostrem que hi ha més membres de la família de les MMPs que es troben sobreexpressats al teixit cerebral isquèmic com són MMP-1, MMP-8 i MMP-10.

Dels nostres resultats és també destacable el nivell del canvi d'expressió, particularment en el cas de MMP-8, MMP-9 i TIMP-1. De la MMP-9 i MMP-8 ja hem demostrat que són alliberades pels neutròfils i la seva importància en el trencament de la BHE (veure article 2 i 3). De la mateixa manera, TIMP-1 augmenta de forma dramàtica al teixit infartat. TIMP-1 és un inhibidor de les MMPs, i particularment de la MMP-9. Recentment s'ha vist com els nivells de MMP-9 augmenten significativament a la isquèmia cerebral en ratolins deficients per *Timp-1* comparat amb els ratolins salvatges (Fujimoto *et al.*, 2008). A més, això produeix un augment de la disrupció de la BHE, l'apoptosi neuronal i el dany isquèmic en general. En canvi, els ratolins deficients per *Timp-2*, no varen mostrar cap diferència en l'expressió de MMPs ni en el grau de dany isquèmic.

L'anàlisi de les mostres de microdissecció confirmen la microvasculatura com una font important de MMP-9 i TIMP-2, especialment a les àrees isquèmiques (Figura 16). Aquests resultats concorden amb els obtinguts en el treball anterior on les mostres de LMD de vasos s'analitzaven per zimografia i veiem nivells superiors de MMP-9 a les zones isquèmiques (veure article 2). TIMP-2, apart de la seva funció inhibidòria, també es coneix que interacciona amb MT1-MMP i pot facilitar l'activació de MMP-2 (Stetler-Stevenson, 2008). Els

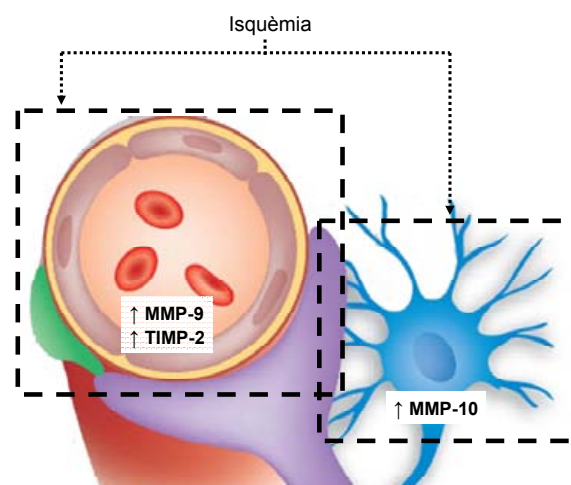


Figura 16. L'anàlisi per LMD mostra que el component vascular cerebral és una font important de MMP-9 i TIMP-2, mentre que el component neuronal és important produint MMP-10. Modificat del original de Zlokovic, 2006.

nostres resultats, però, mostren nivells de MMP-2 més alts a neurones que a vasos, tot i que no és significatiu. Pel que fa a l'expressió neuronal de MMP-10, aquest és el primer cop que aquesta proteïnasa es troba en neurones. La MMP-10 pertany a la subfamília de MMPs estromelisines que inclou entre d'altres a MMP-3 i MMP-11. MMP-3 ja s'ha descrit que és present a neurones després d'una isquèmia cerebral (Gurney *et al.*, 2006). Per tant, podem hipotetitzar que donada la seva alta expressió en neurones comparat amb els microvasos cerebrals, la seva funció pot estar relacionada, com a la resta de MMPs, amb el dany neuronal i, per tant, creiem que també això mereix futurs estudis.

5.5. Implicacions directes dels resultats

Dels resultats obtinguts en tots aquests estudis, se'n deriven diferents implicacions. En termes generals es poden definir dos compartiments clarament diferenciats respecte la contribució cel·lular concreta de MMPs: les cèl·lules residents del cervell i les cèl·lules circulants. Bons exemples d'això són els nostres resultats, els quals demostren que mentre la MMP-9 prové del compartiment sanguini, la MMP-13 ho fa del propi teixit isquèmic.

En primer lloc, la MMP-9 alliberada per part dels neutròfils participa de la degradació de la BHE i, per tant, és responsable directa de les transformacions hemorràgiques que segueixen a un ictus isquèmic. Per tant, la inhibició de la MMP-9 a la fase hiperaguda del ictus mitjançant una teràpia combinada pot millorar l'eficàcia i seguretat del tractament trombolític, reduint els sagnats i el creixement de l'infart. A més, l'activació de les MMPs es produeix ja en els primers moments després de la isquèmia i és aleshores quan hem d'actuar mitjançant la terapèutica si volem inhibir aquestes proteases per intentar reduir el dany isquèmic.

És també destacable la presència al nucli de MMP-13 en cèl·lules molt sensibles a la hipòxia com són les neurones i els oligodendròcits, suggerint una possible implicació directa d'aquestes MMPs nuclears en processos de mort cel·lular i, per tant, la inhibició específica d'aquestes MMPs pot valorar-se com una nova diana terapèutica en el tractament de l'ictus isquèmic.

Al mateix temps, els resultats obtinguts confirmen que tant la MMP-9 com la MMP-13 poden ser bons biomarcadors del creixement de l'infart com es suggeria en treballs anteriors del nostre grup, ja que reflexen a nivell plasmàtic fenòmens que s'estan produint al parènquima cerebral.

Finalment, la descripció de noves MMPs presents i augmentades al cervell demostren la complexitat del procés isquèmic, però també reforcen la implicació de la família de les MMPs en aquest. En un futur pròxim, aquestes MMPs han de ser nous objectius per la recerca en el camp de la patologia cerebrovascular i en funció dels resultats se'n poden

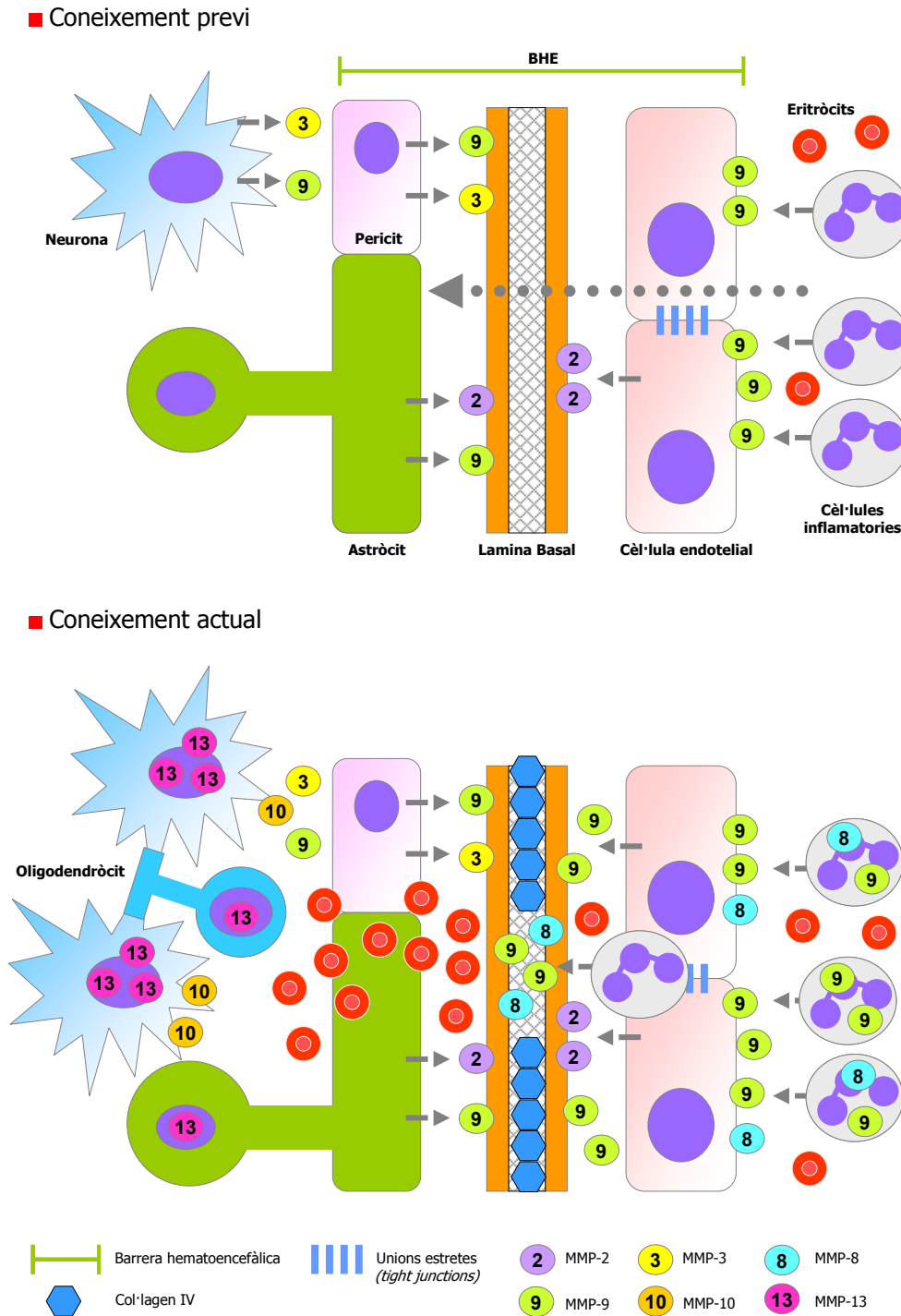


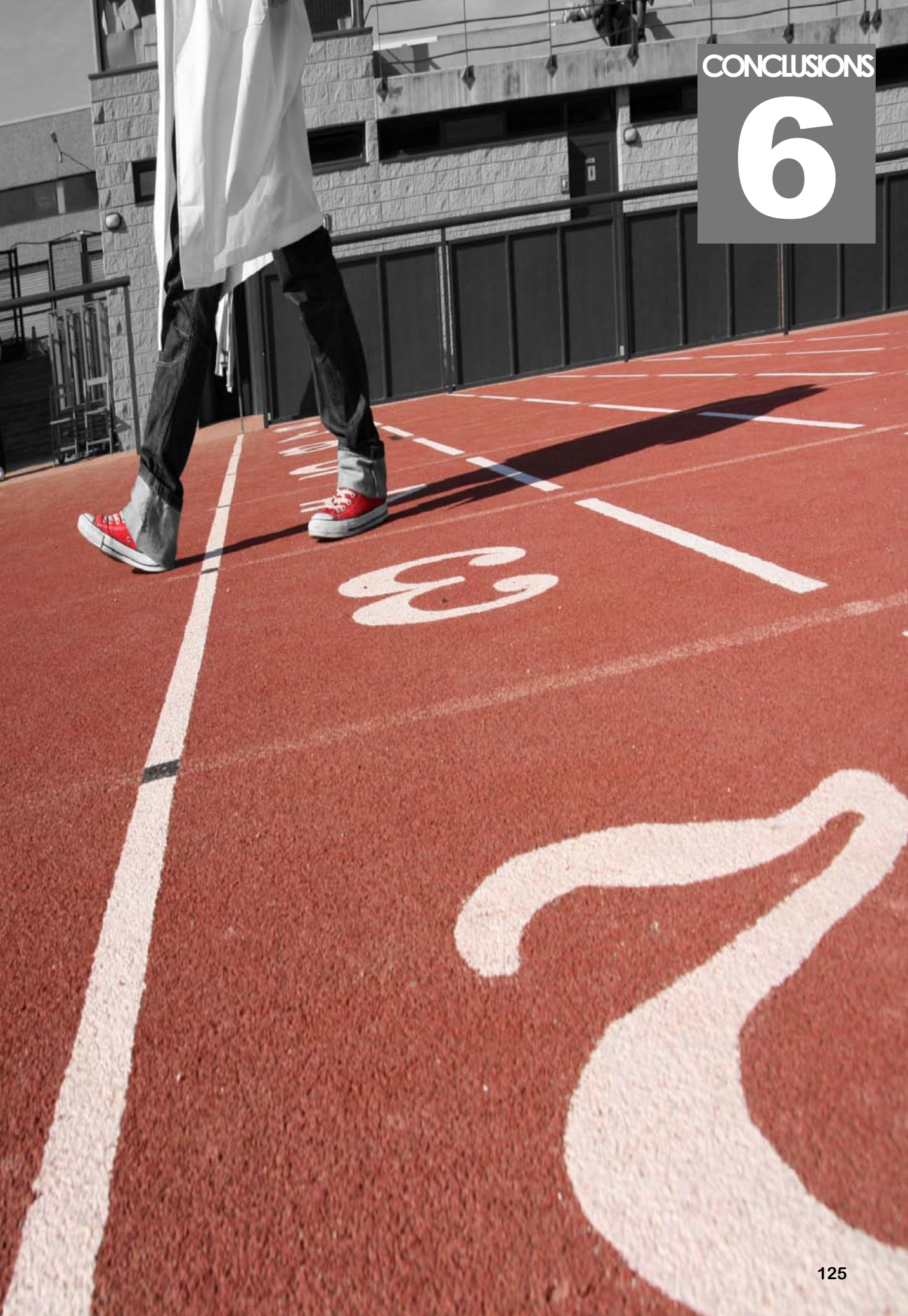
Figura 17. Esquema resum dels coneixements previs i actuals sobre les MMPs a la isquèmia cerebral humana. Esquema adaptat i modificat de Rosenberg, 2002

obtenir noves dianes terapèutiques o possibles biomarcadors.

En conjunt, els resultats incrementen el coneixement tant de la patologia cerebrovascular isquèmica en si mateixa com del paper que juguen les MMPs en els diferents processos de la patofisiologia de la malaltia. Tot plegat els resultats identifiquen noves proteases implicades en els diferents tipus de dany que segueixen al fenòmen isquèmic, i a més, aporten un millor coneixement en la localització subcel·lular i de les cèl·lules productores d'aquestes MMPs tant en el parènquima cerebral com en la unitat neurovascular com es resumeix en la Figura 17.

Buscar un possible benefici del bloqueig selectiu o de la modulació d'algunes d'aquestes MMPs (MMP-9, MMP-8, MMP-10 o MMP-13) en models experimentals són aproximacions que podrien ajudar a millorar la terapèutica de l'íctus.

6



- I. La LMD és una tècnica pràctica i fiable que permet aïllar poblacions cel·lulars específiques del parènquima cerebral i que permet obtenir-ne petites quantitats de proteïna exclusives d'aquests tipus cel·lulars que poden ser analitzades per tècniques de proteòmica, com són la zimografia en gelatina, el western blot o els ELISA múltiples.
- II. La infiltració de neutròfils a les zones infartades i hemorràgiques i els nivells locals elevats de MMP-9 es relacionen amb la degradació del col·lagen IV de la làmina basal i el trencament de la barrera hematoencefàlica. La MMP-9 vascular i de les cèl·lules inflamatòries està directament implicada en les complicacions hemorràgiques que segueixen a un ictus isquèmic.
- III. El tractament amb rt-PA promou la degranulació dels neutròfils *ex vivo* i l'alliberació per part d'aquests de MMP-9, a més de MMP-8 i TIMP-2.
- IV. L'activació de les MMPs amb activitat gelatinasa/col·lagenasa es produeix en els primers instants després de la isquèmia, tan aviat com 30 minuts en el model d'isquèmia cerebral focal en rata. Aquesta activitat es localitza inicialment en el nucli de les cèl·lules i en temps més tardans també al citoplasma.
- V. La MMP-13 és activada al parènquima cerebral humà i de rata després d'una isquèmia cerebral i es troba fonamentalment en neurones però també en oligodendròcits i astròcits. Aquesta MMP-13, a més, es localitza majoritàriament en el nucli d'aquestes cèl·lules a la zona de l'infart. Així mateix, el tractament de privació d'oxigen i glucosa promou la seva localització nuclear en cultius neuronals.
- VI. MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-13 i TIMP-1 es troben augmentades al cervell humà després d'un ictus isquèmic. En el cervell isquèmic, la MMP-9 i el TIMP-2 són produïts fonamentalment pel component vascular, mentre que la MMP-10 es produeix bàsicament en neurones.

BIBLIOGRAFIA

7



Adams, H. P., Jr., Bendixen, B. H., Kappelle, L. J., Biller, J., Love, B. B., Gordon, D. L. and Marsh, E. E., 3rd. (1993). Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* **24**, 35-41.

Adibhatla, R. M. and Hatcher, J. F. (2008). Tissue plasminogen activator (tPA) and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of stroke: therapeutic strategies. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **7**, 243-53.

Akopov, S. E., Simonian, N. A. and Grigorian, G. S. (1996). Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. *Stroke* **27**, 1739-43.

Amantea, D., Corasaniti, M. T., Mercuri, N. B., Bernardi, G. and Bagetta, G. (2008). Brain regional and cellular localization of gelatinase activity in rat that have undergone transient middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience* **152**, 8-17.

Amantea, D., Russo, R., Gliozzi, M., Fratto, V., Berliocchi, L., Bagetta, G., Bernardi, G. and Corasaniti, M. T. (2007). Early upregulation of matrix metalloproteinases following reperfusion triggers neuroinflammatory mediators in brain ischemia in rat. *Int Rev Neurobiol* **82**, 149-69.

Anthony, D. C., Ferguson, B., Matyzak, M. K., Miller, K. M., Esiri, M. M. and Perry, V. H. (1997). Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol* **23**, 406-15.

Asahi, M., Asahi, K., Jung, J. C., del Zoppo, G. J., Fini, M. E. and Lo, E. H. (2000). Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 1681-9.

Asahi, M., Sumii, T., Fini, M. E., Itohara, S. and Lo, E. H. (2001a). Matrix metalloproteinase 2 gene knockout has no effect on acute brain injury after focal ischemia. *Neuroreport* **12**, 3003-7.

Asahi, M., Wang, X., Mori, T., Sumii, T., Jung, J. C., Moskowitz, M. A., Fini, M. E. and Lo, E. H. (2001b). Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* **21**, 7724-32.

Astrup, J., Siesjo, B. K. and Symon, L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* **12**, 723-5.

Ball, H. J., McParland, B., Driussi, C. and Hunt, N. H. (2002). Isolating vessels from the mouse brain for gene expression analysis using laser capture microdissection. *Brain Res Brain Res Protoc* **9**, 206-13.

Barmina, O. Y., Walling, H. W., Fiacco, G. J., Freije, J. M., Lopez-Otin, C., Jeffrey, J. J. and Partridge, N. C. (1999). Collagenase-3 binds to a specific receptor and requires the low density lipoprotein receptor-related protein for internalization. *J Biol Chem* **274**, 30087-93.

Bederson, J. B., Pitts, L. H., Germano, S. M., Nishimura, M. C., Davis, R. L. and Bartkowski, H. M. (1986). Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* **17**, 1304-8.

Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z. et al. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol* **2**, 737-44.

Borregaard, N. and Cowland, J. B. (1997). Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* **89**, 3503-21.

Brew, K., Dinakarandian, D. and Nagase, H. (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* **1477**, 267-83.

Candelario-Jalil, E., Yang, Y. and Rosenberg, G. A. (2008). Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience*.(in press)

Chakrabarti, S., Zee, J. M. and Patel, K. D. (2006). Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release. *J Leukoc Biol* **79**, 214-22.

Chang, D. I., Hosomi, N., Lucero, J., Heo, J. H., Abumiya, T., Mazar, A. P. and del Zoppo, G. J. (2003). Activation systems for latent matrix metalloproteinase-2 are upregulated immediately after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 1408-19.

Chen, S. D., Lee, J. M., Yang, D. I., Nassief, A. and Hsu, C. Y. (2002). Combination therapy for ischemic stroke: potential of neuroprotectants plus thrombolytics. *Am J Cardiovasc Drugs* **2**, 303-13.

Chiuve, S. E., Rexrode, K. M., Spiegelman, D., Logroscino, G., Manson, J. E. and Rimm, E. B. (2008). Primary prevention of stroke by healthy lifestyle. *Circulation* **118**, 947-54.

Clark, A. W., Krekoski, C. A., Bou, S. S., Chapman, K. R. and Edwards, D. R. (1997). Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett* **238**, 53-6.

Copin, J. C., Goodyear, M. C., Gidday, J. M., Shah, A. R., Gascon, E., Dayer, A., Morel, D. M. and Gasche, Y. (2005). Role of matrix metalloproteinases in apoptosis after transient focal cerebral ischemia in rats and mice. *Eur J Neurosci* **22**, 1597-608.

Cunningham, L. A., Wetzel, M. and Rosenberg, G. A. (2005). Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia* **50**, 329-39.

Dominiczak, A. F. and McBride, M. W. (2003). Genetics of common polygenic stroke. *Nat Genet* **35**, 116-7.

Estus, S., Tucker, H. M., van Rooyen, C., Wright, S., Brigham, E. F., Wogulis, M. and Rydel, R. E. (1997). Aggregated amyloid-beta protein induces cortical neuronal apoptosis and concomitant "apoptotic" pattern of gene induction. *J Neurosci* **17**, 7736-45.

Faurschou, M. and Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* **5**, 1317-27.

Ferrer, I., Friguls, B., Dalfo, E., Justicia, C. and Planas, A. M. (2003). Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat. *Neuropathol Appl Neurobiol* **29**, 472-81.

Fu, X., Parks, W. C. and Heinecke, J. W. (2008). Activation and silencing of matrix metalloproteinases. *Semin Cell Dev Biol* **19**, 2-13.

Fujimoto, M., Takagi, Y., Aoki, T., Hayase, M., Marumo, T., Gomi, M., Nishimura, M., Kataoka, H., Hashimoto, N. and Nozaki, K. (2008). Tissue inhibitor of metalloproteinases protect blood-brain barrier disruption in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**, 1674-85.

Fukuda, S., Fini, C. A., Mabuchi, T., Koziol, J. A., Eggleston, L. L., Jr. and del Zoppo, G. J. (2004). Focal cerebral ischemia induces active proteases that degrade microvascular matrix. *Stroke* **35**, 998-1004.

Gasche, Y., Copin, J. C., Sugawara, T., Fujimura, M. and Chan, P. H. (2001). Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **21**, 1393-400.

Gasche, Y., Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., Copin, J. C., Kawase, M., Massengale, J. and Chan, P. H. (1999). Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab* **19**, 1020-8.

Gidday, J. M., Gasche, Y. G., Copin, J. C., Shah, A. R., Perez, R. S., Shapiro, S. D., Chan, P. H. and Park, T. S. (2005). Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**, H558-68.

Goldberg, M. P. and Choi, D. W. (1993). Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* **13**, 3510-24.

Gravanis, I. and Tsirka, S. E. (2008). Tissue-type plasminogen activator as a therapeutic target in stroke. *Expert Opin Ther Targets* **12**, 159-70.

Gu, Z., Cui, J., Brown, S., Fridman, R., Mobashery, S., Strongin, A. Y. and Lipton, S. A. (2005). A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* **25**, 6401-8.

Gurney, K. J., Estrada, E. Y. and Rosenberg, G. A. (2006). Blood-brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation. *Neurobiol Dis* **23**, 87-96.

Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Davalos, A., Guidetti, D., Larrue, V., Lees, K. R., Medeghri, Z., Machnig, T. et al. (2008). Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* **359**, 1317-29.

Hacke, W., Kaste, M., Fieschi, C., Toni, D., Lesaffre, E., von Kummer, R., Boysen, G., Bluhmki, E., Hoxter, G., Mahagne, M. H. et al. (1995). Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *Jama* **274**, 1017-25.

Hahn-Dantona, E., Ruiz, J. F., Bornstein, P. and Strickland, D. K. (2001). The low density lipoprotein receptor-related protein modulates levels of matrix

metalloproteinase 9 (MMP-9) by mediating its cellular catabolism. *J Biol Chem* **276**, 15498-503.

Hamann, G. F., Burggraf, D., Martens, H. K., Liebetrau, M., Jager, G., Wunderlich, N., DeGeorgia, M. and Krieger, D. W. (2004). Mild to moderate hypothermia prevents microvascular basal lamina antigen loss in experimental focal cerebral ischemia. *Stroke* **35**, 764-9.

Hamann, G. F., Okada, Y. and del Zoppo, G. J. (1996). Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **16**, 1373-8.

Handsley, M. M. and Edwards, D. R. (2005). Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer* **115**, 849-60.

Hansen, M. B., Nielsen, S. E. and Berg, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods* **119**, 203-10.

Hawkins, B. T. and Davis, T. P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* **57**, 173-85.

Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N. R., Crystal, R. G., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M. A. et al. (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* **109**, 625-37.

Heo, J. H., Lucero, J., Abumiya, T., Koziol, J. A., Copeland, B. R. and del Zoppo, G. J. (1999). Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **19**, 624-33.

Hernandez-Barrantes, S., Toth, M., Bernardo, M. M., Yurkova, M., Gervasi, D. C., Raz, Y., Sang, Q. A. and Fridman, R. (2000). Binding of active (57 kDa) membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) to tissue inhibitor of

metalloproteinase (TIMP)-2 regulates MT1-MMP processing and pro-MMP-2 activation. *J Biol Chem* **275**, 12080-9.

Imai, K., Yokohama, Y., Nakanishi, I., Ohuchi, E., Fujii, Y., Nakai, N. and Okada, Y. (1995). Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin) from human rectal carcinoma cells. Activation of the precursor, interaction with other matrix metalloproteinases and enzymic properties. *J Biol Chem* **270**, 6691-7.

Ip, Y. C., Cheung, S. T. and Fan, S. T. (2007). Atypical localization of membrane type 1-matrix metalloproteinase in the nucleus is associated with aggressive features of hepatocellular carcinoma. *Mol Carcinog* **46**, 225-30.

Ito, A. and Nagase, H. (1988). Evidence that human rheumatoid synovial matrix metalloproteinase 3 is an endogenous activator of procollagenase. *Arch Biochem Biophys* **267**, 211-6.

Jian Liu, K. and Rosenberg, G. A. (2005). Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med* **39**, 71-80.

Justicia, C., Panes, J., Sole, S., Cervera, A., Deulofeu, R., Chamorro, A. and Planas, A. M. (2003). Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 1430-40.

Kaczmarek, L., Lapinska-Dzwonek, J. and Szymczak, S. (2002). Matrix metalloproteinases in the adult brain physiology: a link between c-Fos, AP-1 and remodeling of neuronal connections? *Embo J* **21**, 6643-8.

Krupinski, J., Kaluza, J., Kumar, P., Kumar, S. and Wang, J. M. (1994). Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* **25**, 1794-8.

Kwan, J. A., Schulze, C. J., Wang, W., Leon, H., Sariahmetoglu, M., Sung, M., Sawicka, J., Sims, D. E., Sawicki, G. and Schulz, R. (2004). Matrix

metalloproteinase-2 (MMP-2) is present in the nucleus of cardiac myocytes and is capable of cleaving poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) in vitro. *Faseb J* **18**, 690-2.

Lange, A., Mills, R. E., Devine, S. E. and Corbett, A. H. (2008). A PY-NLS nuclear targeting signal is required for nuclear localization and function of the *Saccharomyces cerevisiae* mRNA-binding protein Hrp1. *J Biol Chem* **283**, 12926-34.

Lee, S. R., Guo, S. Z., Scannevin, R. H., Magliaro, B. C., Rhodes, K. J., Wang, X. and Lo, E. H. (2007). Induction of matrix metalloproteinase, cytokines and chemokines in rat cortical astrocytes exposed to plasminogen activators. *Neurosci Lett* **417**, 1-5.

Lee, S. R., Kim, H. Y., Rogowska, J., Zhao, B. Q., Bhide, P., Parent, J. M. and Lo, E. H. (2006). Involvement of matrix metalloproteinase in neuroblast cell migration from the subventricular zone after stroke. *J Neurosci* **26**, 3491-5.

Lee, S. R., Tsuji, K., Lee, S. R. and Lo, E. H. (2004). Role of matrix metalloproteinases in delayed neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *J Neurosci* **24**, 671-8.

Leeman, M. F., Curran, S. and Murray, G. I. (2002). The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37**, 149-66.

Lin, C. Y., Chang, C., Cheung, W. M., Lin, M. H., Chen, J. J., Hsu, C. Y., Chen, J. H. and Lin, T. N. (2008). Dynamic changes in vascular permeability, cerebral blood volume, vascular density, and size after transient focal cerebral ischemia in rats: evaluation with contrast-enhanced magnetic resonance imaging. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**, 1491-501.

Lin, K., Kazmi, K. S., Law, M., Babb, J., Peccerelli, N. and Pramanik, B. K. (2007). Measuring elevated microvascular permeability and predicting hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke using first-pass dynamic perfusion CT imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* **28**, 1292-8.

Lin, T. N., Sun, S. W., Cheung, W. M., Li, F. and Chang, C. (2002). Dynamic changes in cerebral blood flow and angiogenesis after transient focal cerebral ischemia in rats. Evaluation with serial magnetic resonance imaging. *Stroke* **33**, 2985-91.

Liu, X. S., Zhang, Z. G., Zhang, L., Morris, D. C., Kapke, A., Lu, M. and Chopp, M. (2006). Atorvastatin downregulates tissue plasminogen activator-aggravated genes mediating coagulation and vascular permeability in single cerebral endothelial cells captured by laser microdissection. *J Cereb Blood Flow Metab* **26**, 787-96.

Lo, E. H., Broderick, J. P. and Moskowitz, M. A. (2004). tPA and proteolysis in the neurovascular unit. *Stroke* **35**, 354-6.

Lominadze, G., Powell, D. W., Luerman, G. C., Link, A. J., Ward, R. A. and McLeish, K. R. (2005). Proteomic analysis of human neutrophil granules. *Mol Cell Proteomics* **4**, 1503-21.

Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S. and Cummins, R. (1989). Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* **20**, 84-91.

Lopez-Atalaya, J. P., Roussel, B. D., Ali, C., Maubert, E., Petersen, K. U., Berezowski, V., Cecchelli, R., Orset, C. and Vivien, D. (2007). Recombinant Desmodus rotundus salivary plasminogen activator crosses the blood-brain barrier through a low-density lipoprotein receptor-related protein-dependent mechanism without exerting neurotoxic effects. *Stroke* **38**, 1036-43.

Love, S. (1999). Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathol* **9**, 119-31.

Lu, A., Clark, J. F., Broderick, J. P., Pyne-Geithman, G. J., Wagner, K. R., Ran, R., Khatri, P., Tomsick, T. and Sharp, F. R. (2008). Reperfusion activates metalloproteinases that contribute to neurovascular injury. *Exp Neurol* **210**, 549-59.

McBean, D. E. and Kelly, P. A. (1998). Rodent models of global cerebral ischemia: a comparison of two-vessel occlusion and four-vessel occlusion. *Gen Pharmacol* **30**, 431-4.

Merrill, J. E., Murphy, S. P., Mitrovic, B., Mackenzie-Graham, A., Dopp, J. C., Ding, M., Griscavage, J., Ignarro, L. J. and Lowenstein, C. J. (1997). Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production by oligodendrocytes. *J Neurosci Res* **48**, 372-84.

Mojsilovic-Petrovic, J., Nestic, M., Pen, A., Zhang, W. and Stanimirovic, D. (2004). Development of rapid staining protocols for laser-capture microdissection of brain vessels from human and rat coupled to gene expression analyses. *J Neurosci Methods* **133**, 39-48.

Montaner, J., Alvarez-Sabin, J., Molina, C., Angles, A., Abilleira, S., Arenillas, J., Gonzalez, M. A. and Monasterio, J. (2001). Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* **32**, 1759-66.

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

Montaner J, R.-Y. M., Castellanos M, Álvarez-Sabín J, Castillo J. (2005). Molecular signatures of course and prognosis of intracerebral hemorrhage. *Seminars in Cerebrovascular Diseases and Stroke* **5**, 178-188.

Mun-Bryce, S. and Rosenberg, G. A. (1998). Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**, 1163-72.

Murphy, S., Simmons, M. L., Agullo, L., Garcia, A., Feinstein, D. L., Galea, E., Reis, D. J., Minc-Golomb, D. and Schwartz, J. P. (1993). Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci* **16**, 323-8.

Nagase, H. (1997). Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem* **378**, 151-60.

Nagase, H. and Woessner, J. F., Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* **274**, 21491-4.

Nagel, S., Sandy, J. D., Meyding-Lamade, U., Schwark, C., Bartsch, J. W. and Wagner, S. (2005). Focal cerebral ischemia induces changes in both MMP-13 and aggrecan around individual neurons. *Brain Res* **1056**, 43-50.

Nagy, V., Bozdagi, O., Matynia, A., Balcerzyk, M., Okulski, P., Dzwonek, J., Costa, R. M., Silva, A. J., Kaczmarek, L. and Huntley, G. W. (2006). Matrix metalloproteinase-9 is required for hippocampal late-phase long-term potentiation and memory. *J Neurosci* **26**, 1923-34.

NINDS. (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J Med* **333**, 1581-7.

Ning, M., Furie, K. L., Koroshetz, W. J., Lee, H., Barron, M., Lederer, M., Wang, X., Zhu, M., Sorensen, A. G., Lo, E. H. et al. (2006). Association between tPA therapy and raised early matrix metalloproteinase-9 in acute stroke. *Neurology* **66**, 1550-5.

Oh, J., Takahashi, R., Kondo, S., Mizoguchi, A., Adachi, E., Sasahara, R. M., Nishimura, S., Imamura, Y., Kitayama, H., Alexander, D. B. et al. (2001). The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* **107**, 789-800.

Ovbiagele, B., Kidwell, C. S., Starkman, S. and Saver, J. L. (2003). Neuroprotective agents for the treatment of acute ischemic stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep* **3**, 9-20.

Overall, C. M. and Lopez-Otin, C. (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* **2**, 657-72.

Pepper, M. S. (2001). Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost* **86**, 346-55.

Pessin, M. S., Del Zoppo, G. J. and Estol, C. J. (1990). Thrombolytic agents in the treatment of stroke. *Clin Neuropharmacol* **13**, 271-89.

Planas, A. M., Sole, S. and Justicia, C. (2001). Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* **8**, 834-46.

Planas, A. M., Sole, S., Justicia, C. and Farre, E. R. (2000). Estimation of gelatinase content in rat brain: effect of focal ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* **278**, 803-7.

Pulsinelli, W. A. and Brierley, J. B. (1979). A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* **10**, 267-72.

Pulsinelli, W. A. and Buchan, A. M. (1988). The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation. *Stroke* **19**, 913-4.

Ra, H. J. and Parks, W. C. (2007). Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. *Matrix Biol* **26**, 587-96.

Raffetto, J. D. and Khalil, R. A. (2008). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* **75**, 346-59.

Rego, A. C., Santos, M. S. and Oliveira, C. R. (2000). Glutamate-mediated inhibition of oxidative phosphorylation in cultured retinal cells. *Neurochem Int* **36**, 159-66.

Renckens, R., Roelofs, J. J., Florquin, S., de Vos, A. F., Pater, J. M., Lijnen, H. R., Carmeliet, P., van 't Veer, C. and van der Poll, T. (2006). Endogenous tissue-type plasminogen activator is protective during Escherichia coli-induced abdominal sepsis in mice. *J Immunol* **177**, 1189-96.

Roelofs, J. J., Rouschop, K. M., Leemans, J. C., Claessen, N., de Boer, A. M., Frederiks, W. M., Lijnen, H. R., Weening, J. J. and Florquin, S. (2006). Tissue-type

plasminogen activator modulates inflammatory responses and renal function in ischemia reperfusion injury. *J Am Soc Nephrol* **17**, 131-40.

Romanic, A. M., White, R. F., Arleth, A. J., Ohlstein, E. H. and Barone, F. C. (1998). Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* **29**, 1020-30.

Rosell, A., Ortega-Aznar, A., Alvarez-Sabin, J., Fernandez-Cadenas, I., Ribo, M., Molina, C. A., Lo, E. H. and Montaner, J. (2006). Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke* **37**, 1399-406.

Rosenberg, G. A. (2002). Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* **39**, 279-91.

Rosenberg, G. A., Cunningham, L. A., Wallace, J., Alexander, S., Estrada, E. Y., Grossetete, M., Razhagi, A., Miller, K. and Gearing, A. (2001). Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures. *Brain Res* **893**, 104-12.

Rosenberg, G. A., Estrada, E. Y. and Dencoff, J. E. (1998). Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke* **29**, 2189-95.

Rosenberg, G. A., Kornfeld, M., Estrada, E., Kelley, R. O., Liotta, L. A. and Stetler-Stevenson, W. G. (1992). TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain barrier by type IV collagenase. *Brain Res* **576**, 203-7.

Rosenberg, G. A. and Mun-Bryce, S. (2004). Matrix metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Ernst Schering Res Found Workshop*, 1-16.

Rosenberg, G. A., Navratil, M., Barone, F. and Feuerstein, G. (1996). Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **16**, 360-6.

Schleimer, R. P. and Rutledge, B. K. (1986). Cultured human vascular endothelial cells acquire adhesiveness for neutrophils after stimulation with interleukin 1, endotoxin, and tumor-promoting phorbol diesters. *J Immunol* **136**, 649-54.

Schruefer, R., Sulyok, S., Schymeinsky, J., Peters, T., Scharffetter-Kochanek, K. and Walzog, B. (2006). The proangiogenic capacity of polymorphonuclear neutrophils delineated by microarray technique and by measurement of neovascularization in wounded skin of CD18-deficient mice. *J Vasc Res* **43**, 1-11.

Si-Tayeb, K., Monvoisin, A., Mazzocco, C., Lepreux, S., Decossas, M., Cubel, G., Taras, D., Blanc, J. F., Robinson, D. R. and Rosenbaum, J. (2006). Matrix metalloproteinase 3 is present in the cell nucleus and is involved in apoptosis. *Am J Pathol* **169**, 1390-401.

Smith, M. L., Auer, R. N. and Siesjo, B. K. (1984). The density and distribution of ischemic brain injury in the rat following 2-10 min of forebrain ischemia. *Acta Neuropathol* **64**, 319-32.

Sole, S., Petegnief, V., Gorina, R., Chamorro, A. and Planas, A. M. (2004). Activation of matrix metalloproteinase-3 and agrin cleavage in cerebral ischemia/reperfusion. *J Neuropathol Exp Neurol* **63**, 338-49.

Sondell, M., Sundler, F. and Kanje, M. (2000). Vascular endothelial growth factor is a neurotrophic factor which stimulates axonal outgrowth through the flk-1 receptor. *Eur J Neurosci* **12**, 4243-54.

Stetler-Stevenson, W. G. (2008). Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* **1**, re6.

Strbian, D., Karjalainen-Lindsberg, M. L., Kovanen, P. T., Tatlisumak, T. and Lindsberg, P. J. (2007). Mast cell stabilization reduces hemorrhage formation and mortality after administration of thrombolytics in experimental ischemic stroke. *Circulation* **116**, 411-8.

Sumii, T. and Lo, E. H. (2002). Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* **33**, 831-6.

Suzuki, Y., Nagai, N., Umemura, K., Collen, D. and Lijnen, H. R. (2007). Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *J Thromb Haemost* **5**, 1732-9.

Tsuji, K., Aoki, T., Tejima, E., Arai, K., Lee, S. R., Atochin, D. N., Huang, P. L., Wang, X., Montaner, J. and Lo, E. H. (2005). Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia. *Stroke* **36**, 1954-9.

Turley, K. R., Toledo-Pereyra, L. H. and Kothari, R. U. (2005). Molecular mechanisms in the pathogenesis and treatment of acute ischemic stroke. *J Invest Surg* **18**, 207-18.

Vaillant, C., Meissirel, C., Mutin, M., Belin, M. F., Lund, L. R. and Thomasset, N. (2003). MMP-9 deficiency affects axonal outgrowth, migration, and apoptosis in the developing cerebellum. *Mol Cell Neurosci* **24**, 395-408.

Van den Steen, P. E., Van Aelst, I., Hvidberg, V., Piccard, H., Fiten, P., Jacobsen, C., Moestrup, S. K., Fry, S., Royle, L., Wormald, M. R. et al. (2006). The hemopexin and O-glycosylated domains tune gelatinase B/MMP-9 bioavailability via inhibition and binding to cargo receptors. *J Biol Chem* **281**, 18626-37.

Van Lint, P. and Libert, C. (2006). Matrix metalloproteinase-8: cleavage can be decisive. *Cytokine Growth Factor Rev* **17**, 217-23.

Wang, L., Zhang, Z. G., Zhang, R. L., Gregg, S. R., Hozeska-Solgot, A., LeTourneau, Y., Wang, Y. and Chopp, M. (2006). Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration. *J Neurosci* **26**, 5996-6003.

Wang, X., Lee, S. R., Arai, K., Lee, S. R., Tsuji, K., Rebeck, G. W. and Lo, E. H. (2003). Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med* **9**, 1313-7.

Yang, Y., Estrada, E. Y., Thompson, J. F., Liu, W. and Rosenberg, G. A. (2007). Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **27**, 697-709.

Yang, Z., Strickland, D. K. and Bornstein, P. (2001). Extracellular matrix metalloproteinase 2 levels are regulated by the low density lipoprotein-related scavenger receptor and thrombospondin 2. *J Biol Chem* **276**, 8403-8.

Yong, V. W. (2005). Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci* **6**, 931-44.

Zebrowska, A., Narbutt, J., Sysa-Jedrzejowska, A., Kobos, J. and Waszczykowska, E. (2005). The imbalance between metalloproteinases and their tissue inhibitors is involved in the pathogenesis of dermatitis herpetiformis. *Mediators Inflamm* **2005**, 373-9.

Zhang, Y., Marcillat, O., Giulivi, C., Ernster, L. and Davies, K. J. (1990). The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J Biol Chem* **265**, 16330-6.

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

Zhao, B. Q., Tejima, E. and Lo, E. H. (2007). Neurovascular proteases in brain injury, hemorrhage and remodeling after stroke. *Stroke* **38**, 748-52.

Zhao, B. Q., Wang, S., Kim, H. Y., Storrie, H., Rosen, B. R., Mooney, D. J., Wang, X. and Lo, E. H. (2006). Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med* **12**, 441-5.

Zheng, Z. and Yenari, M. A. (2004). Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurol Res* **26**, 884-92.

Zlokovic, B. V. (2006). Remodeling after stroke. *Nat Med* **12**, 390-1.

Zukin RS, J. T., Yokota H, Calderone A, Simionescu M, Lau CG. (2004). Molecular and cellular mechanisms of ischemia-induced neuronal death. Philadelphia: Churchill Livingstone.

ANNEXOS

8



ARTICLE 5

Matrix Metalloproteinases in vascular and neuronal components of the human brain after stroke: combining Laser Microdissection and Protein Array

*(Sotmès a *The Journal of Proteome Research*)*

Matrix Metalloproteinases in vascular and neuronal components of the human brain after stroke: combining Laser Microdissection and Protein Array

Eloy Cuadrado¹, Anna Rosell¹, Anna Penalba¹, Mark Slevin², José Alvarez-Sabín¹, Arantxa Ortega-Aznar³, Joan Montaner^{1*}

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

²SBCHS, Manchester metropolitan University, Manchester, UK

³Neuropathology Unit. Department of Pathology. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona, SPAIN.

Matrix Metalloproteinases (MMPs) play an important role in brain injury after ischemic stroke. In the present study we aimed to assess the global MMPs expression in the human brain after stroke by using a combination of Searchlight Protein Array and Laser Microdissection to determine their cellular origin. The study demonstrates that MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-13 and TIMP-1 were upregulated in the infarcted tissue. In addition, and more specifically, MMP-9 and TIMP-2 were highly expressed in brain microvessels whilst MMP-10 was notably increased in neurons of the ischemic brain. These findings open the possibility of selectively targeting some MMPs for neuroprotection or vasculoprotection following stroke.

KEYWORDS: Matrix Metalloproteinases, Laser Microdissection, Protein Array, Neurons, Vessels, Brain, Stroke.

Introduction

Ischemic stroke is a leading cause of death and disability worldwide that occurs after the occlusion of a cerebral artery generally by a thrombus that can cause irreversible brain damage due to neuronal death, blood-brain barrier (BBB) breakdown, and cellular edema¹.

Over the past few years, there has been increasing evidence that matrix metalloproteinases (MMPs) have a significant role in determination of the pathobiological consequences of cerebral ischemia. MMPs are a family of zinc-binding proteolytic enzymes that normally remodel the extracellular matrix and pathologically attack substrates as part of the neuroinflammatory response².

Animal models of cerebral ischemia have reported that MMP-9 and also MMP-2 are abnormally expressed after an ischemic insult^{3, 4}. For example an increased *in situ* gelatinase/collagenase activity has been reported after cerebral ischemia in brain samples from mice⁵, rats⁶⁻⁸ and humans⁹ related to MMP activity. Interestingly, mice lacking MMP-9 gene or treated

with broad spectrum MMP inhibitors exhibit diminished cerebral damage after stroke¹⁰. Recently some MMPs have been shown to be associated with BBB disruption and as a consequence, are involved in brain bleedings after stroke. MMP-9 activity has been related with major basal lamina component destruction, in particular, collagen IV in stroke patients¹. MMP-3 appears to attack tight junctions¹¹ and is up regulated in endothelial cells after thrombolytic treatment in mice¹². MMPs are either transmembrane or secreted proteins, however we have recently demonstrated the presence of MMP-13 in the nuclei of brain cells after cerebral ischemia¹³. In spite of the growing amount of information in the field of MMPs in brain ischemia, data about many non-studied MMPs and about the specific cellular source of those MMPs is lacking. We hypothesize that massive protein analysis techniques coupled with Laser Microdissection (LMD) of the neurovascular unit might aid filling those gaps.

To our knowledge, there are no studies focussing on MMPs in cerebral ischemia using Laser Microdissection (LMD) at the protein level, indeed only a few studies have used a combination of LMD and proteomic techniques for studies in brain tissue. One previous study captured large brain areas separating the proteins in two-dimensional electrophoresis (2-DE) and analyzing selected spots with matrix-assisted laser

*Correspondence:

Dr Joan Montaner, Neurovascular Research Laboratory, Neurovascular Unit, Institut de Recerca, Hospital Vall d'Hebron, Pg Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, SPAIN.

Telephone number: +34934894073

Fax number: +34934894015

E-mail: 31862jmv@comb.cat

desorption/ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF)^{14, 15}. Another group isolated much smaller amounts of brain microvessels and employed isotope-coded affinity tagging (ICAT), nano liquid chromatography and tandem mass spectrometry (nanoLC-MS/MS) for analysis¹⁶. Moreover, in this study the authors confirmed their results determining IL-1 β levels in microdissected samples with a standard ELISA¹⁶. Very recently, a proteomic study was performed using captured brain microvascular endothelial cells and subsequent analysis using linear ion trap coupled with Fourier transform-mass spectrometry (LTQ-FT MS); using this technology, 881 novel proteins were successfully identified¹⁷.

Pierce Searchlight protein array is a plate-based multiplex assay, which is in concept a standard ELISA, incorporating multiple capture/detection antibodies. In this study we aimed to examine the global MMPs expression in human brain samples after a fatal stroke. Furthermore, using the combination of LMD and Searchlight Human MMP Array we aimed to analyze the MMPs profile expression after stroke of two of the major components of the neurovascular unit: neurons and the brain microvasculature.

Material and Methods

Brain Tissue Samples. Ten deceased patients (6 women and 4 men) who had an ischemic stroke within the previous 4 days (range 10-87 h) were included in the study. On autopsy and during macroscopic examination, the infarcted area was identified by an experienced neuropathologist as previously described by our group⁹. Neuroradiological images were used to guide brain tissue sampling from the infarct core (n= 10) and the contralateral hemisphere (n= 10). All samples were obtained within the first six hours after death and snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . This study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Universitari Vall d'Hebron and informed consent was acquired from relatives prior to the autopsy.

Frozen brain samples (0.2 g) were homogenized and mixed with 0.7 mL of cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.05% Brij-35, 0.02% NaN₃ and 1% Triton X-100) containing protease inhibitors (1 mM PMSF and 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinin) and centrifuged at 12,000g for 10 minutes. Total protein content was determined by the standard bicinchoninic acid assay (BCA, Pierce, USA).

Preparation of sections for LMD.

Frozen brain samples were embedded in Tissue-Tek® O.C.T (Sakura Finetek Europe, The Netherlands) at -20°C , and 10 μm -thick sections were cut made using a cryostat (Leica CM3050 S; Leica Microsystems, Germany). Sections were

mounted on 2 μm PEN-Membrane slides (MicroDissect GmbH, Germany) and stored at -80°C .

Neurons were stained using a mouse anti-NeuN antibody (1:50; Chemicon, USA). Briefly, sections were fixed in ice-cold acetone for 30 sec and then washed in tween phosphate buffer saline (TPBS) for 1 min. Preparations were air dried for 5 min at 37°C . The sections were then blocked with 10% BSA (w/v) / 0.3% Triton X-100 (v/v) in PBS (blocking buffer) for 3 min at room temperature, and then incubated for 10 min at 37°C with the primary antibody diluted in blocking buffer. After washing in TPBS (1 min), sections were incubated with a goat Alexa-Fluor 488 anti-mouse IgG (Invitrogen, USA) diluted 1:50 in blocking buffer for 10 min at 37°C . Finally sections were washed in TPBS for 1 min at air dried for 10 min at 37°C prior to microdissection.

Brain microvessels were stained using *Ulex europaeus Agglutinin I* (UEA I) lectin (1:20; Sigma-Aldrich, USA) as previously described¹⁸.

Laser Microdissection. LMD was performed on a Leica LMD6000 microscope (Leica Microsystems, Germany). Approximate areas of 2,000,000 μm^2 of each cell type (4,000-5,500 cells) were dissected from 10 μm cryostat cut sections containing either infarct or contralateral brain tissue from 5 stroke deceased patients (n=10 per cell type). Cells were dissected into dry 0.2 mL tube caps coated with silicon (MicroDissect GmbH, Germany) at a power of 90-92 and a speed of 6 using a 20x objective.

Cells were recovered in 130 μL of cold lysis buffer (described above), vortexed for 5 min and centrifuged at 12,000g for 10 minutes. Total protein content was determined using micro bicinchoninic acid assay (microBCA, Pierce, USA). Protein yield was on average 0.115 $\mu\text{g}/\text{ul}$.

Multiplexed Searchlight® MMP Protein Array. A SearchLight® Human MMP Array 1 (Pierce, USA) was used to measure MMP expression; this assay consists of a multiplexed sandwich enzyme-linked immunosorbent assay, and was used for the simultaneous quantitative measurement of the following 9 proteins: gelatinases (MMP-2 and MMP-9), collagenases (MMP-1, MMP-8, and MMP-13), stromelysines (MMP-3 and MMP-10), and endogenous inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2). Each sample was assayed twice and the mean value of both measurements was used. The mean intra assay coefficients of variation were <20%. The enzyme-substrate reaction produces a chemiluminescent signal detected with a cooled CCD camera (Pierce, USA). The images were analyzed by ArrayVision version 8.0 software (Imaging Research, USA). The sensitivity limit for each molecule was: MMP-1 (24 pg/mL), MMP-2 (7.8 pg/mL), MMP-3 (9.7 pg/mL), MMP-8 (24 pg/mL), MMP-9 (20

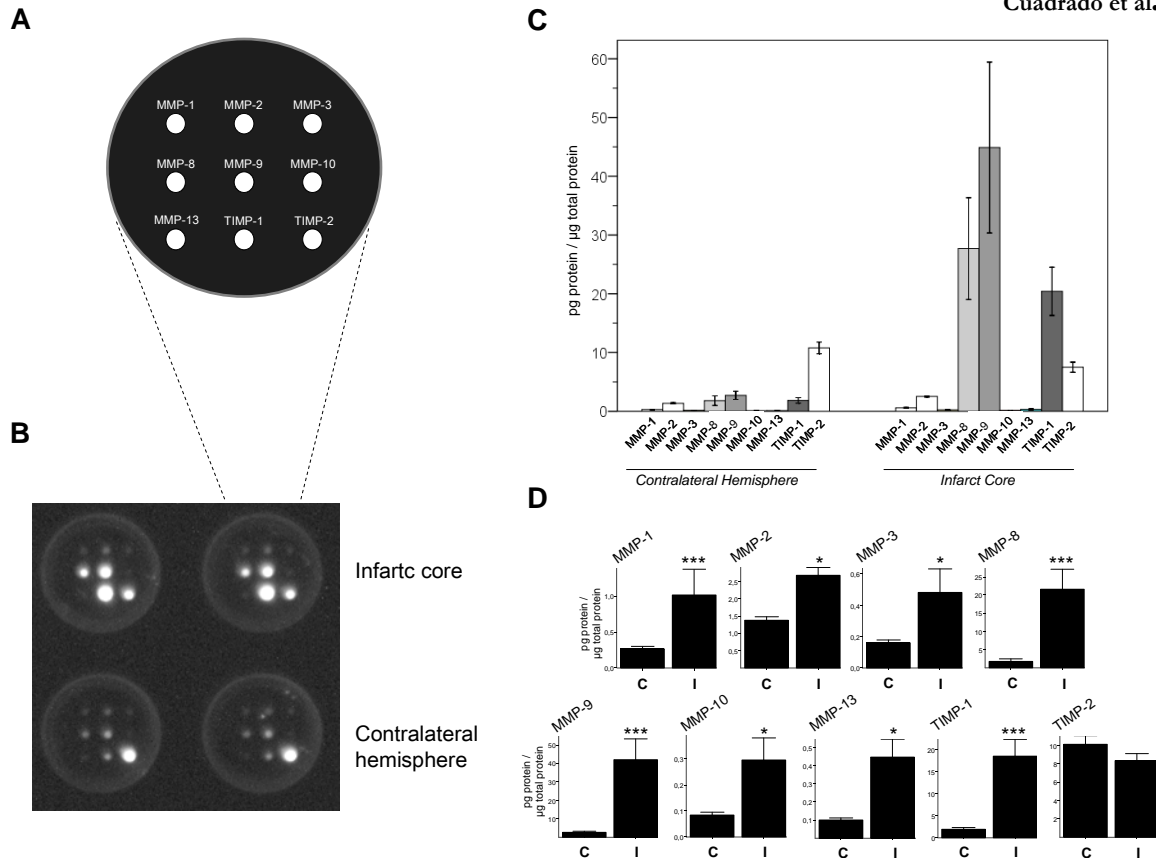


Figure 1. MMP protein array from brain homogenates. **A)** Schematic view of a well showing the antibody configuration. **B)** Images of two replicates corresponding to representative samples from the infarcted (I) and contralateral (C) hemisphere. **C)** Bar graph of all MMPs together clustered in contralateral and infarct samples showing fold changes between them. **D)** Bar graphs showing each MMP value obtained in the array. Bars represent SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

pg/mL), MMP-10 (2.4 pg/mL), MMP-13 (9.7 pg/mL), TIMP-1 (8 pg/mL) and TIMP-2 (1.2 pg/mL) as provided by the manufacturer. The array standard curves are given in pg/mL units, and the resulting MMP protein concentration was finally corrected by its sample total protein content so that the resulting values are given in pg/ μ g total protein. All values out of the standard curve range were omitted in the final study.

Western Blot. Briefly, equal protein concentrations (3 μ g of brain pooled microdissected samples) were loaded in laemmli buffer and proteins separated using SDS-PAGE (10%) at 100V. Separated proteins were transferred onto a PVDF membrane using a Transblot Cell (Bio-Rad, USA) during 1 h at 100V. Non-specific binding was blocked with 10% non-fat milk before membranes were incubated overnight at 4°C with mouse anti-NeuN antibody (1:800, Chemicon, USA), mouse anti-CD31 (1:100, DAKO, USA) or rabbit anti-GFAP (1:1000, DAKO, USA). Secondary antibody sheep anti-mouse-HRP or donkey anti-rabbit-HRP (Chemicon, USA) was diluted 1:1000 and incubated at room temperature for 1 h. Before and after incubations, membranes were washed 3 times (10 min each) with 0.05% Tween-phosphate buffer saline (TPBS). The substrate reaction was developed using the

chemiluminescent reagent Immobilon (Millipore, USA) and visualized with a luminescent image analyzer (Las-3000, Fujifilm; USA).

Statistics. Data were analyzed using SPSS 15.0 software. The Kruskal-Wallis test was used to assess intergroup differences between brain areas. The Wilcoxon test was applied to assess differences in related samples. Results are expressed in mean \pm SD. A P -value of <0.05 was considered statistically significant at a 95% confidence level. Error bars in the figures represent Standard Error of Mean (SEM).

Results

Overexpression of the MMP Family in the ischemic brain

Our results showed that all MMPs studied as well as TIMP-1 presented higher protein levels in the infarct areas compared to the contralateral tissue of brain homogenates (Figure 1.A-B). Three molecules showed the greatest changes between the contralateral area and the infarct core: MMP-8 (from 1.69 ± 2.19 to 21.56 ± 17.5), MMP-9 (from 2.56 ± 1.87 to 42.1 ± 34.85) and TIMP-1 (from 1.9 ± 1.26 to 18.58 ± 9.37) as shown in Figure 1.C.

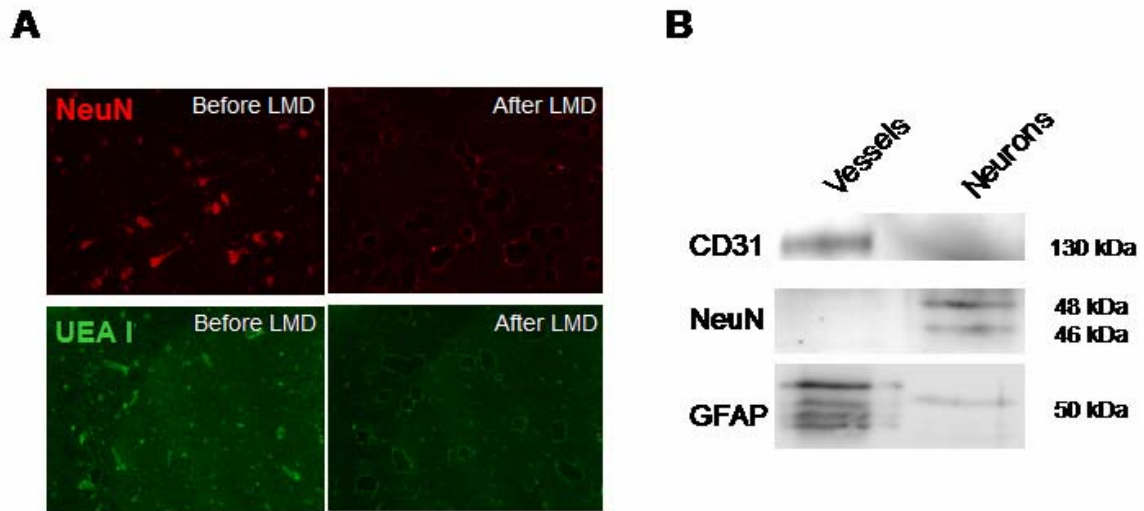


Figure 2. Purity of microdissected brain components. **A)** Images of brain samples stained with NeuN for neuron and UEA I for microvessel detection prior to microdissection. Right hand images correspond to the same fields after laser dissection. **B)** Immunoblots of vascular and neuronal samples obtained by LMD. Vessels appeared positive for CD31 (endothelial marker) and also for GFAP (astrocytes marker), both components of the neurovascular unit. Neurons appeared positive for NeuN (neuronal marker) and almost no GFAP cross contamination was detected.

Statistical evaluation of the expression of individual proteins revealed that MMP-1 ($p=0.001$), MMP-2 ($p=0.002$), MMP-3 ($p=0.041$), MMP-8 ($p=0.001$), MMP-9 ($p<0.001$), MMP-10 ($p=0.011$), MMP-13 ($p=0.016$) and TIMP-1 ($p=0.001$) were significantly increased in the infarcted tissue compared to the contralateral samples (Figure 1.D). TIMP-2, however, showed no differences between the two studied areas ($p=0.096$).

Characterization of tissue procured by LMD

In order to characterize the expression of proteins in brain microdissected samples (Figure 2.A) Western blot analysis of pooled samples was performed. Immunoblot against endothelial (CD31), neuronal (NeuN) and astrocyte (GFAP) markers revealed that microdissected brain microvessels were positive for CD31 and also for GFAP (Figure 2.B), which suggested that captured material represented vascular tissue as previously described¹⁹. Microdissected neurons were positive for NeuN and almost no GFAP and null CD-31 immunoreactivity was displayed.

Differential MMP expression between vascular and neuronal brain components

In general, the MMP Array results showed a differential cell-dependent MMP protein expression between the neuronal and vascular brain components. This difference was statistically significant for MMP-9 ($p=0.001$), MMP-10 ($p=0.019$) and TIMP-2 ($p=0.007$) (Figure 3.A). MMP-9 was highly expressed in microvessels, whilst almost no protein was detected in neurons. Similarly, TIMP-2 was also highly produced by

brain microvessels with only low levels being detected in neurons. Contrarily to these results, MMP-10 was found to be mainly produced in neurons and low protein levels were found in the microvessels.

In this study, we could not find differences within the different cell types between the two studied areas, i.e. infarcted and contralateral tissue (Figure 3.B), however a trend appeared for higher levels of MMP-3 in neurons ($p=0.08$) and for MMP-9 in microvessels ($p=0.18$) from the ischemic areas when compared to the corresponding cell-types of the contralateral hemisphere. In a comparison of protein expression between the two cell types studied, significantly higher MMP-9 levels were detected in microvessels compared to neuronal MMP-9 both in the infarcted and contralateral areas ($p=0.043$). In contrast, neuronal MMP-10 levels from ischemic areas were significantly higher than those found in the vasculature corresponding to contralateral regions ($p=0.042$) and ischemic ($p=0.043$) areas. Finally vascular TIMP-2 levels from the contralateral hemisphere were significantly higher than neuronal contralateral levels ($p=0.043$) whilst in the vasculature, although not significantly different, a trend towards increased vascular TIMP-2 levels occurred in the infarction compared with neuronal contralateral levels ($p=0.066$).

Discussion

Over the past few years, mounting evidence has shown that MMPs participate in the pathophysiology of cerebral ischemia²⁰. However the cellular source has not been fully elucidated

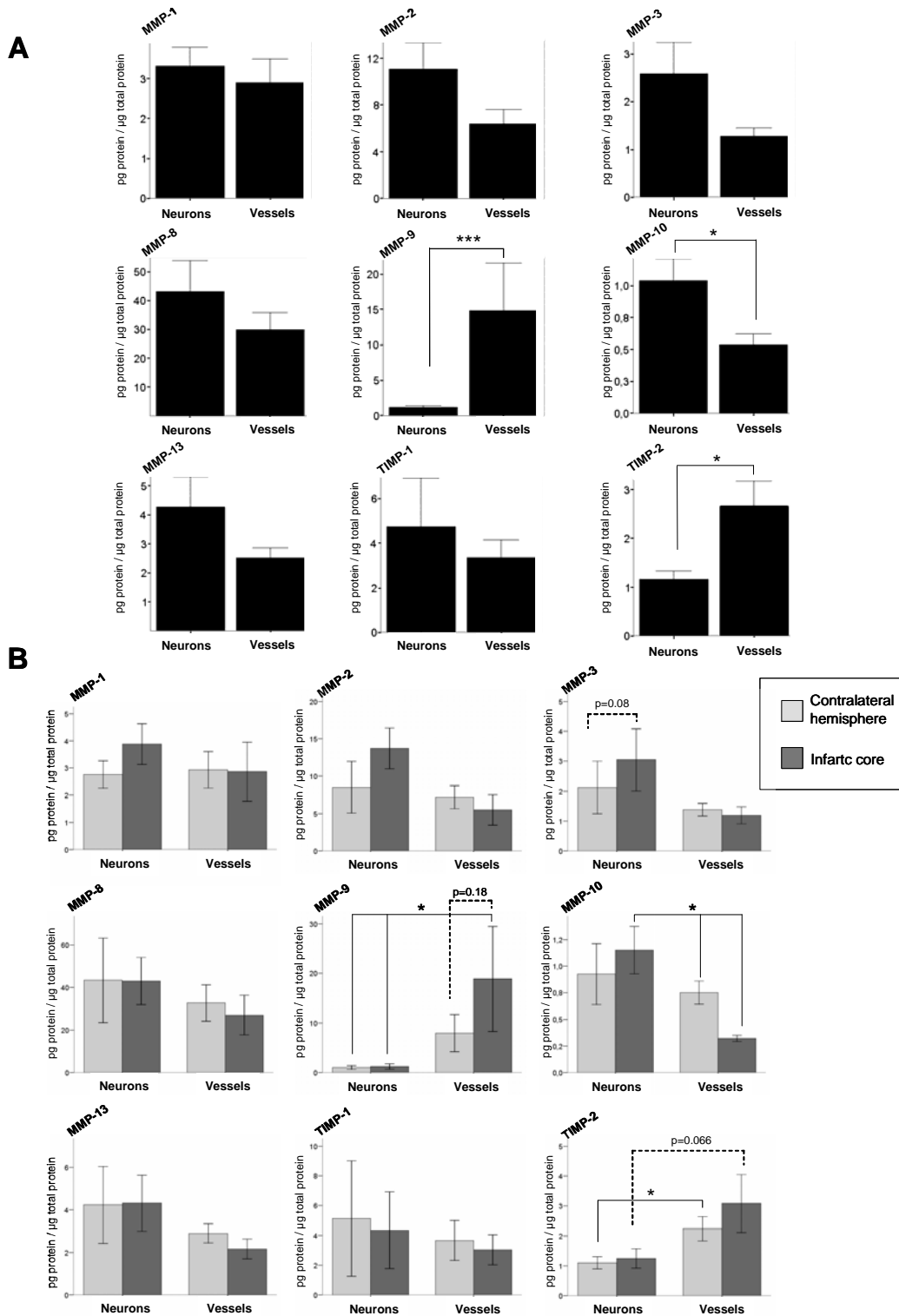


Figure 3. MMP protein array results from microdissected samples. **A)** Bar graphs showing MMPs level in the neuronal and vascular components of the brain. **B)** Bar graphs showing MMP concentration in microdissected samples, neurons and microvessels, in contralateral (light grey) and infarct core (dark grey) samples. Bars represent SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

yet. In the present investigation we aimed to determine MMP protein levels in the ischemic brain and to analyze the vascular and neuronal component in order to determine the cellular origin of defined MMP family-members.

Using a Searchlight MMP protein array we show that MMP-1, -2, -3, -8, -9, -10, -13 and TIMP-1 were over expressed in the infarcted brain tissue of human strokes compared to non-ischemic areas. Moreover, using the combination of laser

microdissection and a dedicated protein array we demonstrate that the vascular tissue is an important source of MMP-9 and TIMP-2 in the brain, whilst neurons expressed different proteins, for example the produce more MMP-10 than brain microvessels. To our knowledge, this is the first time that LMD samples have been obtained from human brain tissue for protein array quantification. In this sense our results demonstrate the usefulness of combining LMD and a multiplex ELISA-based protein array as other authors have previously done in single protein determinations by ELISA¹⁶.

Our results show for the first time that MMP-1, MMP-8 and MMP-10 are up regulated in the brain after an ischemic event. MMP-2 has been shown to be overexpressed in animal models of cerebral ischemia^{21, 22} and in humans after stroke²³. Also, other authors have described MMP-3 to be activated after ischemia/reperfusion in rats²⁴. MMP-9 has been largely studied both in animal models of the disease^{3, 4, 10, 25-27} and in human brain stroke samples^{9, 23}. More recently, MMP-13 has been shown to be activated in a rat model of ischemia/reperfusion²⁸ and we have recently reported its activation also following human stroke¹³. Altogether our results are consistent with these previous investigations and in addition describe the de-regulated synthesis of new members of the MMP family that might play an important role in the pathogenesis of stroke such as MMP-1, MMP-8 and MMP-10.

Regarding the increase of these molecules in the whole brain tissue, of particular importance may be the up regulation of MMP-8, MMP-9 and TIMP-1. MMP-9 and MMP-8 are known to be produced by neutrophils²⁹ which are known to infiltrate the brain during the inflammatory phase of cerebral ischemia^{1, 30}. TIMP-1 also showed a dramatic increase in expression in the infarct core samples. TIMP-1 as an inhibitor of MMPs, and particularly MMP-9, has been proposed as a neuroprotector³¹. Recently, MMP-9 protein expression was reported to be significantly more augmented after cerebral ischemia in TIMP-1 knockout mice compared with WT mice, and also resulted in an exacerbation of BBB disruption, neuronal apoptosis, and ischemic injury. TIMP-2 gene deletion mice, however, exhibited no difference in MMP expression nor in the degree of ischemic injury³². Our results provide new targets within the MMP family which could be specifically inhibited in models of cerebral ischemia in order to understand their potential contribution to the ischemic damage as a new approach in the therapeutics of stroke.

The analysis of microdissected samples confirmed the microvasculature as an important source of MMP-9 and TIMP-2 especially in the ischemic areas. This result is in accordance with previous data from our laboratory where we described increased MMP-9 activity in

microdissected brain microvessels by gelatin zymography¹. TIMP-2 in addition to inhibiting MMPs, is known to selectively interact with MT1-MMP to facilitate the cell-surface activation of pro-MMP-2³³, but based on our results MMP-2 levels are constitutively lower in brain vessels than in neurons, however we do not know the percentage of the total protein that is active in each case, and this could be important in determination of the effects. Concerning neuronal MMP-10 expression, this is the first time, up to our knowledge, that MMP-10 has been reported in neurons. MMP-10 belongs to the stromelysin subfamily of MMPs which includes MMP-3 and MMP-11. MMP-3 has been shown to be present in neurons after cerebral ischemia¹¹ and MMP-10 has been involved in vascular development and atherogenesis³⁴. We believe that considering its presence in neurons and the notably higher expression when compared with blood microvessels, its function might be related to neuronal damage and therefore merits further studies.

Our study certainly presents some limitations that should be discussed. The main concern is that some results from the whole brain homogenate and from microdissected samples are in disagreement. We believe that this discordance can be explained by different factors. Firstly, we do not know which epitopes are the antibodies of the protein array recognizing, and secondly, a more detailed study measuring the active, pro-forms and heterodimers should be carried out. This is particularly important since some results such as the lack of differences in neuronal MMP-13 in infarction and contralateral samples apparently contradict previous results from our laboratory¹³ where we demonstrated that active MMP-13 was over expressed in these cells within the infarction but no differences were found however concerning the proform. Therefore, it is possible that with the array used in this study we are not able to detect such subtle but important differences. Another limitation is that we only study neurons and microvessels; however in the brain parenchyma other cell types produce MMPs such as astrocytes, oligodendrocytes or inflammatory cells, and they might be all contributing to the total MMP content. The differences found between the results of total brain homogenates and microdissected samples for example in relation to MMP-8 or MMP-9 expression (both produced by neutrophils) could also be explained by this. Furthermore, we believe that the lack of differences in MMP levels in some collected cellular fractions may be in part due to the sample size of the study, however because of the difficulty to obtain human samples we believe that these results offer valuable novel information such as the identification of the presence of MMP-10 in neurons.

Conclusions

The present study provides new information concerning the cellular source of MMPs associated with the development of cerebral ischemia, and identifies protein arrays as a reliable and fast methods for the analysis of protein families and pathways in tissue homogenates or samples with low protein content such as the ones procured by laser microdissection.

Acknowledgements

We are very grateful to Dolors Giralt for her statistical advice and to all the staff from the Neurovascular Unit and Neuropathology Department who helped in performing this study. E.C. is supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS 05/322). A.R. is supported by a Beatriu Pinós Fellowship. The Neurovascular Research Laboratory takes part into the Spanish stroke research network RENEVAS (RD06/0026/0010).

References

- Rosell, A.; Cuadrado, E.; Ortega-Aznar, A.; Hernandez-Guillamon, M.; Lo, E. H.; Montaner, J., MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke* **2008**, *39*, (4), 1121-6.
- Matrisian, L. M., Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet* **1990**, *6*, (4), 121-5.
- Planas, A. M.; Sole, S.; Justicia, C., Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 and -9 in rat brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* **2001**, *8*, (5), 834-46.
- Rosenberg, G. A.; Navratil, M.; Barone, F.; Feuerstein, G., Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **1996**, *16*, (3), 360-6.
- Lee, S. R.; Tsuji, K.; Lee, S. R.; Lo, E. H., Role of matrix metalloproteinases in delayed neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *J Neurosci* **2004**, *24*, (3), 671-8.
- Rivera, S.; Ogier, C.; Jourquin, J.; Timsit, S.; Szklarczyk, A. W.; Miller, K.; Gearing, A. J.; Kaczmarek, L.; Khrestchatsky, M., Gelatinase B and TIMP-1 are regulated in a cell- and time-dependent manner in association with neuronal death and glial reactivity after global forebrain ischemia. *Eur J Neurosci* **2002**, *15*, (1), 19-32.
- Loy, M.; Burggraf, D.; Martens, K. H.; Liebetrau, M.; Wunderlich, N.; Bultemeier, G.; Nemori, R.; Hamann, G. F., A gelatin in situ overlay technique localizes brain matrix metalloproteinase activity in experimental focal cerebral ischemia. *J Neurosci Methods* **2002**, *116*, (2), 125-33.
- Justicia, C.; Panes, J.; Sole, S.; Cervera, A.; Deulofeu, R.; Chamorro, A.; Planas, A. M., Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **2003**, *23*, (12), 1430-40.
- Rosell, A.; Ortega-Aznar, A.; Alvarez-Sabin, J.; Fernandez-Cadenas, I.; Ribo, M.; Molina, C. A.; Lo, E. H.; Montaner, J., Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke* **2006**, *37*, (6), 1399-406.
- Asahi, M.; Asahi, K.; Jung, J. C.; del Zoppo, G. J.; Fini, M. E.; Lo, E. H., 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*, (12), 1681-9.
- Gurney, K. J.; Estrada, E. Y.; Rosenberg, G. A., Blood-brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation. *Neurobiol Dis* **2006**, *23*, (1), 87-96.
- Suzuki, Y.; Nagai, N.; Umemura, K.; Collen, D.; Lijnen, H. R., Stromelysin-1 (MMP-3) is critical for intracranial bleeding after t-PA treatment of stroke in mice. *J Thromb Haemost* **2007**, *5*, (8), 1732-9.
- Cuadrado, E.; Rosell, A.; Borrell-Pages, M.; Garcia-Bonilla, L.; Hernandez-Guillamon, M.; Ortega-Aznar, A.; Montaner, J., Matrix metalloproteinase-13 is activated and is found in the nucleus of neural cells after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **2008** Nov 5. [Epub ahead of print].
- Mouledous, L.; Hunt, S.; Harcourt, R.; Harry, J.; Williams, K. L.; Gutstein, H. B., Navigated laser capture microdissection as an alternative to direct histological staining for proteomic analysis of brain samples. *Proteomics* **2003**, *3*, (5), 610-5.
- Mouledous, L.; Hunt, S.; Harcourt, R.; Harry, J. L.; Williams, K. L.; Gutstein, H. B., Proteomic analysis of immunostained, laser-capture microdissected brain samples. *Electrophoresis* **2003**, *24*, (1-2), 296-302.
- Haqqani, A. S.; Nestic, M.; Preston, E.; Baumann, E.; Kelly, J.; Stanimirovic, D., Characterization of vascular protein expression patterns in cerebral ischemia/reperfusion using laser capture microdissection and ICAT-nanoLC-MS/MS. *FASEB J* **2005**, *19*, (13), 1809-21.
- Lu, Q.; Murugesan, N.; Macdonald, J. A.; Wu, S. L.; Pachter, J. S.; Hancock, W. S., Analysis of mouse brain microvascular endothelium using immuno-laser capture microdissection coupled to a hybrid linear ion trap with Fourier transform-mass

- spectrometry proteomics platform. *Electrophoresis* **2008**, *29*, (12), 2689-95.
18. Mojsilovic-Petrovic, J.; Nestic, M.; Pen, A.; Zhang, W.; Stanimirovic, D., Development of rapid staining protocols for laser-capture microdissection of brain vessels from human and rat coupled to gene expression analyses. *J Neurosci Methods* **2004**, *133*, (1-2), 39-48.
 19. Zhang, W.; Mojsilovic-Petrovic, J.; Andrade, M. F.; Zhang, H.; Ball, M.; Stanimirovic, D. B., The expression and functional characterization of ABCG2 in brain endothelial cells and vessels. *Faseb J* **2003**, *17*, (14), 2085-7.
 20. Rosenberg, G. A., Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* **2002**, *39*, (3), 279-91.
 21. Chang, D. I.; Hosomi, N.; Lucero, J.; Heo, J. H.; Abumiya, T.; Mazar, A. P.; del Zoppo, G. J., Activation systems for latent matrix metalloproteinase-2 are upregulated immediately after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **2003**, *23*, (12), 1408-19.
 22. Yang, Y.; Estrada, E. Y.; Thompson, J. F.; Liu, W.; Rosenberg, G. A., Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **2007**, *27*, (4), 697-709.
 23. Clark, A. W.; Krekoski, C. A.; Bou, S. S.; Chapman, K. R.; Edwards, D. R., Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett* **1997**, *238*, (1-2), 53-6.
 24. Sole, S.; Petegnief, V.; Gorina, R.; Chamorro, A.; Planas, A. M., Activation of matrix metalloproteinase-3 and agrin cleavage in cerebral ischemia/reperfusion. *J Neuropathol Exp Neurol* **2004**, *63*, (4), 338-49.
 25. Heo, J. H.; Lucero, J.; Abumiya, T.; Koziol, J. A.; Copeland, B. R.; del Zoppo, G. J., Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **1999**, *19*, (6), 624-33.
 26. Asahi, M.; Wang, X.; Mori, T.; Sumii, T.; Jung, J. C.; Moskowitz, M. A.; Fini, M. E.; Lo, E. H., Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci* **2001**, *21*, (19), 7724-32.
 27. Romanic, A. M.; White, R. F.; Arleth, A. J.; Ohlstein, E. H.; Barone, F. C., Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* **1998**, *29*, (5), 1020-30.
 28. Nagel, S.; Sandy, J. D.; Meyding-Lamade, U.; Schwark, C.; Bartsch, J. W.; Wagner, S., Focal cerebral ischemia induces changes in both MMP-13 and aggrecan around individual neurons. *Brain Res* **2005**, *1056*, (1), 43-50.
 29. Cuadrado, E.; Ortega, L.; Hernandez-Guillamon, M.; Penalba, A.; Fernandez-Cadenas, I.; Rosell, A.; Montaner, J., Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *J Leukoc Biol* **2008**, *84*, (1), 207-14.
 30. Planas, A. M.; Justicia, C.; Sole, S.; Friguls, B.; Cervera, A.; Adell, A.; Chamorro, A., Certain forms of matrix metalloproteinase-9 accumulate in the extracellular space after microdialysis probe implantation and middle cerebral artery occlusion/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **2002**, *22*, (8), 918-25.
 31. Baker, A. H.; Sica, V.; Work, L. M.; Williams-Ignarro, S.; de Nigris, F.; Lerman, L. O.; Casamassimi, A.; Lanza, A.; Schiano, C.; Rienzo, M.; Ignarro, L. J.; Napoli, C., Brain protection using autologous bone marrow cell, metalloproteinase inhibitors, and metabolic treatment in cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, (9), 3597-602.
 32. Fujimoto, M.; Takagi, Y.; Aoki, T.; Hayase, M.; Marumo, T.; Gomi, M.; Nishimura, M.; Kataoka, H.; Hashimoto, N.; Nozaki, K., Tissue inhibitor of metalloproteinases protect blood-brain barrier disruption in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **2008**, *28*, (10), 1674-85.
 33. Stetler-Stevenson, W. G., Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* **2008**, *1*, (27), re6.
 34. Rodriguez, J. A.; Orbe, J.; Martinez de Lizarrondo, S.; Calvayrac, O.; Rodriguez, C.; Martinez-Gonzalez, J.; Paramo, J. A., Metalloproteinases and atherothrombosis: MMP-10 mediates vascular remodeling promoted by inflammatory stimuli. *Front Biosci* **2008**, *13*, 2916-21.

**- ACRÒNIMS I ABREVIACIONS -**

ACM: Artèria Cerebral Mitja

ADN: Àcid desoxiribonucleic

ATP: de l'anglès Adenosine-5'-triphosphate

BCIP: de l'anglès 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt

BHE: Barrera hematoencefàlica

BrdU: de l'anglès Bromodeoxyuridine

CADASIL: de l'anglès Cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy

CNPase: de l'anglès 2',3'- Cyclic Nucleotide 3'-Phosphodiesterase

DAB: Diaminobenzidina

DAPI: de l'anglès 46-diamidino-2-phenyl indole

DMSO: de l'anglès Dimethyl sulfoxide

DPX: de l'anglès Dibutyl polystyrene xylene

FBS: de l'anglès Fetal bovin serum

FDA: de l'anglès Food and Drug Administration

FHS: de l'anglès Fetal horse serum

FITC: de l'anglès Fluorescein isothiocyanate

fMLP: de l'anglès formyl-Met-Leu-Phe

GFAP: de l'anglès glial fibrillary acidic protein

HRP: de l'anglès Horseradish peroxidase

Iba1: de l'anglès ionized calcium-binding adaptor molecule 1

ICAM: de l'anglès Intercellular adhesive molecule

INE: Instituto Nacional de Estadística

LDF: de l'anglès Laser doppler flowmetry

LMD: de l'anglès Laser microdissection

- LRP:** de l'anglès Low-density lipoprotein receptor-related protein
- MAP-2:** de l'anglès Microtubule-associated protein 2
- MMP:** de l'anglès Matrix Metalloproteinases
- MTT:** de l'anglès 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
- NBT:** de l'anglès Nitro-Blue Tetrazolium Chloride
- NeuN:** de l'anglès Neuronal nuclei
- OGD:** de l'anglès Oxygen and glucose deprivation
- PAGE:** de l'anglès Polyacrilamide gel electrophoresis
- PARP:** Poli ADP ribosa polimerasa
- PBS:** de l'anglès Phosphate buffer saline
- PVDF:** de l'anglès Polyvinylidene Fluoride
- rCBF:** de l'anglès regional cerebral blood flow
- RECK:** de l'anglès Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs
- RM:** Resonancia Magnètica
- SDS:** de l'anglès Sodium dodecyl sulfate
- SVZ:** de l'anglès Subventricular zone
- TAC:** Tomografia Axial Computeritzada
- TH:** Transformació Hemorràgica
- TIMP:** de l'anglès Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases
- TIRF:** de l'anglès Total Internal Reflexion Fluorescence
- TOAST:** de l'anglès Trial of ORG 10172 in Acute Stroke Treatment
- TPBS:** de l'anglès Tween phosphate buffer saline
- TTC:** de l'anglès 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride
- UEAI:** de l'anglès *Ulex europaeus* Agglutinin I
- VCAM:** de l'anglès Vascular cell adhesion molecule
- VEGF:** de l'anglès Vascular endothelial growth factor

