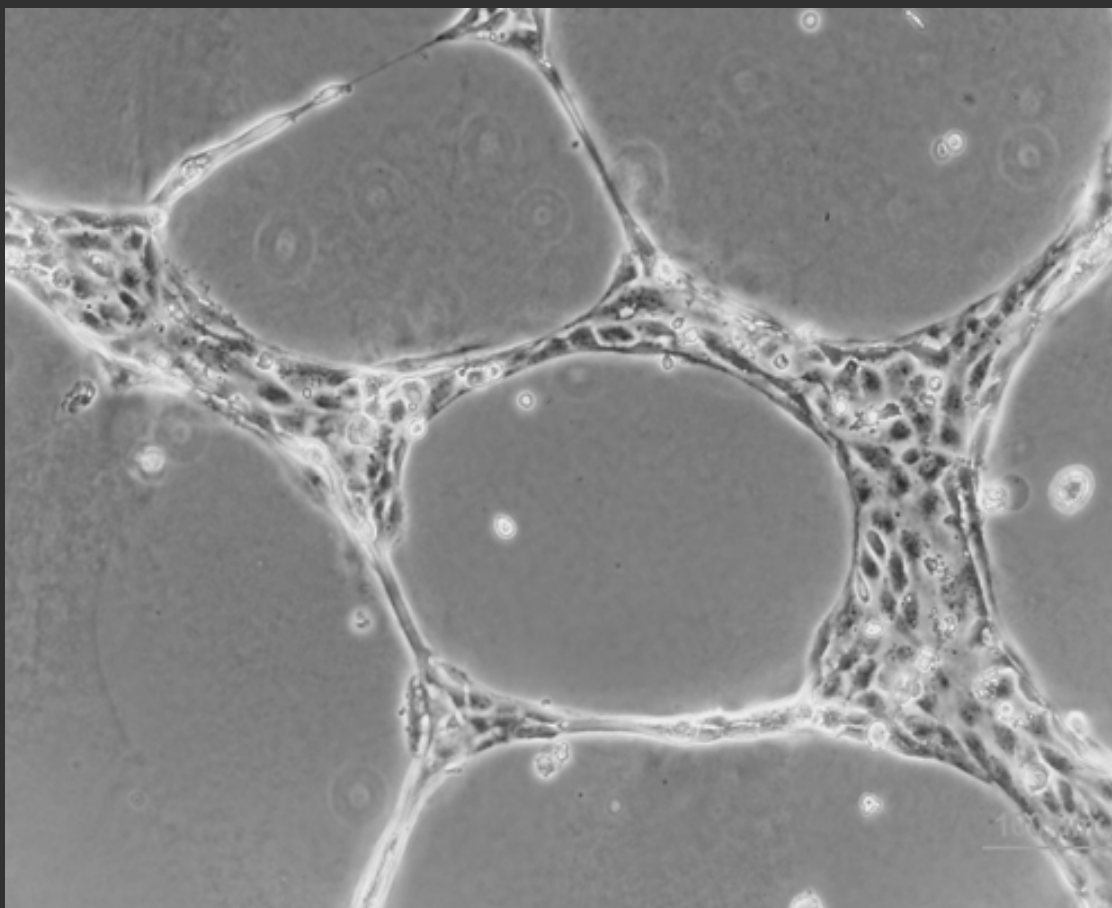


INFLUÈNCIA DE LES CÈL·LULES
ENDOTELIALS PROGENITORES
SOBRE LA MODULACIÓ ESPAIAL I
TEMPORAL DE L'ANGIOGÈNESI I
LA VASCULOGÈNESI DESPRÉS DE
L'ICTUS ISQUÈMIC HUMÀ

Míriam Navarro Sobrino



UAB

Universitat Autònoma de Barcelona

TESI DOCTORAL

**INFLUÈNCIA DE LES CÈL·LULES ENDOTELIALS
PROGENITORES SOBRE LA MODULACIÓ ESPACIAL I
TEMPORAL DE L'ANGIOGÈNESI I LA
VASCULOGÈNESI DESPRÉS DE L'ICTUS ISQUÈMIC
HUMÀ**

MÍRIAM NAVARRO SOBRINO

**FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE MEDICINA INTERNA UNIVERSITAT AUTÒNOMA
DE BARCELONA**

DIRECTORS:

Dr. JOAN MONTANER VILLALONGA

Dra. ANNA ROSELL NOVEL

Dr. JOSÉ ALVAREZ SABÍN

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 (PI060471), RENEVAS (RD06/0026/0010) i dins del projecte "Consortio Terapias Neuroreparadoras en l'Ictus" (TNR) finançat per ACCIÓ i Grupo Ferrer.



LABORATORI
DE RECERCA
NEUROVASCULAR



Vall d'Hebron
Institut de Recerca



Vall d'Hebron
Hospital

UAB

Universitat Autònoma
de Barcelona

LABORATORI DE RECERCA NEUROVASCULAR
INSTITUT DE RECERCA
HOSPITAL UNIVERSITARI VALL D'HEBRON

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
FACULTAT DE MEDICINA
DEPARTAMENT DE MEDICINA

BARCELONA, 29 de JULIOL 2010

AGRAÏMENTS

Després d'escriure, corregir, rellegir-la cent cops i superar els mil tràmits burocràtics que suposa presentar una tesi, escriure aquest apartat és tot un alleujament. Aquest treball és el resultat de l'esforç de molt anys, però no tan sols del meu sinó del de molta altra gent i es per això, que no puc començar sense agrair a tots i cadascun de vosaltres l'ajuda rebuda.

Als meus directors de tesi, el Dr. Alvarez Sabín, el Dr. Montaner i a la Dra. Rosell per la vostra confiança i perquè per aprofitar les oportunitats algú té les ha de donar. Heu fet d'aquest petit grup un gran projecte , al Joan perquè el seu optimisme és contagiï sempre i per creure que els somnis es fan realitat. A l'Anna, perquè tot i que lluny sempre ha estat a prop, per tots aquests dies de nervis, i per tots els altres, pels e-mails eterns des de l'altra banda de l'Atlàntic i per totes les coses que he après amb tu.

A tots els membres del laboratori, perquè cadascun dintre de la seva bombolleta fan possible que les reunions del divendres durin hores. Gràcies a vosaltres sé més de moltes altres coses: gènetica, angiopatia, microdissecció, models d'isquèmia, hipòxies, neurogènesi, etc, etc.... .

A la Lidia i a la Mar, per poder compartir amb vosaltres les vostres eternes discussions científiques, per encomanar-me el vostre entusiasme. Per ensenyar-me el que realment és important en ciència i per ensenyar-me mil coses més. Perquè al vostre costat vaig fer la meva primera faldilla i per escoltar-me sempre.

A l'Eloy perquè sense ell, això no hagués estat possible, per les mil disputes i baralles viscudes i per creure sempre en mi.

A l'Anita per sé com és, per tenir sempre un somriure i estar sempre disposada ajudar, pel nostre viatge i perquè sense tu res seria igual. A la Sandra per les sangs en els seus

iniciis i a la Cris, per esperar-me fins a altes hores de la tarda i per les cireres. A la Vicky, perquè encara que no hi és sempre que guanyi el Barça ens retrobarem.

A l'Isra per la seva tranquil·litat i perquè tot el que faci d'ara endavant ho corregiré per bonferroni. A la Sophie, per l'ajuda amb els controls, amb l'informàtica, amb l'anglès i per aquelles meravelloses "quiches". A la Pilar perquè gràcies a ella, puc utilitzar el reference manager a tot arreu.

I a tots els que esteu a l'inici o a mig camí perquè no us desanimeu, perquè arribarà un dia en que escriureu aquest apartat.

També vull donar les gràcies al meus amics estressats, perquè amb vosaltres vaig començar i amb vosaltres continuo. Al Genís, per la seva ajuda en les correccions però sobretot per la seva paciència.

A les meves nenes i als vostres nens, perquè sempre hi sou i perquè ho heu viscut des de l'inici. A la Carla per estalviar-me el mal de cap del disseny, i a la Jèssica per escoltar els meus assajos. Perquè tenir-vos al costat és el millor.

També vull agrair a tots els residents i infermeres de l'Unitat d'Ictus i sobretot a tots els pacients i voluntaris que heu participat en aquest estudi, ja que sense vosaltres res de tot això seria possible.

I finalment, a la meva família, a tota, però sobretot als meus pares, a la meva germana i als meus nebots, perquè vosaltres meu ensenyat totes aquelles coses que en cap tesi pots arribar a aprendre.

Barcelona, 29 de Juliol 2010

ÍNDEX

AGRAÏMENTS	I
ABREVIATURES	XI
1. INTRODUCCIÓ	
1.1 L'ictus	1
1.2 Cascada isquèmica i neuroinflamació	5
1.3 Tractament trombolític amb l'activador recombinant del plasminogen tissular (rt-PA)	9
1.4 Noves estratègies terapèutiques en l'ictus	11
1.5 Processos de recuperació: angiogènesi, vasculogènesi i neurogènesi	12
1.6 Cèl·lules progenitores endotelials (EPCs) en la isquèmia cerebral	17
1.6.1 Definició i caracterització de les EPCs	17
1.6.2 Origen, mobilització i reclutament de les EPCs	20
1.6.3 EPCs i malaltia cerebrovascular	21
1.7 Estimulació de la neovascularització mitjançant factors de creixement	23
1.8 Biomarcadors pronòstic en l'ictus	27
2. OBJECTIUS	31
3. MATERIALS I MÈTODES	
3.1 Protocol clínic, pacients i mostres biològiques utilitzades	35
3.1.1 Grup de pacients per a l'estudi dels nivells de promotors i inhibidors angiogènics	36
3.1.2 Grup de pacients per a l'estudi d'aïllament i diferenciació d'EPCs	37
3.1.3 Grup de pacients per a la quantificació d'EPCs mitjançant citometria de flux	38
3.2 Tècnica de citometria de flux	38

3.3	Tècniques de cultiu cel·lular	40
3.3.1	Aïllament i diferenciació d'EPCs a partir de sang perifèrica humana	40
3.3.2	Subcultiu, recompte i manteniment d'EPCs	43
3.3.2.1	Subcultiu	43
3.3.2.2	Recompte cel·lular	43
3.3.3	Emmagatzematge de cèl·lules	44
3.3.3.1	Congelació	44
3.3.3.2	Descongelació	45
3.3.4	Immunocitoquímica	45
3.3.5	Assaig de funcionalitat <i>in vitro</i>	47
3.3.6	Obtenció de medi condicionat i de lisat cel·lulars d'EPCs	48
3.3.7	Determinació de l'expressió gènica en EPCs	49
3.4	Searchlight i ELISA simple	50
3.5	Càlculs estadístics	51

4. RESULTATS

4.1	Article 1: Potencial terapéutico de las células progenitoras endoteliales en el ictus isquémico (Rev Neurol. 2007; 45:556-562)	57
4.2	Article 2: Mobilization, endothelial differentiation and functional capacity of endothelial progenitor cells after ischemic stroke (Microv Res. 2010)	67
4.3	Article 3: Role of endogenous granulocyte-macrophage colony stimulating factor following stroke and relationship to neurological outcome (Curr Neurovasc Res. 2009 6: 246-251)	77

4.4	Article 4: A large screening of angiogenesis biomarkers and their association with neurological outcome after ischemic stroke (In submission, Stroke. 2010)	85
5. DISCUSSIÓ		
5.1	Els nivells plasmàtics de certs promotors i inhibidors angiogènics es modulen després de l'ictus isquèmic	99
5.2	Un major balanç proangiogènic endogen no incrementa el risc de transformacions hemorràgiques	101
5.3	Nivells endògens d'alguns promotors i inhibidors angiogènics es troben associats amb el pronòstic clínic a curt termini	102
5.4	Importància dels inhibidors angiogènics: l'endostatina com a potent biomarcador pronòstic a llarg termini	103
5.5	L'ictus isquèmic estimula l'alliberació d'EPCs al torrent circulatori i modula la seva funcionalitat <i>in vitro</i>	105
5.6	Ús de l'angiogènesi i la vasculogènesi com a terapia i/o biomarcador en l'ictus isquèmic	107
5.6.1	La monitorització de l'angiogènesi i la vasculogènesi endògena és útil com a biomarcador pronòstic en l'ictus isquèmic ?	109
5.6.2	La potenciació de l'angiogènesi i la vasculogènesi poden ser noves teràpies en l'ictus isquèmic ?	110
6. CONCLUSIONS		115
7. BIBLIOGRAFIA		119

ABREVIATURES

ACM: artèria cerebral mitja

AMPA: de l'anglès α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

Ang-1: angiopoietin 1

ATP: de l'anglès adenosine triphosphate

BHE: barrera hematoencefàlica

CACs: de l'anglès circulating angiogenic cells

CD34: de l'anglès cluster of differentiation 34, marcador progenitor

CD36: de l'anglès cluster of differentiation 36, marcador d'endoteli

CD133: de l'anglès cluster of differentiation 133, marcador progenitor

CD45: de l'anglès cluster of differentiation 45, marcador leucocitàri

CXCR4: de l'anglès Chemokine (C-X-C motif) receptor 4

DAPI: de l'anglès 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMSO: de l'anglès dimethyl sulfoxide

EBM: de l'anglès endothelial basal medium

EGM-2: de l'anglès endothelial growth medium 2

ELAM-1: de l'anglès endothelial-leukocyte adhesion molecule 1

EPC: de l'anglès endothelial progenitor cell

EPO: eritropoetina

FasL: de l'anglès Fas ligand

FGF: de l'anglès fibroblast growth factor

GM-CSF: de l'anglès granulocyte macrophage colony stimulating factor

HB-EGF: de l'anglès heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor

HGF: de l'anglès fibroblast growth factor

HIF-1 α : de l'anglès hypoxia inducible factor 1 alpha

Hoechst: de l'anglès bisBenzimide H33342 trihydrochloride

IL-8: de l'anglès interleukin 8

IL-1 β : de l'anglès interleukin 1 beta

IL-6: de l'anglès interleukin 6

KGF: de l'anglès de keratinocyte growth factor

MCP-1: de l'anglès monocyte chemotactic protein-1

MMPs: de l'anglès matrix metalloproteinases

MMP-2: de l'anglès matrix metalloproteinase 2

MMP-9: de l'anglès matrix metalloproteinase 9

mRS: de l'anglès modified Rankin scale

NIHSS: de l'anglès National Institute of Health Stroke Scale

NMDA: de l'anglès N-methyl-D-aspartic acid

OECs: de l'anglès outgrowth endothelial cells

PECAM-1: de l'anglès platelet/endothelial cell adhesion molecule-1

PDGF: de l'anglès platelet-derived growth factor

PMSF: de l'anglès phenylmethanesulfonylfluoride

ROS: de l'anglès reactive oxygen species

RM: Ressonància magnètica

rt-PA: de l'anglès recombinant tissular plasminogen activator

SDF-1 α : de l'anglès stromal derived factor 1 alpha

TAC: Tomografia axial computeritzada

TH: transformació hemorràgica

Tie2: receptor de l'angiopoietina 1 i 2

TNF- α : de l'anglès tumor necrosis factor apha

TOAST: de l'anglès Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment

TPO: de l'anglès thrombopoietin

TSP-1: de l'anglès thrombospondin 1

TSP-2: de l'angles thrombospondin 2

uPA: de l'anglès urine type plasminogen activator

VEGF: de l'anglès vascular endothelial growth factor

VEGFR-2: també conegut com KDR o Flk-1, de l'anglès vascular endothelial growth factor receptor 2

VEGFR-1: també conegut com Flt-1, de l'anglès vascular endothelial growth factor receptor 1

1. INTRODUCCIÓ

1.1 L'ictus

L'ictus o infart cerebral es produeix com a resultat d'una alteració del flux sanguini cerebral que pot ser transitori, si es restableix espontàniament o mitjançant accions terapèutiques, o permanent. Com a conseqüència, poden aparèixer tot un seguit de símptomes neurològics com són: afàsia, hemiparèsia, pèrdua de consciència, vertigen, pèrdua de visió o trastorns del llenguatge, entre altres. Segons la zona de l'encèfal afectada, apareixeran aquests o altres dèficits, que seran reversibles o no en funció del temps d'oclusió i de l'evolució clínica del pacient.

Aquesta malaltia suposa una de les primeres causes de mortalitat, juntament amb les malalties cardíaques i el càncer, en el món occidental. La seva incidència anual és de 200 casos per cada 100.000 habitants i és la primera causa de mort en dones i la segona en homes a l'estat espanyol. A més a més, és la primera causa d'incapacitat i invalidesa a llarg termini degut a les seqüeles sensitives i motores que deixa, suposant un cost econòmic, tant sanitari com social, molt elevat (1).

De manera general, podem classificar els ictus en dos grans grups segons el seu mecanisme d'acció: ictus isquèmic, quan s'ha produït una disminució del flux arterial a causa d'un coàgul o una trombosi, i ictus hemorràgic, quan es produeix una extravasació de sang al parènquima com a conseqüència del trencament d'una artèria (figura 1).

Els factors de risc que poden determinar l'aparició de la patologia són comuns amb altres malalties cardiovasculars: l'edat, hipertensió arterial, diabetis, dislipèmia, obesitat, tabaquisme, alcoholisme, sedentarisme, i cardiopaties com la fibril·lació auricular, entre altres. A més a més, també hi ha factors genètics que determinen una major susceptibilitat a patir un ictus.

L'ictus hemorràgic o hemorràgia cerebral apareix com a conseqüència del trencament d'un vas sanguini; suposa un 10-20% del total dels ictus i té una taxa de mortalitat molt elevada. L'etiologia més freqüent és la hipertensió arterial. El seu pronòstic és molt dramàtic i actualment no es disposa de cap tractament efectiu. Tot i la gravetat de l'ictus hemorràgic, aquest subtipus d'ictus és el menys estudiat i es desconeixen els mecanismes moleculars que intervenen en la seva fisiopatologia (2).

L'ictus isquèmic és més comú que l'hemorràgic i suposa aproximadament el 80% dels infarts cerebrals. Aquest apareix com a conseqüència de l'oclusió d'una artèria de calibre mitjà o gran per un mecanisme embòlic (per coàguls, generalment procedents del cor) o trombòtic (per plaques d'ateroma que redueixen la llum del vas i faciliten la producció del trombus). Existeixen diferents classificacions segons els criteris següents: etiologia i mecanisme d'acció, durada de l'oclusió o lloc de l'oclusió.

Una de les classificacions més emprada basada en l'etiologia són els anomenats criteris TOAST (*Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*) (3) que ordena els ictus isquèmics en 5 subgrups:

1. **Aterotrombòtic:** infart degut a una estenosi >50% d'una artèria intracranial o extracranial, i absència de cardiopatia embolígena. Infarts generalment mitjans o grans, de topografia cortical o subcortical i amb aterosclerosi de localització carotídia o vertebrobasilar.
2. **Cardioembòlic:** infart mitjà o gran que s'ha produït per obstrucció d'una artèria cerebral per material embòlic d'origen cardíac. Topografia habitualment cortical.

3. **Lacunar o patologia de vas petit d'origen no aterotrombòtic:** infart de mida petita (<1.5 cm de diàmetre) produït en el territori de distribució d'una artèria perforant cerebral.
4. **De causa inhabitual:** infart en el què s'ha descartat l'origen aterotrombòtic, cardioembòlic o lacunar i en el qual s'ha identificat una causa menys freqüent. Se solen produir per malalties sistèmiques com ara infeccions, neoplàsies, alteracions metabòliques o de coagulació, o per aneurismes, migranyes, malformacions arteriovenoses, etc.
5. **D'origen indeterminat:** infart en què després d'un estudi diagnòstic exhaustiu, s'han descartat els subtipus aterotrombòtic, cardioembòlic, lacunar i de causa inhabitual, o bé s'han identificat diverses etiologies. Són infarts petits, mitjans o grans que es localitzen corticalment o subcortical, o bé en el territori vertebrobasilar o carotidi.

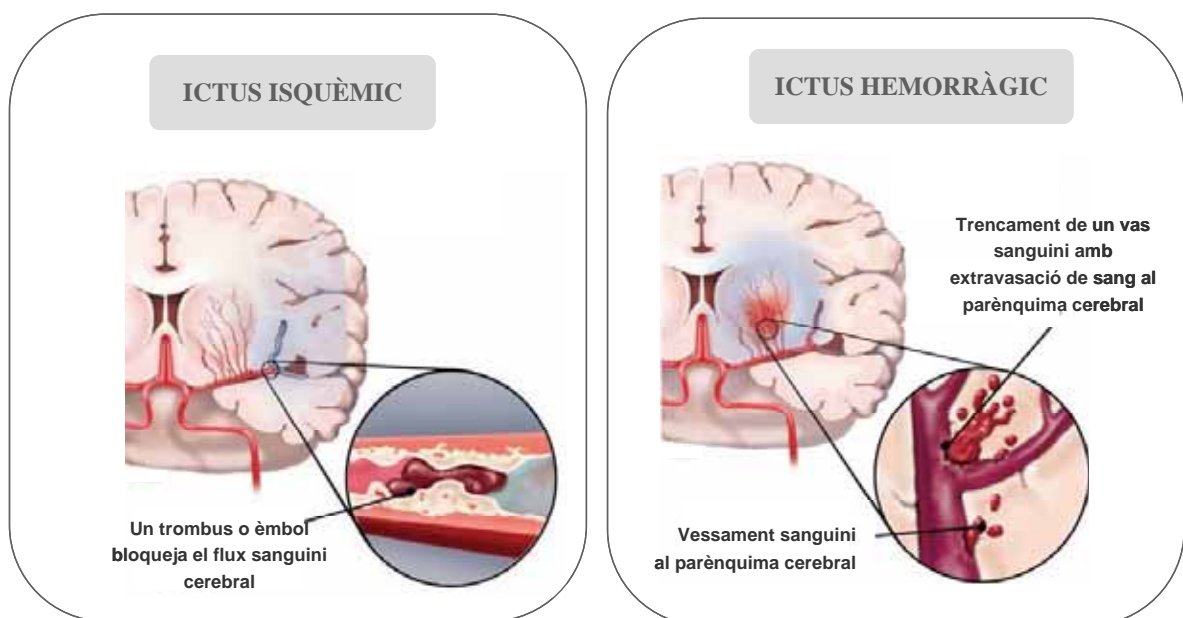


Figura 1. Esquema dels tipus d'ictus: isquèmic i hemorràgic
Adaptat de Heart and Stroke Foundation of Canada

Quan es produeix l'oclusió arterial, la reducció del flux sanguini cerebral no es dona de forma homogènia en tot el territori afectat; existeix un nucli central (anomenat *core* de l'infart), que és la zona directament irrigada per l'artèria obstruïda i on es produeix una lesió tissular i una zona circumdant, que per estudis de neuroimatge s'observa hipoperfosa i s'anomena penombra isquèmica; aquesta zona es troba compromesa metabòlicament, però és potencialment salvable (4) (veure figura 2). A la zona de penombra les neurones són funcionalment inactives però encara són viables; ara bé, si el flux sanguini no es restableix ràpidament el teixit acaba morint i contribuint a la progressió de l'infart. Els factors que determinen la progressió de la penombra a l'infart són el grau de circulació arterial colateral, la duració de la isquèmia i l'estat funcional i metabòlic previ de la cèl·lula. La possibilitat de recuperar el teixit danyat, disminuint així el deteriorament neurològic, ha fet de la penombra isquèmica una diana rellevant i el focus de nombroses investigacions.

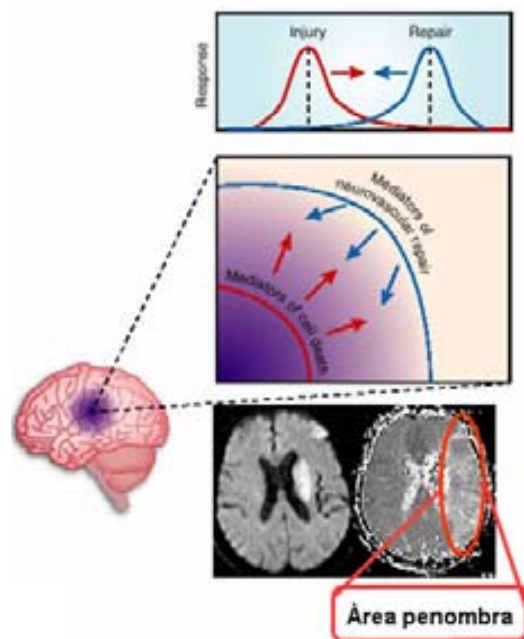


Figura 2. Esquema del balanç entre els processos de dany i de reparació que es donen en la zona de penombra. Adaptat de Lo et al. 2008 (5)

1.2 Cascada isquèmica i neuroinflamació

La falta de flux sanguini cerebral com a conseqüència de l'obstrucció d'una artèria, desencadena una sèrie de mecanismes tant a nivell cel·lular com tissular, els quals segueixen un ordre cronològic després de la isquèmia cerebral.

La manca de nutrients i d'oxigen que es dona durant la hipòxia porta a una immediata pèrdua energètica en les cèl·lules. L'ATP és la principal font d'energia per mantenir el correcte funcionament de les bombes iòniques de les membranes cel·lulars. Al disminuir els nivells d'ATP durant la isquèmia, es perd la capacitat de mantenir la homeòstasi iònica, produint-se la fallida de la bomba Na^+/K^+ ATP-asa, i sortint K^+ de l'interior cel·lular a l'espai intersticial. En compensació, es produeix l'entrada al citosol de Na^+ i Ca^{2+} , així com també d'aigua per osmòsi. Això provoca, per una banda, el desenvolupament d'un edema intracel·lular, i per altra, la impossibilitat de mantenir el potencial de membrana, produint-se així la despolarització de la cèl·lula i eliminant l'activitat elèctrica neuronal. La despolarització de la membrana plasmàtica condiona l'obertura dels canals de Ca^{2+} depenents de voltatge, provocant un increment de la concentració de calci iònic intracel·lular. En un dany isquèmic greu, aquest Ca^{2+} provoca una brusca despolarització, coneguda com "despolarització anòxica"(6;7). La intensa despolarització de la membrana neuronal dona lloc a l'alliberació de vesícules pre-sinàptiques carregades de glutamat i altres aminoàcids excitants(8). El glutamat alliberat estimula els canals-receptors NMDA (N-metil-D-aspartat), AMPA (àcid amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoazol propiònic), i els receptors metabotròpics a la neurona postsinàptica. L'estimulació dels receptors NMDA provoca una nova entrada de Ca^{2+} al citosol cel·lular; l'activació dels receptors AMPA augmenta l'entrada de Na^+ , agreujant així l'edema citotòxic (9).

La sobrecàrrega de Ca^{2+} incrementa la permeabilitat de la membrana i estimula proteases, endonucleases i fosfolipases que destrueixen components estructurals de la membrana. A més, incrementa la síntesi d'òxid nítric (NO) i l'activitat de l'òxid nítric sintasa (NOS), participant en el dany cel·lular a través de mecanismes d'estrès oxidatiu (figura 3).

La intervenció terapèutica en qualsevol d'aquests processos per tal d'evitar la mort neuronal o la lesió isquèmica és molt complicada, ja que aquests mecanismes es donen en els minuts posteriors a l'oclusió de l'artèria, quan la possibilitat de rebre un tractament és molt difícil.

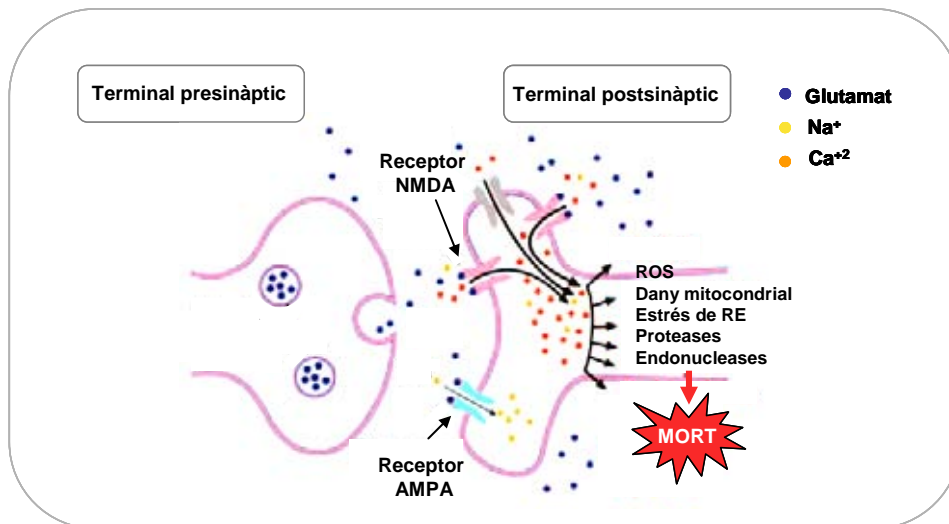


Figura 3. Esquema d'una sinapsi neuronal després del dany isquèmic. Model d'activació patològica dels receptors NMDA i AMPA com a conseqüència de l'alteració de l'homeòstasi del Ca^{2+} . Adaptat de Diaz-Guerra et al. 2009 (10)

En la isquèmia cerebral, es pot produir un dany no només durant la pròpia isquèmia sinó també en el moment de la reperfusió de l'artèria (dany per isquèmia-reperfusió). La formació d'espècies reactives de l'oxigen (ROS, de l'anglès *Reactive oxygen species*) excedeix la capacitat antioxidant de la neurona, ocasionant alteracions en els constituents proteics, lipídics i d'àcids nucleics. Les ROS responsables de l'estrès

oxidatiu són principalment els radicals lliures com l'anió superòxid ($\cdot\text{O}_2^-$), el radical hidroxil ($\cdot\text{OH}$) i l'òxid nítric ($\cdot\text{NO}$), i altres espècies també tòxiques com el peròxid d'hidrogen (H_2O_2) i el peroxinitrit (ONOO^-) (11).

L'acidosi, l'entrada de Ca^{2+} i l'estrès oxidatiu, són processos comuns a totes les cèl·lules del parènquima cerebral afectades per la isquèmia. A diferència de les neurones, les cèl·lules glials no tenen estructures post-sinàptiques, per tant no són especialment sensibles al dany per mecanismes d'excitotoxicitat. La micròglia (cèl·lules inflamatòries residents al cervell) i oligodendròglia (cèl·lules productores de mielina del sistema nerviós central) també contribueixen al dany tissular isquèmic a través de la producció de citocines i radicals lliures. Els astròcits pateixen un procés d'hipertrofia i proliferació, conegut com gliosis reactiva, que es troba relacionat amb mecanismes de neuroprotecció i recuperació de la lesió isquèmica (12).

La reducció del flux cerebral desencadena una **resposta inflamatòria** caracteritzada per l'expressió de gens inflamatoris. Aquests, produeixen una activació local i l'alliberació de citocines, quimiocines, molècules d'adhesió endoteli-leucòcit i enzims proteolítics, els quals propaguen senyals inflamatòries, causant un increment del dany tissular durant dies després de l'aparició dels primers símptomes (13).

Els astròcits, la micròglia, els leucòcits i les cèl·lules endotelials que s'activen mitjançant el procés d'isquèmia produeixen citocines ($\text{IL-1}\beta$, IL-6 , $\text{TNF-}\alpha$) i quimiocines (IL-8 i MCP-1) inflamatòries (14;15). L'alliberació d'aquestes citocines indueix l'expressió de molècules d'adhesió com ICAM-1 , molècules d'adhesió plaqueta-cèl·lula endotelial (PECAM-1) i molècules d'adhesió leucòcit-cèl·lula endotelial (ELAM-1).

La **barrera hematoencefàlica** (BHE) està constituïda per les cèl·lules endotelials, els perícits i els peus dels astròcits. La sobreexpressió de molècules d'adhesió facilita la unió dels neutròfils a la BHE i la seva migració al parènquima cerebral (16).

Les primeres cèl·lules en ser reclutades són els neutròfils (ja en les primeres hores post-isquèmia), però després els segueixen els **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 a més, l'alliberament i producció de més radicals lliures i proteases (com les metal·loproteïnases; MMPs), tant per part dels leucòcits infiltrants, com per part d'algunes cèl·lules del sistema nerviós (17) (veure figura 4).

Les estratègies per intentar reduir o inhibir la resposta inflamatòria tenen una finestra terapèutica més àmplia i poden, per tant, ser més efectives. No obstant, els efectes secundaris beneficiosos de la inflamació, entre els que trobem la reparació del teixit i la remodelació que es produeix durant el procés inflamatori, es perdrien. Per exemple, la reducció dels macròfags que netejarien el teixit de cèl·lules mortes, suposaria una disminució dels factors de creixement secretats a la zona infartada, i per tant l'empitjorament del procés de revascularització (18;19). Així, actualment el paper beneficiós o deleteri de la resposta inflamatòria depèn de la intensitat de la isquèmia i de l'estat del procés isquèmic. Probablement, existeix una modulació temporal bifàsica dels mecanismes inflamatoris, potenciant el dany cerebral en fases primerenques de la isquèmia però ajudant a la recuperació i reparació del dany en fases més tardanes.

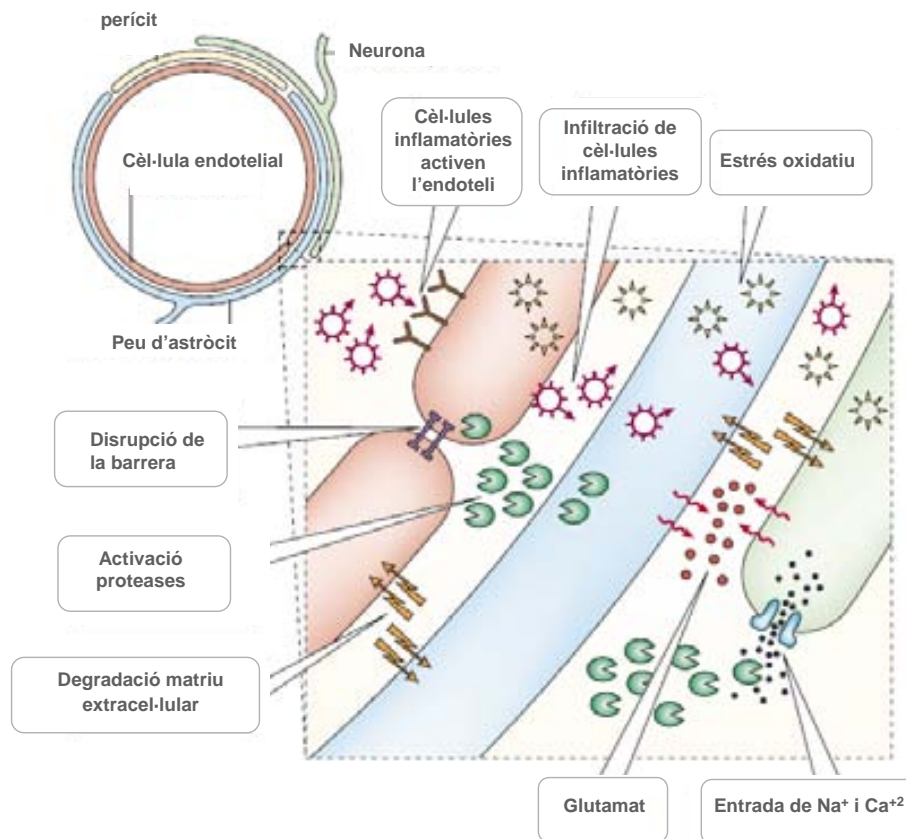


Figura 4. Esquema de la BHE després de la isquèmia. La disrupció de la BHE afavoreix la infiltració de cèl·lules inflamatòries al parènquima cerebral incrementant l'estrès oxidatiu i els processos d'excitotoxicitat neuronal. Adaptat de Lo et al. 2002 (20)

1.3 Tractament trombolític amb l'activador recombinant del plasminogen tissular (rt-PA)

Actualment l'únic tractament disponible per a l'ictus isquèmic és l'administració de l'activador recombinant del plasminogen tissular (rt-PA) dintre de les 4,5h primeres hores des de l'inici dels símptomes (21). El rt-PA és un fibrinolític que junt amb la fibrina del trombus, forma un complex que s'uneix al plasminogen que és degradat produint plasmina que contribuirà a la disgregació de l'èmbol i en conseqüència a la recanalització de l'artèria. Tot i la seva eficàcia, evitant una mort/dependència de cada

set pacients tractats (22), la seva estreta finestra terapèutica i els estrictes criteris d'inclusió fan que menys del 5% del pacients amb ictus isquèmic es puguin beneficiar de la teràpia en països desenvolupats. A més, en un 3-5% dels pacients el tractament trombolític provoca efectes adversos com són l'increment del risc a patir **transformació hemorràgica** (TH) o els efectes neurotòxics, complicacions amb una alta mortalitat (23). La TH apareix com a conseqüència del debilitament de la paret vascular i de la làmina basal que conforma la BHE (figura 5). Lin i col·laboradors varen descriure que fins al 88% dels ictus isquèmics tenien incrementada la permeabilitat microvascular dins les 3 primeres hores després del inici dels símptomes (24). A més, aquesta permeabilitat estava augmentada significativament en els pacients que més tard patien una TH (24).

El baix nombre de pacients que es beneficien del tractament amb rt-PA així com les complicacions hemorràgiques produïdes per aquest, fa que cada cop hi hagi més estudis dirigits a identificar noves dianes terapèutiques que ens permetin aplicar nous tractaments més efectius i segurs amb una finestra terapèutica més ampla amb els que puguem tractar un major nombre de pacients.

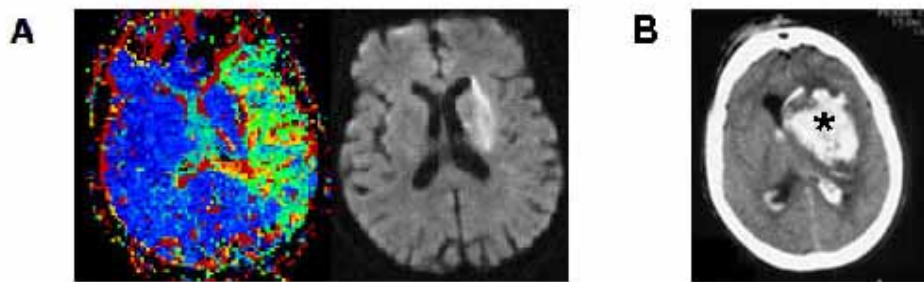


Figura 5. A) Imatge de RM amb tècniques de perfusió (esquerra) i difusió (dreta). La perfusió ens mostra un extens defecte en el territori de la ACM (zona hipoperfosa però potencialment salvable) i la difusió una lleugera alteració (infart) abans del tractament trombolític. **B)** Imatge de TAC que mostra l'aparició d'un sagnat (*) després del tractament amb rt-PA. Adaptat de Cuadrado et al. 2009 (25)

1.4 Noves estratègies terapèutiques en l'íctus

En els últims anys, la **neuroprotecció** ha estat una estratègia extensament estudiada pel tractament de la isquèmia cerebral. El bloqueig de molècules claus en la cascada isquèmica que evitin la mort del teixit danyat en la zona de penombra reduiria el creixement de l'infart i en conseqüència milloraria el dèficit neurològic dels pacients. A més, la teràpia amb neuroprotectors permetria l'administració més tardana d'aquests tractament (fins les 24 hores) (veure figura 6). En els últims 20 anys, aproximadament uns 1000 compostos neuroprotectors (inhibidors de l'alliberació del glutamat, antagonistes del Ca^{2+} i dels receptors NMDA, antiinflamatoris, hipotèrmia...) han estat testats en models animals, i d'ells 114 han estat inclosos en assajos clínics. Tot i això, cap d'ells ha mostrat un benefici terapèutic pels pacients (26).

Davant d'aquests resultats desencoratjadors en la neuroprotecció, cada cop hi ha més estudis dirigits a potenciar molècules endògenes, com ara factors de creixement, els quals ja han demostrat un efecte beneficiós en isquèmia experimental (27-29). En comparació amb molècules que actuen en una única via de senyalització, els factors de creixement tenen un clar avantatge donat els seus efectes pleiotròpics, activant diferents processos importants durant la recuperació del teixit danyat, com l'angiogènesi i la neurogènesi.

Algunes d'aquestes molècules també prenen part en processos de neuroreparació. La **neuroreparació**, és una estratègia terapèutica que englobaria diferents mecanismes patofisiològics que es donen més tardanament en la isquèmia cerebral i que permeten recuperar tant la zona de penombra com formar nous circuits neuronals per restablir les funcions sensorials i motores perdudes (30). L'actuació sobre aquest processos ampliaria la finestra terapèutica a dies i/o setmanes (figura 6), augmentant així el nombre de pacients que es podrien beneficiar d'aquests tractaments. És molt important

destacar el paper que té la plasticitat cerebral en els processos de neuroreparació, és a dir, la capacitat que té el sistema nerviós central per reorganitzar-se anatòmicament i funcionalment en resposta a una demanda fisiològica o un dany com és l'ictus. És en aquest context, on els processos d'angiogènesi, vasculogènesi i neurogènesi tenen un paper rellevant, i és per això que en els últims anys el seu estudi en la isquèmia cerebral ha estat objecte de nombrosos treballs científics.

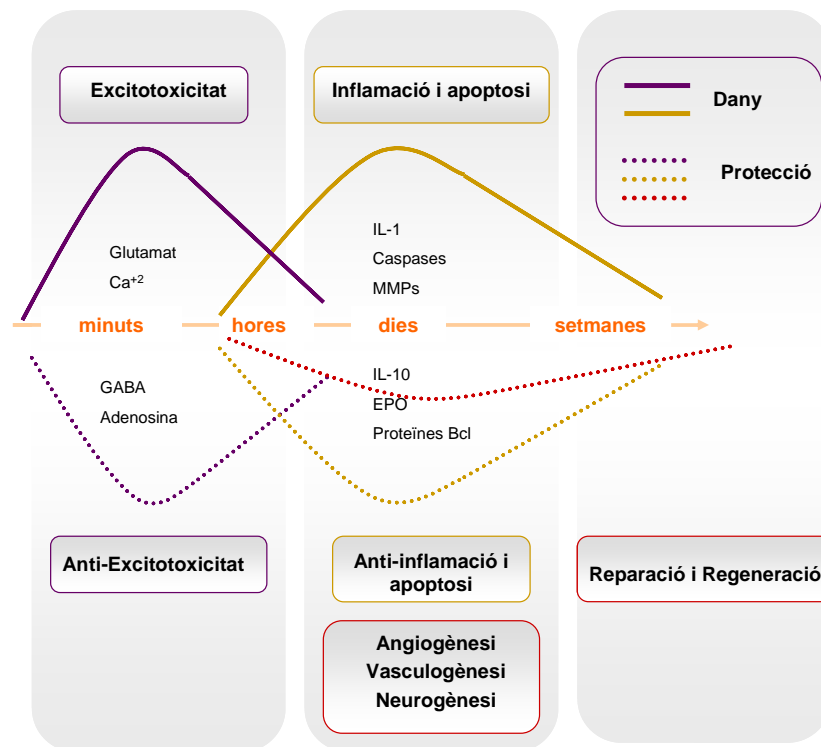


Figura 6. Vies de dany que s'activen i estratègies de protecció que s'han testat després de l'ictus.

1.5 Processos de recuperació: angiogènesi, vasculogènesi i neurogènesi

Històricament, la neurona havia estat considerada l'única cèl·lula amb capacitat de transmissió de senyals i principal component funcional del sistema nerviós central. Per tant, la majoria d'investigacions en la patologia cerebral s'havien centrat en el seu estudi. Tanmateix, en els últims anys ha anat guanyant importància el concepte que la

integració de les funcions i disfuncions cerebrals es dona com a resultat d'una complexa xarxa d'interaccions entre múltiples tipus cel·lulars: neurones, astròcits, oligodendròcits, micròglia i cèl·lules endotelials que formen el parènquima cerebral. Aquest concepte va ser identificat com "**Unitat Neurovascular**" (31) i emfatitza les interaccions cèl·lula-cèl·lula així com la relació entre els diferents components del teixit nerviós i la matriu extracel·lular. La unitat fonamental comprèn la neurona, l'astròcit i l'endoteli, però també els oligodendròcits i els feixos d'axons de la substància blanca (32;33). En la isquèmia cerebral, es produeix un dany en els components de la unitat neurovascular que s'ha de restaurar, processos com l'angiogènesi, la vasculogènesi i la neurogènesi (que es descriuen en detall més endavant) tenen un paper clau en aquesta recuperació i s'ha demostrat que existeixen molts elements comuns entre ells.

L'angiogènesi és el procés mitjançant el qual es produeixen nous vasos sanguinis a partir d'altres ja existents. És un procés àmpliament regulat que es produeix tant en condicions fisiològiques com patològiques. L'angiogènesi té lloc principalment en dues fases: activació i maduració. En la primera es produeix un increment de la permeabilitat vascular, una remodelació de la matriu extracel·lular i una proliferació i migració de les cèl·lules endotelials. Durant la fase de maduració s'inhibeix la proliferació de les cèl·lules endotelials i té lloc la reconstrucció de la làmina basal i el reclutament de perícits i cèl·lules musculars llises per crear l'estructura del vas sanguini i restablir el flux sanguini (34;35) (veure figura 7).

Un fenomen similar però d'origen diferent és la **vasculogènesi**, el procés de formació de vasos sanguinis *de novo*. En l'embrió aquest procés suposa la creació de nous vasos sanguinis a partir dels precursors endotelials (36) (figura 7), però la identificació de les cèl·lules endotelials progenitores (EPCs) en l'adult ofereix un nou marc per a la vasculogènesi més enllà de la fase embrionària (37) (veure figura 7). Les

EPCs també contribueixen al desenvolupament dels vasos sanguinis colaterals mitjançant l'increment del calibre i mida de les connexions arteriolars, procés conegut com **arteriogènesi** (38).

El descobriment de la **neurogènesi** en l'individu adult data de finals del segle XX i va suposar tot un canvi en la concepció del sistema nerviós central ja que aquest deixava d'ésser un sistema estàtic i obria un camp d'investigació molt ampli en les neurociències. Diferents estudis en animals han demostrat que la isquèmia cerebral estimula el procés de neurogènesi endògena de cada individu i que aquesta activació, es dona en zones determinades del cervell adult com l'hipocamp (més concretament en el gir dentat) i en la zona subventricular. És en aquestes zones, on trobem la presència de cèl·lules neurals progenitores, principalment neuroblasts, que tenen la capacitat de migrar a la zona isquèmica malmesa, on poden participar en la recuperació funcional dintre dels processos de plasticitat cerebral del cervell adult (39;40).

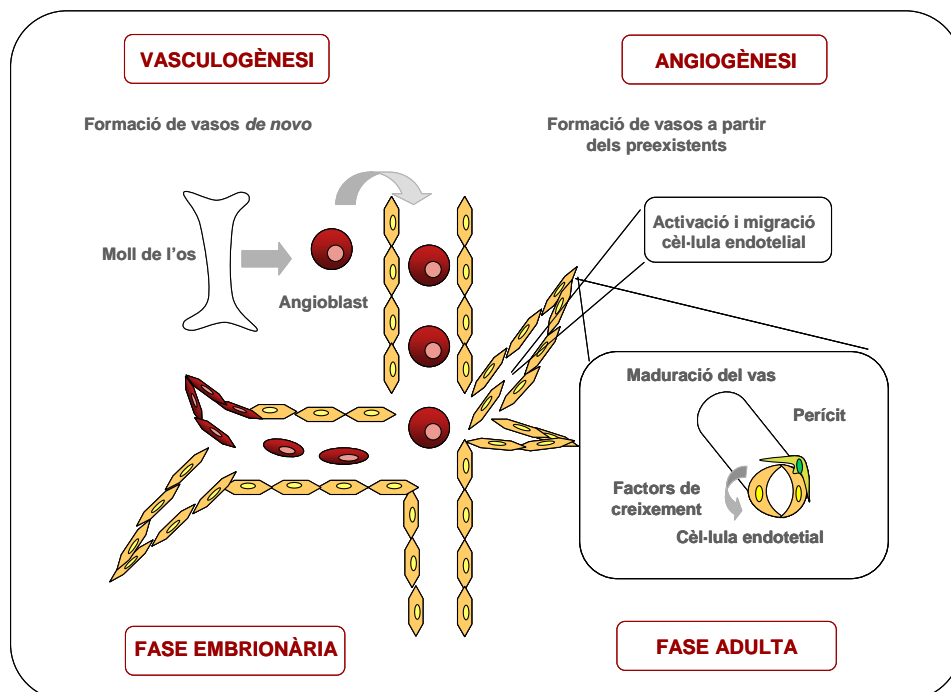


Figura 7. Esquema dels processos de neovascularització que es donen en el desenvolupament embrionari i en l'individu adult. Aquest paradigma va ser revocat amb el descobriment de les EPCs. Adaptat de Dimmeler et al. 2005 (41).

El dany isquèmic generalment es produeix lluny de les zones germinals anteriorment esmentades i, per tant, les cèl·lules progenitores neurals han de migrar, diferenciar-se i proliferar cap a les zones de regeneració on establiran noves connexions cèl·lula-cèl·lula i cèl·lula-matriu. És per això, que és absolutament necessari un entorn vascular que faciliti l'arribada de nutrients i d'oxigen. Però la relació entre la neurogènesi i l'angiogènesi després del dany cerebral és més profunda. Sabem que en les zones germinals del cervell adult els progenitors neurals es troben estretament units a les cèl·lules endotelials, i que els focus d'angiogènesi tenen lloc al mateix temps que la neurogènesi (42). En aquest sentit, estudis recents han demostrat que les cèl·lules endotelials secreten factors essencials per a la diferenciació neuronal en sistemes *in vitro* (43) i que els neuroblasts migren en associació als vasos sanguinis en les zones de l'estriat després de la isquèmia cerebral (44) (figura 8). En models animals s'ha demostrat que en les zones perifèriques a l'infart, en l'anomenat "nínxol neurovascular", s'expressen factors de creixement com el factor derivat de cèl·lules estromals 1 (SDF-1 α) o l'angiopoietina 1 (Ang-1) que actuen directament sobre receptors neurals (CXCR4 i Tie2, respectivament), provocant la migració dels neuroblasts a les zones perifèriques a l'infart. A més, la inhibició farmacològica de l'angiogènesi amb un potent inhibidor d'aquesta (l'endostatina) redueix significativament el nombre de neurones immadures presents en el còrtex peri-infart (45).

Per tant, avui en dia sabem que els fenòmens de neurogènesi i angiogènesi després de la isquèmia cerebral no tan sols es donen de forma paral·lela sinó que es troben íntimament relacionats, parlant alguns autors ja de que la neurogènesi es produeix dintre d'un nínxol angiogènic (45) (figura 8).

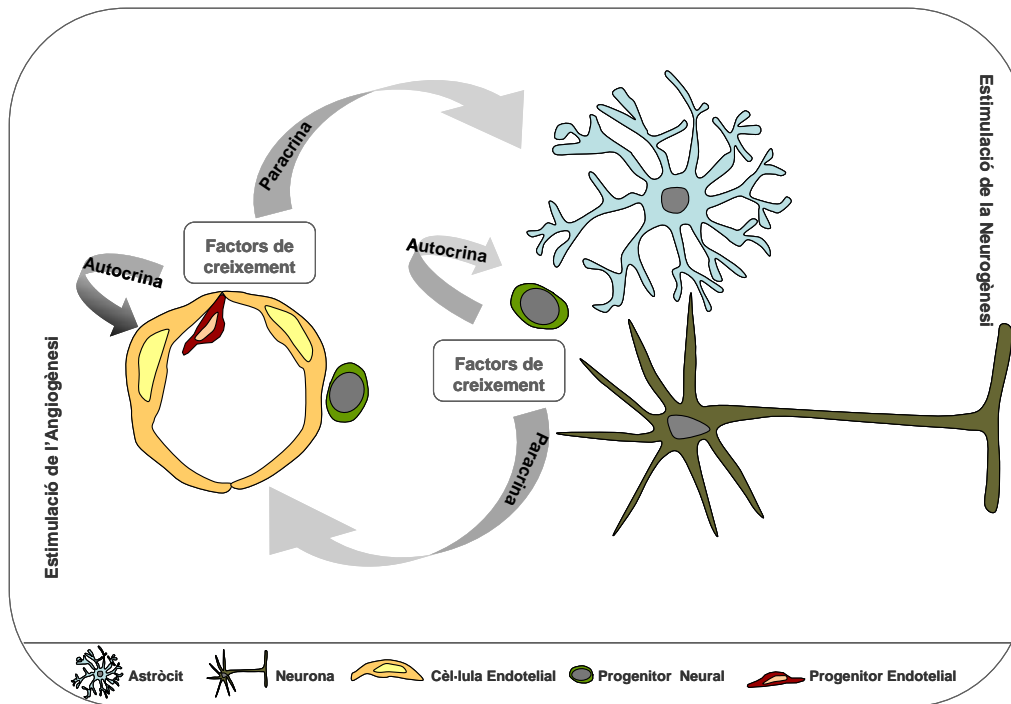


Figura 8. Esquema de l'estimulació recíproca entre l'angiogènesi i la neurogènesi. Adaptat de Navarro et al. 2009. (46)

Aquestes teràpies farmacològiques i cel·lulars es basen, com ja hem mencionat anteriorment, en la capacitat de neuroregeneració i neuroplasticitat cerebral després de la isquèmia cerebral, però encara avui desconeixem quin és el millor moment i en quina zona del cervell serien més efectives. Estudis en models experimentals demostren una activació de les cèl·lules endotelials que envolten la zona infartada ja a les 12-24 h després de la isquèmia cerebral (47-49). Estudis en mostres humanes demostren que es produeix una activació de l'angiogènesi principalment en la zona de penombra després de l'ictus (50). Resultats obtinguts en models experimentals, mostren que la potenciació de l'angiogènesi molt aviat després de la isquèmia amb factors de creixement com el factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF), provoca un increment de la permeabilitat vascular i el trencament de la BHE; en canvi el tractament més tardà augmenta l'angiogènesi en la zona de penombra i millora la recuperació neurològica (27;51). D'altres estudis demostren un increment en

l'expressió de factors inhibidors de l'angiogènesi com l'endostatina i la trombospondina-1 i -2 (TSP-1 i TSP-2) durant la fase aguda de l'ictus (48;52;53). Per tant, els estudis publicats fins al moment mostren que es produeix una activació tant dels promotors com dels inhibidors de l'angiogènesi després de la isquèmia cerebral.

1.6 Cèl·lules progenitores endotelials (EPCs) en la isquèmia cerebral

1.6.1 Definició i caracterització de les EPCs

El descobriment per Asahara i col·laboradors de les **EPCs** ja fa més d'una dècada va obrir una nova disciplina en la biologia vascular (37). Les EPCs són cèl·lules mare adultes derivades del moll de l'os d'origen hematopoiètic, amb capacitat per diferenciar-se a cèl·lula endotelial madura i de formar nous vasos sanguinis totalment funcionals. En l'individu adult, la neovascularització és el procés de restauració o regeneració dels vasos sanguinis danyats. És un procés essencial per a la supervivència del teixit isquèmic afectat i es produeix per tres mecanismes diferents: **angiogènesi**, **vasculogènesi** i **arteriogènesi** (apartat 1.5). Així, durant molts anys es va pensar que els processos d'angiogènesi i arteriogènesi eren els únics responsables de la neovascularització en l'individu adult, i en canvi, la vasculogènesi es considerava que es donava només durant la fase embrionària. Aquest paradigma es va veure revocat quan Asahara i els seus col·laboradors van demostrar que les cèl·lules CD34 i Flk-1 (VEGFR-2 o KDR) positives de la fracció mononuclear aïllada de sang perifèrica de voluntaris sans, tenia la capacitat de formar estructures similars a tubs *in vitro* i, a més, podien incorporar-se als capil·lars de les regions isquèmiques en un model animal d'isquèmia perifèrica (37). Actualment, existeixen més d'11.000 articles publicats sobre EPCs, però tot i la recerca realitzada en aquest camp, encara avui en dia hi ha moltes incògnites per resoldre com per exemple quin és el llinatge exacte d'aquesta població

cel·lular, quins són les diferents subpoblacions que l'integren i quin paper juguen en diferents patologies (54).

El terme EPC engloba diferents subtipus cel·lulars que clàssicament s'han dividit en dos subtipus, en funció de la seva capacitat de diferenciació a cèl·lula endotelial madura *in vitro*: les *early-EPCs* més recentment anomenades *circulating angiogenic cells* (**CACs**), i les *late-EPCs* o també conegudes com *outgrowth-EPCs* (**OECs**). Les dues subpoblacions es diferencien per la seva funcionalitat en cultiu; les CACs apareixen més aviat en el cultiu, als 5-7 dies i tenen una morfologia fusiforme (de l'anglès *spindle-shaped*), mentre que les OECs apareixen a partir de les dues setmanes de cultiu formant una monocapa cel·lular de tipus llamborda (de l'anglès *cobblestone*) (55).

Les taxes de proliferació també són diferents en les dues subpoblacions, les OECs tenen major capacitat de proliferació que les CACs (55). També hi ha diferències en la capacitat d'aquestes cèl·lules per formar capil·lars *in vitro*. Només les OECs tenen potencial per formar túbuls (56), tot i que els factors de creixement secretats per les CACs potencien aquesta capacitat (55;57).

Existeixen majoritàriament dues tècniques per a la seva quantificació que, tot i no ser comparables, ens donen informació complementària: el cultiu cel·lular i la citometria de flux. La primera es fonamenta en la capacitat d'adhesió i diferenciació *in vitro* cap a cèl·lula endotelial, en canvi, la segona es basa en la selecció fenotípica mitjançant el marcatge d'anticossos fluorescents. El cultiu cel·lular ens dona una idea de la capacitat funcional d'aquestes cèl·lules mentre que la citometria de flux ens permet el recompte directe d'aquestes cèl·lules en la circulació perifèrica (sent una població molt poc freqüent) (58;59) (figura 9).

Degut a la manca d'un únic marcador per les EPCs, la combinació de marcadors hematopoètics, endotelials i progenitors ha estat l'estratègia més utilitzada. Clàssicament, els marcadors de superfície utilitzats han estat CD34+, VEGFR-2+ i

CD133+, encara que també s'han utilitzat altres marcadors de cèl·lules endotelials madures com CD31+, CD62E+, CD144+ o el factor von Willebrand o marcadors pel llinatge hematopoietic com el CD14+ i CD45+. Aquest fet evidencia l'heterogeneïtat d'aquesta població.

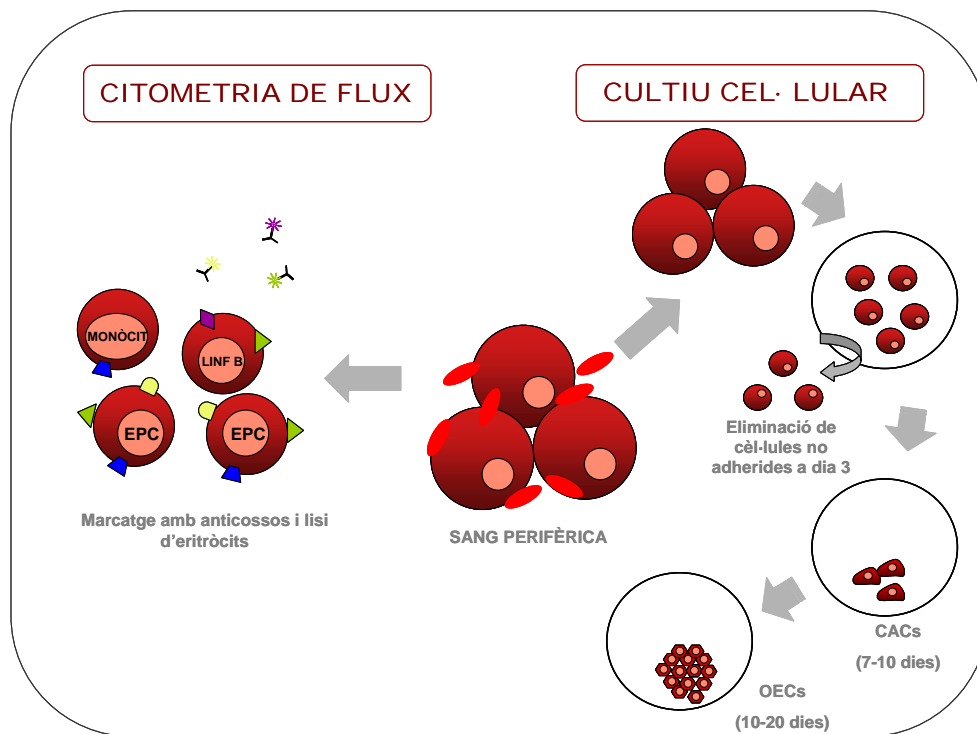


Figura 9. Esquema de la metodologia existent per a l'aïllament d'EPCs a partir de sang perifèrica.

S'han destinat molts esforços en la caracterització d'aquesta població heterogènia i la majoria d'estudis van en la mateixa direcció. El terme EPC englobaria diferents poblacions cel·lulars, però totes aquestes mantindrien la capacitat d'assolir un fenotip endotelial diferenciat i funcional *in vivo* i serien capaces d'estimular l'angiogènesi en cèl·lules endotelials madures. Tot i els múltiples orígens, aquestes cèl·lules mantindrien unes característiques comunes al seu llinatge de cèl·lula mare adulta o progenitora, com el potencial clonogènic i la capacitat proliferativa, fet que no

presenten les cèl·lules endotelials madures amb una capacitat de proliferació més limitada (60;61).

1.6.2 Origen, mobilització i reclutament de EPCs

Les EPCs són cèl·lules derivades del moll de l'os que provindrien d'un antecessor comú entre les cèl·lules hematopoètiques i les cèl·lules endotelials (l'hemangioblast). L'administració de certs factors (citocines, factors de creixement) o l'exercici físic, així com processos endògens com la isquèmia, estimulen la mobilització d'EPCs des del moll de l'os al torrent circulatori (62). Més detalladament, s'ha demostrat que dins del moll de l'os diferents proteases com les elastases, la catèpsina G i la metal·loproteïnasa de matriu 9 (MMP-9) trenquen els enllaços entre les EPCs i les cèl·lules estromals provocant l'alliberació i la migració de les EPCs a la circulació perifèrica (63). La isquèmia provoca l'augment de l'expressió del factor induïble per hipòxia 1α (HIF- 1α). Aquest factor de transcripció, indueix la sobreexpressió de VEGF que, juntament amb altres factors, com el factor derivat de cèl·lules estromals 1α (SDF- 1α) i el factor estimulador de colònies de granulòcits (G-CSF), incrementen els nivells de MMP-9, provocant l'alliberació de les EPCs a la circulació (63). Aquestes cèl·lules migrarien fins al teixit isquèmic i podrien per una banda, estimular l'angiogènesi mitjançant la secreció de factors de creixement, i per l'altra, elles mateixes podrien formar nous capil·lars funcionals (veure figura 9).

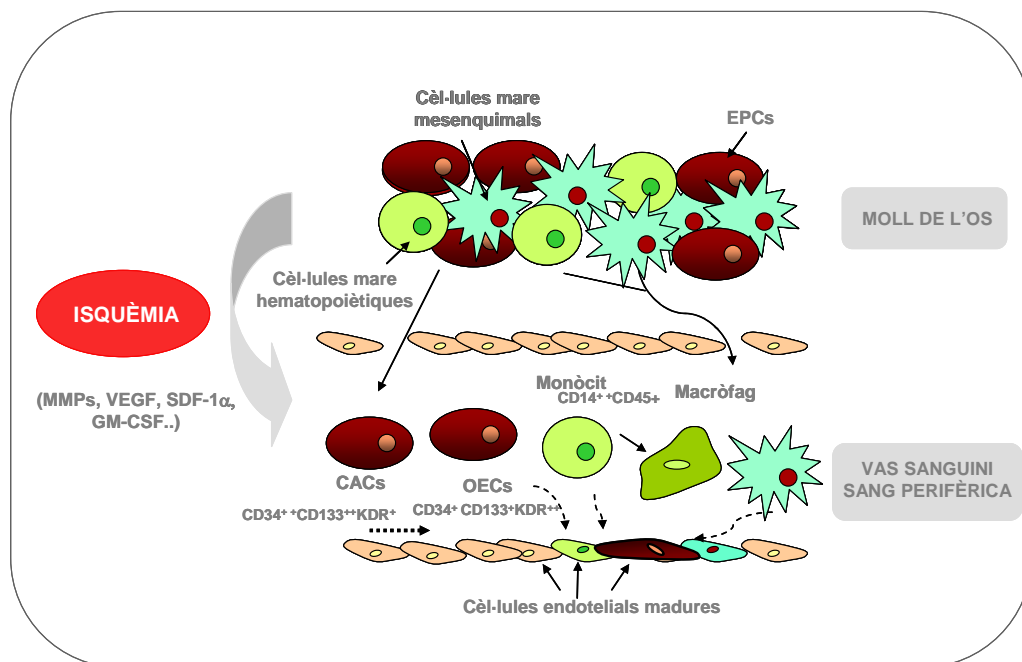


Figura 9. Esquema de la mobilització a sang perifèrica de les EPCs i d'altres poblacions progenitores residents en el moll de l'os després de la isquèmia. Aquestes poblacions cel·lulars poden migrar i diferenciar-se a cèl·lules endotelials madures per reparar el teixit afectat. Adaptat de Shantila et al. 2007.(57)

1.6.3 EPCs i malaltia cerebrovascular

En els darrers anys les EPCs han estat estudiades com a biomarcador de la gravetat de les malalties cardiovasculars i com a possible estratègia terapèutica per a la regeneració del teixit afectat. Estudis en malalties cardíques han mostrat que un baix nombre d'EPCs incrementa el risc de patir una patologia cardiovascular (64;65). En general, es creu que nivells baixos d'aquestes cèl·lules reflecteixen un consum més elevat per restaurar l'endoteli danyat (58). Tot i això, el seu ús com a biomarcador en la pràctica clínica compren certes dificultats, com són els baixos nivells circulants o la influència sobre aquests nivells dels factors de risc cardiovascular (l'edat, el tabaquisme, diabetes, hipercolesterolèmia) o pel consum de fàrmacs com les estatines,

inhibidors de l'enzim conversor de l'angiotensina (ACE) o l'eritropoetina (66). En canvi, la seva utilització com a teràpia cel·lular en l'infart agut de miocardi ja és una realitat. S'han portat a terme uns 14 assajos clínics amb un total de 811 pacients, i tot i que els resultats són difícilment comparables (per les diferents poblacions cel·lulars trasplantades, protocols o objectius clínics utilitzats) els resultats mostren un lleugera millora en la funció cardíaca (67). Així, en altres malalties com en la isquèmia perifèrica o en la hipertensió pulmonar arterial de tipus idiopàtic també s'ha demostrat que el transplantament d'EPCs podria jugar un paper beneficiós millorant el pronòstic dels pacients (68-70).

Tot i l'avanç en l'estudi de les EPCs en altres patologies, el seu paper en l'ictus és avui en dia poc conegut. Estudis en models animals d'isquèmia cerebral han demostrat que la infusió d'EPCs millora el dèficit neurològic i redueix el volum d'infart. A més, aquestes cèl·lules s'incorporen a les arterioles de l'hemisferi isquèmic (71-75).

D'altra banda, els resultats obtinguts fins al moment en pacients amb ictus isquèmic són confusos (veure taula 1). En estudis realitzats en pacients i controls sans alguns autors mostren una disminució dels nivells d'EPCs en pacients amb ictus (76;77) mentre que d'altres n'han descrit un augment respecte als controls (78). Pel que fa al seu ús com a biomarcador pronòstic, els resultats tampoc són concloents. Diferents autors mostren que un major nombre d'EPCs circulants s'associa a un millor pronòstic i una millor funció cerebrovascular al tercer mes (78-80). En canvi, un estudi recent mostra que nivells més alts d'EPCs no s'associen a un millor pronòstic en el moment de l'alta mèdica (81).

Les divergències en la metodologia emprada en els diferents treballs així com la heterogeneïtat dels pacients inclosos dificulta la interpretació dels resultats i fa necessari estudis més amplis on s'estudiïn les diferents subpoblacions, on s'analitzin els nivells d'EPCs per diferents tècniques, i on es determini la capacitat funcional

d'aquestes cèl·lules després de l'ictus isquèmic. Aquest estudis ens permetran establir quin és el paper de les EPCs en la isquèmia cerebral i si el seu ús com a biomarcador pronòstic o com a eina terapèutica pot ser útil en la pràctica clínica.

Taula 1. Estudis en la bibliografia on s'analitzen els nivells d'EPCs en pacients amb malaltia cerebrovascular i controls.

AUTOR	ANY	MOSTRA	TÈCNICA D'ESTUDI	RESULTATS
Rhouf	2009	Sang perifèrica de pacients d'ictus i controls	Citometria i cultiu cel·lular a partir sang perifèrica	EPCs inferiors en pacients comparat amb controls
Cesari	2009	Sang perifèrica de pacients d'ictus	Citometria de flux i recompte de cèl·lules progenitores circulants CPC (CD34+, CD133+) i EPC(CD34+, CD133+, KDR+)	Bon pronòstic associat a major nombre de CPC però no amb EPCs
Yip	2008	Sang de pacients d'ictus i controls	Citometria de flux i recompte de EPCs (CD34, CD31, KDR, CD62E)	Nivells més alts d'EPCs en pacients vs controls i associació amb bon pronòstic
Chu	2008	Sang de pacients d'ictus (agut i crònic) i controls	Cultiu (recompte de CFU) i assaig funcional (efecte de sobrenedants CFU sobre cèl·lules endotelials)	Menys CFUs i reducció de la capacitat tubulogènica en pacients ictus agut vs ictus crònic o controls.
Jung K-H	2008	Sang perifèrica de pacients d'ictus i controls	Cultiu de outgrowth endothelial cells i neuronal outgrowth cells	Incorporació de neuronal outgrowth cells en teixit isquèmic
Sobrinó T	2007	Sang perifèrica pacients d'ictus	Cultiu (recompte de CFU)	Bon pronòstic (NIHSS<12) major nombre de CFU
Ghani U	2005	Sang de pacients d'ictus (agut i crònic) i controls	Cultiu (recompte de CFU)	Nivells inferiors en pacients d'ictus (agut i crònic) vs controls
Taguchi A	2004	Sang perifèrica de pacients d'ictus	Citometria de flux i recompte de CD34+ i CD133+	Més cèl·lules CD34+ amb més flux sanguini cerebral i més CD133+ en pacients amb menys nombre d'infarts.

1.7 Estimulació de la neovascularització mitjançant factors de creixement

La teràpia cel·lular sembla ser una bona estratègia terapèutica en malalties cardiovasculars. Tot i això, les reaccions del sistema immune al transplantament de cèl·lules així com el baix nombre de cèl·lules progenitores existents, fan que ens trobem amb importants limitacions pràctiques i tècniques que dificulten la seva aplicació clínica. És per això, que la potenciació dels processos angio-neurogènics en el sistema nerviós mitjançant múltiples factors que s'expressen de forma endògena podria

ajudar a la recuperació del teixit isquèmic, evitant així els efectes adversos de la teràpia cel·lular.

Molts factors de creixement són proteïnes multifuncionals que potencien els processos de neovascularització per diferents vies i actuen sobre diferents tipus cel·lulars. El **VEGF** o el factor de creixement dels fibroblasts (**FGF**) actuen principalment sobre cèl·lules endotelials promovent la seva proliferació, migració i la seva activitat tubulogènica, així com també inhibint l'apoptosi (82). D'altra banda, el factor de creixement dels hepatòcits (**HGF**) té una gran capacitat per promoure l'angiogènesi de les cèl·lules endotelials, però també d'estimular la mobilització de cèl·lules progenitores hematopoiètiques (83). Altres factors, com ara el factor de creixement derivat de plaquetes (**PDGF**), activen els receptors de VEGF 1 i 2 (**VEGFR-1** i **VEGFR-2**) amplificant el senyal i actuant sinèrgicament amb el VEGF (84). Donada la vida mitja limitada d'aquests factors, així com la dificultat per travessar la BHE, alguns investigadors han centrat els seus estudis en el tractament amb aquests factors mitjançant transferència gènica. En aquests estudis s'ha demostrat l'efecte beneficiós de la transferència gènica amb el factor de creixement d'unió a heparina similar al factor de creixement epidèrmic (**HB-EGF**), millorant la recuperació funcional dels animals tractats després de la isquèmia cerebral (85).

Altres factors com citocines o algunes hormones també han demostrat ser potents promotors de l'angiogènesi. Així, hormones com la trombopoetina (**TPO**) o citocines com l'**SDF-1 α** i el factor estimulador de colònies de granulòcits i macròfags (**GM-CSF**) també actuen activant les cèl·lules endotelials i potenciant la seva funció angiogènica o mobilitzant cèl·lules progenitores del moll de l'os (86;87).

A més, de les funcions angiogèniques, molts d'aquests factors també presenten propietats neurogèniques, ampliant per tant el seu efecte potencial en la recuperació del teixit afectat després de la isquèmia cerebral. Per exemple, el factor de creixement

dels queratinòcits (**KGF**) o el VEGF han mostrat tenir un efecte neuroprotector potenciant la supervivència de les neurones (88).

Tot i que el paper que juguen els inhibidors angiogènics en la patologia cerebrovascular és poc conegut, avui en dia sabem que també es modulen després de la isquèmia cerebral (48;53). Existeixen diferents tipus d'inhibidors essent alguns d'ells fragments de proteïnes endògenes amb activitat anti-angiogènica.

L'**angiostatina**, per exemple, és un fragment intern del plasminogen i s'ha demostrat que actua inhibint l'adhesió i migració de cèl·lules endotelials (89). Es genera a partir del trencament del plasminogen a plasmina mitjançant el tPA o l'activador del plasminogen de tipus urinari (uPA). La plasmina és processada per serina proteases generant els fragments que seran processats posteriorment per les MMPs i que tindran com a resultat final l'angiostatina.

L'**endostatina**, per la seva banda, és una altra molècula angiostàtica que prové del trencament proteolític del col·lagen XVIII per diferents proteases com les elastases, la catèpsina L o les MMPs, provocant l'alliberament del fragment carboxiterminal NC-1 de 20-kD (90) (figura 10). L'endostatina és, per tant, un component de la membrana basal que pot interactuar amb altres components com el col·lagen IV i VI i que s'uneix a un ventall molt ampli de molècules com ara a les integrines, les tropomiosines o als heparan sulfats participant així en el control de l'angiogènesi (91). La seva expressió és majoritàriament perivascular encara que en gliomes s'ha descrit també en macròfags o micròglia (92) i més recentment també en neurones (93). La seva acció ha estat molt estudiada, principalment en càncer, ja que s'ha utilitzat com a inhibidor de la invasió tumoral. Així, doncs, s'ha observat la seva capacitat per impedir l'acció de promotors angiogènics com el FGF o el VEGF, inactivar les MMPs, inhibir la migració i proliferació i per promoure també l'apoptosi de cèl·lules endotelials (94). El tractament

de cèl·lules endotelials amb endostatina provoca la sobreexpressió de molts gens suggerint que el seu efecte pot ser el resultat de l'alteració de múltiples vies (95).

La **trombospondina-1** i **-2** (TSP-1 i -2) són glicoproteïnes que formen part de la matriu extracel·lular i que s'uneixen a un receptor específic, anomenat CD36. Són inhibidores endògenes de l'angiogènesi que actuen activant l'apoptosi de les cèl·lules endotelials a través del lligand de Fas (FasL) i de la caspasa 3 (96), inhibint la proliferació així com també la migració a través d'MMP-2. Es van descriure com a producte de secreció de les plaquetes activades, però també les sintetitzen els fibroblasts, les cèl·lules endotelials i les cèl·lules musculars llises.

Tenint en compte que l'angiogènesi és un procés altament regulat i que diferents treballs demostren que els inhibidors angiogènics poden jugar un paper important després de la isquèmia cerebral (53;97), estudiar quina és la seva modulació en pacients amb ictus isquèmic és de cabdal importància.

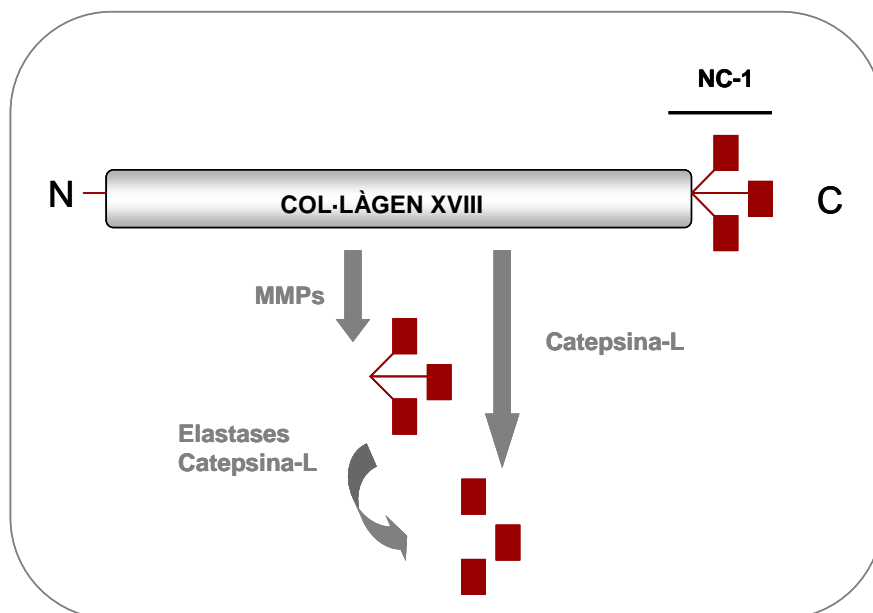


Figura 10. Esquema de la formació de l'endostatina pel trencament proteolític de del col·lagen XVIII.

1.8 Biomarcadors pronòstic en l'ictus

L'any 2001 es va publicar la definició oficial de marcador biològic o biomarcador; es va definir com: aquella característica que pot ser mesurada de forma objectiva i avaluada com a indicador de processos biològics normals, processos patològics o respostes farmacològiques a una intervenció terapèutica (98). Marcadors biològics que ens permetin realitzar el diagnòstic o que ens ajudin en el tractament de l'ictus (per tal d'evitar les complicacions hemorràgiques degudes al tractament trombolític), així com també a determinar-ne l'etiologia, o que ens donin informació sobre el pronòstic dels pacients serien de gran utilitat en la pràctica clínica (99).

El coneixement de la patofisiologia de l'ictus és essencial per tal d'identificar molècules que puguin funcionar com a biomarcadors. És en aquest sentit, doncs, que els diferents processos que tenen lloc després de l'ictus com són la inflamació, el dany per reperfusió o els mecanismes implicats en les complicacions hemorràgiques, han estat objecte d'estudi per part de molts investigadors. Tanmateix, en la patologia cerebrovascular tot i el gran nombre d'estudis realitzats encara ens trobem amb resultats preliminars que dificulten el seu ús generalitzat (100).

Per altra banda, l'estudi dels processos neuroreparadors, com l'angiogènesi, el qual té lloc després de la isquèmia cerebral, també ens poden aportar nous biomarcadors en el pronòstic clínic dels pacients. Com ja hem explicat en l'apartat 1.5, l'angiogènesi té un doble paper dins de la isquèmia cerebral: estudis experimentals han demostrat que la seva potenciació exògena durant la fase aguda de l'ictus incrementa la inestabilitat de la BHE i per tant, podria incrementar les complicacions hemorràgiques. En canvi, la seva estimulació en una fase més tardana ajudaria a la recuperació del teixit afectat (51). Per tant, trobar un biomarcador que ens ajudés a determinar el millor moment per potenciar l'angiogènesi seria de gran ajuda a la pràctica clínica.

L'estudi de molècules endògenes promotores i inhibidores de l'angiogènesi, així com l'anàlisi dels nivells d'EPCs en pacients després d'un ictus isquèmic i l'associació d'aquests nivells amb diferents paràmetres de pronòstic clínic, són de gran importància per tal d'establir si els processos d'angiogènesi i vasculogènesi poden ser eines útils com a biomarcadors en l'ictus isquèmic.

2. OBJECTIUS

Els objectius principals d'aquesta tesi són:

- Realitzar una revisió sistemàtica de la literatura sobre el coneixement actual de les tècniques d'estudi, possible ús com a biomarcador i implicació terapèutica de les EPCs en la isquèmia cerebral.
- Estudiar els nivells d'EPCs mitjançant diferents tècniques (citometria de flux i cultiu cel·lular) en pacients amb un ictus isquèmic tractats amb rt-PA i en controls sans.
- Determinar la funcionalitat *in vitro* de diferents subpoblacions d'EPCs en les diferents fases de l'ictus (aguda i subaguda) isquèmic tractats amb rt-PA i en controls sans.
- Estudiar els nivells de diferents promotors (GM-CSF, PDGF-AA, PDGF-BB, HGF, FGF, VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, HB-EGF, TPO, KGF i SDF-1 α) i inhibidors (endostatina, angiostatina, TSP-1 i TSP-2) angiogènics en plasma de pacients amb ictus isquèmic tractats amb rt-PA i controls sans.
- Determinar si els factors o els balanços entre promotors i inhibidors de l'angiogènesi s'associen amb el risc a partir TH i amb diferents paràmetres de pronòstic clínic.

3. MATERIALS I MÈTODES

3.1 Protocol clínic, pacients i mostres biològiques utilitzades

Els pacients inclosos en tots els estudis realitzats van ser atesos al servei d'Urgències o a la Unitat d'Ictus de l'Hospital Vall d'Hebron de Barcelona. Tots els estudis que es detallen van ser aprovats pel comitè ètic de l'Hospital Vall d'Hebron i en tots els casos es va demanar un consentiment informat als pacients o familiars.

Tots els pacients presentaven un ictus isquèmic de menys de 3 h d'evolució per oclusió de l'Artèria Cerebral Mitja (ACM), comprovat mitjançant tècniques de Doppler Transcraneal, i havien rebut tractament trombolític (rt-PA, 0,9 mg/kg). Es van emprar les tècniques de neuroimatge (ressonància magnètica i/o TAC cranial) per tal de valorar l'evolució de l'infart i l'aparició de TH. Aquestes es van classificar segons els criteris de Pessin (101) i ECASS-1 (21): HI-1 (infart hemorràgic de tipus 1): amb puntejat hemorràgic al voltant de l'infart; HI-2 (infart hemorràgic de tipus 2): amb puntejat dins de l'infart però sense efecte de massa; PH-1 (hemorràgia parenquimatososa de tipus 1): no superior al 30% de l'infart; PH-2 (hemorràgia parenquimatososa de tipus 2): superior al 30% de l'infart i amb efecte de massa significatiu.

Es va fer un seguiment de l'oclusió de l'artèria mitjançant Doppler Transcraneal realitzat per un neuròleg experimentat, per tal de valorar la recanalització induïda per rt-PA i es va estudiar l'estat del vas durant les següents 48 h. L'oclusió i el grau de recanalització es van classificar seguint els criteris TIBI (102). L'aparell utilitzat va ser un Multi-Dop X/TCD DWL (Electroniche Systeme GmbH) amb la sonda de 2MHz.

La valoració de la situació neurològica i la gravetat de l'ictus es va realitzar mitjançant l'escala NIHSS (de 0 a 42, puntuació de menys a més gravetat), que permet valorar el dèficit neurològic i la millora o empitjorament a curt termini (dies, setmanes). En aquest sentit també es va determinar el grau d'afectació funcional al tercer mes mitjançant l'escala de Rankin modificada (mRS). Aquesta mesura ens

permet valorar la dependència o independència del pacient a l'hora de fer les tasques quotidianes al tercer mes. Una puntuació superior a 2 en l'escala mRS implica que el pacient és incapaç de realitzar les tasques quotidianes de manera independent.

A continuació es detalla el nombre de pacients inclosos en cadascun dels estudis:

3.1.1 Grups de pacients per a l'estudi dels nivells de promotors i inhibidors angiogènics

Les mostres sanguínies per realitzar l'estudi de promotors i inhibidors angiogènics en plasma es van obtenir de 29 pacients. Per tal d'establir el perfil temporal d'aquestes molècules es van fer extraccions a diferents temps: abans de les 3 h des de l'inici dels símptomes (temps basal), a 1 h, 2 h, 12 h i 24 h després d'haver rebut el tractament trombolític, en el moment de rebre l'alta mèdica (entre 3 i 7 dies) i als tres mesos.

Com a grup control es van utilitzar mostres sanguínies de 26 voluntaris sans de la mateixa edat i sexe sense antecedents neurològics o cerebrovasculars, cardiovasculars, malalties autoimmunes ni càncer. Posteriorment es va ampliar el grup d'estudi incloent més pacients que havien patit un ictus isquèmic (n=80). D'aquests pacients en vam valorar els nivells d'endostina a temps basal i a les 24 h després del tractament amb rt-PA.

Per a la determinació dels nivells plasmàtics del promotor angiogènic GM-CSF es van incloure un total de 43 pacients amb un ictus isquèmic tractats amb rt-PA, i un grup de voluntaris sans (n=19) sense antecedents neurològics, cerebrovasculars, malalties cardiovasculars, autoimmunes ni càncer. Es recollien les mostres sanguínies dels pacients i controls en tubs amb l'anticoagulant EDTA, després se centrifugaven a 3.000 rpm durant 15 min a 4° C i es guardava el sobrenedant (plasma) congelat a -80° C fins al seu processament.

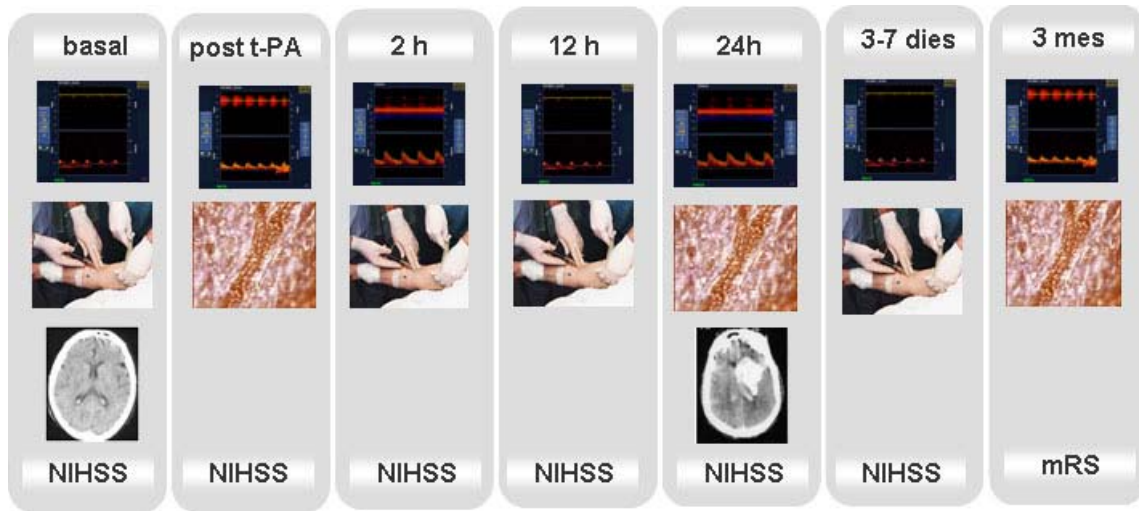


Figura 11. Esquema del protocol de seguiment i obtenció de mostres.

3.1.2 Grup de pacients per a l'estudi d'aïllament i diferenciació d'EPCs

Per l'estudi de les EPCs es van extreure mostres sanguínies d'un total de 30 pacients, els quals es van agrupar en dos grups d'estudi: 12 pacients amb menys de 24h d'evolució des de l'inici dels símptomes (ictus en fase aguda) i 18 pacients que feia entre 3 i 7 dies que havien patit l'esdeveniment isquèmic (ictus en fase subaguda). Com a grup control es van utilitzar mostres sanguínies de 16 voluntaris sans de la mateixa edat i sexe sense antecedents neurològics o cerebrovasculars, cardiovasculars, malalties autoimmunes ni càncer.

Per a l'aïllament i diferenciació de les EPCs vam utilitzar la fracció mononuclear procedent de sang total (aproximadament uns 20 ml) i el protocol que vam utilitzar es detalla a l'apartat 3.3.1.

3.1.3 Grup de pacients per a la quantificació d'EPCs mitjançant citometria de flux

L'estudi per citometria de flux es va realitzar en un grup de 18 pacients amb ictus que també havien rebut tractament trombolític: 9 amb ictus en fase aguda i 9 en fase subaguda. Com a grup control es van utilitzar mostres sanguínies de 16 voluntaris sans de la mateixa edat i sexe sense antecedents neurològics, cerebrovasculars, cardiovasculars, malalties autoimmunes ni càncer.

Per a la quantificació d'EPCs circulants vam utilitzar sang total (10^7 leucòcits per mostra), i el protocol que vam utilitzar es detalla en l'apartat 3.3. Els nombre de pacients inclosos en cada estudi es detalla a la taula 2.

Taula 2. Nombre de pacients i controls en cada estudi realitzat

ESTUDI	PACIENTS	CONTROLS
Promotors i inhibidors	29	26
Endostatina	80	
GM-CSF	43	19
EPC cultiu	30	16
EPC citometria	18	16

3.2. Tècnica de citometria de flux

La determinació dels nivells d'EPCs circulants en sang perifèrica es va realitzar mitjançant l'anàlisi per citometria de flux. Aquesta tècnica és una eina d'anàlisi que permet discriminar partícules de diferent mida i color, permetent la detecció de la població cel·lular d'interès mitjançant el seu marcatge amb anticossos (figura 12).

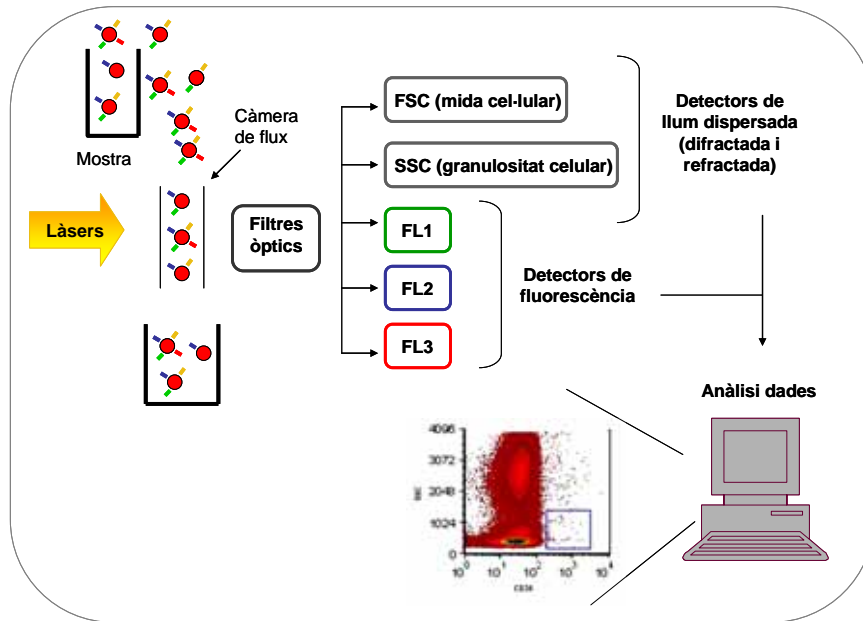


Figura 12. Esquema del funcionament d'un citòmetre de flux. El làser incideix sobre la mostra i excita els fluorocroms que marquen les cèl·lules, la llum dispersada ens dona informació sobre la mida i la granulositat del citoplasma cel·lular (monòcits, limfòcits o granulòcits) i la fluorescència en dona informació sobre el marcatge específic de la població d'interès.

A partir de sang total de pacients i controls es va realitzar el recompte de leucòcits mitjançant la tinció de Turk (0,01% tinció de Giemsa i 3% àcid acètic en aigua bidestil·lada). En totes les mostres es va partir de 10^7 leucòcits totals. Se centrifugava la sang total a 4.000 rpm durant 5 min a 4 °C i es descartava el plasma.

El precipitat cel·lular resultant es resuspensia amb 500 µl de solució de bloqueig procedent de sèrum humà AB (cedit pel Banc de sang i de teixits de l'Hospital Vall d'Hebron) durant 10 min a TA. Pel marcatge de les EPCs s'empraven anticossos monoclonals marcats amb diferents fluorocroms: 2 µg/ml CD45-FITC (Becton Dickinson Biosciences, NJ, USA), 2 µg/ml CD133-APC (Miltenyi Biotec, CA, USA), 0,5 µg/ml CD14-PE-Cy7 (BD Biosciences), 0,04 µg/ml KDR-biotina (Sigma-Aldrich, MO, USA) i 0,5 µg/ml CD34-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences). Per a la discriminació de restes cel·lulars i cèl·lules sense nucli s'utilitzà Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich,

Espanya) a una concentració final de 5 µg/ml. El marcatge es va realitzar a TA durant 30 min protegit de la llum.

Un cop marcades se centrifugaven les mostres a 4.000 rpm durant 5 min a 4 °C i es resuspenia el precipitat amb clorur d'amoni (tampó de lisi d'eritròcits), deixant-ho horitzontalment a TA durant 15 min. Després es tornava a centrifugar a 4000 rpm 5 min a 4 °C. Finalment, es resuspenia amb PBA (1% BSA, 0.1% azida sòdica en PBS) fins a un volum final d'1 ml. Abans d'analitzar-la, la mostra es filtrava a través de filtres estèrils de 30 µm (Partec, Alemanya). El citòmetre de flux utilitzat va ser un MoFloW (Dako, USA) i es van adquirir 10⁶ events per cada mostra amb el programa Summit 4.3. L'anàlisi es va realitzar amb el programa FCS Express (De Novo software, USA).

3.3. Tècniques de cultiu cel·lular

3.3.1 Aïllament i diferenciació d'EPCs a partir de sang perifèrica humana

A partir de sang total (tant de pacients com de controls) es va aïllar la fracció mononuclear pel mètode de Ficoll-Paque Plus™ (GE Healthcare, USA). Aquesta tècnica permet l'aïllament de cèl·lules mononuclears (MNC) a partir de sang total mitjançant un gradient de densitat. La capa de MNC es diposita en una interfase entre el plasma i el Ficoll i en els sediments queden els granulòcits, les plaquetes i els eritròcits (figura 13).

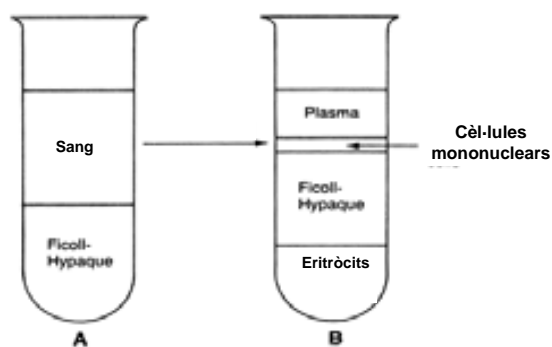


Figura 13. Esquema de l'aïllament de la fracció mononuclear de sang perifèrica pel mètode de Ficoll. A) abans del processament i B) després del processament.

Es va seguir el protocol estàndard. A partir d'aproximadament 20 ml de sang total recollida en tubs amb EDTA, es va diluir la sang 1:1 en tampó fosfat salí (PBS) complementat amb 2% de sèrum fetal boví (FBS) (Invitrogen,USA). En tubs falcon de 15ml s'afegien 5ml de Ficoll a la part inferior i 7 ml de sang diluïda a la part superior, amb molt de compte de no barrejar les dues fases. Se centrifugaven els tubs a 1400 rpm durant 30 min a TA i es recollia la capa de MNC i es transferia a un tub falcon de 50ml.

Se centrifugava el tub durant 10 min a 1500 rpm a TA i es descartava el sobrenedant. Per lisar els eritròcits, s'afegien 6 ml de solució de lisi d'eritròcits (155 mM NH_4Cl , 10 mM NaHCO_3 , 0,12 mM EDTA) es barrejava per pipeteig durant 2 min i se centrifugava a 1500 rpm durant 5 min a TA. Un cop descartat el sobrenedant es feien dos rentats de 10 min a 1500 rpm a TA amb el propi medi de cultiu EGM-2TM (Cambrex, USA) que conté el medi basal EBM-2TM complementat amb diferents factors de creixement (0,04% hidro cortisona, 0,4% hFGF, 0,1% VEGF, 0,1% R³-IGF-1, 0,1% àcid ascòrbic, 0,1% hEGF, 0,1% gentamicina-amfotericina i 0,1% heparina) i 10% FBS per al creixement de les EPCs.

Es resuspenia el precipitat amb 10 ml d'EGM-2TM i se sembraven 10⁷ cèl·lules/ml en plaques NunclonTM delta surface (Nunc) de 12 pous precotinades prèviament amb fibronectina (10µg/ml) durant 30 minuts a 37°C (BD Biosciences,USA).

Es canviava el medi per primera vegada 3 dies després de la sembra i posteriorment cada dos dies. Es van obtenir imatges a 200 augments amb un microscopi Olympus BX71 de 5 camps aleatoris de cada pou a diferents temps: 3, 7 i 10 dies . Les imatges es van analitzar amb el programa DP Controller i Manager (Olympus).

Per tal de quantificar la capacitat de diferenciació endotelial de les EPCs circulants en pacients i controls es van contar el nombre de cèl·lules estirades (CACs) per cada camp. Es van mantenir les cèl·lules en cultiu durant dues setmanes per determinar l'aparició i la posterior expansió de les OECs (figura 14).

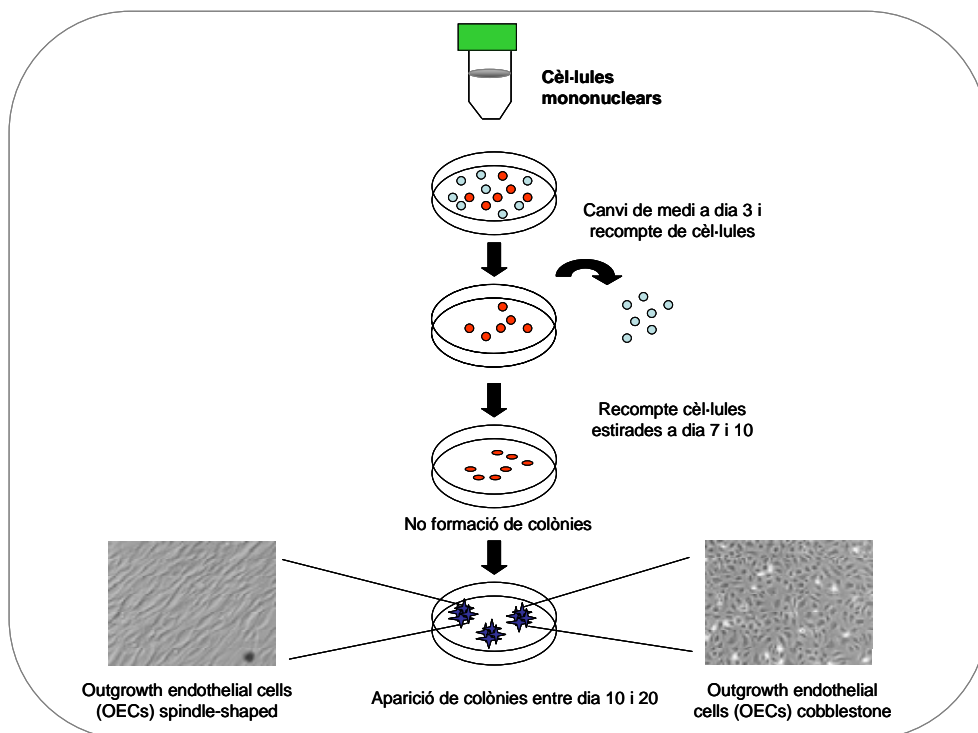


Figura 14. Esquema del protocol emprat per a l'aïllament de CACs i d'OECs a partir de sang perifèrica de pacients i controls

3.3.2 Subcultiu, recompte i manteniment d'EPCs

Els diferents subtipus d'EPCs (CACs i OECs) es mantenien en creixement en medi EGM-2™, en un incubador amb atmosfera humida amb un 5% de CO₂ a 37°C. Es canviava el medi per primer cop al tercer dia i després cada dos dies, fins que les cèl·lules arribaven al 90% de confluència. Un cop les cèl·lules estaven confluentes es procedia a la tripsinització. Els experiments amb OECs es van realitzar amb cèl·lules fins al passatge 10.

3.3.2.1.1 Subcultiu

Per a l'expansió de les EPCs, les cèl·lules eren sotmeses a un procés de tripsinització que trencava les unions entre les cèl·lules i la superfície on es trobaven adherides i se sembraven a una densitat adequada en una altra placa. Abans de la tripsinització, es rentaven les plaques amb PBS per tal d'eliminar les restes d'FBS, que inactivarien la tripsina. Seguidament, s'afegien 35 µl/cm² de tripsina-EDTA (Invitrogen, USA) i s'incubava la placa a 37°C durant 5 min. L'acció de la tripsina es parava amb un volum de medi complet tres vegades superior al de tripsina i se centrifugava la suspensió durant 5 min a 1.000 rpm. El precipitat es resuspensia amb medi complet i es procedia al recompte cel·lular mitjançant el principi d'exclusió del colorant vital Blau de Tripà en cambra de Neubauer. Una vegada es coneixia el nombre de cèl·lules, es diluïa la suspensió inicial per tal d'obtenir la densitat cel·lular adequada per sembrar les noves plaques.

3.3.2.1.2 Recompte cel·lular

Per realitzar el recompte cel·lular, es diluïa una mostra de la suspensió cel·lular amb Blau de Tripà 1:2. Es vortejava la solució i es feien entrar per capil·laritat uns 15 µl de la mescla per un dels costats de la cambra. Es contaven les cèl·lules viables (cèl·lules

amb la membrana plasmàtica intacta i que exclouen el colorant) dels quatre quadrants externs de la cambra. L'àrea d'un quadrant equival a una superfície d'1 mm² i com que la separació entre el cobreobjectes i la cambra és de 0,1 mm, el volum de cada quadrant és de 0,1 µl. Per tant, el nombre de cèl·lules/ml s'obté en multiplicar per 10⁴ la mitjana de cèl·lules contades per cada quadrant. Tenint en compte la dilució realitzada inicialment en afegir el colorant i el volum de suspensió, es determinava el nombre de cèl·lules/ml de la mostra i el nombre total de cèl·lules obtingudes.

3.3.3 Emmagatzematge de cèl·lules

La preservació de les cèl·lules es realitzava satisfactòriament congelant les cèl·lules a -80 °C (per períodes no superiors a tres mesos) o en nitrogen líquid, i en presència d'un agent crioprotector com el dimetilsulfòxid (DMSO) (Sigma, Espanya). Aquest agent protegeix les cèl·lules del dany físic produït per la formació de cristalls de gel i de l'alteració osmòtica provocada per l'increment de la concentració de sals en el medi extracel·lular. En general, es recomana que la congelació es faci paulatinament per evitar la formació de cristalls de gel intracel·lulars, mentre que la descongelació s'ha de fer de manera brusca, per tal d'augmentar la supervivència de les cèl·lules.

3.3.3.1 Congelació

El procediment de congelació el vam seguir per les OECs. Les cèl·lules es feien créixer en medi complet i es tripsinitzaven com en el subcultiu (apartat 3.3.2.1). Es feia el recompte cel·lular en una cambra de Neubauer com es detalla en l'apartat 3.3.2.2. Un cop determinat el nombre de cèl·lules inicials, se centrifugava la suspensió inicial durant 5 min a 1.000 rpm. Mentre es realitzava la centrifugació, es preparava el medi de congelació. Aquest consistia en EGM-2TM amb un 20% de FBS i un 10% de DMSO. Es resuspenien les cèl·lules en el medi de congelació a una densitat de 10⁶ cèl·lules/ml.

Es preparaven alíquotes d'1.5 ml en criotubs de 2 ml de capacitat i es col·locaven els criotubs al congelador de -80 °C en una caixa amb un sistema de congelació amb alcohol isopropílic; d'aquesta manera s'aconseguia congelar les cèl·lules a una taxa de descens de la temperatura de 1-3 °C/min. Es deixava a -80 °C durant un període de 3 mesos com a màxim. Per períodes més llargs, i passades un mínim de 24 hores a -80°C, es portaven els criotubs al tanc de nitrogen líquid.

3.3.3.2 Descongelació

El procediment de descongelació el vam seguir per les OECs Per portar a terme aquest procés, s'extreien els criotubs del tanc de nitrogen i s'introduïen ràpidament en un bany de 37 °C, sense submergir-los del tot. Un cop descongelada la suspensió cel·lular, es transferia el contingut del criotub a un tub falcon i se centrifugava a 1.000 rpm durant 5 min, per tal d'eliminar el DMSO i les possibles restes cel·lulars. Després se sembraven les cèl·lules en un flascó de 25 mm² que contenia 5 ml de medi EGM-2TM prèviament temperat a 37 °C. A partir d'aquest punt, les cèl·lules es mantenien com es descriu en l'apartat 3.3.1.

3.3.4 Immunocitoquímica

Per al fenotipatge tant de les CACs com de les OECs vam utilitzar la immunocitoquímica. Se sembraven les cèl·lules en una placa a la densitat desitjada i es deixaven créixer durant 24 h abans del marcatge. Es rentaven les cèl·lules amb PBS tres vegades i es fixaven amb paraformaldehid (4% paraformaldehid en tampó fosfat de potassi 0,1 M, pH 7.4) durant 15 min a TA. Seguidament, es feien dos rentats de 5 min amb PBS i es permeabilitzaven les cèl·lules incubant-les durant 15 min amb PBS-Tween 0.1% a TA. El bloqueig de la preparació es realitzava amb la incubació d'una solució PBS-Tween amb 1% BSA (solució de bloqueig) durant 30 min a TA. El

marcatge amb l'anticòs primari es realitzava a la dilució adequada en solució de bloqueig durant tota la nit a 4 °C i posteriorment es feien tres rentats de 5 min amb solució de bloqueig. S'incubava amb l'anticòs secundari (si era necessari) a la dilució adequada en solució de bloqueig durant 1 h a TA i es feien tres rentats de 5 min amb la solució de bloqueig. Finalment, es procedia al muntatge amb el cobreobjectes utilitzant medi de muntatge per a fluorescència amb DAPI (Vectashield, USA). Els controls negatius van rebre el mateix tractament excepte la incubació amb l'anticòs primari.

L'observació de les preparacions es va realitzar amb un microscopi de fluorescència Olympus BX71 i el software DP Controller i Manager (Olympus). El DAPI (4,6-diamino-2 fenilindol) emet fluorescència a 365 nm, la fluoresceïna (FITC) a 520 nm i la rodamina (TRITC) a 580 nm.

Anticossos utilitzats

Els anticossos primaris utilitzats per realitzar la immunocitoquímica van ser: Ulex europaeus agglutinin 1 lectin conjugat a fluoresceïna (Sigma, Espanya) 1:100, rabbit anti-human von Willebrand factor clon 1A4 (Sigma, Espanya) 1:200, goat anti-Kinase insert Domain containing Receptor clon Q-20 (KDR) (Santa Cruz Biotechnology, USA) 1:20 i rabbit anti-CD133 clon H-284 (Santa Cruz Biotechnology, USA) 1:50.

Els anticossos secundaris conjugats a cromòfors fluorescents utilitzats van ser: Bovine anti-goat FITC (Santa Cruz Biotechnology, USA) 1:400 i Goat anti-rabbit TRITC (Santa Cruz Biotechnology, USA) 1:500.

3.3.5. Assaig de funcionalitat *in vitro*

El BD Matrigel TM amb menor quantitat de factors de creixement (BD Bioscience, USA) és una matriu gelatinosa composta principalment per laminina, col·lagen IV, entactina, proteoglicans d'heparan sulfat, colagenases, activadors del plasminogen, altres components no especificats i molt poca quantitat de factors de creixement (bFGF, EGF, IGF-1, PDGF, NGF i TGF- β). Aquest substrat simula la matriu extracel·lular permetent l'adhesió, creixement i diferenciació de diferents cèl·lules i, per tant, és una tècnica que ens permet valorar la capacitat tubulogènica de les EPCs. Es descongela la matriu BD Matrigel TM a 4 °C tota la nit i es mantenia el producte en gel durant tota la seva manipulació, ja que gelifica molt fàcilment; per aquest motiu es refredaven prèviament les puntes, els tubs i les plaques que s'utilitzaven durant l'experiment.

Un cop descongelat es barrejava bé i s'afegien 200 μ l/pou en una placa Nunclon TM de 24 pous (Nunc, USA); es deixava solidificar la matriu a 37 °C durant 30 min. Es contaven les cèl·lules i se sembraven sobre la matriu gelificada a una densitat de 6×10^4 cèl·lules/ml amb medi EBM-2 TM.

Es mantenien les cèl·lules a l'incubador a 37 °C amb un 5% de CO₂. Després de 16 hores, es fotografiaven a camp clar 4 camps representatius per pou (40x) amb el microscopi Olympus IX71. Cada experiment es va fer per duplicat i es va repetir tres vegades independentment amb OECs procedents d'un total de 7 pacients amb ictus isquèmic (3 en fase aguda i 4 en fase subaguda) (veure figura 15). Els paràmetres que es van determinar amb el programa ImageJ software (National Institutes of Health, MD, USA) van ser: el nombre i l'àrea total dels anells complets, la longitud total dels túbuls formats i el nombre de connexions (més de dos) entre els anells.

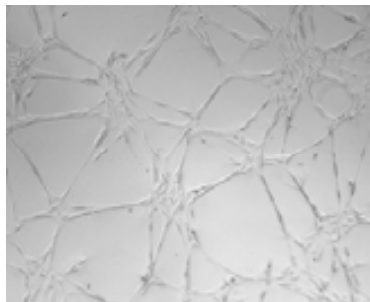


Figura 15. Imatge representativa d'EPCs en matriu BD Matrigel TM

3.3.6 Obtenció de medi condicionat i de lisats cel·lulars d'EPCs

Per tal d'estudiar la capacitat angiogènica de les OECs es va determinar la concentració de factors angiogènics (VEGF, PDGF-BB, FGF i HGF) secretats en el medi on estaven creixent aquestes cèl·lules.

Les OECs procedents de diferents pacients (3 en fase aguda i 3 en fase subaguda), se sembraven en plaques de Nunclon TM de 12 de pous (Nunc, USA) a una densitat de 10^5 cèl·lules/ml i es deixaven créixer en medi EGM-2 TM fins al 90% de confluència. Després d'un rentat amb PBS s'afegia medi EBM-2 TM i es mantenien a l'incubador a 37 °C i un 5% de CO₂ durant 24 h. Passat aquest temps, els factors angiogènics que trobàvem en el medi (anomenat medi condicionat) provenien tots de la secreció de les OECs. Es recollia el medi condicionat i se centrifugava a 10.000 rpm durant 10 min a 4 °C per tal d'eliminar les possibles restes cel·lulars. Es recollia el sobrenedant i es guardava a -80 °C. Per valorar els nivells proteics dels promotors angiogènics secretats per les OECs es va utilitzar el sistema comercial per valorar proteïnes *Human 4 plex array* de la plataforma Searchlight® (veure apartat 3.4).

Per tal d'assegurar-nos que les diferències entre els nivells de factors angiogènics secretats no eren degudes a diferències en el nombre de cèl·lules, vam corregir els valors obtinguts per la quantitat de proteïna total del lisat cel·lular. Així doncs, per

obtenir els lisats cel·lulars s'afegia 0.1 ml de tampó de lisi prèviament refredat a 4 °C (50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.05% Brij-35, 0.02% NaN₃ i 1% Tritó X-100) amb inhibidors de proteases (PMSF i aprotinina). Després de mantenir les cèl·lules 10 min en gel, es recollia el lisat i es guardava a -80 °C, per a la posterior determinació de la concentració de proteïna total mitjançant el mètode de l'àcid bicinconínic (BCA; Pierce, IL, EUA).

3.3.7. Determinació de l'expressió gènica en EPCs.

L'expressió gènica de les OECs procedents de diferents pacients (3 en fase aguda i 3 en fase subaguda) es va realitzar mitjançant l'extracció d'RNA total amb el kit comercial RNAeasy Mini kit (Qiagen, USA). La concentració i la puresa de l'RNA obtingut es va mesurar utilitzant Nanochips i el sistema Bioanalyzer 2100 (Agilent, USA); la retrotranscripció per obtenir el cDNA es va realitzar amb el kit High-Capacity cDNA (Applied Biosystems, USA). Els nivells d'mRNA del VEGF i de l'HGF es van determinar mitjançant *real-time* RT-PCR amb les sondes Taqman Hs00173626_m1 pel VEGFA i Hs00300159_m1 per l'HGF (Applied Biosystems, USA). Per normalitzar els nivells es va utilitzar l'expressió del gen peptidilprolilisomerasa A (PPIA) es va utilitzar la sonda Hs99999904_m1 (Applied Biosystems, USA). Es van determinar els nivells en tres experiments independents utilitzant el programa Applied Biosystems SDS 7500 system software (Applied Biosystems). Els resultats es van expressar en percentatge en relació a un calibrador que va ser utilitzat en tots els experiments.

3.4. Searchlight® i ELISA simple

Per detectar els nivells d'endostatina (Quantikine, R&D Systems, USA), angiostatina (Raybiotech, USA), SDF-1 α (Quantikine, R& D Systems, USA) i GM-CSF (Biotrack, Amersham Pharmacia) es van utilitzar les tècniques tradicionals d'ELISA (*Enzyme linked immunosorbent assay*) en sandvitx, les quals ens permeten quantificar els nivells de les molècules d'interès en la mostra estudiada, a través de la reacció antígen-anticòs i l'extrapolació de les concentracions mitjançant a una corba patró de concentració coneguda.

La plataforma Searchlight® és un *array* de proteïnes que es basa en el sistema d'ELISA múltiple, en el qual hi ha diferents anticossos adherits a cada pou de la placa, permetent la detecció de diferents molècules d'una mostra simultàniament dins d'un mateix pou. Per a la valoració en plasma dels nivells dels 10 promotors i dels 2 inhibidors angiogènics vam utilitzar tres *arrays* de proteïnes comercials diferents de la plataforma *Searchlight*®: el *Human Angiogenesis 4-Plex Array* (Aushon Biosystems) per a la determinació del PDGF-BB, HGF, FGF i VEGF, i el *Human Angiogenesis 6-Plex Array* (Aushon Biosystems) per quantificar els nivells plasmàtics d'HB-EFG, PDGF-AA, KGF, TPO, VEGF-R1 i VEGF-R2. Els nivells plasmàtics de TSP-1 i TSP-2 també es van analitzar mitjançant un altre *array* comercial d'aquesta tecnologia.

La reacció final produeix una senyal de quimioluminescència d'intensitat proporcional a la quantitat d'antigen que hi ha en la mostra (figura 16); aquesta senyal és captada per una càmera freda (CCD, Aushon, USA). Les imatges obtingudes s'analitzen amb el programa *Array Analyst* (Aushon, USA). Cada mostra s'analitza per duplicat i el resultat final és la mitjana dels dos valors. El coeficient de variació intra-assaig va ser menor al 30% per a totes les proteïnes analitzades.

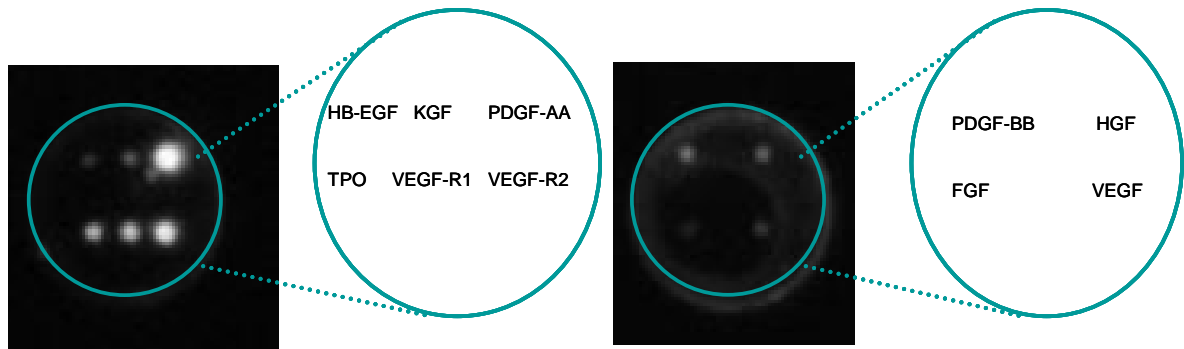


Figura 16. *Searchlight protein array.* Imatge representativa de la senyal obtinguda d'una mostra per diferents proteïnes.

3.5. Càlculs estadístics

L'anàlisi estadística es va realitzar amb el programa SPSS 15.0. En cada estudi es detalla el tractament estadístic de les dades i els tests aplicats en cada cas.

4. RESULTATS

Article 1

Potencial terapéutico de las células progenitoras endoteliales en el ictus
isquémico

Rev Neurol. 2007 ;45:556-562

Potencial terapéutico de las células progenitoras endoteliales en el ictus isquémico

M. Navarro, A. Rosell, M. Hernández-Guillamón, E. Cuadrado, J. Montaner

POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LAS CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES EN EL ICTUS ISQUÉMICO

Resumen. Objetivo. Revisar el conocimiento actual sobre células progenitoras endoteliales (CPE), su relación con el ictus y su posible uso terapéutico. Desarrollo. La activación de la angiogénesis y la vasculogénesis tras la isquemia supone un intento de recuperación del tejido cerebral. El papel que pueden tener las CPE en estos procesos tras la isquemia cerebral es aún desconocido. Son muchos los trabajos que aparecen en la bibliografía sobre el aislamiento, fenotipo y estudio de la funcionalidad de las CPE, pero no existe aún una definición única para estas células, y su origen y función son aún motivo de controversia. En esta revisión se resumen las técnicas utilizadas actualmente para su estudio y se revisan las publicaciones más relevantes en modelos experimentales de isquemia cerebral y de su papel en el ictus isquémico. Conclusiones. La identificación de las CPE en sangre periférica como células hematopoyéticas, con capacidad de diferenciarse en células con un fenotipo endotelial, rompió la visión clásica de la vasculogénesis como un proceso exclusivamente embriogénico. Una década después, sólo encontramos tres trabajos publicados en relación con el papel de las CPE tras la isquemia cerebral en humanos. A pesar de que es necesario un mayor conocimiento de la naturaleza y funcionalidad de las CPE en la isquemia cerebral, la potenciación de estas células para su uso como terapia celular podría ser una buena herramienta terapéutica basada en la angiogénesis tras la isquemia cerebral. [REV NEUROL 2007; 45: 556-62]

Palabras clave. Angiogénesis. Célula progenitora endotelial (CPE). Ictus. Isquemia cerebral. Potencial terapéutico. Vasculogénesis.

ANGIOGÉNESIS Y VASCULOGÉNESIS TRAS LA ISQUEMIA

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes. Es un proceso complejo y ampliamente regulado, que se produce tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. La angiogénesis tiene lugar principalmente en dos fases: la fase de activación y la fase de maduración. En la fase de activación se produce un incremento de la permeabilidad vascular, una remodelación de la matriz extracelular y una proliferación y migración de células endoteliales. En la fase de maduración, tras la inhibición de la proliferación de las células endoteliales, tiene lugar la reconstrucción de la lámina basal y el reclutamiento de pericitos y células musculares lisas para crear la estructura del vaso sanguíneo y restablecer el flujo sanguíneo [1,2].

En cambio, la vasculogénesis es el proceso de formación de vasos sanguíneos *ex novo*, a partir del cual células derivadas de la médula ósea con la capacidad de diferenciarse en células endoteliales (angioblastos) forman nuevos vasos sanguíneos [3].

Durante muchos años se pensaba que el único proceso existente en la neovascularización posnatal era la angiogénesis, mientras que la vasculogénesis era un proceso exclusivamente embriogénico. Sin embargo, los estudios realizados por Asahara et al en 1997 [4] demostraron la existencia de células de origen hematopoyético circulantes en sangre capaces de mostrar un fenotipo endotelial *ex vivo*. Estos autores fueron capaces de

diferenciar *in vitro* células endoteliales a partir de la fracción mononuclear de sangre periférica humana. Además, demostraron que éstas tenían la capacidad funcional de incorporarse a zonas de isquemia y formar capilares y pequeñas arterias. Este descubrimiento supuso una revolución, revocando el paradigma de la vasculogénesis como un proceso restringido a la embriogénesis, y ofreciendo un nuevo modelo para la regeneración endotelial en múltiples patologías.

Paralelamente, numerosos estudios han mostrado que durante el proceso isquémico se produce una potenciación endógena, tanto de la angiogénesis como de la vasculogénesis. En la fase aguda del ictus, se produce la liberación de ciertas citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, como VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), SDF-1 (factor derivado de células estromales-1), bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico), que potencian la angiogénesis, y otros, como MMP-9 (metaloproteinasa de matriz 9), que ayudan a la remodelación tisular [5-7]. Además, después del ictus se produce una activación de la angiogénesis *in situ*, con un incremento de la microvasculatura en el tejido hipóxico [5].

Pero en la patología cerebrovascular aguda aún se desconoce si el papel que juega la angiogénesis en la zona de isquemia es beneficioso o deletéreo. En fase aguda, se produce una sobreexpresión de factores promotores que podrían favorecer el proceso de angiogénesis e incrementarían la circulación colateral en la zona de penumbra, entendiéndose como un intento de revascularizar el tejido hipóxico [6,7]. Además, se ha mostrado que durante el proceso de angiogénesis se produce una migración y proliferación de células endoteliales de vasos que no han sido dañados para formar nuevos vasos [1]. Para este proceso se requiere una apertura de la barrera hematoencefálica, que incrementaría el riesgo de sufrir una hemorragia [8,9]. Pero el proceso de angiogénesis tras el ictus parece ser más complejo, ya que otros estudios han demostrado que durante la fase aguda del ictus se produce un incremento en la expresión de ciertos inhibidores de

Aceptado tras revisión externa: 10.10.07.

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. Passeig Vall d'Hebron, 119-129. E-08035 Barcelona. Fax: +34 934 894 015. E-mail: jmontane@ir.vhebron.net

© 2007, REVISTA DE NEUROLOGÍA

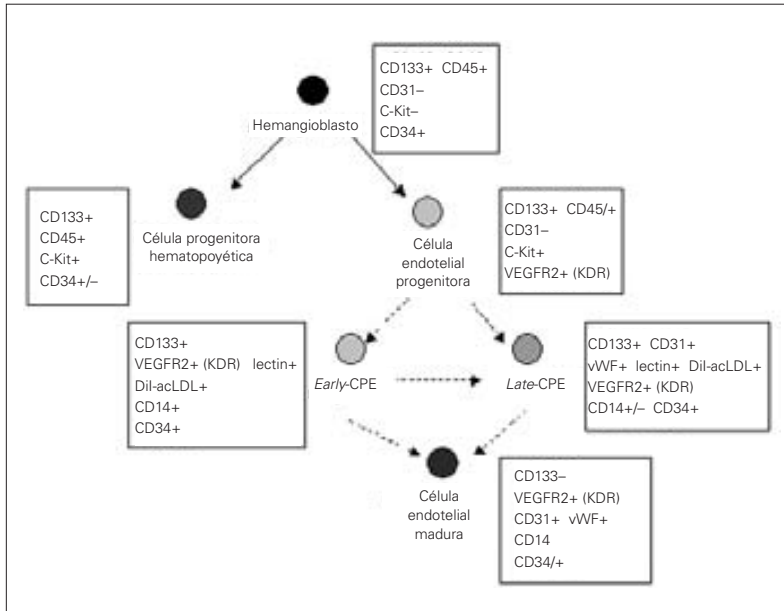


Figura 1. Esquema del origen y linaje de las células progenitoras endoteliales.

la angiogénesis, como la endostatina, la angiostatina o la trombospondina-1 [10,11]. Otras hipótesis apuntan a que la angiogénesis se activa para facilitar la entrada de macrófagos en un proceso de *clean-up* del tejido necrótico para una posterior remodelación tisular [12]. En resumen, los estudios publicados hasta el momento parecen mostrar una doble función en la estimulación de la angiogénesis/vasculogénesis tras el ictus: en la fase aguda, aumentando la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, incrementando el riesgo de transformaciones hemorrágicas [9,13]; en la fase subaguda o crónica, en la recuperación del tejido afectado [14]. Por tanto, el beneficio terapéutico dependerá de la regulación espacio-temporal de los procesos de angiogénesis y vasculogénesis.

ORIGEN Y FUNCIÓN DE LAS CPE

Las células progenitoras endoteliales (CPE) son células primitivas indiferenciadas, con un fenotipo intermedio entre células hematopoyéticas y endoteliales. Estas células tienen la capacidad de proliferar, migrar y diferenciarse en células endoteliales maduras e incorporarse a los tejidos para formar nuevos vasos funcionales, estimulando a los preexistentes a iniciar la angiogénesis.

La primera referencia que encontramos en la bibliografía sobre CPE pertenece a Asahara et al (1997) [4]. Sus resultados obligaron a replantear un paradigma fuertemente establecido, la limitación de la vasculogénesis a la etapa embrionaria. En este estudio emplearon la fracción mononuclear de sangre periférica humana para aislar un tipo de células positivas para marcadores de células progenitoras, como CD34, y otros marcadores típicamente endoteliales, como KDR (*kinase-insert domain-containing receptor*, también conocido como Flk-1 o VEGFR2). Asimismo, fueron capaces de expandir *ex vivo* estas células en células endoteliales maduras y, además, demostraron que estas células endoteliales eran funcionalmente activas, ya que eran capaces de incorporarse al endotelio y formar capilares funcionales en el tejido isquémico de animales. Estos autores fueron los

primeros en identificar las unidades formadoras de colonias (UFC) con un *cluster* central de células redondeadas, rodeado por las llamadas *spindle-shaped cells*, con una forma alargada. Además, los resultados sugirieron que el origen de las CPE era el hemangioblasto, precursor común de células hematopoyéticas y angioblastos (Fig. 1).

Desde su descubrimiento, se han destinado muchos esfuerzos a entender el origen de estas células, sus características fenotípicas, así como su capacidad funcional en la recuperación del tejido isquémico, ya que su potenciación podría suponer una importante herramienta terapéutica en diferentes patologías. Algunos ejemplos de ello se han demostrado en modelos animales de infarto de miocardio, en que la inyección de CPE humanas cultivadas *ex vivo* mejora significativamente el flujo sanguíneo y la función cardíaca en estos animales [15]. En ensayos clínicos en pacientes con infarto agudo de miocardio a los que se ha realizado una infusión intracoronaria de CPE autólogas procedentes de sangre periférica expandidas *ex vivo*, se observa una mejora en la función ventricular y en la reserva de flujo coronario, incluso a los cuatro meses del trasplante [16,17].

De manera similar, la infusión de estas células en roedores sometidos a isquemia periférica mejora la neovascularización en el tejido hipóxico [18]. Y en humanos, se ha observado que el trasplante autólogo de células mononucleares obtenidas de médula ósea en pacientes con isquemia periférica aumenta la cicatrización del tejido y disminuye los síntomas dos meses después de la infusión [19,20].

De manera similar, la infusión de estas células en roedores sometidos a isquemia periférica mejora la neovascularización en el tejido hipóxico [18]. Y en humanos, se ha observado que el trasplante autólogo de células mononucleares obtenidas de médula ósea en pacientes con isquemia periférica aumenta la cicatrización del tejido y disminuye los síntomas dos meses después de la infusión [19,20].

TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CPE

Debido al prometedor potencial de las CPE como marcadores de la función endotelial y como base de una posible terapia celular basada en la vasculogénesis, desde su identificación se han destinado muchos esfuerzos para mejorar las técnicas de aislamiento de estas células. A lo largo de los años se han incorporado nuevas metodologías para la caracterización y cuantificación más precisa de las CPE, pero, a pesar de ello, hoy en día no existe un único marcador para las CPE, y su origen y fenotipo siguen siendo motivo de discusión.

Cultivo de CPE

El cultivo *in vitro* de CPE es uno de los métodos más utilizados. En 1997, Asahara et al ya utilizaron esferas magnéticas cubiertas con anticuerpos para un marcador de células progenitoras, CD34, para aislar estas células de la fracción mononuclear de sangre de individuos sanos. La separación de células CD34+ y CD34- se realizó mediante un separador celular (*sorter*), técnica que permite la separación física de células en función de diferentes parámetros analizables mediante citometría de flujo, como puede ser la expresión diferencial de marcadores de superficie.

Se observó que el cultivo de las células CD34+ tenía la capacidad de proliferar durante cuatro semanas. Estos autores realizaron el recuento de UFC como una manera indirecta de cuantificación de CPE. Realizaron el recuento de estas UFC mediante el marcaje con un marcador de células endoteliales DiI-

acLDL (lipoproteína acetilada de baja densidad), y observaron que se marcaban las células alargadas de la periferia. Éste ha sido un artículo de referencia para muchos estudios y, por lo tanto, son muchos los investigadores que han utilizado esta metodología, con algunas modificaciones. De manera estandarizada, el cultivo de CPE se realiza a partir de la fracción mononuclear de sangre periférica o tisular, sembrando en placas con fibronectina o gelatina a alta densidad celular y utilizando un medio de cultivo específico para células endoteliales con diferentes factores de crecimiento.

Tras la publicación de nuevos estudios, el concepto de célula progenitora endotelial como una única población se ha ido modificando, y se ha aceptado el concepto de población heterogénea. Una de las técnicas más utilizadas para identificar los diferentes subtipos celulares es el cultivo celular. Así, aparecieron estudios en los que se establecían dos subpoblaciones bien definidas con características fenotípicas y funcionales diferenciadas, las llamadas *early* (células tempranas) y *late* (células tardías) o *outgrowth* CPE [21,22] (Tabla I). Las *early*-CPE aparecen más tempranamente en el cultivo, a los 5-7 días, y tienen la morfología característica de las UFC (Fig. 2a), mientras que las *late*-CPE aparecen a partir de las dos semanas en cultivo, y forman una monocapa celular tipo 'adoquín' (*cobblestone*) (Fig. 2b). Según Hur et al, las tasas de proliferación también son diferentes en las dos subpoblaciones: las *early*-CPE son capaces de sobrevivir en cultivo hasta ocho semanas, mientras que las *late*-CPE tienen una capacidad proliferativa mayor y permanecen en cultivo hasta 12 semanas [21]. También existen diferencias en la capacidad de estas células para formar estructuras tubulares en sustratos de Matrigel. Las *late*-CPE son las células con mayor potencial para formar túbulos, aunque se cree que los factores de crecimiento secretados por las *early*-CPE potencian esta capacidad [22]. Otros autores, como Ingram et al [23,24], proponen la existencia de más de dos subpoblaciones dentro de las CPE, y realizan una clasificación jerárquica [23] en función de su potencial clonogénico [24]. Estos autores demuestran que las UFC tienen capacidad macrofágica [25] y no son capaces de formar capilares *in vivo*.

Parece evidente que no existe un consenso sobre el linaje de las CPE y existen controversias sobre la naturaleza endotelial de las UFC, ya que parece que comparten más características monocíticas y macrofágicas que endoteliales. Se han destinado muchos esfuerzos para la caracterización de esta población heterogénea, y la mayoría de estudios va en la misma dirección: el término CPE englobaría diferentes poblaciones celulares con diferente capacidad para asumir un fenotipo endotelial diferenciado y funcional *ex vivo*.

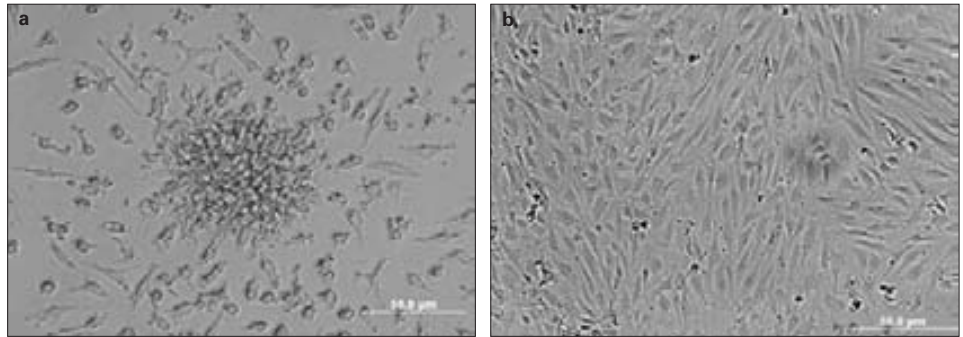


Figura 2. Cultivo a partir de sangre periférica de: a) *early*-CPE el 4.º día, 20x, imagen de una UFC con células redondeadas en el centro y alargadas en la periferia; y b) *late*-CPE el 13.º día, 20x, con morfología *cobblestone*.

Tabla I. Diferencias y características entre las dos subpoblaciones identificadas de células progenitoras endoteliales.

	<i>Early</i>	<i>Late</i>
Crecimiento <i>in vitro</i>	Aparición temprana (5-7 días)	Aparición tardía (14-22 días)
Marcadores de superficie	Dil-acLDL, UEA1-lectin, CD34, KDR, CD14, CD133	Dil-acLDL, UEA1-lectin, vWF, CD31, KDR
Secreción de citocinas	Niveles altos de VEGF, IL-8, G-CSF, HGF	Niveles bajos
Formación de túbulos	No	Sí
Potencial angiogénico	Bueno	Bueno

CD: *cluster differentiation*; Dil-acLDL: *acetylated low-density lipoprotein*; G-CSF: *granulocyte colony-stimulating factor*; HGF: *hepatocyte growth factor*; IL-8: *interleucina-8*; KDR: *kinase-insert domain-containing receptor*; UEA1-lectin: *ulex europaeus agglutinin-1 lectin*; VEGF: *vascular endothelial growth factor*; vWF: *von Willebrand factor*.

Ya que no existe un marcador único para las CPE, su fenotipo se realiza con un panel de marcadores de células endoteliales y progenitoras. Se han utilizado diferentes marcadores para la identificación de estas células, compartidos entre células endoteliales y hematopoyéticas. Como marcadores endoteliales se utilizan lectinas, como, por ejemplo, UEA1-lectin (*ulex europaeus agglutinin-1 lectin*) o VEGFR2 (receptor del factor de crecimiento vascular endotelial-2, también conocido como KDR o Flk-1) [21-32], así como también CD31 o vWF (factor de von Willebrand) [21-32]; y marcadores progenitores, como el CD34, clásico marcador de células madre, o el anticuerpo CD133 (también conocido como AC133), marcador de células progenitoras más indiferenciadas [33]. La figura 3 muestra la expresión de algunos de estos marcadores obtenida de *early*-CPE y *late*-CPE derivadas de sangre periférica humana.

Citometría de flujo y separación celular

La posible utilización de las CPE como valor pronóstico de disfunción vascular y, por lo tanto, su aplicación en diferentes patologías generó la necesidad de utilizar nuevas técnicas para su aislamiento que permitieran un diagnóstico más rápido. La técnica más utilizada ha sido la citometría de flujo, que es una herramienta de análisis que permite discriminar partículas de diferente tamaño y color, y detectar la población celular de interés. A partir de sangre total o a partir de la fracción celular mononuclear, y mediante la marcación con diferentes anticuerpos endoteliales y hematopoyéticos (KDR, CD45, CD14, CD31 u otros) [34-36], y marcadores progenitores como CD34 o CD133 [34-36], se puede identificar la población de CPE. Además, la utilización adicional de la separación celular (*sorter*) abre un campo amplio para el

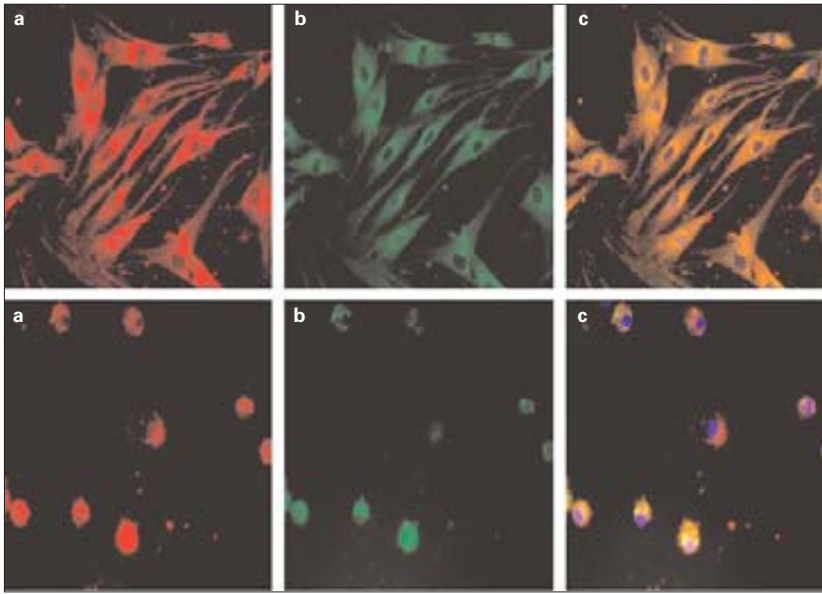


Figura 3. Inmunocitoquímica de *late*-CPE (arriba) el 30.º día, que marca positividad para marcadores: a) progenitores AC133; b) endoteliales KDR; y c) *merge* a 20x. Inmunocitoquímica de *early*-CPE (abajo) el quinto día, que marca positividad para marcadores: a) progenitores AC133; b) endoteliales KDR; y c) *merge* a 40x.

aislamiento y caracterización de las diferentes subpoblaciones de CPE y su posterior estudio. Desafortunadamente, hoy en día aún nos encontramos con ciertas limitaciones para la posterior expansión *ex vivo* y el ulterior estudio de los subtipos por separado, básicamente por el bajo número de CPE circulantes en sangre. Por ello, normalmente se utiliza un solo marcador, como CD34 o CD133, para realizar *sorter* y su cultivo posterior, dificultando parcialmente la separación de las diferentes subpoblaciones.

Ensayos de funcionalidad: tubulogénesis sobre matrices de Matrigel®

Además de mostrar el fenotipo celular, es de gran importancia demostrar la funcionalidad endotelial de las CPE. Por este motivo, se realizan diferentes ensayos con CPE en diferentes sustratos que simulan la matriz extracelular, y se observa que éstas son capaces de formar estructuras tubulares similares a capilares [22]. Esta capacidad difiere en las distintas subpoblaciones: las *early*-CPE no forman túbulos, mientras que las *late*-CPE sí [21,22]. Hur et al demostraron, mediante la adición al medio de cultivo de anticuerpos contra factores de crecimiento (IL-8 y VEGF) de *early*-CPE, que la migración y la formación de túbulos de las *late*-CPE se veía limitada, pero, en cambio, el cocultivo con las *early*-CPE potenciaba la capacidad funcional de las *late*-CPE.

Estudios de vasculogénesis in vivo

Técnicas más complejas, pero claves para determinar el posible potencial terapéutico de las CPE, son su uso en modelos animales *in vivo*. Encontramos estudios en la bibliografía realizados en conejos sometidos a una isquemia periférica [18,37,38], así como en ratas o ratones sometidos a una isquemia cerebral por oclusión de la arteria cerebral media (ACM) y posterior infusión de células mononucleares de médula ósea [39], que incluirían las CPE, marcadas con la proteína fluorescente verde [39]. Estas técnicas nos permiten visualizar la implantación de estas células tras el sacrificio del animal y el posterior estudio histo-

lógico. Los resultados encontrados por diferentes grupos son muy alentadores, ya que demuestran la incorporación de CPE en los nuevos capilares [39-41]. El trabajo realizado por Otha et al muestra que la infusión de CPE de médula ósea cultivadas *ex vivo* y administradas intraarterialmente en ratas tras una oclusión transitoria de la ACM reduce el volumen del infarto y produce una mejora neurológica. Además, los autores observan la implantación de CPE en el hemisferio isquémico.

Para observar si las CPE tendrían un papel directo en la reparación del endotelio dañado, se han utilizado modelos animales a los que se les ha producido un daño en el endotelio, y se ha demostrado que las CPE mejoran la vasoreactividad arterial y aceleran la reendotelización, por lo que se reduce la formación de la neointima [37,38].

CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES: NUEVAS DIANAS TERAPÉUTICAS PARA EL ICTUS

Hasta el momento, hemos visto que existen numerosos trabajos sobre el beneficio terapéutico que pueden tener las CPE en enfermedades cardiovasculares [15-17], o sobre su papel en la cicatrización del tejido dañado en enfermedades asociadas a isquemia periférica [18-20]. Debido a los prometedores resultados obtenidos en dichas patologías, algunos grupos han empezado a estudiar su implicación en la isquemia cerebral.

Trabajos realizados en modelos animales en ratones a los que se les sometía a un trasplante de médula ósea y una posterior oclusión de la ACM observaron la posterior implantación de células endoteliales en el tejido cerebral (procedentes de la médula ósea), formando nuevos capilares [39-42]. Zhang et al también han demostrado recientemente la participación de células de la médula ósea en la neovascularización del tejido cerebral en ratones después de la isquemia, relacionada con una mejoría en el flujo sanguíneo y en el metabolismo cerebral [40].

Las evidencias de que las CPE podrían desempeñar un papel beneficioso en la recuperación del tejido cerebral después de la isquemia cerebral han llevado a algunos autores a realizar estudios en pacientes. Pero, debido a que el fenotipo de estas células no está claramente establecido, y a que aún existe cierta controversia sobre las técnicas de aislamiento y caracterización, algunos de los trabajos que encontramos en la bibliografía son difícilmente comparables.

Taguchi et al [43] realizaron un estudio en ictus isquémicos de etiología aterotrombótica empleando la citometría de flujo. Analizaron la presencia de CPE mediante el marcaje de éstas con marcadores progenitores como CD34 y CD133, y endoteliales como CD117 y CD135, en sangre periférica de pacientes. Correlacionaron los niveles de células progenitoras con diferentes parámetros clinicorradiológicos, y estudiaron su movilización después de la isquemia. Sus resultados indican un aumento gradual de células CD34+ después del evento isquémico hasta el séptimo día y una disminución hasta los valores basales a los 30 días. Además, encontraron una correlación inversa entre células CD34+ o CD133+ y el número de in-

Tabla II. Trabajos realizados en animales y humanos en isquemia cerebral y células progenitoras endoteliales (CPE).

Ref.	Especie	Técnica de estudio	Resultados
Sobrino et al [45]	Sangre periférica de ictus	Cultivo y recuento UFC el quinto día	Incremento de niveles de UFC el séptimo día del evento isquémico hasta el tercer mes respecto a los niveles basales en pacientes con buen pronóstico
Otha et al [41]	Rata	Oclusión transitoria de ACM e infusión CPE de médula ósea expandidas <i>ex vivo</i>	Mejora neurológica y reducción del tamaño del infarto a las 24 y 48 h de la oclusión
Shyu et al [42]	Rata	Oclusión de tres vasos e infusión de CD34+ de sangre periférica	Inducción angiogénesis/neurogénesis <i>in vivo</i> y mejora neurológica
Ghani et al [44]	Sangre periférica de ictus y controles	Cultivo y recuento UFC el séptimo día	Niveles inferiores en pacientes frente a grupo control
Taguchi et al [43]	Sangre periférica de ictus	Citometría de flujo y recuento de CD34+ y CD133+	Incremento de CD34+ el séptimo día tras el evento isquémico. Correlación negativa CD34+ y CD133 frente al flujo sanguíneo y número de infartos
Hess et al [39]	Ratón	Transplante de médula ósea tras MCAO	Incorporación de CPE en los vasos de la zona isquémica hasta 14 días después del transplante
Zhang et al [40]	Ratón	Infusión de células de médula ósea en MCAO embólico	Incremento del flujo sanguíneo cerebral después de un mes de la isquemia, e incorporación de CPE en los vasos

ACM: arteria cerebral media; MCAO: oclusión de la arteria cerebral media; UFC: unidad formadora de colonias.

fartos, y una correlación positiva entre estas células y el flujo sanguíneo cerebral. Estos resultados sugirieron que las células progenitoras podrían utilizarse como marcador de la función cerebrovascular y reparación endotelial.

Aunque muy discutido, algunos estudios de CPE se centran en la valoración del número de UFC. Ghani et al centraron su estudio en esta cuantificación [44]. A partir de sangre periférica de pacientes estables que habían sufrido un evento isquémico un mes antes, de pacientes con un ictus agudo y de controles sanos, realizaron el aislamiento de la fracción mononuclear. Después de siete días en cultivo, realizaron el recuento de las UFC y, mediante la marcación con anticuerpos característicos de células endoteliales como CD31 o el vWF, confirmaron el linaje endotelial. Sus resultados mostraron que el número de colonias en los pacientes que habían sufrido un ictus era significativamente menor en comparación con los controles y era especialmente bajo durante la fase aguda del ictus. Los bajos niveles de CPE en pacientes con patología cerebrovascular podrían indicar una disfunción vascular.

Un trabajo recientemente realizado por Sobrino et al [45] con sangre periférica de pacientes con ictus isquémicos, empleando el cultivo celular, muestra que se produce un incremento de los niveles de UFC a los siete días del evento isquémico respecto a los niveles basales, y se mantienen elevados hasta el tercer mes en los pacientes con buen pronóstico, mientras que en los pacientes con mal pronóstico estos niveles se mantienen estables. Sus resultados muestran también una correlación inversa entre el incremento de UFC con el crecimiento del volumen de infarto durante la primera semana, y una asociación positiva entre el incremento de UFC y el pronóstico funcional a los tres meses.

Por lo tanto, nos encontramos con tres únicos trabajos en la bibliografía. Taguchi et al y Sobrino et al observan un incremento de CPE el séptimo día en pacientes después del ictus isquémico, mientras que Ghani et al observan una disminución de UFC respecto a los controles.

Aunque los resultados encontrados en humanos en isquemia cerebral no son concluyentes, sí que parecen indicar que las

CPE podrían tener un papel importante tras el ictus isquémico [46,47]. Si esto se confirmara, el empleo de las CPE como terapia celular sería muy beneficioso, aunque de momento se requiere un mayor conocimiento sobre la naturaleza y funcionalidad de las CPE en la isquemia cerebral (Tabla II).

Son muchos los trabajos que encontramos en la bibliografía sobre la influencia de los factores de riesgo cardiovascular en el número y funcionalidad de las CPE. La edad [48], el tabaquismo [49], la hipertensión [50] y diferentes patologías, como la diabetes [51] o la aterosclerosis [52], disminuyen los niveles de estas células. El tratamiento con fármacos, como estatinas [53] o glitazonas [54], provoca también variaciones en los niveles de CPE. Es importante tener en cuenta estos factores en la realización de futuros estudios en humanos.

CONCLUSIONES

El papel de la angiogénesis y la vasculogénesis tras la isquemia cerebral es aún parcialmente desconocido. Clásicamente, se pensaba que favorecer estos procesos podría suponer una mayor recuperación del tejido dañado, pero recientes estudios muestran que es necesaria una modulación más precisa de estos procesos, tanto en el espacio (zona penumbra y *core*) como en el tiempo (fase aguda y subaguda del ictus). La influencia que pueden tener las CPE en estos procesos es todavía incierta, aunque parece clara la relación entre estas células y el proceso de isquemia.

Los estudios realizados en otras patologías y en modelos animales de isquemia utilizando las CPE como terapia celular indican que estas células tienen un buen potencial en terapias angiogénicas celulares.

Aunque son numerosos los trabajos existentes en la bibliografía desde el descubrimiento de estas células, quedan aún muchas incógnitas por resolver, ya que cada vez son más los estudios que muestran la heterogeneidad de esta población celular, así como la diversidad funcional y fenotípica entre las diferentes subpoblaciones. Respecto a la enfermedad cerebrovascular,

son necesarios trabajos más amplios y precisos que nos ayuden a entender la capacidad de las CPE en la potenciación de la angiogénesis y la vasculogénesis tras la isquemia.

Cada vez disponemos de técnicas más punteras y de marcaciones más específicas que nos permiten discriminar entre poblaciones celulares fenotípicamente muy similares y de ensayos, tanto *in vitro* como *in vivo*, para observar la capacidad funcional

de la CPE. La utilización de estas tecnologías nos tiene que facilitar este trabajo para esclarecer el papel de las CPE en la isquemia cerebral. Hasta este momento, y con los resultados publicados en la bibliografía, parece que la potenciación de estas células podría suponer una nueva herramienta terapéutica para el tratamiento del ictus. Por esta razón, es necesario incrementar el esfuerzo en el estudio de las CPE en la isquemia cerebral.

BIBLIOGRAFÍA

- Rosell A, Montaner J, Álvarez-Sabín J. Implicación de la angiogénesis en la isquemia cerebral humana. *Rev Neurol* 2004; 38: 1076-82.
- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438: 932-6.
- Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11: 73-91.
- Asahara T, Murshara T, Sullivan A, Silver M, Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964.
- Kuprinsky J, Kaluzs J, Kumar S, Wang JM. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* 1994; 25: 1794-8.
- Slevin M, Kuprinsky J, Slowic A. Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor in serum of patient with acute ischemic stroke. *Stroke* 2000; 31: 1863-70.
- Scheufler KM, Dreves J, van Velthoven V, Reusch P, Kliscti J, Augustin HG, et al. Implications of vascular endothelial growth factor sFlt-1 and sTie-2 in plasma, serum and cerebrospinal fluid during cerebral ischemia in man. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 99-110.
- Valable S, Montaner J, Bellail A, Berezowski V, Brillant J, Cecchelli R, et al. VEGF induced BBB permeability is associated with and MMP-9 activity increase in cerebral ischemia both effects decreased by Ang-1. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25: 1491-504.
- Zhang ZG, Zhang L, Jian Q, Zhang R, Davies K, Powers C, et al. VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* 2000; 106: 829-38.
- Hayashi T, Noshita N, Sugawara. Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23: 166-80.
- Lin T, Kim GM, Chen JJ, Cheung WM, He YY, Hsu CY. Differential regulation of thrombospondin 1 and thrombospondin 2 after focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke* 2003, 34: 177-86.
- Manookitwongsa PS, Jackson-Friedman C, Millán PJ, Schultz RL, Lyden PD. Angiogenesis after stroke is correlated with increase numbers of macrophages: the clean-up hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21: 1223-31.
- Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, Soltanian-Zadeh H, Morris D, Zhang R, et al. Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22: 379-92.
- Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, et al. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest* 2003; 111: 1843-51.
- Kawamoto A, Gwon HC, Iwaguro H, Yamaguchi JJ, Uchida S, Masuda H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardium ischemia. *Circulation* 2001; 103: 634-7.
- Assmus B, Schächinger V, Teupe C, Britten M, Lehmann R, Döbert N, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106: 3009-17.
- Strauer B, Brehm M, Zeus T, Köstering M, Hernandez A, Sorg R, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106: 1913-8.
- Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 3422-7.
- Tateishi-Yayuma E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427-35.
- Yamamoto K, Kondo T, Suzuki S, Izama H, Kobayashi M, Emi Nobuhiko, et al. Molecular evaluation of endothelial progenitor cells in patients with ischemic limbs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 192-6.
- Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Khang HJ, Hwang KK, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 288-93.
- Yoon CH, Hur J, Park KW, Kim JH, Lee CS, Oh IY, et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation* 2005; 112: 1618-27.
- Ingram D, Mead L, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 2004; 104: 2753-60.
- Ingram D, Caplice N, Yoder M. Unresolved questions, changing definition, and a novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 2005; 106: 1525-31.
- Yoder M, Mead L, Prater D, Krier T, Mroueh N, Li F. Re-defining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cells principals. *Blood* 2006; 419: 439-73.
- Lin Y, Weisdorf D, Solovey A, Heibel R. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 2000; 105: 71-7.
- Gulati R, Jevremovic D, Peterson T, Chatterjee S, Shah V, Vile R, et al. Diverse origin and function of cells with endothelial phenotype obtained from adult human blood. *Circ Res* 2003; 93: 1023-5.
- Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Dernbach E, Zeiber AM, Dimmer S. Relevance of monocytic features for neovascularization capacity of circulating endothelial progenitor cells. *Circulation* 2003; 108: 2511-6.
- Fuchs S, Hermanns M, Kirkpatrick Ch. Retention of differentiated endothelial phenotype by outgrowth endothelial cells isolated from human peripheral blood and expanded in long-term cultures. *Cell Tissue Res* 2006; 326: 79-92.
- Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 2004; 95: 343-53.
- Bellik L, Ledda F, Parenti A. Morphological and phenotypical characterization of human endothelial progenitor cells in an early stage of differentiation. *FEBS Lett* 2005; 2731-6.
- Sharpe E, Teleron A, Li B, Price J, Sands M, Alford K. The origin and in vivo significance of murine and human culture-expanded endothelial progenitor cells. *Am J Pathol* 2006; 168: 1710-21.
- Gehling U, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000; 95: 3106-5112.
- Rustemeyer P, Wittkowski W, Kershin J, Koller A. Optimized flow cytometry analysis of endothelial progenitor cells in peripheral blood. *J Immunoassay Immunochem* 2006; 27: 77-88.
- Shaffer R, Greene S, Arshi A, Supple G, Bantly A, Moore JS. Flow cytometric measurement of circulating endothelial cells: the effect of age and peripheral arterial disease on baseline levels of mature and progenitor populations. *Cytometry B Clin Cytom* 2006; 70: 56-62.
- Khan S, Solomon M, Mc Coy J. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2005; 64: 1-8.
- He T, Smith LA, Harrington S, Nath KA, Caplice NM, Katusic ZS. Transplantation of circulating endothelial progenitor cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries. *Stroke* 2004; 35: 2378-84.
- Gulati R, Jevremovi D, Witt T, Kleppe L, Vile R, Lerman A. Modulation of the vascular response to injury by autologous blood-derived outgrowth endothelial cells. *Am J Physiol Heart Cir Physiol* 2004; 287: 512-7.
- Hess D, Hill W, Martin-Studdard A, Carrol J, Brailer J, Carothers J. Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells after stroke. *Stroke* 2002; 22: 1362-8.
- Zhang Z, Zhang L, Jiang Q, Chopp M. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells participate in cerebral neovascularization after focal cerebral ischemia in the adult mouse. *Circ Res* 2002; 90: 284-8.
- Ohta T, Kikuta K, Imamura H, Takagi Y, Nishimura M, Masaki N, et al.

- Administration of ex vivo-expanded bone marrow-derived endothelial progenitor cells attenuates focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Neurosurgery* 2006; 59: 679-86.
42. Shyu WC, Lin SZ, Chiang MF, Su CY, Li H. Intracerebral peripheral blood stem cell (CD34+) implantation induces neuroplasticity by enhancing beta1 integrin-mediated angiogenesis in chronic stroke rats. *J Neurosci* 2006; 26: 3444-53.
 43. Taguchi A, Matsuyama T, Moriwaki H, Hayashi T, Hayashida K, Nagatsuka K, et al. Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* 2004; 109: 2972-5.
 44. Ghani U, Shnaib A, Salam A, Nasir A, Shnaib U, Jeeradathi T. Endothelial progenitor cells during cerebrovascular disease. *Stroke* 2005; 36: 151-3.
 45. Sobrino T, Hurtado O, Moro MA, Rodríguez-Yáñez M, Castellanos M, Brea D, et al. The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke* 2007; 38: 2759-64.
 46. Hill J, Zalos G, Halcox J, Schenke W, Waclawiw M, Quyyumi A, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348: 593-600.
 47. Güven H, Shepherd R, Bach R, Capoccia B, Link D. The number of endothelial progenitor cell colonies in the blood is increased in patients with angiographically significant coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48: 1579-87.
 48. Sharp A, Zipori D, Toledo J, Tal S, Resnitzky P, Globerson A. Age related changes in hemopoietic capacity of bone marrow cells. *Mech Ageing Dev* 1989; 48: 91-9.
 49. Michaud SE, Dussault S, Haddad P, Groleau J, Rivard A. Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis* 2006; 187: 423-32.
 50. Delva P, Degan M, Vallerio P, Arosio E, Minuz P, Amen G, et al. Endothelial progenitor cells in patients with essential hypertension. *J Hypertens* 2007; 25: 127-32.
 51. Fadini GP, Sartore S, Agostini C, Avogaro A. Significance of endothelial progenitor cells in subjects with diabetes. *Diabetes Care* 2007; 30: 1305-13.
 52. Werner N, Nickenig G. Endothelial progenitor cells in health and atherosclerotic disease. *Ann Med* 2007; 39: 82-90.
 53. Walter DH, Dimmeler S, Zeiher AM. Effects of statins on endothelium and endothelial progenitor cell recruitment. *Semin Vasc Med* 2004; 4: 385-93.
 54. Wang CH, Ting MK, Verma S, Kuo LT, Yang NI, Hsieh IC, et al. Pioglitazone increases the numbers and improves the functional capacity of endothelial progenitor cells in patients with diabetes mellitus. *Am Heart J* 2006; 152: 1051.

THE THERAPEUTIC POTENTIAL OF ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS IN ISCHAEMIC STROKE

Summary. Aim. To review the present knowledge about endothelial progenitor cells (EPCs), their relationship with stroke and their possible therapeutic potential. Development. Activation of angiogenesis and vasculogenesis after cerebral ischemia is an attempt to recover damaged cerebral tissue. The role of EPCs in angiogenesis/vasculogenesis after brain ischemia remains unknown. Many studies have been published about the isolation, phenotyping and function of EPCs. However, there is not a unique definition for these cells; their origin and function are still an issue of controversy between different research groups. In this review, we summarize the currently used techniques and the most relevant publications about EPCs in experimental models of cerebral ischemia and their role in stroke. Conclusions. The identification of EPCs in peripheral blood as hematopoietic cells with the ability to differentiate into endothelial cells, broke the paradigm that vasculogenesis was only an embryogenic process. However, better knowledge about the origin and function of EPCs in cerebral ischemia is required. Stimulation of these cells opens a wide new field of cell-based angiogenic therapy that could improve the current stroke treatment. [REV NEUROL 2007; 45: 556-62]

Key words. Angiogenesis. Brain ischemia. Endothelial progenitor cells (EPCs). Stroke. Therapeutic potential. Vasculogenesis.

Article 2

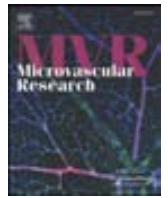
Mobilization, endothelial differentiation and functional capacity of
endothelial progenitor cells after ischemic stroke

In Press, Microvasc. Res , 2010



Contents lists available at ScienceDirect

Microvascular Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymvre

Mobilization, endothelial differentiation and functional capacity of endothelial progenitor cells after ischemic stroke

Miriam Navarro-Sobrino, Anna Rosell, Mar Hernandez-Guillamon, Anna Penalba, Marc Ribó, José Alvarez-Sabín, Joan Montaner*

Neurovascular Research Laboratory, Neurovascular Unit and Neurology Department, Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Vall d'Hebròn Hospital, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 March 2010
Revised 4 May 2010
Accepted 25 May 2010
Available online xxx

Keywords:

Endothelial progenitor cells
Ischemia
Stroke
Flow cytometry
Matrigel®
Angiogenesis
Vasculogenesis

ABSTRACT

Endothelial progenitor cells (EPCs) have introduced new possibilities for cell-based vasculogenesis treatment after stroke. In this study we quantified circulating levels of EPCs in stroke patients and in healthy controls, and evaluated the potential of EPCs to induce vasculogenesis *in vitro*. Blood was drawn from tPA-treated stroke patients and control subjects, and the circulating EPCs levels in each group were quantified by flow cytometry and cell culture assays. Immunophenotyping was performed using multiple markers (UEA-lectin, CD133, vWF and KDR) and tubulogenic function was assessed with the Matrigel® assay. The produced angiogenic factors were quantified by multiple ELISA and RT-PCR. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) revealed higher levels of circulating CD133+/CD34+/KDR+/CD45+ cells in the acute strokes as compared to the control subjects ($p = 0.02$). On the other hand, more EPCs grew in cell culture from subacute strokes ($p = 0.016$) than from controls. The endothelial and progenitor lineages of the EPCs were confirmed by immunophenotyping. Interestingly, the appearance of outgrowth EPCs (OECs) correlated positively to stroke severity ($p = 0.013$). Finally, greater capacity to induce vasculogenesis *in vitro* was found in EPCs from subacute strokes ($p = 0.03$), which we attribute to a higher expression and secretion of angiogenic factors. Our results suggest an early EPC mobilization but an enhanced angiogenic function in the subacute phase of stroke. Nonetheless, development of cell-based therapy for stroke will require further studies to identify those EPCs with the greatest therapeutic potential.

© 2010 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

Stroke is the third leading cause of death and the most common cause of permanent disability in adults worldwide. In the acute phase of stroke an energy loss caused by reduction of cerebral blood flow triggers multiple brain-cell death pathways. However, during this time, neuro-reparative processes can be enhanced. In fact, angiogenesis may contribute to recovery after stroke, via remodeling of the damaged area during the subacute phase, consequently generating new blood vessels and promoting neurogenesis (Lo, 2008; Ohab et al., 2006).

Currently, the only available treatment for stroke is the use of thrombolytic drugs to restore brain perfusion during the hyperacute phase. The National Institutes of Neurological Disorders Study (NINDS) and the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS) have described the beneficial effects of intravenous tissue plasminogen activator (tPA) administered up to 3–4.5 h after symptom onset of ischemic stroke (Anon, 1995; Anon, 1997; Hacke et al., 2004). However,

despite its proven efficacy, tPA is only given to less than 5% of stroke patients due to its narrow therapeutic window and the fact that it carries an increased risk of intracranial hemorrhage (Anon, 1997). Therefore, there is an urgent need for new stroke therapies applicable beyond the hyperacute phase. One promising therapeutic strategy is to induce neovascularization in the brain.

Over a decade ago, Asahara and colleagues reported their discovery of a cell population that participates in adult neovascularization in pathological as well as physiological processes; they called these endothelial progenitor cells (EPCs) (Lapergue et al., 2007; Asahara et al., 1997). EPCs lack of a unique EPC marker and represent a heterogeneous population with different capacities to assume a differentiated and functional endothelial phenotype *in vitro*. Classically, at least two different subsets have been identified: early EPCs which appear firstly in cultures with spindle-shaped morphology, more recently renamed as circulating angiogenic cells (CACs) (Akita et al., 2003; Dimmeler, 2001), and outgrowth endothelial cells (OECs) which appear later and display cobblestone and palisading forming colonies with proliferative and tubulogenic potential (Hur et al., 2004; Ingram et al., 2004).

However, knowledge on EPCs and stroke is nebulous: several relevant publications have reported controversial results (Taguchi et al., 2004; Ghani et al., 2005; Sobrino et al., 2007; Chu et al., 2008; Jung

* Corresponding author. Neurovascular Research Laboratory, Institut de Recerca, Hospital Vall d'Hebròn, Pg Vall d'Hebròn 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Fax: +34 934894015.

E-mail address: 31862jmv@comb.cat (J. Montaner).

et al., 2008), and little is known about how EPCs function after the ischemic event.

Thus, in the present study we sought to quantify circulating levels of EPCs in stroke patients and in healthy controls, and to assess EPC endothelial functioning *in vitro*.

2. Materials and Methods

2.1. Study population and samples

Peripheral blood (20 ml) was obtained in EDTA tubes from patients that had suffered an ischemic stroke involving the middle cerebral artery (MCA) territory and that had been admitted to our hospital's emergency department between January 2007 and March 2008. All patients received thrombolytic therapy (tPA) in a standard dose 0.9 mg/kg (10% bolus and 90% continuous infusion for 1 h) within 3 h of symptoms onset. All patients received transcranial Doppler examinations (TCD) before, during, and up to 24 h after tPA treatment. On admission, all patients underwent a cranial computed tomography (CT) scan, and a second CT was repeated after 24–48 h. A detailed history of vascular risk factors, drug abuse, alcoholism, and any concomitant medication was obtained from each patient. Patients were scored for stroke severity and neurological status on admission and on follow-up visits according to the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS).

The EPC culture assays were performed for tPA treated stroke patients ($n=30$): acute stroke patients ($n=12$), whose blood samples were obtained during the first day of symptom onset (ranging from 3 to 24 h), and subacute stroke patients ($n=18$) who had suffered the ischemic event between 3 and 7 days earlier. The EPCs were counted by flow cytometry in another set of stroke patients ($n=18$; 9 obtained acutely and 9 subacutely). Additionally, the EPCs from an age-matched control group ($n=16$) of patients not suffering from any inflammatory or infectious diseases was studied by cell culture and flow cytometry. The study was approved by the Ethics Committee and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients or relatives and healthy controls gave written informed consent.

2.2. Isolation and culture of EPCs

Ficoll gradient (GE Healthcare, NJ, USA) was used to isolate peripheral blood human mononuclear cells from (PB-MNC) as previously described (Asahara et al., 1997; Choi et al., 2004). Blood was diluted (1:1) with PBS containing 2% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, CA, USA), and 7 ml of diluted blood was then carefully overlaid onto 5 ml Ficoll-Paque Plus™ (GE Healthcare). Cells were centrifuged for 30 min at room temperature (1400 rpm), yielding a PB-MNC layer that was isolated and then centrifuged for 10 min (1500 rpm). The cell pellet was washed with red cell lysis buffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃, 0.115 mM EDTA) and centrifuged for 5 min (1500 rpm). Finally, the PB-MNCs were washed with the Endothelial growth medium -2 endothelial growth medium-2 (EGM-2; Clonetics®, CA, USA), which is composed of endothelial cell basal medium-2 (EBM-2) containing 10% FBS, human endothelial growth factor (hEGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), human basic fibroblast growth factor (hFGF-B), insulin like growth factor 1 (R³-IGF-1), GA-1000 (gentamicin and amphotericin-B), heparin, hydrocortisone and ascorbic acid. Cells were seeded (2×10^7 cells/ml) in fibronectin-coated (10 µg/ml Sigma-Aldrich), 12-well plates and then incubated (37 °C and 5% CO₂). The medium was changed at day 3, and then subsequently changed every other day.

2.3. EPC cell counts

During culture of EPCs, five representative fields per well were taken with a microscope (Olympus IX71) at 200× at days 3, 7 and 10. Spindle-shaped cells were counted using ImageJ software (National

Institutes of Health, MD, USA). Outgrowth endothelial progenitor cells (OECs) were expanded for further experiments (Fig. 1).

2.4. Flow cytometry

To assess cell surface antigen expression, 10^7 leukocytes counted by Turks solution (0.01% Giemsa stain, 3% acetic acid) were stained with 20 µl of each primary monoclonal antibody: 2 µg/ml CD45-FITC (Becton Dickinson Biosciences, NJ, USA), 2 µg/ml CD133-APC (Miltenyi Biotec, CA, USA), 0.5 µg/ml CD14-PE-Cy7 (BD Biosciences), 0.04 µg/ml KDR biotin (Sigma-Aldrich, MO, USA), 0.5 µg/ml CD34-PerCP-Cy5.5 (BD Biosciences) and 44 µg/µl secondary extravidin-PE (Sigma-Aldrich) for 30 min at room temperature. Cell viability was assessed using Hoechst 33352 (5 µg/ml) (Sigma-Aldrich). Previously, cells were blocked for 10 min with 100 µl human serum. After incubation, cells were centrifuged for 5 min (4000 rpm) and resuspended in ammonium chloride lysis buffer for 15 min. Finally, cells were centrifuged for 5 min (4000 rpm), and then mixed with 1 ml PBA buffer [1% bovine serum albumin, 0.1% sodium azide in phosphate buffer saline (PBS)]. Before being analyzed, the samples were filtered through 30 µm CellTricks filters (Partec, Münster, Germany). Finally, 10^6 events per sample were analyzed using the MoFlow high-speed cell sorter cytometer (Beckman Coulter, CA, USA) and different populations were detected. To control for non-specific antibody binding, cells were also labeled with a fluorescent, negative-isotype control antibody. The data were analyzed using FCS Express™ version 3, Research Edition (DeNovo Software, CA, USA).

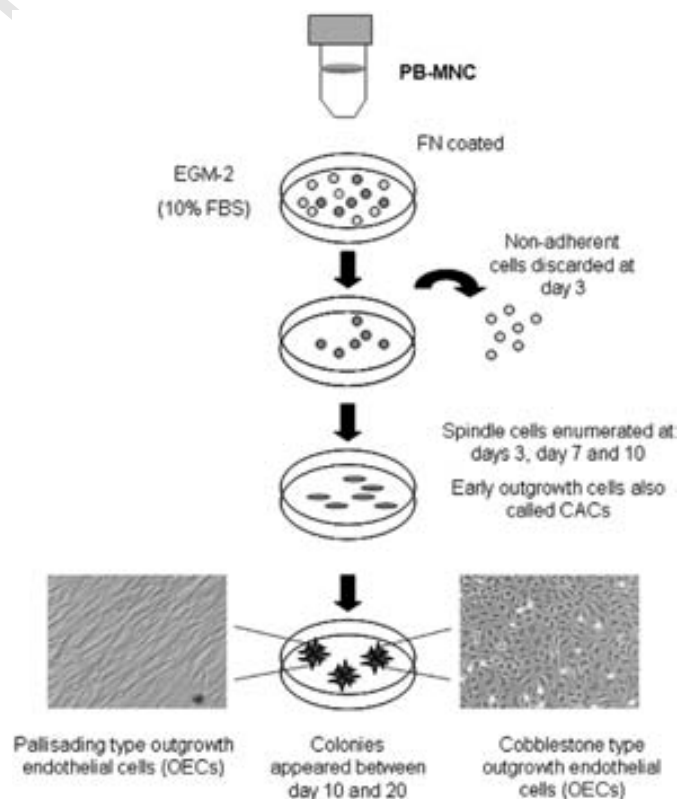


Fig. 1. Method for culturing EPCs: PB-MNCs were isolated by Ficoll gradient density, harvested in fibronectin (FN)-coated plates, and then maintained in EGM-2. After 3 days in culture, non-adherent cells were discarded and adherent CACs were counted as "spindle-shaped" cells. The OECs appeared as either cobblestone or palisading type colonies.

168 2.5. Immunocytochemistry

169 Cells were prepared for immunofluorescent staining by fixation in
 170 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature. After being
 171 washed with PBS, they were permeabilized by PBS containing 0.1%
 172 Tween 20 and incubated with a blocking solution containing 1%
 173 bovine serum albumin in PBS 0.1% Tween 20 for 1 h at room
 174 temperature. After fixation the cells were stained with 10 µg/ml
 175 fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated Ulex Europaeus Agglu-
 176 tinin (Sigma-Aldrich) for 1 h. The samples were then incubated with
 177 mouse anti-VEGFRceptor-2/KDR (1:20, Sigma-Aldrich), rabbit anti-
 178 von Willebrand factor (1:200, Sigma-Aldrich), and rabbit anti-CD133
 179 (1:50, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) overnight at 4 °C. They
 180 were subsequently washed in PBS 0.1% Tween 20 and then incubated
 181 with the secondary antibody (1:1000, anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488
 182 or anti-mouse IgG Alexa Fluor 568 [Invitrogen, CA, USA]) for 1 h. For
 183 nuclear staining, coverslips were mounted with Vectashield mounting
 184 medium with DAPI (Vector Laboratories, CA, USA). Immunostained
 185 samples were analyzed with a fluorescence microscope (Olympus
 186 IX71) equipped with a digital charge-coupled device camera and an
 187 image analysis system (DP-BSW Olympus). Negative controls re-
 188 ceived identical treatment except for the primary antibody.

189 2.6. Tubulogenesis assay

190 Experiments were performed with cultured OECs taken between
 191 passages 1 and 10. Twenty-four-well plates were coated with 200 µl
 192 Matrigel® growth factor reduced (GFR) basement membrane matrix
 193 (BD Biosciences). After 30 min incubation at 37 °C, 6×10^4 OECs/ml
 194 obtained from EPC cell cultures of the stroke patients ($n = 7$; three
 195 acute and four subacute) were seeded in Matrigel®-coated 24-well
 196 plates with EBM-2 and maintained at 37 °C. After 16 h, digitized
 197 images of four representative fields were taken (40× magnification)
 198 in bright field with a microscope (Olympus IX71). Each assay was
 199 performed in duplicate in three independent experiments. The
 200 number and total area of complete rings, the total tube length, and
 201 the number of branching points (i.e. points featuring more than two
 202 connections between rings) were counted by ImageJ software
 203 (National Institutes of Health, MD, USA).

204 2.7. SearchLight® multiplex array analysis of angiogenic proteins

205 This analysis was started using cultured OECs (taken between
 206 passages 1 and 10) representing acute ($n = 3$) or subacute ($n = 3$)
 207 stroke patients. The OECs were seeded in 12-well plates with 1 ml
 208 EGM-2 (Clonetics®), and then maintained until confluence reached
 209 90%. The cells were starved of serum and growth factors for 24 h to
 210 collect EPC-conditioned media (EPC-CM), and then lysed with 0.1 ml
 211 of cold lysis buffer (50 mmol/L Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl,
 212 5 mmol/L CaCl₂, 0.05% Brij-35, 0.02% NaN₃, and 1% Triton X-100)
 213 containing protease inhibitors (phenylmethanesulfonylfluoride and
 214 aprotinin) to assess total protein content. The SearchLight® Human
 215 Angiogenesis Array 2 (Aushon Biosystems, MA, USA) was used to
 216 simultaneously measure four angiogenic factors: platelet derived
 217 growth factor bb (PDGF-BB), hepatocyte growth factor (HGF),
 218 fibroblast growth factor (FGF) and vascular endothelial growth factor
 219 (VEGF). Samples were assayed twice and the mean value of the two
 220 measurements was used. The mean intra-assay coefficients of
 221 variation were <20%. The images were analyzed with Array Analyst
 222 software (Imaging Research, USA). The sensitivity limits were 1 pg/ml
 223 for PDGF-BB, 3.1 pg/ml for HGF, 2 pg/ml for FGF, and 4.9 pg/ml for
 224 VEGF. The standard curves are shown in units of pg/ml, and the
 225 resulting protein concentration was ultimately corrected for the
 226 corresponding total protein content of each cell lysate, such that the
 227 resulting values are expressed as pg/µg of total protein.

2.8. Real-time PCR analysis

228 Experiments were performed with cultured OECs (taken between
 229 passages 1 and 10) representing the acute ($n = 3$) or subacute ($n = 3$)
 230 stroke patients. Real-time PCR was used to quantify mRNA expression
 231 levels of VEGF and HGF, which showed the greatest differences in EPC-
 232 CM growth factor content. Total RNA was extracted with the RNeasy
 233 Mini kit (Qiagen, CA, USA). The RNA concentration and quality were
 234 measured with NanoChips using the Bioanalyzer 2100 system (Agilent,
 235 CA, USA), and the corresponding cDNA was synthesized using the High-
 236 Capacity cDNA Archive kit (Applied Biosystems, CA, USA). The mRNA
 237 levels were quantified using TaqMan Hs00173626_m1 VEGFA (for
 238 VEGF) and Hs00300159_m1 HGF (for HGF). Moreover, expression of the
 239 housekeeping gene peptidylprolylisomerase A (PPIA; probe
 240 Hs99999904_m1) was quantified as a reference to normalize all values.
 241 Real-time PCRs were run in triplicate and analyzed using the Applied
 242 Biosystems SDS 7500 system software (Applied Biosystems). The results
 243 are expressed as percentages based on a calibration sample used in all
 244 experiments.
 245

2.9. Statistical analysis

246 All statistics were analyzed using SPSS® software version 15.0. For
 247 variables that were not normally distributed values are expressed as
 248 median (interquartile range) and statistical significance for inter-
 249 group differences was assessed using the Kruskal–Wallis and Mann-
 250 Whitney tests and for repeated measurements using the Friedman
 251 and Wilcoxon tests. For variables that were normally distributed
 252 significance was assessed using the *T*-test. Correlations between
 253 continuous variables were evaluated using the Spearman coefficient.
 254 A *p* value less than 0.05 was considered statistically significant.
 255

3. Results

3.1. Baseline demographics

256 The demographic characteristics and risk factors profile for our
 257 study populations are summarized in Table 1. These populations did
 258 not show any significant differences in age, or in cardiovascular risk
 259 factors such as sex, smoking, hypertension or diabetes mellitus. The
 260 only significant difference that we identified is the incidence of
 261 dyslipidemia between the subacute stroke patients and the control
 262 subjects ($p = 0.019$); the acute group and the subacute group did not
 263 differ significantly in stroke etiology ($p = 0.585$) or baseline neuro-
 264 logical score ($p = 0.140$). We did not find any differences in
 265 recanalization rate between the acute and subacute groups at 1
 266 ($p = 0.180$), 2 ($p = 0.180$), 6 ($p = 0.281$) or 24 ($p = 0.799$) hours after
 267 thrombolytic treatment. Furthermore, these two groups did not differ
 268 in terms of the number of patients with neurological improvement,
 269 which we defined as a decrease of at least 4 points in NIHSS score at
 270 48 h ($p = 0.215$) or at discharge ($p = 0.880$), or in mortality rate
 271 ($p = 0.361$).
 272
 273

3.2. Phenotypic characterization of EPC populations

274 All cultures of the PB-MNCs from the two stroke patient groups
 275 and from the healthy controls yielded spindle-shaped cells (Fig. 2A).
 276 Immunophenotyping showed that the EPCs were bound to UEA-1
 277 lectin and von Willebrand factor (vWF) antigen, thereby confirming
 278 their endothelial lineage and co-expression of CD133 (progenitor)
 279 and KDR (endothelial) markers (Fig. 2B). Long-term culture of these
 280 cells afforded emerging, expanding colonies of OECs in four acute and
 281 five subacute strokes patients, but not in our healthy controls (under
 282 the same culture conditions). The OECs exhibited two different
 283 morphologies: palisade and cobblestone (Fig. 2A). Endothelial
 284 markers such as UEA1-lectin and vWF were positive in both OEC
 285

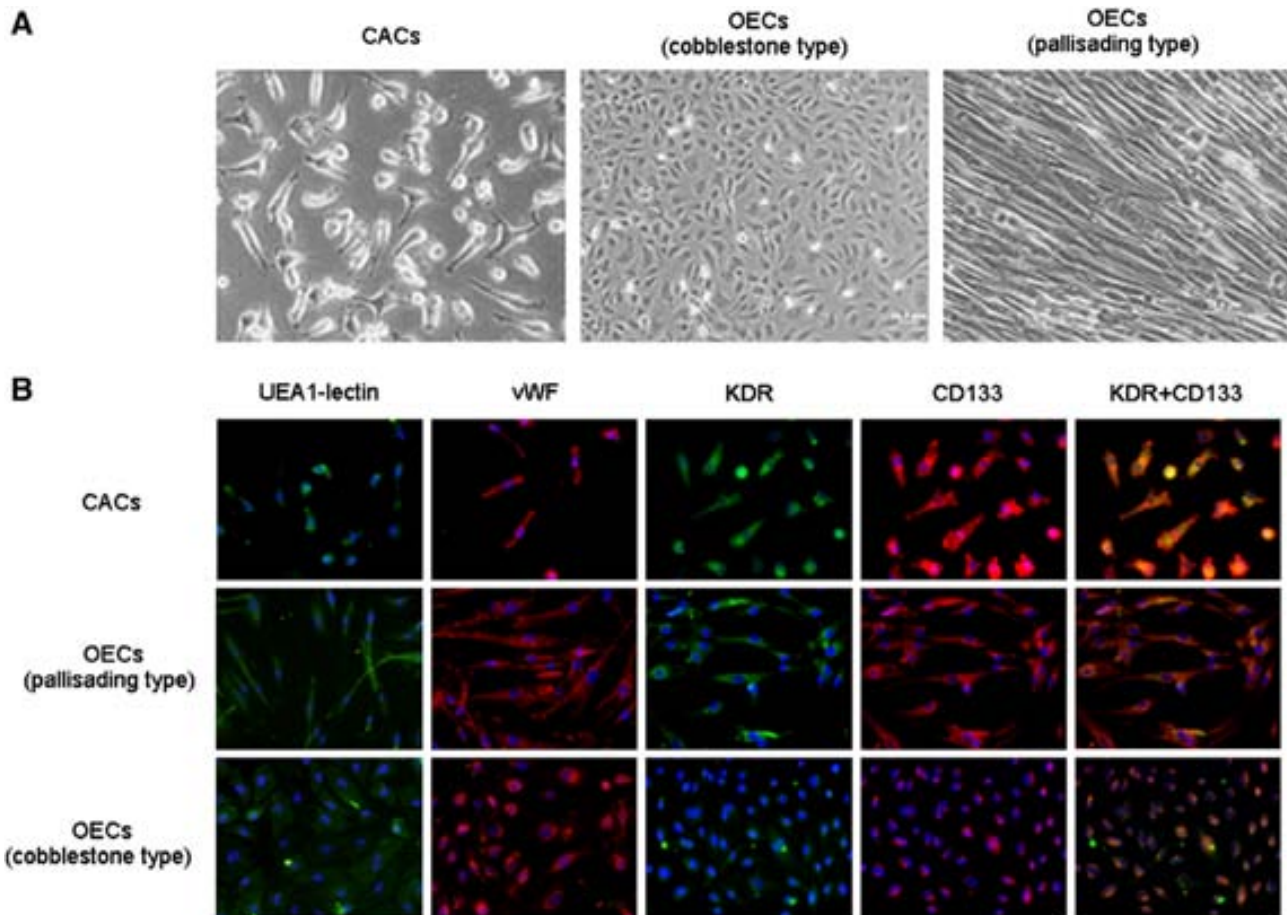


Fig. 2. Immunophenotypic characteristics of EPCs. A) Representative images of CACs at day 7, showing cobblestone type and palisading type OECs (200 \times magnification). B) Representative images (200 \times magnification) of CACs and OECs for UEA-1 lectin (green), vWF (red), KDR (green), CD133 (red). The blue signal corresponds to nuclear DAPI. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

286 populations and also showed progenitor (CD133) and endothelial
287 (KDR) lineage, as shown in Fig. 2B.

288 3.3. Circulating levels of EPCs in patients and controls

289 Fig. 3A shows representative density dot plots in which CD34+
290 cells were identified among viable cells (the blue square in the left
291 panel). The right panel shows further analysis, indicating that 38.6% of
292 CD34+ cells were also KDR+/CD133+. Interestingly, a significantly
293 higher number of KDR+/CD133+/CD34+/CD45+ EPCs was found in
294 acute stroke patients ($n=9$) compared to control subjects ($n=16$)
295 ($p=0.026$), as illustrated in Fig. 3B.

296 3.4. Cell culture counts

297 Fig. 4A shows the results obtained from EPCs cell cultures. In
298 healthy controls ($n=16$), no spindle-shaped cells were found at day
299 3, whereas 2 (0–29.3) cells/mm² were found at day 7 and 8.9 (0–14.8)
300 cells/mm², at day 10. The cultures from the acute stroke patients
301 ($n=12$) showed 4.1 (0–6.9) cells/mm² at day 3, 25.5 (1.3–40.7) cells/
302 mm² at day 7 and 6.5 (0.3–17.4) cells/mm², at day 10. Finally, in the
303 cultures from the subacute stroke patients ($n=18$), 0 (0–0.34)
304 spindle-shaped cells/mm² were found at day 3, whereas 19.3 (6.2–
305 83.1) cells/mm² were observed at day 7, and 10.3 (3.1–63.1) cells/
306 mm², at day 10. In the subacute culture, a significant increase in new
307 differentiated cells was found between days 3 and 7 ($p=0.016$)
308 (Fig. 4B). Fig. 4C shows representative microphotographs of CACs at
309 days 3 and 7 of the different cultures.

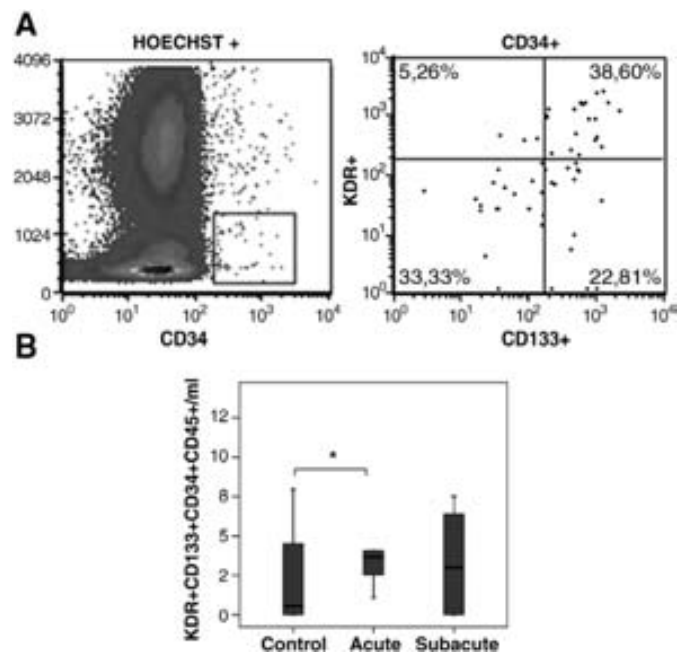


Fig. 3. FACS analysis of cells from the stroke patients or healthy controls. A) Density plot shows CD34+ cells (blue gate). CD34+ amplified gate (right panel) showing that 38.6% were KDR+/CD34+/CD133+ cells. B) KDR+/CD45+/CD34+/CD133+ cells/ml levels in the stroke patients and in the control subjects. Results are expressed as median (interquartile range); * $p<0.05$.

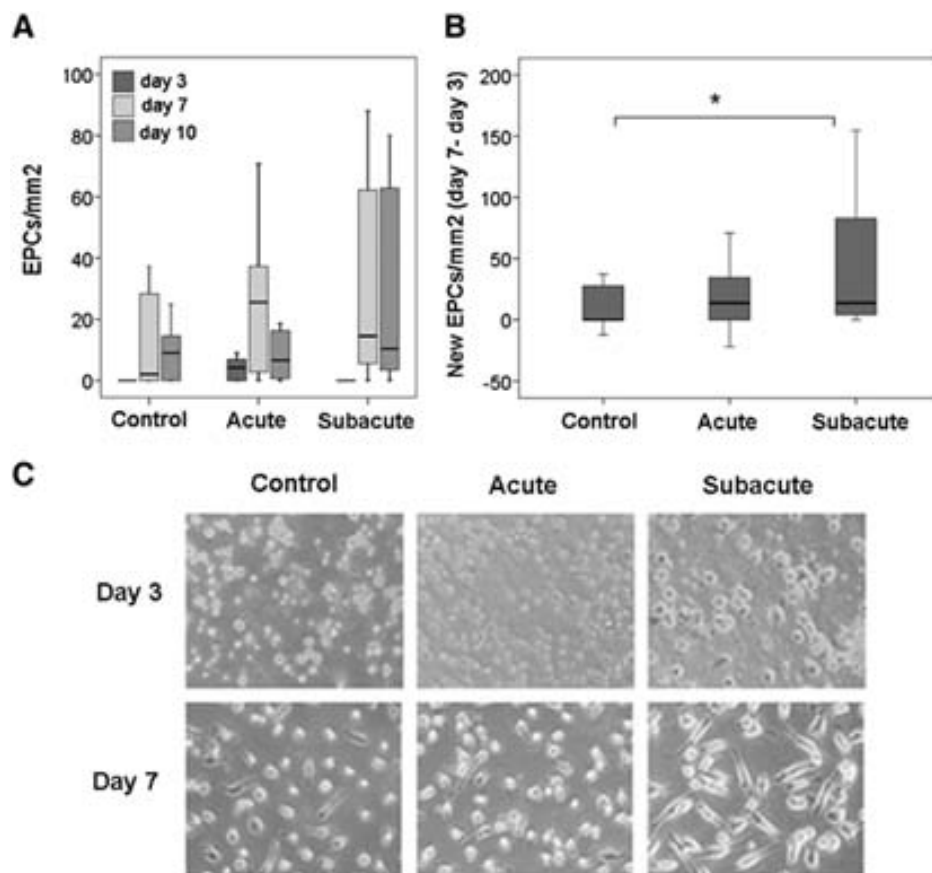


Fig. 4. Circulating angiogenic cells (CACs). A) Concentration (cells/mm²) at days 3, 7 and 10 in each group. B) Newly differentiated EPCs between days 3 and 7. C) Representative images of EPCs from each group (200 \times magnification). Results are expressed as median (interquartile range); * $p < 0.05$.

310 3.5. EPCs presence is related to stroke severity

311 As observed in Fig. 5A, the appearance of OECs in a small sample
 312 size of patients ($n = 9$: four acute plus five subacute) was significantly
 313 positively associated to stroke severity according to baseline NIHSS
 314 score ($p = 0.013$). Moreover, the presence of CD34+/CD133+ cells
 315 was positively correlated to baseline NIHSS score ($p = 0.03$; $R^2 = 0.6$)
 316 (see Fig. 5B).

317 3.6. EPCs from acute and subacute stroke patients differ in their capacity 318 to induce vasculogenesis

319 To assess the ability of the OECs obtained from stroke patients to
 320 induce vasculogenesis, we performed an *in vitro* tubulogenesis assay
 321 with Matrigel® matrix. Fig. 6A shows representative images of
 322 tubulogenesis by OECs from acute ($n = 3$) and subacute ($n = 4$) stroke
 323 patients. We examined different parameters and found that the OECs
 324 from subacute strokes always exhibited better tubulogenic capacity.
 325 However, the only statistically significant difference observed was
 326 that capillary-like tubes in the OECs from the subacute patients had a
 327 longer total tube length than those in the OECs from the acute group
 328 ($p = 0.03$), as seen in Fig. 6B to E.

329 3.7. EPC secreting growth factors

330 We analyzed a panel of angiogenic promoters in EPC-CM and their
 331 gene expression in EPCs from acute ($n = 3$) and subacute ($n = 3$)
 332 stroke patients. Fig. 7A shows that the EPCs from subacute group had
 333 higher levels of HGF (133.8 ± 21.7 vs. 4522.3 ± 4085 pg/ μ g) and VEGF
 334 (164.5 ± 92.8 vs. 260.5 ± 199 pg/ μ g). Likewise, the EPCs from the
 335 subacute group had higher relative mRNA levels of HGF ($32.6 \pm 32.3\%$

vs. $84.1 \pm 42.4\%$) and VEGF (43.9 ± 18.8 vs. $159 \pm 67.8\%$) (Fig. 7B).
 However, these differences were not significant ($p > 0.05$).

4. Discussion

Our results show that EPCs are mobilized in the peripheral blood
 during the acute phase of stroke (<24 h). However, EPCs obtained in a
 delayed stroke phase (3–7 days) might display enhanced endothelial
 differentiation and greater capacity to induce vasculogenesis.

True EPCs are exceptionally rare in peripheral blood: indeed, their
 concentration in healthy volunteers has been estimated at one cell per
 20 ml of blood (Ingram et al., 2005). In the present study we have
 quantified early EPCs by counting spindle-shaped cells (circulating
 angiogenic cells [CACs]) in short-term cultures, as previously
 described (Akita et al., 2003; Dimmeler et al., 2001). To obtain
 different subtypes of EPCs with minor modifications, we followed
 guide-lines for EPC culture assays described by Ingram et al. (2004).
 We did not observe any differences in endothelial or progenitor
 phenotype between CACs and OECs. Furthermore, despite their
 diverse morphologies, the OECs did not differ in the functional assays.
 Interestingly, we did find discrepancies in the number and differentia-
 tion capacity between the EPCs from stroke patients and those from
 control subjects, and in functioning between the EPCs from the two
 stroke groups.

Putative EPCs were targeted by multiparametric flow cytometry as
 previously described (Machaliński et al., 2006; Dunac et al., 2007;
 Huang et al., 2007; Povsic et al., 2009; Fadini et al., 2006; Rustemeyer
 et al., 2006; Friedrich et al., 2006; Shaffer et al., 2006; Yip et al., 2008).
 A significant difference found in levels of a specific EPC population
 was that the acute stroke group had higher levels of KDR+/CD34+/
 CD133+/CD45+ as compared to the control subjects, which probably

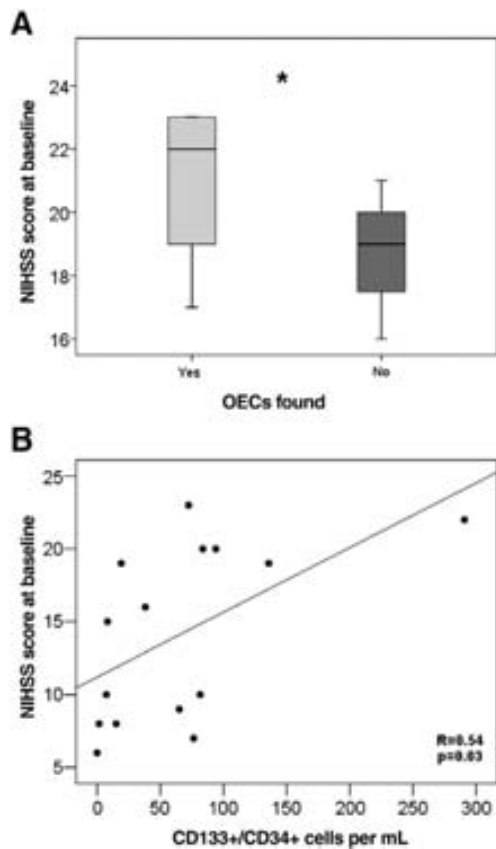


Fig. 5. Stroke severity positively correlates to the number of EPCs. A) OECs appeared in cultures from patients with higher NIHSS score. B) Concentration of CD133+/CD34+ cells positively correlated to NIHSS score. Results are expressed as median (inter-quartile range); *** $p < 0.001$.

reflects a response to the ischemic event. Supporting this data, we positively associated stroke severity to CD34+/CD133+ levels and to the appearance of OEC colonies. Our findings are consistent with those reported for experiments employing CD34+ as the sole progenitor cell marker (Machaliński et al., 2006; Dunac et al., 2007) or using a combination of endothelial and progenitor markers (Yip et al., 2008). However, other studies have shown higher levels of circulating progenitor populations (but not EPCs) counted within 72 h after ischemic stroke are associated with better outcome at discharge (Cesari et al., 2009).

We observed a higher number of CACs in the cell cultures from the subacute group than in those from the control group. Moreover, endothelial-like OECs appeared only in the cultures from the stroke patients. In this sense, our results suggest that EPCs truly capable of inducing vasculogenesis might be more efficiently isolated from stroke patients than from controls. However, the literature on EPC levels and stroke varies widely: some authors have actually reported lower CFU-EPCs in stroke patients than in control subjects (Ghani et al., 2005; Chu et al., 2008), and others have affirmed that higher levels of CFU-EPCs correlate to better neurological outcome (Sobrino et al., 2007). Nevertheless, all of these results must be interpreted cautiously, given the lack of consensus on the definition of EPCs: some researchers claim that CFU-EPCs are not true EPCs but rather hematopoietic-derived progeny committed to the myeloid lineage which differentiates into phagocytic macrophages, and that they do not possess the ability to form vascular structures *in vivo* (Yoder et al., 2007).

FACS and cell culture provide information about the number of EPCs present in the blood stream but it is essential to also determinate their endothelial function. OECs are only capable of tubulogenesis *in*

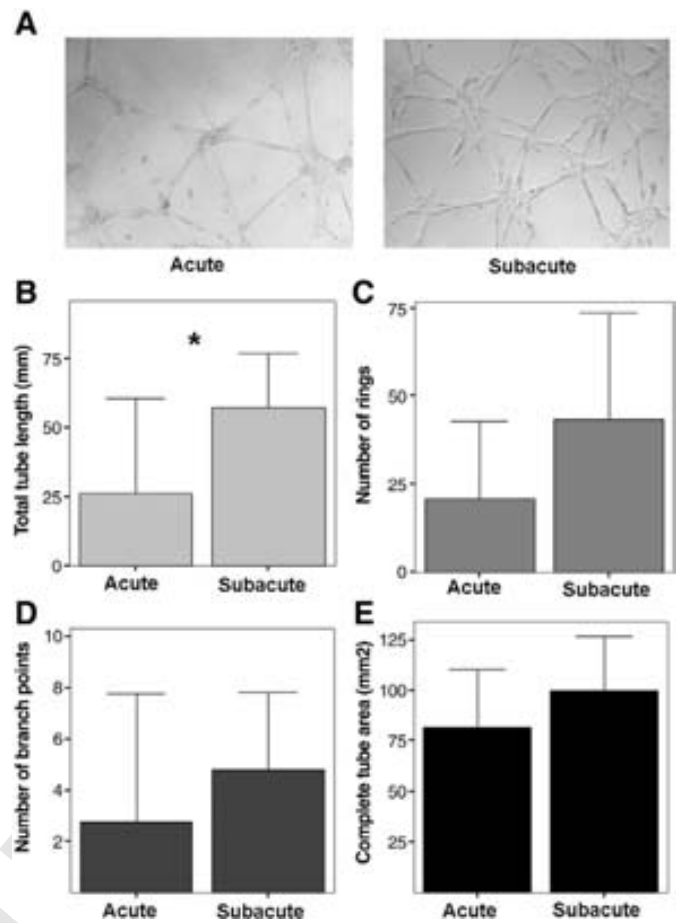


Fig. 6. Tubulogenesis assay on Matrigel®. A) Photomicrographs show tube-like structures in acute and subacute strokes (40 \times magnification). Total length (mm) (B), mean number of rings (C), number of branching points (D), and tube area of complete rings (mm²) (E) were determined. Results are expressed as means \pm SEM; * $p < 0.05$.

in vitro assays (Hur et al., 2004; Yoon et al., 2005; Sieveking et al., 2008) therefore; we performed the Matrigel® assay with this population. Our results demonstrate that OECs from ischemic stroke patients can perfectly form capillary-like structures *in vitro*. Furthermore, greater tubulogenic capacity was found in cells obtained from subacute stroke patients, suggesting that after stroke, EPC functioning may vary with the time following the ischemic event. Local hypoxia is known to stimulate differentiation of EPCs from healthy subjects, consequently enhancing the *in vitro* neovascularization efficacy of EPCs by increasing the release of growth factors such as VEGF (Akita et al., 2003; Di Santo et al., 2009). Moreover, in rats, hypoxia-stimulated cells administered after unilateral hind limb ischemia exhibited greater angiogenic properties than non-hypoxic cells *in vivo* (Akita et al., 2003). Interestingly, our data also indicate that ischemic cells can secrete growth factors known to be crucial for angiogenesis such as HGF, VEGF, FGF and PDGF-BB. Though this is an interesting finding never reported for EPCs from stroke patients, we observe clear interindividual differences which make difficult to conclude how stroke time-course modulates the growth factor secretion.

We recognize that our study is limited by its small population of test subjects. However, and as previously described, we isolated greater quantities of OECs from stroke patients than from healthy controls (Chu et al., 2008; Jung et al., 2008), which is why we performed all cell function assays using only cells from the stroke patients. Albeit this can be interpreted as a limitation, it could also be understood as reflecting the reduced functional potential of EPCs from healthy subjects for transplantation. Finally, repeated sampling from a uniform group of patients to examine how the number of EPCs is

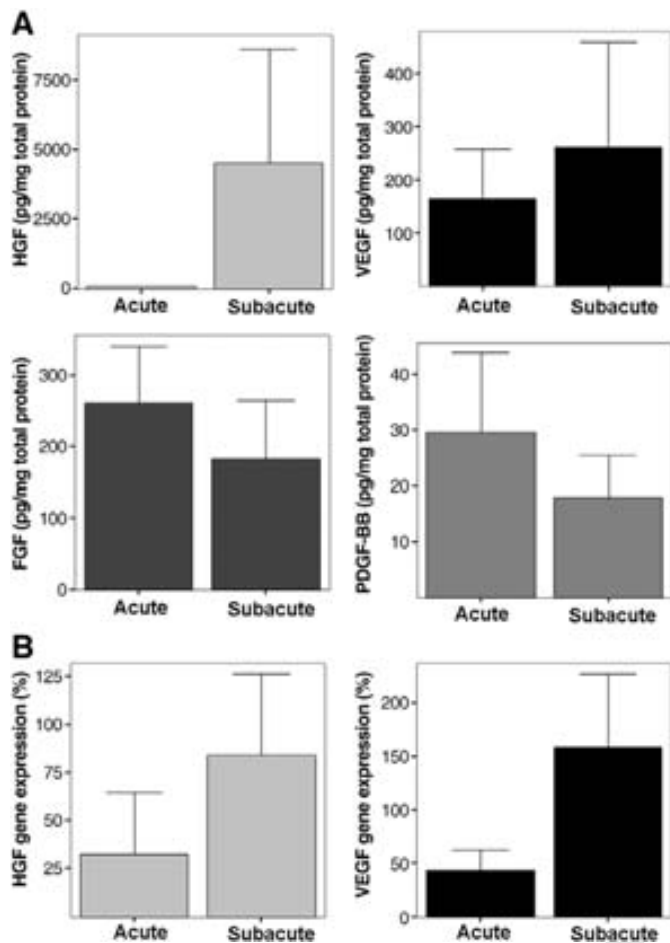


Fig. 7. Secreted growth factor levels and growth factor gene expression levels in OECs. A) Secreted amounts of HGF, VEGF, FGF and PDGF-BB, corrected for total protein content. B) HGF and VEGF mRNA levels, expressed as median percentages compared to a housekeeping marker. Data are expressed as means \pm SEM.

changing in time following the stroke onset is needed to confirm the time-dependant functionality of EPCs after stroke.

In conclusion, our findings suggest that higher circulating levels of EPCs do not correlate to better endothelial function *in vitro*. Moreover, our data indicate that the ischemic insult may modulate the vasculogenic capacity of EPCs, such that those obtained in the subacute phase of stroke would have the greatest potential. The acute increase of EPC counts in the blood stream might be explained by a rapid release from the bone marrow activated by the ischemic event and the inflammatory response whereas a later decrease but enhanced functionality of EPCs could be explained by the activation of endogenous angiogenesis and be an advantage for neurorepair. Further studies are warranted to determine if transplanted autologous EPCs used for treatment of ischemic stroke are most effective during the subacute phase and to determine if the ischemic shift can indeed modify functioning of EPCs (and consequently, their capacity to induce vasculogenesis).

Acknowledgments

We are grateful to Manolo Quintana for statistical advice and to the entire Stroke Department. We also thank Jordi Petriz for his valuable suggestions and for his contributions in the flow cytometry analysis. M.N.-S. is supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS PI060471); A.R. is supported by a Beatriz Pinós Fellowship; M.H.-G holds a postdoctoral grant from the Spanish Ministry of Health (Instituto de Salud Carlos III). The Neurovascular

Research Laboratory is a member of the Spanish stroke research network RENEVAS (RD06/0026/0010) and participates in the project "Consorcio Terapias Neuroreparadoras en Ictus" (TNR), supported by ACCIÓ (an agency of the autonomous government of Catalonia) and Grupo Ferrer.

References

- Akita, T., et al., 2003. Hypoxic preconditioning augments efficacy of human endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Lab. Invest.* 83, 65–73.
- Anon, 1995. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institutes of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. *N Engl J. Med.* 333, 1581–1587.
- Anon, 1997. Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. The NINDS t-PA Stroke Study Group. *Stroke* 28, 2109–2118.
- Asahara, T., et al., 1997. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275, 964–967.
- Cesari, F., et al., 2009. Bone marrow-derived progenitor cells in the early phase of ischemic stroke: relation with stroke severity and discharge outcome. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 29, 1983–1990.
- Choi, J.H., et al., 2004. Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arterioscler., Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1246–1252.
- Chu, K., et al., 2008. Circulating endothelial progenitor cells as a new marker of endothelial dysfunction or repair in acute stroke. *Stroke* 39, 1441–1447.
- Di Santo, S., et al., 2009. Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. *PLoS ONE* 4, e5643.
- Dimmeler, S., et al., 2001. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J. Clin. Invest.* 108, 391–397.
- Dunac, A., et al., 2007. Neurological and functional recovery in human stroke are associated with peripheral blood CD34+ cell mobilization. *J. Neurol.* 254, 327–332.
- Fadini, G.P., et al., 2006. Peripheral blood CD34 + KDR + endothelial progenitor cells are determinants of subclinical atherosclerosis in a middle-aged general population. *Stroke* 37, 2277–2282.
- Friedrich, E.B., et al., 2006. CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circ. Res.* 98, e20–e25.
- Ghani, U., et al., 2005. Endothelial progenitor cells during cerebrovascular disease. *Stroke* 36, 151–153.
- Hacke, W., et al., 2004. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet* 363, 768–774.
- Huang, Y., et al., 2007. Study on culture, identification and differentiation of CD133+ endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 45, 619–622.
- Hur, J., et al., 2004. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularization. *Arterioscler., Thromb. Vasc. Biol.* 24, 288–293.
- Ingram, D.A., et al., 2004. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 104, 2752–2760.
- Ingram, D.A., et al., 2005. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 106, 1525–1531.
- Jung, K.H., et al., 2008. Identification of neuronal outgrowth cells from peripheral blood of stroke patients. *Ann. Neurol.* 63, 312–322.
- Lapergue, B., et al., 2007. Endothelial progenitor cells and cerebrovascular diseases. *Prog. Neurobiol.* 83, 349–362.
- Lo, E.H., 2008. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat. Med.* 14, 497–500.
- Machalinski, B., et al., 2006. Mobilization of human hematopoietic stem/progenitor-enriched CD34+ cells into peripheral blood during stress related to ischemic stroke. *Folia Histochem. Cytobiol.* 44, 97–101.
- Ohab, J.J., et al., 2006. A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J. Neurosci.* 26, 13007–13016.
- Povsic, T.J., et al., 2009. Common endothelial progenitor cell assays identify discrete endothelial progenitor cell populations. *Am. Heart J.* 157, 335–344.
- Rustemeyer, P., et al., 2006. Optimized flow cytometric analysis of endothelial progenitor cells in peripheral blood. *J. Immunol.* 177, 77–88.
- Shaffer, R.G., et al., 2006. Flow cytometric measurement of circulating endothelial cells: the effect of age and peripheral arterial disease on baseline levels of mature and progenitor populations. *Cytometry, Part B.* 70, 56–62.
- Sieveking, D.P., et al., 2008. Strikingly different angiogenic properties of endothelial progenitor cell subpopulations: insights from a novel human angiogenesis assay. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51, 660–668.
- Sobrino, T., et al., 2007. The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke* 38, 2759–2764.
- Taguchi, A., et al., 2004. Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* 109, 2972–2975.
- Yip, H.K., et al., 2008. Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke. *Stroke* 39, 69–74.
- Yoder, M.C., et al., 2007. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 109, 1801–1809.
- Yoon, C.H., et al., 2005. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation* 112, 1618–1627.

Article 3

Role of endogenous granulocyte-macrophage colony stimulating factor following stroke and relationship to neurological outcome.

Curr Neurovasc Res. 2009; 6: 246-251

Role of Endogenous Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor Following Stroke and Relationship to Neurological Outcome

Miriam Navarro-Sobrino, Anna Rosell, Anna Penalba, Marc Ribó, José Alvarez-Sabín, Israel Fernández-Cadenas and Joan Montaner*

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

Abstract: Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) is a proinflammatory cytokine with neuroprotective and angiogenic properties demonstrated in animal models of cerebral ischemia but its role in human ischemic stroke is still unknown. Thus, our aim is to determine human GM-CSF plasma level in control subjects and stroke patients and its relationship to clinical outcome. Forty-three patients with middle cerebral artery occlusion who received thrombolytic therapy within the first three hours of stroke onset and nineteen healthy controls were included. Blood samples were drawn before tissue plasminogen activator (t-PA) treatment. In a group of thirteen strokes blood samples were also obtained one hour after t-PA treatment, at 24 hours of symptoms onset, at discharge and at three months. GM-CSF levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Stroke severity and neurological outcome were assessed by National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) and functional outcome was scored by modified Rankin Scale (mRS) at 3 months. Baseline GM-CSF level was significantly higher in stroke patients than in healthy controls (17.8 pg/ml vs. 12.8 pg/ml); $p < 0.0001$ and was positively correlated with NIHSS score at 12 hours ($R = 0.3$, $p = 0.03$). No association was detected with functional status at three months measured by mRS. Temporary profile of GM-CSF level in stroke patients gradually decreases from admission to three months. Higher plasma endogenous GM-CSF level is found in stroke patients compared to controls. However, no relation was found with a better outcome. Further research is necessary for elucidating the role of GM-CSF in ischemic stroke.

Keywords: Stroke, neuroprotection, angiogenesis, GM-CSF, thrombolysis, hematopoietic cytokines.

INTRODUCTION

Stroke is one of the most important causes of death and disability in developing countries. The only acute treatment approved by the health authorities for ischemic stroke is reperfusion induced by recombinant tissue plasminogen activator (rtPA) (Montaner *et al.*, 2003). Unfortunately, due to stringent inclusion criteria, only 3 to 8.5% of stroke patients can benefit from it, thus leaving most patients untreated. For this reason, it is mandatory to look for new strategies to improve stroke treatment.

In this sense, to promote angiogenesis and vasculogenesis seems to be a promising tool to enhance neurorecovery of the damaged area (Sun *et al.*, 2003, Hansen *et al.*, 2008, Otha *et al.*, 2006). However, different studies in experimental models have demonstrated that promoting these processes in the acute phase of cerebral ischemia might increase blood brain barrier instability (Zhang *et al.*, 2000). Thus, a better knowledge of these factors' kinetics in stroke patients and their relation with clinical prognostic parameters is required.

Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF) is a glycoprotein of 127 amino acids with an important function as a growth and differentiation factor for

the development of hematopoietic progenitor cells into macrophages, granulocytes and dendritic cells (Metcalfe *et al.*, 1989). For this reason, GM-CSF has been clinically employed for the reconstitution of hematopoiesis in cancer (Dale *et al.*, 2002) or to counteract neutropenia due to a complication of chemotherapy (Antman *et al.*, 1988). GM-CSF also participates in inflammatory processes activating macrophages/monocytes and eosinophils and is a histamine-releasing factor for basophils. Thus, it has been involved in different diseases as asthma (Sasha *et al.*, 2009), allergy (Sitkauskiene *et al.*, 2005) or chronic obstructive pulmonary disease (Ziora *et al.*, 2007). In addition, GM-CSF also acts in angiogenesis and arteriogenesis phenomena both in physiological and pathological conditions such as ovulation, wound healing, fracture repair or tumor growth and metastasis (Buschmann *et al.*, 1999, Takeda *et al.*, 1991).

In the neuroscience field, recent studies have focused their research in its potential as a neuroprotective molecule in the central nervous system (Ribatti *et al.*, 2001) (Schäbitz *et al.*, 2008) (Huang *et al.*, 2007). Furthermore, GM-CSF appears to be induced in the cerebrospinal fluid (CSF) of stroke patients and correlated with better neurological score (Tarkowski *et al.*, 1997).

Besides, some other hematopoietic factors like erythropoietin (EPO) and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) have been tested in clinical trials, and their results showed an improvement of outcome in stroke patients (Schäbitz *et al.*, 2007, Hasselblatt *et al.*, 2006, Sprigg *et al.*, 2006, Bath *et al.*, 2007) suggesting that those could be a promising therapeutic tool for ischemic stroke.

*Address correspondence to this author at the Neurovascular Research Lab, Institut de Recerca, Hospital Vall d'Hebron., Pg Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain; Fax: +34934894015; Tel: +34934894073; E-mail: 31862jmv@comb.cat

Received: July 20, 2009, Revised: August 07, 2009, Accepted: August 12, 2009

However, it is still unknown which are GM-CSF endogenous plasma level and its relationship with different clinical parameters in stroke patients. Therefore, our aim is to study GM-CSF plasma profile in stroke patients and correlate this level with prognostic parameters.

MATERIALS AND METHODS

Study Population

The study included 43 patients with an acute ischemic stroke involving the middle cerebral artery (MCA) territory admitted to the emergency department. All patients received thrombolytic therapy in standard dose 0.9 mg/Kg (10% bolus and 90% continuous infusion for 1 hour) within 3 hours of symptom onset. On admission, all patients underwent a cranial computed tomography (CT) scan and a second CT was repeated after 24-48 h (or earlier when rapid neurological deterioration occurred) to evaluate the presence of hemorrhagic transformation (HT) and types of HT were defined according to previously published criteria (Hacke *et al.*, 1995).

A detailed history of vascular risk factors, drug abuse, alcoholism, concomitant medication was obtained from each patient. National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) were recorded to assess level of consciousness and neurological status on admission and on follow-up visits (12, 24, 48 hours and 7 days). We defined a neurological improvement as a decrease in NIHSS by ≥ 4 points and neurological deterioration as either death or increase in NIHSS by ≥ 4 points at 48 hours. Functional outcome was defined by modified Rankin scale (mRS) at three months after stroke onset.

Additionally, a control group of 19 age-matched healthy subjects, non suffering from inflammatory or infectious diseases was studied as a control range of GM-CSF in plasma. The study was approved by the Ethics Committee and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients or relatives and healthy controls gave informed consent.

Immunoassay Methods

Venous blood samples were drawn from each patient at admission (baseline) and before any treatment was initiated.

A temporary profile was determined at different time points in a group in 13 patients included in the study group: 1h after thrombolytic treatment, 24h after symptoms onset, at discharge (between 5-7 days) and at three months. EDTA tubes were used to collect the blood. Plasma was immediately separated by centrifugation at 3000 rpm for 15 minutes and stored at -80°C until analysis. The level of GM-CSF was determined by commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to manufacturer's instructions (Biotrack; Amersham Pharmacia). Each plasma sample was analyzed by duplicate and the mean of two values was used. Intrassay and interassay coefficients of variation (CV) were less than 20% and 4% respectively.

Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted using the Statistical Products and Service Solution (SPSS) package 15.0. GM-CSF levels showed a normal distribution (Kolmogorov-Smirnov and P-P plot). Statistical significance for intergroup differences was assessed by T-test and One-way ANOVA. To study correlation between continuous variables Pearson's coefficient were used. A repeated measurements test (Friedman test) was used to analyze increases/decreases on temporary profile of the studied molecule. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Demographic Population Characteristics

A total of 43 stroke patients and 19 age- and sex-matched healthy controls were included in the study. Hypertension was significantly higher in patients (72%) and previous antiplatelet treatment was more common in this group (38%) than in control group ($p < 0.05$). Patients mean age was 74 years (60-80) and 48.8% were male. Regarding risk factors 25.6% were smokers, 21% had diabetes mellitus, 23.2 had dyslipidemia, 9.3% had a history of coronary artery disease and 18.6% received statins previously. Concerning etiologic subgroups, 60.5% had a cardioembolic stroke, 16.3% an atherothrombotic stroke, 4.6% had an uncommon stroke and 25.6% remained undetermined according to TOAST criteria. Based on OSCP criteria 74.4% showed a total anterior circulation infarct (TACI) and the median NIHSS score at admission was 17 (11-20). Neurological improvement at 48

Table 1. Demographic and Risk Factors Characteristics Among the Studied Patients and Controls

	Healthy Controls (n=19)	Stroke Patients (n=43)	P Value
Age (years)	70 (62-79)	74 (60-80)	0.873
Sex male (%)	52.6	48.8	0.785
Current smoking (%)	10.5	25.6	0.183
Hypertension (%)	36.8	72	0.009*
Diabetes mellitus (%)	5.3	21	0.125
Dyslipidemia (%)	5.3	23.2	0.493
Statin treatment (%)	21	18.6	0.823
Antiplatelet agents	10.5	38	0.030*

hours was recorded in 58.1% of patients and worsening was found in 18.6% of patients (Table 1).

GM-CSF Plasma Level

GM-CSF level at baseline was significantly higher 17.8 (14.8-19.6) pg/ml in patients compared to healthy controls 12.8 (11.9-16) pg/ml as shown in Fig. (1) ($p < 0.001$).

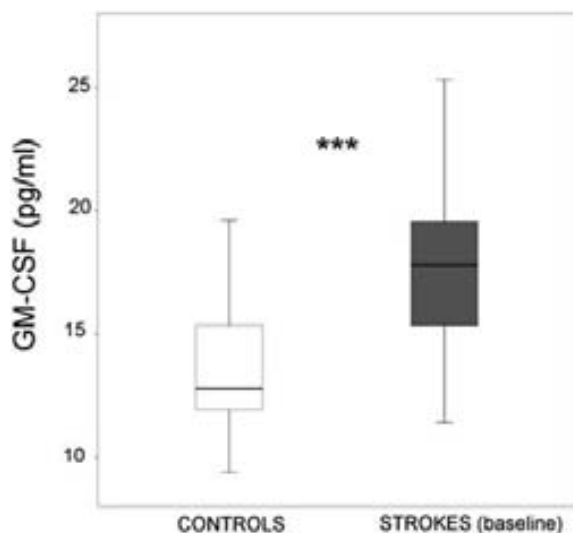


Fig. (1). Box plot graph shows higher GM-CSF level in stroke patients (gray box plot) ($n=43$) than in healthy controls (white box plot) ($n=19$). Bars represent S.D. *** $p < 0.001$.

Table 2 describes patients' risk factors that could be related to baseline GM-CSF level. In this sense, our results showed that baseline GM-CSF level was not related to any of the studied risk factors, stroke severity or neurological outcome. More specifically, no differences in GM-CSF plasma level were found regarding etiologies or with symptomatic hemorrhagic transformations. Regarding short-term neurological outcome, a significant positive correlation was observed between baseline GM-CSF level and NIHSS score at 12 hours ($r=0.3$, $p=0.03$). However, we could not find any association between patients who improved or got worse during the first 48 hours after stroke ($p=0.826$). At long-term, GM-CSF plasma level did not change depending on the functional outcome measured by mRS at three months of the event ($p=0.938$).

The GM-CSF temporary profile is represented in Fig. (2), showing a gradually decrease from admission to the third month. Plasma level at 1 hour was 13.8 (13.1-16.1) pg/ml, at 24 hours 14.9 (13.5-15.9) pg/ml, 13.7 (13-16.3) pg/ml at discharge and at three months 13.9 (13.1-14.7) pg/ml. No correlation was found between plasma GM-CSF level and NIHSS at later time points, although a positive correlation with mRS at three months and GM-CSF level at discharge was reached ($r=0.57$, $p=0.03$).

DISCUSSION

Despite increasing data about the neuroprotective effect of GM-CSF in animal models, there is a lack of information regarding the endogenous plasma level of this cytokine in stroke patients. In this sense our study demonstrates an early

Table 2. GM-CSF Plasma Level and Presence of Several Risk Factors, Pharmacological Treatment and Different Clinical Variables in Stroke Patients at Baseline

	YES	NO	P value
Male	16.9 (13.6-19.5)	17 (12.7-19.2)	0.671
Smoking	16.7 (12.4-19.5)	17.1 (13-19)	0.519
Hypertension	17.1 (13.7-19)	14.2 (12.7-19.4)	0.462
Diabetes mellitus	17.8 (15.9-20.2)	16.5 (12.8-19.1)	0.872
Atrial Fibrillation	17.8 (17-20.1)	14.8 (12.7-18.1)	0.237
Coronary artery disease	22 (15.5-22)	16.85 (12.8-18.9)	0.454
Dyslipidemia	16.9 (12.8-19.5)	16.9 (12.8-19.5)	0.766
Previous stroke	14.8 (12-22.5)	17 (13-19.2)	0.323
Previous antiplatelet agents	17.4 (13.2-19.2)	16.8 (12.8-19.5)	0.595
Previous Statins	17.8 (14.1-20.3)	16.7 (12.7-18.9)	0.416
Cardioembolism	17.8 (19.6-16.8)	17.45 (13.4-20.1)	0.360
Neurological improvement 48h	17.2 (14.4-19.5)	17.9 (16.1-20)	0.826
Neurological worsening 48h	17.9 (17.3-19.1)	17.6 (14.1-20)	0.826
Parenchymal hematoma	17.8 (12.8-19.3)	17.8 (14.8-20)	0.702
Symptomatic HT	17.9 (11.5-18.9)	17.8 (15-19.9)	0.603
Rankin>2	17.8 (13.7-20)	17.5 (13.9-19.8)	0.938
Death	17.9 (17.7-19.6)	17.5 (13.9-19.8)	0.453

increase in GM-CSF plasma level in stroke patients compared to controls but, surprisingly, higher levels are not related with a better outcome in our population.

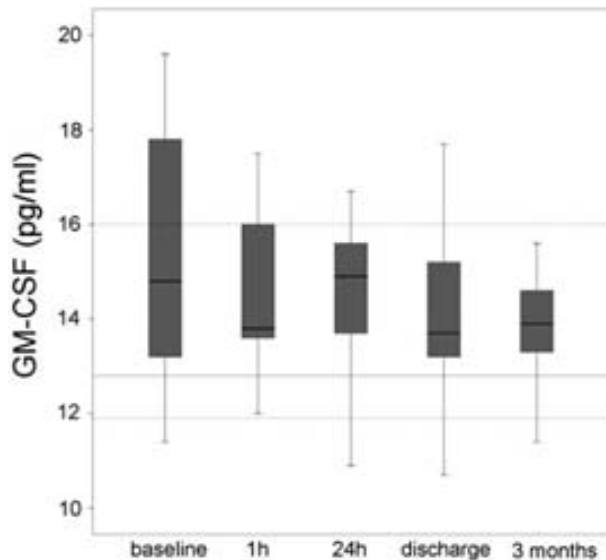


Fig. (2). Temporal profile of GM-CSF after ischemic stroke (gray box plot). Median value of healthy controls at each time point is represented by continuous line and broken lines indicates 25th and 75th percentiles. Bars represent S.D.

GM-CSF is a polyfunctional cytokine that can stimulate the maturation and function of such different cell types as hematopoietic cells (Metcalf *et al.*, 1989), endothelial cells (Bussolini *et al.*, 1991), smooth muscle cells (Plenz *et al.*, 1999), bone marrow progenitor cells (Kong *et al.*, 2009) or neuronal progenitor cells (Kim *et al.*, 2004). Hence, GM-CSF can participate in many different pathologic processes such as arteriosclerosis (Kleemann *et al.*, 2008), angiogenesis modulating the microenvironment to the benefit of tumor growth (Lázár-Molnár *et al.*, 2000) or in chronic pulmonary inflammatory diseases (Vlahos *et al.*, 2006) from which the neutralization of GM-CSF could be very useful for the treatment of these diseases.

Exogenous GM-CSF infusion has neuroprotective effects against stroke injury in both *in vitro* and *in vivo* experimental models (Schäbitz *et al.*, 2007, Kong *et al.*, 2009). GM-CSF treatment increases significantly neuronal cell viability in a model of glutamate-induced neuronal injury (Kong *et al.*, 2009). A previous report by this group also showed that GM-CSF induces the proliferation of neural progenitor cells *in vitro* (Kim *et al.*, 2004) while inhibits apoptosis of primary cortical neurons and neuroblastoma cells regulating the expression of apoptosis-related genes (Schäbitz *et al.*, 2007, Huang *et al.*, 2007). Moreover, GM-CSF increases the number of peripheral bone marrow cells suggesting a role during neurological recovery following cerebral ischemia (Kong *et al.*, 2009).

Furthermore, it has been demonstrated that *in vivo* GM-CSF administration at 60µg/kg daily for 5 consecutive days after a transient middle cerebral artery occlusion (MCAO), reduces infarction volume by altering the expression of different apoptosis-related genes (Bcl-2, Bax, caspase 3, and p53) and improves locomotor behavior (Kong *et al.*, 2009).

Schäbitz and colleagues also have demonstrated that GM-CSF treatment (10µg/kg intravenously) passes the blood brain barrier, and decreases infarct damage in two different experimental stroke models by inducing of antiapoptotic genes expression (Schäbitz *et al.*, 2007). Similar results were found in a rat MCAO model (60 minutes occlusion) treated with GM-CSF by intracarotid injection (Nakagawa *et al.*, 2006). Also, in a hemodynamic stroke model GM-CSF-treated animals (40µg × Kg⁻¹ × day⁻¹) showed a recovery in energy failure detected by ATP imaging (Schneeloch *et al.*, 2004).

The previous positive results obtained in the pre-clinical studies show the importance of some hematopoietic growth factors such as GM-CSF or others like EPO and G-CSF as promoters of neovascularization agents. In this sense a step forward has been done since phase II/III clinical trials have been conducted in several cardiovascular diseases with promising results (Kovacic *et al.*, 2007, Sprigg *et al.*, 2006, Bath *et al.*, 2007).

In these studies, intravenous high-dose of rhEPO treatment is associated with an improvement in follow-up outcome scales after cerebral ischemia in rhEPO treated group. At the same time, a strong trend for reduction in infarct size in rhEPO patients is observed by MRI (Ehrenreich *et al.*, 2002). G-CSF (5 daily doses of 10 µg/Kg subcutaneously) achieves a 15-fold increase in CD34⁺ stem cells in patients with subacute ischemic stroke compared with placebo but there is no difference in impairment, disability and dependence measured as mRS at three months (Sprigg *et al.*, 2006). In another small clinical trial, 10 patients with acute cerebral infarction were assigned to either G-CSF therapy (5 daily doses of 15 µg/Kg subcutaneously) or usual care and different clinical scales and neurological functioning using positron emission tomography (PET) were assessed at baseline and at 12 months (Shyu *et al.*, 2006). They observed a significant improvement in neurological function according to clinical scales in G-CSF group at 12 months and PET results showed an increase in metabolic activity in the area surrounding the core in the G-CSF group. Despite promising results obtained in clinical trials, it should be noted that these are preliminary studies due to the small number of participating patients and more clinical trials should be performed to know whether colony stimulating factors improve recovery in stroke or not.

Although increasing interest in testing GM-CSF for future neuroprotective and pro-angiogenic therapies, its endogenous plasma level in stroke patients is completely unknown. Only a previous study has reported the release of pro and anti-inflammatory cytokines including the GM-CSF into the cerebrospinal fluid after stroke (Tarkowski *et al.*, 1997). The authors showed that mean GM-CSF level were significantly higher in stroke patients than in controls on the day of stroke onset. This level increases rapidly to reach a peak at day 2 and remains elevated until three months after. In our study no significant differences between any time points analyzed were observed but a progressive decrease into standard levels was found throughout the observation period. GM-CSF level in cerebrospinal fluid at three months became significantly more elevated in patients who had blood brain barrier disruption. However, our results shows similar plasma GM-CSF level was detected in patients who

suffered bleeding or not due to a hemorrhagic transformation. Besides, we have found that plasma GM-CSF level in stroke patients was positively correlated with NIHSS at 12 hours from symptoms onset while intrathecal level was inversely correlated with the Scandinavian Stroke Index during the first week in the CSF study.

Although some findings are similar in both studies, some results seem to be controversial but it could be explained by the different source of the cytokine analyzed: cerebrospinal fluid vs. plasma. In this sense, our results confirm that GM-CSF level increases also in peripheral circulation starting in the hyperacute phase of stroke. Surprisingly, our results only show a positive correlation between hyperacute GM-CSF plasma level and NIHSS at 12 hours of the stroke onset. It could be explained as an acute inflammatory response related or not with following neurological status. In this sense, other authors have reported that plasma GM-CSF level increases during the course of acute myocardial infarction with highest levels in patients with severe heart failure manifestations (Parissis *et al.*, 2004) suggesting a relationship between high levels of this cytokine and posterior post-infarction left ventricular dysfunction complications. Our results, however, only show a single time point relationship with NIHSS score since none other correlation was found neither at later time points nor with Rankin scale. Then, we believe that our results need to be confirmed in larger series of patients to make clear the potential relationship between GM-CSF levels and neurological outcome.

In conclusion, our findings not validate the previous results by others authors but since NIHSS might also indicate stroke severity this could be explained as an endogenous response to ischemic damage and GM-CSF release from the bone marrow. Besides, increased levels of circulating GM-CSF could be a basal part of persistent inflammatory activity during the hyperacute phase of stroke. More detailed studies might be carried out to confirm ours results but they might be explained as an ineffective attempt of GM-CSF neuro-protection in stroke patients.

Certainly, this study also displays several limitations. The small sample size could be include finding of more prognostic associations and further studies showing association between plasma levels and infarct size or neovasculogenesis parameters would be required to asses the GM-CSF neuro-protective potential.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Manolo Quintana for statistical advice and to all neurologists, nurses and residents from the Neurovascular Unit. M.N-S. is supported by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS PI060471). A.R. is supported by a Beatriu Pinós Fellowship. Neurovascular Research Laboratory takes part into the Spanish stroke research network RENEVAS (RD06/0026/0010) and into the "Consorcio Terapias Neuroreparadoras en Ictus" (TNR) supported by ACCIÓ (Catalonia Autonomous government) and Grupo Ferrer. The project was funded in part by a grant from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS PI08/361).

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- Antman, KS, Griffin, JD, Elias, A, Socinski, MA, Ryan, L, Cannistra, SA, Oette, D, Whitley, M, Frei, E 3rd, Schnipper, LE. (1988) Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on chemotherapy-induced myelosuppression. *N Engl J Med* **319**: 593-598.
- Bath, PM, Sprigg, N. (2007) Colony stimulating factors (including erythropoietin, granulocyte colony stimulating factor and analogues) for stroke. *Cochrane Database Syst Rev* **18**: CD005207.
- Buschmann, I, Schaper, W. (1999) Arteriogenesis Versus Angiogenesis: Two Mechanisms of Vessel Growth. *News Physiol Sci* **14**: 121-125.
- Bussolino, F, Ziche, M, Wang, JM, Alessi, D, Morbidelli, L, Cremona, O, Bosia, A, Marchisio, PC, Mantovani, A. (1991) *In vitro* and *in vivo* activation of endothelial cells by colony-stimulating factors. *J Clin Invest* **87**: 986-995.
- Dale, DC. (2002) Colony-stimulating factors for the management of neutropenia in cancer patients. *Drugs* **62** Suppl 1: 1-15.
- Ehrenreich, H, Hasselblatt, M, Dembowski, C, Cepek, L, Lewczuk, P, Stiefel, M, Rustenbeck, HH, Breiter, N, Jacob, S, Knerlich, F, Bohn, M, Poser, W, Rütger, E, Kochen, M, Gefeller, O, Gleiter, C, Wessel, TC, De Ryck, M, Itri, L, Prange, H, Cerami, A, Brines, M, Sirén, AL. (2002) Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* **8**: 495-505.
- Hacke, W, Kaste, M, Fieschi, C, Toni, D, Lesaffre, E, von Kummer, R, Boysen, G, Bluhmki, E, Höxter, G, Mahagne, MH. (1995) Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA* **274**: 1017-1025.
- Hansen, TM, Moss, AJ, Brindle, NP. (2008) Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in neurovascular regeneration and protection following stroke. *Curr Neurovasc Res* **5**: 236-245.
- Hasselblatt, M, Ehrenreich, H, Sirén, AL. (2006) The brain erythropoietin system and its potential for therapeutic exploitation in brain disease. *J Neurosurg Anesthesiol* **18**: 132-138.
- Huang, X, Choi, JK, Park, SR, Ha, Y, Park, H, Yoon, SH, Park, HC, Park, JO, Choi, BH. (2007) GM-CSF inhibits apoptosis of neural cells via regulating the expression of apoptosis-related proteins. *Neurosci Res* **58**: 50-57.
- Kim, JK, Choi, BH, Park, HC, Park, SR, Kim, YS, Yoon, SH, Park, HS, Kim, EY, Ha, Y. (2004) Effects of GM-CSF on the neural progenitor cells. *Neuroreport* **15**: 2161-2165.
- Kleemann, R, Zadelaar, S, Kooistra, T. (2008) Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res* **79**: 360-376.
- Kong, T, Choi, JK, Park, H, Choi, BH, Snyder, BJ, Bukhari, S, Kim, NK, Huang, X, Park, SR, Park, HC, Ha, Y. (2009) Reduction in programmed cell death and improvement in functional outcome of transient focal cerebral ischemia after administration of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in rats. *J Neurosurg* **111**: 155-163.
- Kovacic, JC, Muller, DW, Graham, RM, Kovacic, JC, Muller, DW, Graham, RM. (2007) Actions and therapeutic potential of G-CSF and GM-CSF in cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol* **42**: 19-33.
- Lázár-Molnár, E, Hegyesi, H, Tóth, S, Falus, A. (2000) Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine* **12**: 547-554.
- Metcalf, D. (1989) The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in haemopoietic cells. *Nature* **339**: 27-30.
- Montaner, J, Molina, CA, Monasterio, J, Abilleira, S, Arenillas, JF, Ribó, M, Quintana, M, Alvarez-Sabín, J. (2003) Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* **107**: 598-603.
- Nakagawa, T, Suga, S, Kawase, T, Toda, M. (2006) Intracarotid injection of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces neuro-protection in a rat transient middle cerebral artery occlusion model. *Brain Res* **1089**: 179-185.

- Ohta, T, Kikuta, K, Imamura, H, Takagi, Y, Nishimura, M, Arakawa, Y, Hashimoto, N, Nozaki, K. (2006) Administration of *ex vivo*-expanded bone marrow-derived endothelial progenitor cells attenuates focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Neurosurgery* **59**: 679-686.
- Parisis, JT, Adamopoulos, S, Venetsanou, K, Kostakis, G, Rigas, A, Karas, SM, Kremastinos, D. (2004) Plasma profiles of circulating granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and soluble cellular adhesion molecules in acute myocardial infarction. Contribution to post-infarction left ventricular dysfunction. *Eur Cytokine Netw* **15**: 139-144.
- Plenz, G, Reichenberg, S, Koenig, C, Rauterberg, J, Deng, MC, Baba, HA, Robenek, H. (1999) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) modulates the expression of type VIII collagen mRNA in vascular smooth muscle cells and both are codistributed during atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**: 1658-1668.
- Ribatti, D, Vacca, A, De Falco, G, Ria, R, Roncali, L, Dammacco, F. (2001) Role of hematopoietic growth factors in angiogenesis. *Acta Haematol* **106**: 157-61.
- Saha, S, Doe, C, Mistry, V, Siddiqui, S, Parker, D, Sleeman, M, Cohen, ES, Brightling, CE. (2009) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression in induced sputum and bronchial mucosa in asthma and COPD. *Thorax* **64**: 671-6.
- Schäbitz, WR, Krüger, C, Pitzer, C, Weber, D, Laage, R, Gassler, N, Aronowski, J, Mier, W, Kirsch, F, Dittgen, T, Bach, A, Sommer, C, Schneider, A. (2008) A neuroprotective function for the hematopoietic protein granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). *J Cereb Blood Flow Metab* **28**: 29-43.
- Schäbitz, WR, Schneider, A. (2007) New targets for established proteins: exploring G-CSF for the treatment of stroke. *Trends Pharmacol Sci* **28**: 157-161.
- Schneeloch, E, Mies, G, Busch, HJ, Buschmann, IR, Hossmann, KA. (2004) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced arteriogenesis reduces energy failure in hemodynamic stroke. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 12730-12735.
- Shyu, WC, Lin, SZ, Lee, CC, Liu, DD, Li, H. (2006) Granulocyte colony-stimulating factor for acute ischemic stroke: a randomized controlled trial. *CMAJ* **174**: 927-933.
- Sitkauskienė, B, Sakalauskas, R. (2005) The role of beta(2)-adrenergic receptors in inflammation and allergy. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* **4**: 157-162.
- Sprigg, N, Bath, PM, Zhao, L, Willmot, MR, Gray, LJ, Walker, MF, Dennis, MS, Russell, N. (2006) Granulocyte-colony-stimulating factor mobilizes bone marrow stem cells in patients with subacute ischemic stroke: the Stem cell Trial of recovery EnhanceMent after Stroke (STEMS) pilot randomized, controlled trial (ISRCTN 16784092). *Stroke* **37**: 2979-2983.
- Sun, Y, Jin, K, Xie, L, Childs, J, Mao, XO, Logvinova, A, Greenberg, DA. (2003) VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest* **111**: 1843-1851.
- Takeda, K, Hatakeyama, K, Tsuchiya, Y, Rikiishi, H, Kumagai, K. (1991) A correlation between GM-CSF gene expression and metastases in murine tumors. *Int J Cancer* **47**: 413-420.
- Tarkowski, E, Rosengren, L, Blomstrand, C, Wikkelso, C, Jensen, C, Ekholm, S, Tarkowski, A. (1997) Intrathecal release of pro- and anti-inflammatory cytokines during stroke. *Clin Exp Immunol* **110**: 492-499.
- Vlahos, R, Bozinovski, S, Hamilton, JA, Anderson, GP. (2006) Therapeutic potential of treating chronic obstructive pulmonary disease (COPD) by neutralising granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF). *Pharmacol Ther* **112**: 106-115.
- Zhang, ZG, Zhang, L, Jiang, Q, Zhang, R, Davies, K, Powers, C, Bruggen, N, Chopp, M. (2000) VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* **106**: 829-838.
- Ziora, D, Dworniczak, S, Kaczmarczyk, G, Jastrzebski, D, Krzywiecki, A, Kozielski, J. (2007) Correlation of exhaled nitric oxide with nitrogen oxides and selected cytokines in induced sputum of chronic obstructive pulmonary disease patients. *J Physiol Pharmacol* **58**: 791-799.

Article 4.

A large screening of angiogenesis biomarkers and their association
with neurological outcome after ischemic stroke

Submitted in Stroke, June 2010

A Large Screening of Angiogenesis Biomarkers and Their Association with Neurological Outcome After Ischemic Stroke

Míriam Navarro-Sobrino, Anna Rosell, Mar Hernández-Guillamon, Anna Penalba, Cristina Boada, Sophie Domingues-Montanari, Marc Ribó, José Alvarez-Sabín, and Joan Montaner*

Neurovascular Research Laboratory and Neurovascular Unit. Neurology and Medicine Departments. Universitat Autònoma de Barcelona. Research Institute of the Vall d'Hebron Hospital, Barcelona, Spain.

Background and Purpose — The induction of angiogenesis after stroke may enhance neurorestorative processes. Our aim was to examine the endogenous angiogenesis balance and their association with long-term clinical outcome in ischemic stroke patients.

Methods — A total of 109 stroke subjects were included in the study. Firstly, plasma samples were obtained from control subjects (n=26) and tPA-treated stroke patients (n=29) at baseline (within 3h of symptoms onset), 1, 2, 12, 24h after tPA treatment, at discharge and 3 months after the ischemic event. Angiogenic promoters (PDGF-AA, PDGF-BB, HGF, FGF, KGF, HB-EGF, TPO, VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2 and SDF-1 α) and inhibitors (endostatin, angiostatin, thrombospondin-1 and thrombospondin-2) were analyzed by Searchlight® technology or ELISA. Additionally, baseline and 24h endostatin plasma level was determined in a new set of stroke patients (n=80). Clinical parameters (NIHSS, mRS, mortality and hemorrhagic transformation events) were assessed to evaluate outcome.

Results — Baseline PDGF-BB, endostatin and thrombospondin-2 levels were higher in stroke patients than in controls (p<0.05). Most angiogenesis biomarkers showed a decrease during the first 24h after stroke and a long recovery to baseline levels. A pro-angiogenic balance was associated with lower NIHSS scores and less intracranial hemorrhagic complications. Interestingly, a high baseline endostatin level was associated to long-term functional dependency (mRS>2; p=0.004). Finally, a baseline endostatin cut-off point of 184 ng/ml was an independent predictor of functional dependency at three months in the multiple logistic regression with an odds ratio of 14.4 (95% CI: 3.2-64.3; p=0.0004).

Conclusions — Our results indicate that an early pro-angiogenic balance is associated with mild short-term neurological deficit, while an acute anti-angiogenesis status determined by high endostatin plasma level predicts a worse long-term functional outcome.

Key Words: angiogenesis, stroke, outcome, endostatin, biomarker

*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

Introduction

Stroke is the third leading cause of death and the most common cause of permanent disability in adults worldwide. Currently, the only available treatment for acute ischemic stroke is the intravenous administration of tissue plasminogen activator (tPA) up to 4.5h after symptoms onset. However, despite its proven efficacy, tPA is administered to less than 5% of stroke patients due to its narrow therapeutic time-window and its increased risk of intracranial hemorrhage.¹ These data suggest that there is an urgent need for new stroke therapies applicable beyond the hyperacute phase. In this scenario, cerebral neovascularization after ischemia could be one promising strategy.^{2,3}

The use of blood biomarkers is becoming increasingly accepted in cerebrovascular diseases since biomarkers might aid physicians in several steps of stroke evaluation. Injury-related pathological pathways such as inflammation, reperfusion injury, hemorrhagic events and others have been the main focus to search for potential biomarkers.^{4,5} Restorative therapies based on neuro-angiogenic phenomena that endogenously occur after the ischemic event might also provide useful biomarkers.⁶⁻⁷ New blood vessels in the adult can be formed through the different processes of angiogenesis, arteriogenesis and vasculogenesis and might thus participate in remodeling the damaged area during the subacute phase.⁸

A better understanding of the temporal profile of pro- and anti-angiogenic factors in stroke patients can add relevant information to the field. Thus, the aim of our study was to examine plasma level of a large number of promoters and

inhibitors of angiogenesis and their association with long-term clinical outcome in tPA-treated stroke patients.

MATERIALS AND METHODS

Study population

The prospective study included stroke patients (n=109) through two steps: a first phase was an angiogenesis screening to establish a temporal profile (n=29) and the second phase included more patients (n=80) to evaluate baseline and 24h endostatin level. All patients had an acute ischemic stroke involving the middle cerebral artery (MCA) territory admitted to the emergency department of a teaching hospital. All patients received thrombolytic therapy in a standard dose of 0.9 mg/kg within 3h of symptoms onset. On admission, all patients underwent a cranial computed tomography (CT) scan and repeated 24 to 48h later (or earlier when rapid neurological deterioration occurred) to evaluate the presence and type of hemorrhagic transformation (HT), defined according to previously published criteria.⁹

A detailed history of vascular risk factors, drug abuse, and concomitant medication was obtained from each patient. National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) score was recorded to assess neurological status at admission and during follow-up visits [1, 2, 12, 24, 48 and at discharge (between 3-7 days)]. Neurological improvement was defined as a decrease in NIHSS ≤ 4 points and neurological deterioration as either death or increase in NIHSS ≥ 4 points at 48h. Functional outcome was defined by modified Rankin Scale (mRS) at three months. Patients were considered dependent when mRS was >2 points.

Transcranial Doppler (TCD) examinations were performed before the beginning of the treatment, at the end of tPA administration and serially for the first 24h. Proximal or distal MCA occlusions and follow-up recanalization degrees were defined as previously described.¹⁰ Additionally, a age- and sex-matched control group (n=26) of subjects not suffering from any inflammatory or infectious disease was studied to obtain a control range of the studied promoters and inhibitors. The study was approved by the local Ethics Committee and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All participants or relatives gave informed, written consent.

Immunoassay methods

Blood samples were drawn from each patient (or control) at admission (baseline) before any treatment was initiated. A temporal profile was determined at different time points: 1h after treatment, 2h, 12h, 24h after symptoms onset, at discharge (between 3-7 days) and at three months. Plasma was extracted in EDTA tubes, immediately separated by centrifugation at 3000 rpm for 15 minutes and stored at -80°C until analysis.

Quantitative measurement of human angiogenic factors was performed using different protein arrays (Searchlight®, Aushon Biosystems, MA, USA) to detect plasma level of platelet derived growth factor BB (PDGF-BB), hepatocyte growth factor (HGF), fibroblast growth factor (FGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), heparin binding epidermal growth factor like growth factor (HB-EGF), keratinocyte growth factor (KGF), platelet derived growth factor AA (PDGF-AA), thrombopoietin (TPO), vascular endothelial

growth factor receptor 1 (VEGFR-1), vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2), thrombospondin 1 (TSP-1) and thrombospondin 2 (TSP-2). The level of SDF-1 α and endostatin (Quantikine, R& D Systems, MN, USA) and angiostatin (Raybiotech, GA, USA) was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Each sample was analyzed twice and the mean of the two values was used. The mean intra-assay coefficient of variation (CV) was lower than 20% for all biomarkers measured.

Statistical analysis

Angiogenic promoters and inhibitors did not follow a normal distribution (Kolmogorov-Smirnov and P-P plot). Angiogenic balance was assessed with the ratio between the level of promoter and inhibitor analyzed. Statistical significance for intergroup differences was assessed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney test. To study correlations between continuous variables, Spearman coefficients were used. A repeated measurement test (Wilcoxon) was used to analyze significant increases/decreases on the temporal profile of the studied molecules. Logistic regression was performed to determine factors that could be considered as independent predictors of dependency at three months (mRS>2), using the forward step-wise method by the likelihood ratio test. The odd ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) for the effect on dependency at three months were estimated using logistic regression analysis adjusted for the effects of conventional risk factors. All statistical analysis was conducted using SPSS® 15.0 (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). To account for multiple statistical testing in temporal profiles, Bonferroni's correction

was applied. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Population characteristics

Demographic characteristics and risk factors profile of our study population are described in Table 1. Mean age in stroke patients was 70.9 years and 60% were male. Concerning risk factors, 24.1% of stroke patients were smokers, 10.4% had diabetes mellitus and 3.4% of patients had a coronary artery disease. Dyslipidemia was significantly higher in controls (42.3%) than in patients (17.2%, $p = 0.045$) while atrial fibrillation was more common in patients (39% vs 4%, $p = 0.003$). Antiplatelet agents and angiotensin-converting enzyme inhibitor treatments were observed at a higher frequency in patients ($p = 0.009$ and $p = 0.014$, respectively). Etiology of stroke defined by the TOAST criteria revealed that about 60% of cases were of cardioembolic etiology, 20% were atherothrombotic and 20% were of undetermined cause.

Endogenous angiogenic promoters and inhibitors after ischemic stroke

The plasma temporal profiles of nine angiogenic promoters are shown in figure 1A. Baseline PDGF-BB level in strokes was 250.1 (171.9-588.1) pg/ml and the interval observed in healthy controls was 93 (49.1-203) pg/ml, $p = 0.003$. Overall, the growth factors PDGF-BB, PDGF-AA and VEGF all showed a similar profile, with a decrease during the 2-12h period and an increase after 24h.

The angiogenic promoter SDF-1 α presented a peak during the first hour post-thrombolytic

treatment and gradually decreased during the following 7 days. TPO and HB-EGF plasma level in both stroke and control subjects could not be detected. Figure 1B shows the results obtained for the four angiogenic inhibitors. Baseline endostatin level was significantly higher in stroke patients than in controls [161.6 (126.7-198.9) ng/ml vs. 141 (115.6-173.4) ng/ml respectively, $p = 0.026$]. Additionally, TSP-2 level was also higher in patients on admission compared to control subjects [31.2 (23.5-47.6) ng/ml vs 17.4 (11.8-21.3) ng/ml respectively, $p < 0.0001$]. Finally, no differences were found for angiostatin or TSP-1 plasma level between groups. Regarding the temporal profile, TSP-1 and angiostatin increased at 2 and 24h respectively, whereas endostatin level decreased from admission to 24h.

We observed that patients with atrial fibrillation presented higher baseline TSP-2 level ($p = 0.001$). In this sense, those patients with cardioembolic etiology also showed increased TSP-2 level ($p = 0.009$) whereas endostatin or PDGF-BB were not related to any of the studied risk factors, treatment or etiology subgroup of patients.

In stroke patients baseline PDGF-BB/endostatin and PDGF-BB/angiostatin balances were 1.67 (0.98-3.47) and 4.9 (2.5-11.5) respectively, whereas in controls they were 0.69 (0.36-1.07) and 1.60 (0.60-3.70). These differences were significantly different, $p = 0.003$ and $p = 0.004$, respectively. The similar temporal profile identified for single factors was found for PDGF-BB/endostatin and PDGF-BB/angiostatin ratios after ischemic stroke: a decrease from 1 to 7 days and then an increase back to baseline level at 3 months. SDF-1 α /TSP-2 balance showed lower baseline ratio in stroke patients

Table 1. Demographic features of stroke patients and healthy volunteers

	Healthy controls (n=26)	Stroke patients (n=29)	P value
Age (years)	68.8 ±8.6	70.9 ±15.1	0.520
Male gender (%)	44.8	55.2	0.455
Smokers (%)	11.5	24.1	0.179
Hypertension (%)	34.6	55.2	0.081
Diabetes (%)	3.8	10.4	0.335
Dyslipidemia (%)	42.3	17.2	0.045
Coronary artery disease (%)	0	3.4	0.509
Atrial fibrillation (%)	4	39	0.003

72.2 (59.4-127.4) compared to controls 151.3 (117.8-251.3) ($p>0.001$) (Figure 1C).

The statistical significance decrease from baseline to 24h for PDGF-BB, PDGF-AA and PDGF-BB/endostatin persisted after correction for multiple testing by the Bonferroni method. Therefore, it is extremely unlikely that these results are false positives.

Promoters and inhibitors of angiogenesis are associated with short-term neurological outcome

Overall, our results showed that patients with mild neurological impairment presented a higher plasma level of several angiogenic factors. Baseline HGF level, as well as the balance HGF/endostatin, were inversely associated with NIHSS score at 2 and 12h time-points ($p=0.02$, $R= -0.4$ and $p=0.04$, $R= -0.4$ respectively). Other baseline balances, such as

KGF/endostatin ($p=0.04$, $R=-0.4$) or KGF/TSP-1 were also higher in patients with mild neurological affection ($p=0.001$, $R= -0.7$; $p=0.04$, $R= -0.4$ and $p=0.01$, $R= -0.5$ at 1, 2 and 12h respectively). Additionally, VEGF and VEGF/endostatin ratio 1h after tPA treatment was strongly associated with a lower NIHSS score from 2h to discharge ($p<0.05$ at all time points). This association was also found for PDGF-BB/angiostatin at 1h ($p<0.05$) as shown in Table 2. Clinical assessment revealed that 5 patients improved (17.2%) and 8 worsened (27.6%) during the first 48h after admission but only HGF level at 12h was higher in patients who improved neurologically.

Regarding recanalization, we observed a higher baseline angiostatin level in patients who did not recanalize within the first 6h ($p=0.02$) while TSP-2 level was higher at 1h in patients who recanalized at 24h ($p=0.04$). The angiogenic balance between FGF/TSP-1 and

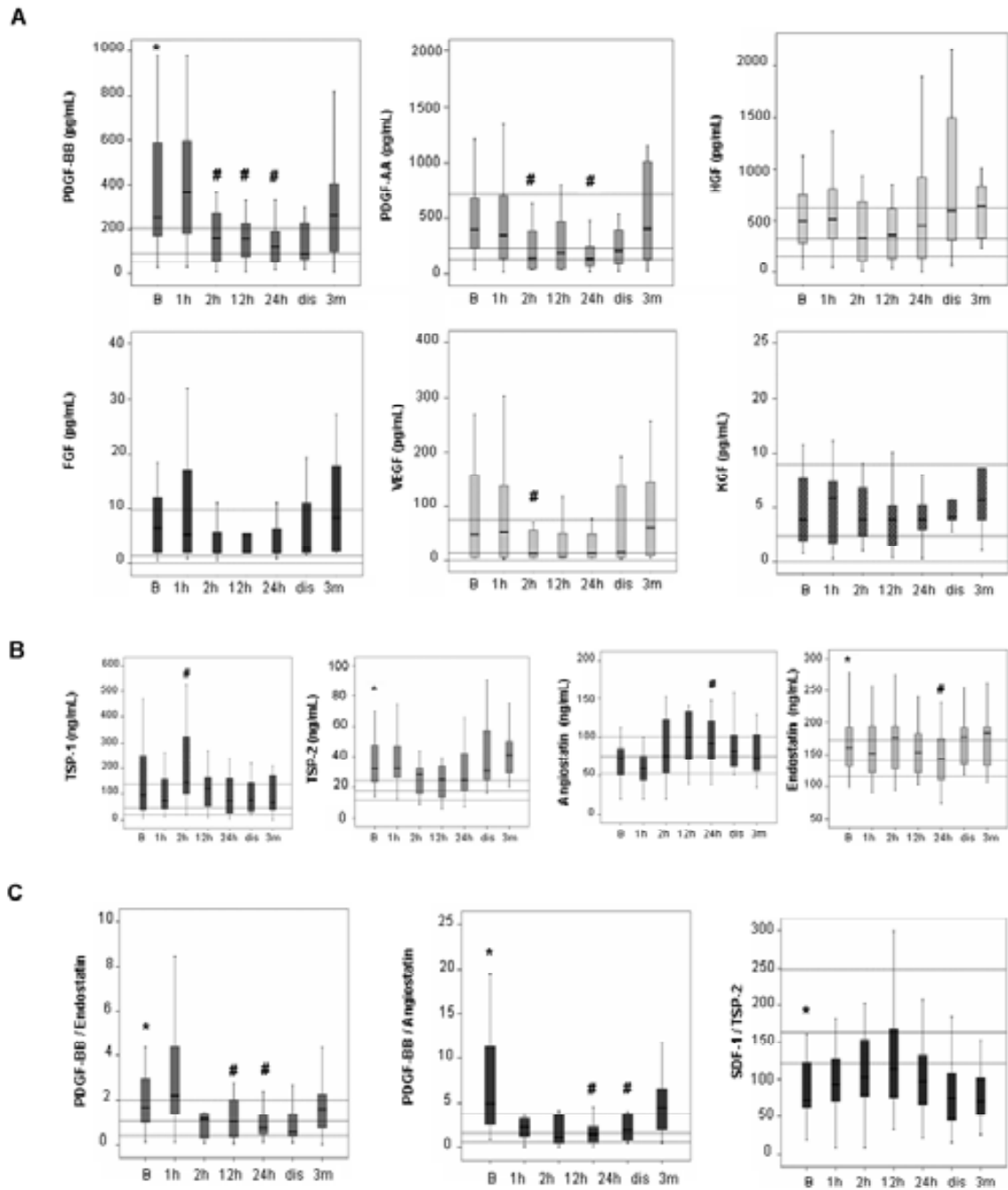


Figure 1. Temporal profiles of angiogenic promoters and inhibitors after ischemic stroke (n=29). Box plots show plasma level of angiogenic promoters (**A**) and inhibitors (**B**) in tPA-treated stroke patients at different time points after ischemic stroke (pg/ml or ng/ml, respectively). (**C**) Plasma angiogenic balances between promoters and inhibitors in tPA-treated stroke patients at different time points. Median value of healthy controls (n=26) at each time point is represented by the continuous line and broken lines indicate corresponding 25th and 75th percentiles. * p<0.05 (vs. controls); # p> 0.05 (vs. baseline level).

SDF1 α /angiostatin on admission was elevated in patients who recanalized at 1h (p=0.037) and 2h (p=0.038) respectively. Finally, higher baseline VEGFR1/TSP-2 and PDGF-AA/TSP-2 level were detected in patients who recanalized at 1 and 6h (p=0.04 and p=0.04, respectively). Intracranial bleeding complications were

observed in 8 (27.5%) patients: 6 (20.7%) HI (4 were HI-1 and 2 were HI-2) and 2 (6.8%) PH (1 was PH-1 and 1 was PH-Remote). Our results demonstrated a higher baseline HGF/TSP-2, PDGF-AA/TSP-2, VEGFR-1/TSP-2 and PDGF-AA/angiostatin ratios in patients who did not develop HT (p<0.05).

Table 2. Correlation between angiogenic factors and NIHSS score. R= Spearman’s rho correlation coefficient. Non significant correlations (n.s.) are not shown.

	NIHSS baseline	NIHSS 1h	NIHSS 2h	NIHSS 12h	NIHSS 24h	NIHSS 48h	NIHSS discharge	mRS
HGF (baseline)	n.s.	n.s.	R=-0.4 p=0.02	R=-0.4 p=0.04	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
Endostatin (baseline)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	R=0.4 p=0.02
SDF-1 (baseline)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	R=0.4 p=0.03
HGF/Endostatin (baseline)	n.s.	n.s.	R=-0.5 p=0.03	R=-0.4 p=0.02	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
KGF/Endostatin (baseline)	R=-0.55 p=0.005	R=-0.4 p=0.04	R=-0.4 p=0.04	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
KGF/TSP-1 (baseline)	R=-0.6 P=0.002	R=-0.7 p=0.001	R=-0.4 p=0.04	R=-0.5 p=0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VEGF (1h)	n.s.	n.s.	R=-0.5 p=0.003	R=-0.5 p=0.009	R=-0.4 p=0.02	R=-0.4 p=0.03	R=-0.4 p=0.03	n.s.
PDGF-BB/Angiostatin (1h)	n.s.	n.s.	R=-0.6 p=0.01	R=-0.4 p=0.04	R=-0.5 p=0.02	R=-0.4 p=0.04	R=-0.4 p=0.02	n.s.
PDGF-AA/TSP-1 (1h)	n.s.	n.s.	R=-0.6 p=0.01	R=-0.4 p=0.04	R=-0.5 p=0.021	n.s.	n.s.	n.s.
VEGF/TSP1 (1h)	n.s.	n.s.	R=-0.6 p=0.001	R=-0.5 p=0.01	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
VEGF/Endostatin (1h)	n.s.	n.s.	R=-0.6 p=0.001	R=-0.4 p=0.01	R=-0.4 p=0.04	R=-0.4 p=0.04	R=-0.4 p=0.02	n.s.
VEGF-R2/TSP1 (1h)	R=-0.4 p=0.02	n.s.	R=-0.5 p=0.009	R=-0.4 p=0.02	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
HGF/Angiostatin 1h	n.s.	n.s.	R=-0.5 p=0.01	R=-0.4 p=0.03	R=-0.4 p=0.04	n.s.	n.s.	n.s.

Elevated endostatin level during the acute phase of stroke strongly predicts worse long-term outcome

When evaluating functional outcome in our initial stroke population, we found a positive correlation between baseline SDF-1 α and endostatin level with mRS score three months after stroke ($p=0.03$, $R=0.4$ and $p=0.02$, $R=0.4$ respectively) as shown in Table 2. Nevertheless, baseline endostatin level was the main predictor of functional dependency (mRS >2) at three months. Those patients who were dependent at three months showed increased endostatin levels both at baseline ($p=0.002$) and at 24h ($p=0.007$).

We further explored these initial results in a larger population of stroke patients (total $n=109$). No differences in endostatin level were found between controls and stroke patients ($p=0.313$). Clinical assessment revealed that 75 patients improved (69%), and 9 (8%) worsened during the first 48h after admission. Furthermore, baseline endostatin level was not associated with the appearance or degree of intracranial bleeding complications. Interestingly, endostatin level on admission and at 24h were positively associated to mRS score at three months as Figure 2A shows ($p=0.002$, $R=0.3$ and $p=0.008$, $R=0.26$ respectively). Our results showed that patients with impaired functional dependency (mRS >2) presented higher baseline endostatin than those who were functionally independent (mRS ≤ 2), 176.9 (116.7-224.1) ng/ml vs. 135.65 (107.7-170.6) ng/ml, ($p=0.004$); as shown in Figure 2B. These results were also found when 24h endostatin level was analyzed: patients functionally dependent at three months had higher endostatin level compared to patients considered

independent, 154.7 (112.4-209.8) ng/ml vs 123.9 (96-159.8) ng/ml, ($p=0.007$).

A receiver operating characteristics (ROC) curve was drawn to identify the best cut-off point for the association of baseline and 24h endostatin level with mRS >2 . Baseline endostatin cut-off point of 184 ng/ml had 48.9% sensitivity and 84.5% specificity to identify dependency at three months of the ischemic event with a positive predictive value of 71.8% and a negative predictive value of 67.12% (Figure 2C). A cut-off point for 24h endostatin level of 160ng/ml had 43.8% sensitivity and 77.6% specificity to detect dependency at three months with a positive predictive value of 56.5% and a negative predictive value of 66.1%. Interestingly, in a logistic regression model, after adjustments for potential confounders such as worsening, age, baseline NIHSS score and mortality, endostatin ≥ 184 ng/ml was the main baseline independent predictor of functional dependency at three months with an OR= 14.4; 95%CI= 3.2-64.3 and $p<0.0001$ while proximal occlusion showed an OR= 6.2; 95%CI= 1.6-23.8 and $p=0.007$ as shown in Figure 2D.

DISCUSSION

In our study, we observe that a pro-angiogenic shift in plasma is associated with mild short-term neurological deficit while an acute anti-angiogenic status, mainly determined by a high endostatin level, predicts a worse long-term functional outcome.

Beneficial effects of therapeutic angiogenesis have been demonstrated in coronary heart disease.¹¹ Angiogenic factors have also been used for diagnosis and prognosis as biomarkers in ischemic disorders^{12,13}.

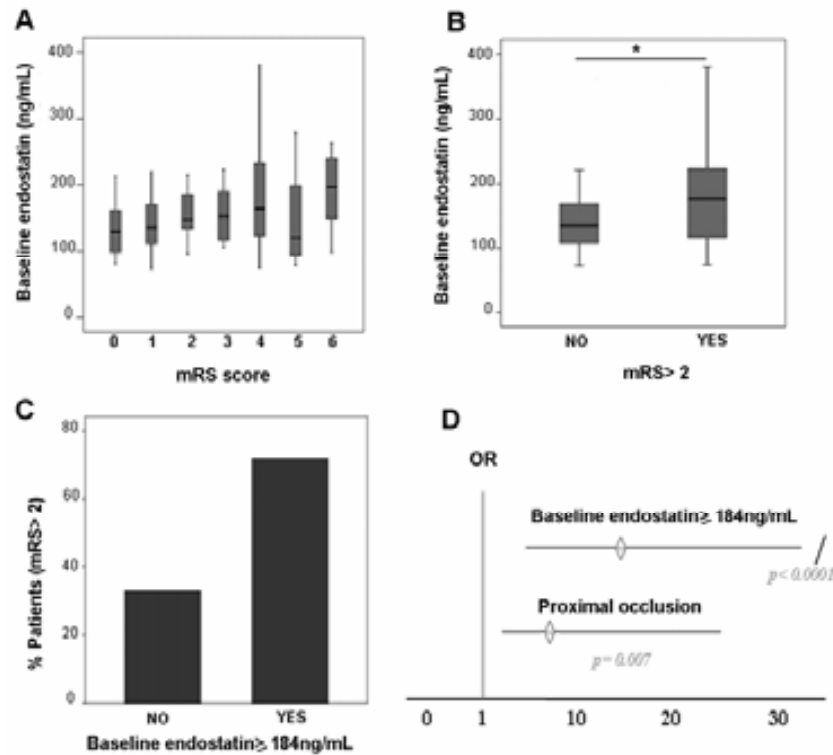


Figure 2. Endostatin plasma level and long-term functional outcome in 109 stroke patients. **A)** Box plots represent baseline endostatin level in relation to mRS score. **B)** Baseline endostatin level was significantly higher in patients who were dependent (mRS >2) at three months, * $p < 0.05$. **C and D)** represent the predictive value of baseline endostatin ≥ 184 ng/mL cut-off point of patients presenting long-term functional dependency.

Human studies have also demonstrated that angiogenesis occurs in the ischemic penumbra and pro-angiogenic factors such as transforming growth factor-1 beta (TGF-beta 1) and PDGF family members might be implicated.^{14,15} However, the temporal plasma profile of most of these growth factors after human ischemic stroke, which could serve as prognosis biomarkers are still unknown. Little information comes mainly from two studies: one reported the increase in serum FGF after cerebral infarction versus control subjects.¹⁶ The authors suggested that its level may be useful to estimate the infarct size and clinical prognosis. The other report shows a sustained VEGF increase during the first two weeks after stroke.¹⁷ Our results reveal a PDGF-BB increase in plasma, as previously described in penumbra

areas of stroke patients, suggesting a role in the regeneration of the damaged area.²¹ Moreover, baseline TSP-2 level was also increased in stroke patients, in accordance to the results of a previous report in a focal ischemic model in rats.¹⁸

Despite the fact that the administration of VEGF in experimental cerebral ischemia models increase blood brain barrier (BBB) permeability.^{19,20} Our study shows that those patients with a higher endogenous pro-angiogenic balance did not suffer bleeding complications. In addition, several angiogenic promoters showed a negative correlation with short-term neurological deficit. We believe that our results demonstrate that an endogenous pro

angiogenic shift might be beneficial and safe in terms of BBB stability.

We previously studied the VEGF/endostatin balance in patients with symptomatic intracranial stenoses, identifying a predominance of endostatin in patients with a greater risk of recurrence.²¹ Recently, another study in hemorrhagic strokes reported that VEGF, angiopoietin-1 and granulocyte colony stimulating factor levels were increased during the 3 days following stroke and were associated with an improvement at 90 days.²² To our knowledge, this study is the first to investigate the temporal plasma profile of several angiogenesis inhibitors and their angiogenic balances after human ischemic stroke.

Unexpectedly, we found an association between SDF-1 α and higher mRS score. An increase in SDF-1 α in cerebral ischemia models is also associated with monocytes infiltration into the injured ischemic areas but also contributes to neuroreparative processes.^{23,24} In our study, the possible pro-inflammatory role of SDF-1 α after ischemic stroke could be related to a worse functional outcome in patients.

Nevertheless, in a large population of stroke patients we have also demonstrated that those who were functionally dependent after three months had higher endostatin level in the hyperacute phase of stroke. Endostatin is derived from collagen XVIII, which is a major proteoglycan of both endothelial and epithelial basement membranes. Endostatin is a powerful inhibitor of endothelial cell proliferation and migration^{25,26} and an elevated circulating endostatin level has been described in different diseases.²⁷⁻²⁹ In this study we observe that tPA-treated stroke patients showing higher

endostatin level had an impaired functional outcome at three months. This association was independent from risk factors and other potential predictors of long-term outcome and was specific only for endostatin. It thus seems promising to monitorize endostatin plasma level as a potential biomarker for stroke prognosis. Gertz and colleagues have demonstrated that the beneficial effect of physical activity after stroke was completely abolished when animals were treated with endostatin after inducing brain ischemia.³⁰ Nevertheless, the pathophysiological importance of endostatin in stroke is still unknown and further experimental and human studies would be required.

This study certainly presents some limitations. The assessment of plasma level of angiogenic factors represents then a primary approach to our goal, but more information regarding the real origin of these molecules deserves further investigation. Furthermore, new studies exploring infarct size, lesion growth or functional parameters such as cerebral blood flow or vascular reactivity would be necessary to elucidate the role of angiogenesis after ischemic stroke.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank all neurologists, residents and nurses from the Vall d'Hebron Stroke Unit, as well as stroke patients and their relatives for their continuous support to conduct studies on stroke biomarkers. We would like also to thank Manolo Quintana for statistical support. M.N-S. is supported by a pre-doctoral grant; S.D-M is supported by a pre-doctoral grant from Fundaci3n Ram3n Areces. M.H-G by a post-doctoral grant and A.R. by a senior research contract (Miguel Servet programme) from the

Instituto de Salud Carlos III. The Neurovascular Research Laboratory takes part in the Spanish stroke research network (RENEVAS, RD06/0026/0010), the European Stroke Network (EUSTROKE 7FP Health F2-08-202213) and participates in the project "Consortio Terapias Neuroreparadoras en Ictus" (TNR), supported by ACCIÓ (an agency of the autonomous government of Catalonia) and Grupo Ferrer, and is also supported by FIS 06/0471 and FIS 08/361.

REFERENCES

- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2003; 59:1317-1329.
- Hansen TM, Moss AJ, Brindle NP. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins in neurovascular regeneration and protection following stroke. *Curr Neurovasc Res* 2008; 5:236-245.
- Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA. VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest* 2003; 111:1843-1851.
- Montaner J. Blood biomarkers to guide stroke thrombolysis. *Front Biosci (Elite Ed)* 2009; 1:200-208.
- Shenhar-Tsarfaty S, Ben Assayag E, Bova I, Shopin L, Fried M, Berliner S, Shapira I, Bornstein NM. Interleukin-6 as an early predictor for one-year survival following an ischaemic stroke/transient ischaemic attack. *Int J Stroke* 2010; 5:16-20.
- Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S, Wang JM. Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* 1994; 25:1794-1798.
- Slevin M, Krupinski J, Rovira N, Turu M, Luque A, Baldellou M, Sanfeliu C, de Vera N, Badimon L. Identification of pro-angiogenic markers in blood vessels from stroked-affected brain tissue using laser-capture microdissection. *BMC Genomics* 2009; 10:113.
- Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; 6:389-395.
- Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, Boysen G, Bluhmki E, Höxter G, Mahagne MH. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA* 1995; 274:1017-1025.
- Burgin WS, Malkoff M, Felberg RA, Demchuk AM, Christou I, Grotta JC, Alexandrov AV. Transcranial doppler ultrasound criteria for recanalization after thrombolysis for middle cerebral artery stroke. *Stroke* 2000; 31:1128-1132.
- Pecher P, Schumacher BA. Angiogenesis in ischemic human myocardium: clinical results after 3 years. *Ann Thorac Surg* 2000; 69:1414-1419.
- Bhatia GS, Sosin MD, Patel JV, Grindulis KA, Khattak FH, Davis RC, Lip GY. Plasma indices of angiogenesis in rheumatoid disease: Relationship to cardiovascular risk factors and cardiac function. *Int J Cardiol*. Epub 2009 Jan 28.
- Patel JV, Abraheem A, Chackathayil J, Gunning M, Creamer J, Hughes EA, Lip GY. Circulating biomarkers of angiogenesis as indicators of left ventricular systolic dysfunction among patients with coronary artery disease. *J Intern Med* 2009; 265:562-567.
- Krupinski J, Kumar P, Kumar S, Kaluza J. Increased expression of TGF-beta 1 in brain tissue after ischemic stroke in humans. *Stroke* 1996; 27:852-857.
- Krupinski J, Issa R, Bujny T, Slevin M, Kumar P, Kumar S, Kaluza J. A putative role for platelet-derived growth factor in angiogenesis and neuroprotection after ischemic stroke in humans. *Stroke* 1997; 28:564-573.
- Guo H, Huang L, Cheng M, Jin X, Zhao Y, Yi M. Serial measurement of serum basic fibroblast growth factor in patients with acute cerebral infarction. *Neurosci Lett* 2006; 393:56-59.
- Slevin M, Krupinski J, Slowik A, Kumar P, Szczudlik A, Gaffney J. Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 in serum of

patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 2000; 31:1863-1870.

18. Lin, T.N.; Kim, G.M.; Chen, J.J.; Cheung, W.M.; He, Y.Y.; Hsu, C.Y. Differential regulation of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 after focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke*. 2003;34:177-86

19. Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, Soltanian-Zadeh H, Morris D, Zhang R, Goussev A, Powers C, Yeich T, Chopp M. Correlation of VEGF and angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002; 22:379-392.

20. Abumiya T, Yokota C, Kuge Y, Minematsu K. Aggravation of hemorrhagic transformation by early intraarterial infusion of low-dose vascular endothelial growth factor after transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2005; 1049:95-103.

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

22. Sobrino T, Arias S, Rodriguez-Gonzalez R, Brea D, Silva Y, de la Ossa NP, Agulla J, Blanco M, Pumar JM, Serena J, Dávalos A, Castillo J. High serum levels of growth factors is associated with good outcome in intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009; 29:1968-1974.

23. Shyu WC, Lin SZ, Yen PS, Su CY, Chen DC, Wang HJ, Li H. Stromal cell-derived factor-1 alpha promotes neuroprotection, angiogenesis, and mobilization/homing of bone marrow-derived cells in stroke rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 324:834-849.

24. Hill WD, Hess DC, Martin-Studdard A,

Carothers JJ, Zheng J, Hale D, Maeda M, Fagan SC, Carroll JE, Conway SJ. SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004; 63:84-96.

25. Sudhakar A, Sugimoto H, Yang C, Lively J, Zeisberg M, Kalluri R. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:4766-4771.

26. Wickstrom SA, Alitalo K, Keski-Oja J. Endostatin associates with integrin alpha5beta1 and caveolin-1, and activates Src via a tyrosyl phosphatase-dependent pathway in human endothelial cells. *Cancer Res* 2002; 62:5580-5589.

27. Funatsu H, Yamashita H, Noma H, Shimizu E, Yamashita T, Hori S. Stimulation and inhibition of angiogenesis in diabetic retinopathy. *Jpn J Ophthalmol* 2001; 45:577-584.

28. Hebbar M, Peyrat JP, Hornez L, Hatron PY, Hachulla E, Devulder B. Increased concentrations of the circulating angiogenesis inhibitor endostatin in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:889-893.

29. Perkins GD, Nathani N, Richter AG, Park D, Shyamsundar M, Heljasvaara R, Pihlajaniemi T, Manji M, Tunnicliffe W, McAuley D, Gao F, Thickett DR. Type XVIII collagen degradation products in acute lung injury. *Crit Care* 2009; 13:R52.

30. Gertz K, Priller J, Kronenberg G, Fink KB, Winter B, Schrock H, Milosevic M, Harms C, Böhm M, Dirnagl U, Laufs U, Endres M. Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial nitric oxide synthase-dependent augmentation of neovascularization and cerebral blood flow. *Circ Res* 2006; 99:1132-1140

5. DISCUSSIÓ

5.1 Els nivells plasmàtics de diferents promotors i inhibidors angiogènics es modulen després de l'ictus isquèmic

L'angiogènesi és un procés que s'activa tant en situacions fisiològiques com en processos patològics, i tot i que ha estat estudiada extensament en diferents malalties com en la isquèmia cardíaca o en el càncer, en l'ictus encara queden moltes incògnites per resoldre. Actualment, sabem que l'angiogènesi després de la isquèmia cerebral es produeix en l'àrees de penombra i es relaciona amb una major supervivència dels pacients (50). Avui en dia, molt del coneixement que tenim del paper de l'angiogènesi després de l'ictus prové principalment d'estudis realitzats en models experimentals. Els resultats mostren una activació entre les 12 i les 24 h, que resultaria en un increment de la microvasculatura cerebral en la zona de penombra al tercer dia després de la isquèmia (103;104). Per tant, són necessaris estudis en pacients que confirmin aquests resultats i que ens ajudin a determinar la importància d'aquest fenomen en el context de la malaltia isquèmica cerebral

És en aquest sentit, que l'estudi de diferents molècules reguladores de l'angiogènesi a nivell plasmàtic d'un mateix grup de pacients amb un ictus i la seva associació amb diferents paràmetres de pronòstic clínic ens sembla de gran interès. Els resultats d'aquesta tesi demostren que la monitorització plasmàtica de certs promotors i/o inhibidors angiogènics pot ser útil com a biomarcador pronòstic en l'ictus isquèmic.

Així, hem observat que en pacients amb un ictus isquèmic de menys de 3 h d'evolució, es produeix un increment dels nivells de GM-CSF i de PDGF-BB respecte als nivells trobats en una població control sana. Els nostres resultats coincideixen amb estudis previs realitzats en humans on s'ha demostrat un increment de GM-CSF en líquid cefaloraquídi després de l'ictus isquèmic (105). També, en mostres de necròpsies humanes s'observa que es produeix una sobreexpressió de PDGF-BB en la zona

infartada i en la zona de penombra en comparació amb el teixit contralateral sa (106), suggerint que aquest factor participa en la remodelació de la zona afectada. Altres autors també han analitzat els nivells en sèrum de VEGF i FGF mostrant resultats que van en la mateixa direcció, ja que es troben augmentats després de la isquèmia en tots els temps estudiats en comparació amb la població control (107;108).

En els últims anys, l'estudi d'inhibidors angiogènics endògens ha anat guanyant importància en la malaltia cerebrovascular ja que la resposta angiogènica després de l'ictus és un procés altament regulat, tant per promotors, com per inhibidors angiogènics (48). Els nostres resultats mostren un increment d'alguns d'aquests factors angiostàtics com són l'endostatina i la TSP-2 en pacients respecte als controls corroborant així estudis previs en models animals on ja s'havia demostrat un augment d'endostatina (109) o de la TSP-1 i 2 (53) a nivell tissular després de la isquèmia cerebral.

La cinètica endògena dels promotors i inhibidors angiogènics després de l'ictus és encara avui en dia desconeguda. En aquest treball, hem demostrat que certs factors pro- i anti-angiogènics es modulen al llarg del temps (fins a tres mesos després de l'ictus) i mostren un perfil temporal semblant. Així doncs, els nivells plasmàtics de PDGF-AA i PDGF-BB disminueixen durant les primeres 24 h i recuperen els valors basals entre 3-7 dies i al tercer mes. Aquests resultats coincideixen amb un treball previ, on es descriu una activació de l'angiogènesi entre el tercer dia i la primera setmana després de la isquèmia cerebral (50). En els altres promotors analitzats no trobem diferències significatives, però també observem aquest perfil temporal. En canvi, aquesta cinètica no s'observa en els inhibidors angiogènics analitzats. Tot i així, evaluant el balanç endogen final entre promotors i inhibidors, el perfil temporal observat és més semblant al dels promotors indicant el paper dominant dels promotors angiogènics en aquest procés.

Tanmateix, el nostre estudi té certes limitacions, ja que estem realitzant una mesura indirecta en plasma dels processos que assumim que tenen lloc després de la isquèmia en el parènquima cerebral. Altres estudis on es valorés l'angiogènesi i el flux sanguini cerebral, o es quantifiqués la microvasculatura o el volum d'infart ens haurien de donar més informació sobre el paper de l'angiogènesi després de la isquèmia en el cervell adult.

5.2 Un major balanç proangiogènic endogen no incrementa el risc de transformacions hemorràgiques

En els últims anys, molts factors angiogènics han estat investigats en models experimentals demostrant que la seva administració té un efecte positiu en la recuperació funcional després de la isquèmia cerebral (27). Els efectes pleiotròpics d'algunes d'aquestes molècules han estat molt estudiats. Aquest és el cas, per exemple, del promotor angiogènic VEGF (27;51). Tot i que diferents treballs mostren el seu efecte neuroreparador també indiquen que podria incrementar la inestabilitat de la BHE si s'administra en la fase més aguda de la malaltia (110;111).

Tot i aquests resultats, es desconeix si els nivells endògens d'aquests promotors angiogènics estan relacionats amb el risc de patir una TH, sobretot en pacients tractats amb rt-PA. De fet, els nostres resultats mostren que aquells pacients amb balanços angiogènics endògens més elevats no van patir complicacions hemorràgiques després del tractament trombolític. Més concretament, aquells pacients que presentaven balanços angiogènics més elevats d'HGF/TSP-2, PDGF-AA/TSP-2, VEGFR-1/TSP-2 i PDGF-AA/angiostatina no patien aquest tipus de complicacions, indicant que la potenciació endògena de l'angiogènesi no potenciarà els efectes adversos del tractament trombolític.

5.3 Nivells endògens d'alguns promotors i inhibidors angiogènics es troben associats amb el pronòstic clínic a curt termini

Determinar si l'angiogènesi és un procés beneficiós o perjudicial per a la recuperació funcional dels pacients ens hauria de ser de gran ajuda a l'hora d'establir el seu ús com a biomarcador pronòstic en l'ictus isquèmic. En aquesta tesi demostrem que els valors elevats de VEGF o del seu balanç amb l'endostatina s'associen a un menor dèficit neurològic des de les primeres hores posteriors al tractament trombolític i fins al moment de l'alta mèdica del pacient (3-7è dia), sent aquest efecte independent del dèficit inicial. En el mateix sentit, un balanç elevat de PDGF-BB/angiostatina també es relaciona amb un menor dèficit neurològic fins al moment de l'alta mèdica del pacient.

Resultats obtinguts en un estudi amb pacients que havien patit una hemorràgia intracerebral mostren que valors en sèrum més elevats de VEGF, G-CSF i angiopoietina-1 es relacionen amb un millor pronòstic neurològic i amb una reducció del volum de l'hemorràgia al tercer mes (112). En un estudi anterior realitzat en pacients amb ictus isquèmic, es demostra que aquells pacients amb els nivells d'FGF augmentats també presentaven una millor situació neurològica un mes després de la lesió isquèmica (107).

En el nostre treball, algunes de les molècules analitzades són també citocines inflamatòries, les quals, també actuen estimulant l'angiogènesi, com per exemple, el GM-CSF i l'SDF-1 α . Els nostres resultats mostren que nivells plasmàtics de GM-CSF més elevats s'associen a un major dèficit neurològic i que nivells elevats d' SDF-1 α es relacionen amb un pitjor estat funcional al tercer mes. Aquests resultats es podrien explicar com una resposta inflamatòria davant del dany isquèmic com ja s'ha descrit en altres patologies isquèmiques com l'infart agut de miocardi (113;114).

És important destacar que en el nostre treball la majoria d'associacions estadísticament significatives es troben en l'anàlisi dels balanços entre promotors i inhibidors, destacant novament la importància que poden tenir els inhibidors angiogènics en la patofisiologia de l'ictus.

En resum, els nostres resultats mostren que aquells pacients que tenen uns valors proangiogènics més elevats en plasma durant la primera hora després de l'ictus mostren un millor pronòstic clínic dintre de la primera setmana d'evolució. Per tant, alguns dels promotors (VEGF) i balanços analitzats (VEGF/endostatina o PDGF-BB/angiostatin) poden ser bons biomarcadors pronòstic de l'evolució clínica dels pacients.

5.4 Importància dels inhibidors angiogènics: l'endostatina com a potent biomarcador pronòstic a llarg termini

Com ja hem esmentat amb anterioritat, en els últims anys han anat guanyant importància el paper que juguen els factors angioestàtics en el control de l'angiogènesi en la isquèmia cerebral, però tot i això encara ens trobem en un camp poc estudiat. Tot i que sabem que l'angiogènesi és un procés altament regulat, fins al moment, desconeixem quins són els nivells endògens dels inhibidors angiogènics i la seva relació amb el pronòstic dels pacients.

En aquesta tesi es presenten resultats rellevants respecte a l'ús de molècules inhibidores de l'angiogènesi com a biomarcadors pronòstic en l'ictus isquèmic, demostrant com el nivell d'endostatina a temps basal, per exemple, pot ser un potent predictor de l'estat funcional del pacient a llarg termini. Així, aquells pacients que presentaven nivells plasmàtics d'endostatina basal superiors a 184 ng/ml eren

funcionalment dependents (incapaços de realitzar les tasques quotidianes de forma independent) al tercer mes.

La monitorització dels nivells plasmàtics d'endostatina semblen, doncs, una eina útil per al pronòstic de l'ictus isquèmic a llarg termini. L'associació trobada en pacients amb ictus isquèmic és independent dels factors de risc cardiovascular identificats així com també dels predictors clàssics de mal pronòstic com són un alt dèficit neurològic inicial o la presència d'oclusió proximal de l'ACM. A més a més, és important remarcar que aquest valor pronòstic de l'endostatina és exclusiu i no aplicable als altres inhibidors angiogènics estudiats.

Els nivells d'endostatina s'han trobat elevats en diferents malalties com ara l'esclerosi sistèmica progressiva (115), el dany pulmonar agut (116), la retinopatia diabètica (117) o els glioblastomes (92;118). Estudis previs del nostre laboratori havien demostrat que pacients amb nivells més elevats del balanç endostatina/VEGF tenien una major nombre d'estenosis intracranials. A més, aquells pacients amb nivells d'endostatina basal superiors a 185 ng/ml mostraven una major recurrència de nous esdeveniments isquèmics (52).

A partir dels resultats obtinguts i dels existents en la bibliografia, podem especular que la inhibició de l'endostatina durant la fase aguda de l'ictus isquèmic podria tenir un benefici terapèutic en l'estat funcional del pacient. En aquest sentit, l'efecte perjudicial de l'endostatina com a inhibidor de l'angiogènesi després de la isquèmia cerebral ja s'ha demostrat en models experimentals. Així, s'ha observat que l'administració d'endostatina aboleix completament l'efecte beneficiós de l'activitat física després de la isquèmia cerebral (97). D'altra banda, un treball amb un model d'infart de miocardi en rata, demostra que la inhibició de l'endostatina mitjançant l'administració d'un anticòs no millora el pronòstic, sinó que sorprenentment, incrementa el risc d'insuficiència cardíaca (119).

Recentment, també s'ha vist que l'endostatina no té un efecte exclusiu sobre l'endoteli sinó que també afecta altres components de la unitat neurovascular com, per exemple, les neurones (93). La inhibició de la catepsina B (enzim encarregat del trencament del col·lagen XVIII) reverteix l'apoptosi neuronal produïda per l'endostatina. Per tant, aquests resultats indiquen que actuar sobre els enzims encarregats del trencament proteolític del col·lagen XVIII podria ser una bona estratègia terapèutica per tal de protegir la unitat neurovascular.

Per tant, el paper que pugui jugar la inhibició de l'endostatina endògena en l'ictus és encara desconegut i treballs experimentals amb animals *knock-out/knock-in* ens haurien d'ajudar a establir el mecanisme d'acció de l'endostatina en la patofisiologia de l'ictus isquèmic.

5.5 L'ictus isquèmic estimula l'alliberació d'EPCs al torrent sanguini i modula la seva funcionalitat *in vitro*.

El descobriment de les EPCs i el seu estudi en diferents malalties isquèmiques, ha obert la possibilitat d'utilitzar-les com a potencials biomarcadors de la funció o disfunció endotelial així com també com a teràpia per estimular la revascularització del teixit afectat. Tot i això, encara desconeixem quin és el seu paper en l'ictus i com es troben influenciades per la isquèmia.

Els nostres resultats mostren que hi ha una mobilització de cèl·lules KDR+/CD133+/CD34+/CD45+ (definides com a població d'EPCs) en pacients d'ictus en comparació amb els controls sans. De manera similar també obtenim una major diferenciació endotelial i una major formació de colònies proliferatives en pacients amb ictus en comparació amb els controls, relacionant-se positivament amb la gravetat de la isquèmia mesurada per l'escala NIHSS.

A més, els nostres resultats mostren diferències en la funcionalitat de les EPCs en les diferents fases de l'ictus isquèmic. Les EPCs obtingudes en la fase subaguda mostren una major capacitat tubulogènica *in vitro*, i tot i que les diferències no arriben a ser estadísticament significatives també observem una major secreció i expressió d'alguns factors claus en la potenciació de l'angiogènesi.

L'augment agut dels nivells d'EPCs circulants en sang perifèrica de pacients durant el primer dia després de l'ictus, es podria explicar per l'activació de l'alliberament d'EPCs del moll de l'os com a conseqüència de la isquèmia (120) i la conseqüent resposta inflamatòria (121). En canvi, la posterior disminució però major funcionalitat de les EPCs es podria explicar per l'activació de l'angiogènesi endògena i suposaria un avantatge pels processos de neuroreparació. Per tant, un major nombre d'EPCs no significaria un augment de l'angiogènesi si aquestes no són realment funcionals.

Tot i que el paper beneficiós de l'administració d'EPCs s'ha demostrat en models animals d'isquèmia cerebral (71-75), els resultats en pacients no són tan clars. Existeixen resultats contradictoris en la bibliografia, ja que mentre alguns autors demostren un increment d'EPCs en pacients (78) comparat amb controls, altres descriuen una disminució dels seus nivells en pacients (76;77). Altres estudis han demostrat que l'increment d'EPCs es correlaciona amb un millor pronòstic dels pacients al tercer mes (78;79) i amb una millora en la funció cerebrovascular (80). En un treball recent, però, aquesta associació amb un millor pronòstic no s'ha confirmat (81).

Les diferències en les tècniques utilitzades per l'aïllament i per la quantificació de les EPCs podria explicar aquestes divergències. Diferents treballs utilitzen el recompte d'unitats formadores de colònies (CFU) com a mesura indirecta del nombre d'EPCs circulants, però treballs recents han demostrat que aquestes cèl·lules tenen un llinatge

monocític, macrofàgic o de limfòcit T (61;122) i no funcionen com a cèl·lules endotelials.

En aquest sentit, cal destacar que en el nostre estudi vam realitzar la quantificació d'EPCs mitjançant tècniques diferents: citometria de flux i cultiu cel·lular. En aquest últim cas hem emprat com a mesura dels nivells d'EPCs el recompte de CACs, com ja s'ha realitzat en altres estudis (120;123).

Diversos estudis en isquèmia perifèrica demostren que la isquèmia podria ser un gran estimulador que milloraria la potencialitat terapèutica de les EPCs així com també del seu medi condicionat (120;124). En la mateixa direcció, un estudi molt recent en isquèmia cerebral demostra que el transplantament de cèl·lules del moll de l'os de rates sotmeses a isquèmia millora el dèficit neurològic comparat amb cèl·lules de rates no isquèmiques (125).

En resum, el nostre estudi també suggereix que la isquèmia seria un potent estimulador no només de l'alliberació d'EPCs sinó també de la seva major funcionalitat, indicant que el transplantament autòleg d'EPCs obtingudes de pacients amb ictus isquèmic durant la fase subaguda podria tenir una millor eficàcia terapèutica respecte al transplantament de cèl·lules procedents de controls sans.

5.6 Ús de l'angiogènesi i la vasculogènesi com a biomarcador i/o teràpia en l'ictus isquèmic

Tot i que el disseny del nostre estudi no ens permet determinar la causalitat del efectes observats, els resultats obtinguts en aquesta tesi es podrien resumir en l'esquema mostrat en la figura 16. En el nostre model, la isquèmia provocaria l'augment plasmàtic de PDGF-BB, GM-CSF, TSP-2 i endostatina, aquests promotors i inhibidors angiogènics estimularien aleshores la mobilització d'EPCs des del moll de

l'os fins a la sang perifèrica, augmentant el seu nombre durant les 24 h després de l'inici dels símptomes. En canvi, els nivells d'alguns dels factors de creixement estudiats es trobarien disminuïts en aquest temps, afectant a la funcionalitat de les EPCs. Per altra banda, a la setmana de l'ictus les EPCs mostrarien una major funcionalitat endotelial. En aquest sentit, trobem dues possibles explicacions: per una banda, l'augment d'alguns dels factors de creixement estudiats podrien contribuir a la major funcionalitat de les EPCs, o per altra banda, podria ser que els factors de secreció d'aquesta població cel·lular es relacionessin amb la recuperació dels valors basals d'alguns dels promotors i inhibidors angiogènics estudiats (figura 17).

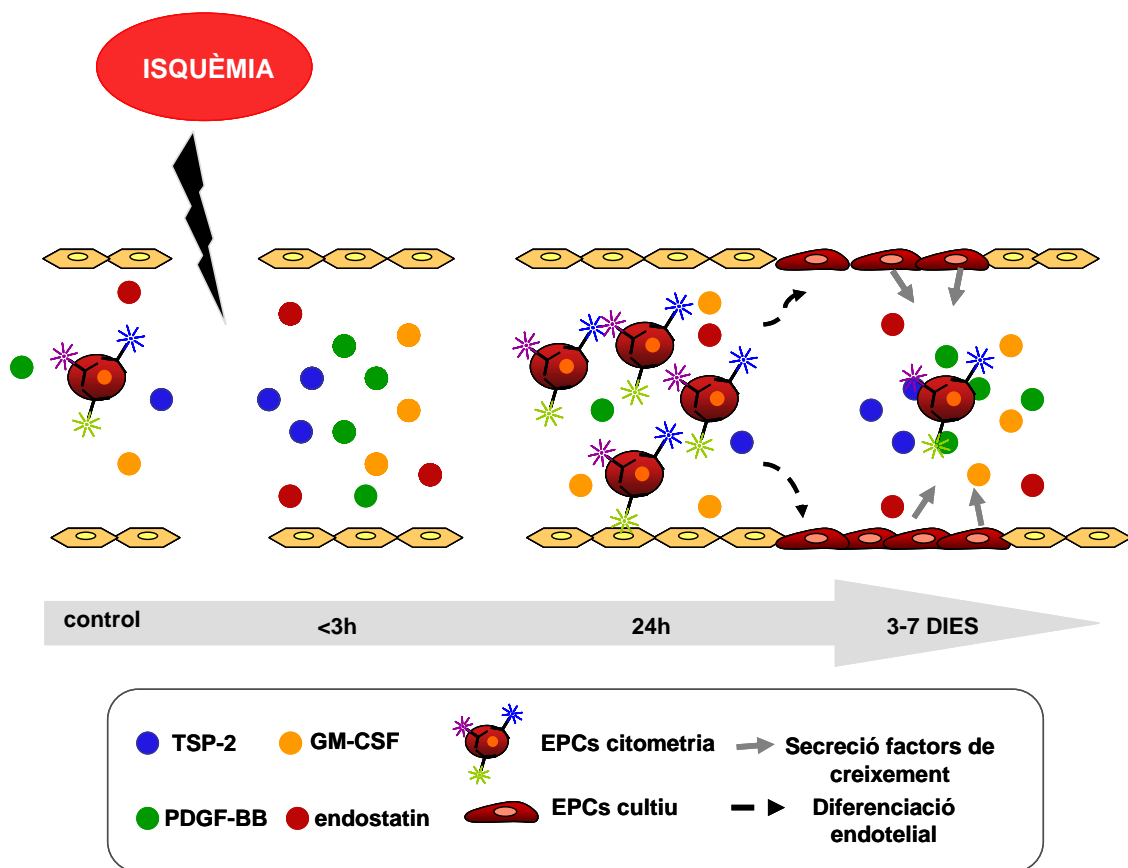


Figura 17. Esquema resum dels resultats obtinguts en aquesta tesi

5.6.1 La monitorització de l'angiogenesi i la vasculogènesi endògena és útil com a biomarcador pronòstic en l'ictus isquèmic ?

En conjunt, el nostre treball indica que després de l'ictus, la monitorització de certs factors o balanços angiogènics com són el VEGF, el VEGF/endostatina o el PDGF-BB/angiostatina poden ser útils com a biomarcadors pronòstic a curt termini, mentre que els nivells d'endostatina a temps basal serveixen per predir el pronòstic funcional dels pacients a llarg termini. En canvi, els nivells d'EPCs circulants no serien una eina útil en la pràctica clínica com a biomarcador pronòstic en l'ictus sinó una eina terapèutica d'angiogènesi endògena.

Determinar els nivells de certs promotors i inhibidors angiogènics, com l'VEGF i l'endostatina, poden ser de gran utilitat tant en la pràctica clínica com en la investigació bàsica en diferents aspectes. Si els nostres resultats es repliquen en altres poblacions la monitorització de l'VEGF i l'endostatina, podrien ajudar al neuròleg en a l'hora de valorar l'evolució del pacient i pendre una decisió clínica. Els nostres resultats indiquen que els valors plasmàtics d'endostatina es podrien determinar durant les primeres 24 h des de l'inici dels símptomes associant-se a el pronòstic del pacient. Per tant, es podria realitzar un seguiment més acurat d'aquells pacients que tenint nivells d'endostatina més alts es preveu que tinguin un pitjor pronòstic funcional. També seria de vital importància desenvolupar tècniques de detecció més ràpides, que avui en dia no tenim disponibles. Finalment, i amb una previsió a llarg termini, aquests resultats ens podrien ajudar a la identificació d'aquells pacients més susceptibles d'obtenir un major benefici de teràpies futures basades en la neuroreparació.

5.6.2 La potenciació de l'angiogenesis i la vasculogènesi poden ser noves teràpies en l'ictus isquèmic ?

Models experimentals han demostrat l'efecte beneficiós de l'administració exògena de promotors angiogènics en la isquèmia cerebral (85;126). De fet, ja s'han dut a terme alguns assajos clínics en fase I-II amb promotors angiogènics com l'EPO i el G-CSF on s'ha demostrat que aquests factors hematopoètics amb propietats angiogèniques milloren el pronòstic dels pacients (28;127-129).

En aquest sentit, els nostres resultats són rellevants ja que demostren que la potenciació de l'angiogènesi endògena pot ser beneficiosa ja que es correlaciona amb un menor dèficit neurològic sense incrementar el risc de TH. Tot i això, per a la seva utilització com a teràpia en l'ictus isquèmic, són necessaris estudis amb un major nombre de pacients així com també un millor coneixement de la farmacocinètica d'aquests factors i del seu efecte a llarg termini per a la seva utilització com a teràpia en l'ictus isquèmic.

Per altra banda, en els últims anys la utilització de teràpies cel·lulars després de la isquèmia cerebral sembla ser una estratègia terapèutica prometedora. Resultats obtinguts en diferents models experimentals demostren que el tractament amb EPCs després de la isquèmia redueix el volum d'infart i millora el dèficit neurològic (71-75). S'han dut a terme diferents assajos clínics trasplantant cèl·lules mesenquimals o cèl·lules neurals progenitores procedents de teratocarcinomes a pacients amb ictus isquèmic observant-se també una certa millora funcional dels pacients (130). Tot i això, encara hem de ser prudents a l'hora d'interpretar aquests resultats, ja que els estudis inclouen pocs pacients i són encara preliminars. La utilització del medi condicionat d'aquestes cèl·lules, que conté el seus factors de secreció, també sembla ser una eina

terapèutica prometedora, ja que evitaria els problemes de rebuig de la teràpia cel·lular (124).

En aquest sentit, els nostres resultats demostren que EPCs procedents de pacients amb ictus isquèmic secreten factors de creixement com el PDGF-BB, el VEGF, el FGF i l'HGF molt importants en la regulació dels processos de neovascularització. Per tant, la utilització del medi condicionat d'aquestes cèl·lules procedents dels propis pacients podria ser també una bona estratègia terapèutica.

És important destacar que en aquesta tesi demostrem que existeixen diferències en la funcionalitat de les EPCs depenent del temps transcorregut des de l'ictus, i tot i que, aquests resultats s'haurien de confirmar en estudis futurs, la teràpia amb EPCs hauria de tenir en compte aquesta modulació temporal per tal que els pacients amb ictus isquèmic obtinguessin el major benefici terapèutic.

6. CONCLUSIONS

Les conclusions d'aquesta tesi són:

- Models experimentals han demostrat que les EPCs són una eina terapèutica útil en la isquèmia cerebral, en canvi el seu ús com a biomarcador de la funció cerebrovascular i del pronòstic dels pacients amb ictus no són concloents. La utilització de les diferents tècniques existents per la seva quantificació i aïllament així com estudis que demostrin la seva funcionalitat tant *in vitro* com *in vivo* són de cabdal importància per determinar el paper de les EPCs en la patologia cerebrovascular.
- Els nivells circulants d'EPCs determinats mitjançant citometria de flux es troben elevats en pacients amb ictus isquèmic comparat amb controls. De la mateixa manera, trobem una major capacitat de diferenciació a cèl·lula endotelial en els cultius cel·lulars de pacients amb ictus.
- Les EPCs obtingudes de pacients en la fase subaguda de l'ictus mostren una major funcionalitat *in vitro* que les obtingudes durant la fase aguda, i podrien ser més eficients en teràpies de neuroreparació.
- Diferents promotors i inhibidors angiogènics es troben modulats després de l'ictus isquèmic. Els nivells en plasma de PDGF-BB, d'endostatina i de TSP-2 i GM-CSF es troben augmentats en la fase hiperaguda de l'ictus comparat amb una població control.
- Una major angiogènesi endògena determinada pels nivells de VEGF, VEGF/endostatina o PDGF-BB/angiostatina s'associen a un menor dèficit

neurològic a curt termini, sense incrementar el risc de TH. En canvi, nivells elevats de l'inhibidor angiogènic endostatina s'associen a un pitjor pronòstic funcional dels pacients al tercer mes.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Bonita R 1992 Epidemiology of stroke. *Lancet* 339:342-344
2. Montaner J R-YMCMÁ-SJCJ 2010 Molecular Signatures of Course and Prognosis of Intracerebral Hemorrhage. *Seminars in Cerebrovascular Diseases and Stroke* 5, 178-188.:
3. Adams HP, Jr., Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE, III 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
4. Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA 1977 Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 8:51-57
5. Lo EH 2008 A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med* 14:497-500
6. Martin LL, Lee GE, Lee TB, Rush DK, Wilmot CA, Paulus E, Elben U, Grome JJ, Porsche-Wiebkling E, Rudolphi KA, . 1994 Synthesis, resolution, and SAR of (+/-)-2-amino-N-methyl-alpha-(3-methyl-2-thienyl)benzeneethanamine++ + and related analogs as noncompetitive NMDA antagonists with neuroprotective properties. *J Med Chem* 37:3008-3015
7. Lipton P 1999 Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79:1431-1568
8. Krause GS, White BC, Aust SD, Nayini NR, Kumar K 1988 Brain cell death following ischemia and reperfusion: a proposed biochemical sequence. *Crit Care Med* 16:714-726
9. White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, Grossman LI, Rafols JA, Krause GS 2000 Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *J Neurol Sci* 179:1-33
10. Díaz-Guerra M 2010 Terapias orientadas al bloqueo de la excitotoxicidad. In: Montaner J (ed). *Tratamiento del ictus isquémico*.:125-135
11. Dugan LL, Kim-Han JS 2004 Astrocyte mitochondria in in vitro models of ischemia. *J Bioenerg Biomembr* 36:317-321
12. Castillo J, Alvarez-Sabin J, Davalos A, Diez-Tejedor E, Lizasoain I, Martinez-Vila E, Vivancos J, Zarranz JJ 2003 [Consensus review. Pharmacological neuroprotection in cerebral ischemia: is it still a therapeutic option?]. *Neurologia* 18:368-384
13. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA 1999 Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22:391-397

14. Pelidou SH, Kostulas N, Matusevicius D, Kivisakk P, Kostulas V, Link H 1999 High levels of IL-10 secreting cells are present in blood in cerebrovascular diseases. *Eur J Neurol* 6:437-442
15. Barone FC, Feuerstein GZ 1999 Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:819-834
16. Zheng Z, Yenari MA 2004 Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurol Res* 26:884-892
17. Akopov SE, Simonian NA, Grigorian GS 1996 Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. *Stroke* 27:1739-1743
18. Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Sasaki K, Duan J, Imaizumi T 2001 Augmentation of postnatal neovascularization with autologous bone marrow transplantation. *Circulation* 103:897-903
19. Lutun A, Carmeliet G, Carmeliet P 2002 Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med* 12:88-96
20. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA 2003 Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 4:399-415
21. Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D 2008 Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359:1317-1329
22. Intracerebral hemorrhage after intravenous t-PA therapy for ischemic stroke. The NINDS t-PA Stroke Study Group. *Stroke* 28, 2109-2118. 1997.
23. Adibhatla RM, Hatcher JF 2008 Tissue plasminogen activator (tPA) and matrix metalloproteinases in the pathogenesis of stroke: therapeutic strategies. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7:243-253
24. Lin K, Kazmi KS, Law M, Babb J, Peccerelli N, Pramanik BK 2007 Measuring elevated microvascular permeability and predicting hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke using first-pass dynamic perfusion CT imaging. *AJNR Am J Neuroradiol* 28:1292-1298
25. Eloy Cuadrado Godia. Les metal·loproteïnases de matriu en la isquèmia cerebral: origen, localització cel·lular i contribució al dany tissular. 2009.
26. O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horky LL, van der Worp BH, Howells DW 2006 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* 59:467-477

27. Sun Y, Jin K, Xie L, Childs J, Mao XO, Logvinova A, Greenberg DA 2003 VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest* 111:1843-1851
28. Schabitz WR, Kruger C, Pitzer C, Weber D, Laage R, Gassler N, Aronowski J, Mier W, Kirsch F, Dittgen T, Bach A, Sommer C, Schneider A 2008 A neuroprotective function for the hematopoietic protein granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). *J Cereb Blood Flow Metab* 28:29-43
29. Kilic U, Bassetti CL, Kilic E, Xing H, Wang Z, Hermann DM 2005 Post-ischemic delivery of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor rosuvastatin protects against focal cerebral ischemia in mice via inhibition of extracellular-regulated kinase-1/-2. *Neuroscience* 134:901-906
30. Bacigaluppi M, Hermann DM 2008 New targets of neuroprotection in ischemic stroke. *ScientificWorldJournal* 8:698-712
31. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA 2003 Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 4:399-415
32. Hawkins BT, Davis TP 2005 The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57:173-185
33. Lo EH, Broderick JP, Moskowitz MA 2004 tPA and proteolysis in the neurovascular unit. *Stroke* 35:354-356
34. Carmeliet P 2005 Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438:932-936
35. Rosell-Novel A, Montaner J, Alvarez-Sabin J 2004 [Angiogenesis in human cerebral ischemia]. *Rev Neurol* 38:1076-1082
36. Risau W, Flamme I 1995 Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11:73-91
37. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der ZR, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM 1997 Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-967
38. Freedman SB, Isner JM 2002 Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *Ann Intern Med* 136:54-71
39. Yamashita T, Ninomiya M, Hernandez AP, Garcia-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe K, Okano H, Sawamoto K 2006 Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci* 26:6627-6636
40. Gould E, Tanapat P 1997 Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 80:427-436

41. Dimmeler S 2005 ATVB in focus: novel mediators and mechanisms in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2245
42. Thored P, Wood J, Arvidsson A, Cammenga J, Kokaia Z, Lindvall O 2007 Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke* 38:3032-3039
43. Alvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F 2002 Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. *Brain Res Bull* 57:751-758
44. Yamashita T, Deguchi K, Sawamoto K, Okano H, Kamiya T, Abe K 2006 Neuroprotection and neurosupplementation in ischaemic brain. *Biochem Soc Trans* 34:1310-1312
45. Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST 2006 A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci* 26:13007-13016
46. Navarro M RA 2009 Potenciando la angioneurogénesis con factores de crecimiento. In: Joan Montaner (ed). *Tratamiento del ictus isquémico*:166-173
47. Beck H, Acker T, Wiessner C, Allegrini PR, Plate KH 2000 Expression of angiopoietin-1, angiopoietin-2, and tie receptors after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Am J Pathol* 157:1473-1483
48. Hayashi T, Noshita N, Sugawara T, Chan PH 2003 Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:166-180
49. Marti HJ, Bernaudin M, Bellail A, Schoch H, Euler M, Petit E, Risau W 2000 Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol* 156:965-976
50. Krupinski J, Kaluza J, Kumar P, Kumar S, Wang JM 1994 Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* 25:1794-1798
51. Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C, Bruggen N, Chopp M 2000 VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* 106:829-838
52. Arenillas JF, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Rosell A, Molina CA, Rovira A, Ribo M, Sanchez E, Quintana M 2005 Angiogenesis in symptomatic intracranial atherosclerosis: predominance of the inhibitor endostatin is related to a greater extent and risk of recurrence. *Stroke* 36:92-97
53. Lin TN, Kim GM, Chen JJ, Cheung WM, He YY, Hsu CY 2003 Differential regulation of thrombospondin-1 and thrombospondin-2 after focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke* 34:177-186

54. Deb A, Patterson C 2010 Hard Luck Stories: The Reality of Endothelial Progenitor Cells Continues to Fall Short of the Promise. *Circulation*
55. Hur J, Yoon CH, Kim HS, Choi JH, Kang HJ, Hwang KK, Oh BH, Lee MM, Park YB 2004 Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:288-293
56. Mukai N, Akahori T, Komaki M, Li Q, Kanayasu-Toyoda T, Ishii-Watabe A, Kobayashi A, Yamaguchi T, Abe M, Amagasa T, Morita I 2008 A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Exp Cell Res* 314:430-440
57. Shantsila E, Watson T, Lip GY 2007 Endothelial progenitor cells in cardiovascular disorders. *J Am Coll Cardiol* 49:741-752
58. Rouhl RP, van Oostenbrugge RJ, Damoiseaux J, Cohen Tervaert JW, Lodder J 2008 Endothelial progenitor cell research in stroke: a potential shift in pathophysiological and therapeutical concepts. *Stroke* 39:2158-2165
59. Tura O, Barclay GR, Roddie H, Davies J, Turner ML 2007 Absence of a relationship between immunophenotypic and colony enumeration analysis of endothelial progenitor cells in clinical haematopoietic cell sources. *J Transl Med* 5:37
60. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley D, Yoder MC 2004 Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 104:2752-2760
61. Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC 2005 Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 106:1525-1531
62. Urbich C, Dimmeler S 2004 Endothelial progenitor cells functional characterization. *Trends Cardiovasc Med* 14:318-322
63. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S 2002 Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell* 109:625-637
64. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T 2003 Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348:593-600
65. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Bohm M, Nickenig G 2005 Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353:999-1007

66. Hristov M, Weber C 2004 Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med* 8:498-508
67. Martin-Rendon E, Brunskill S, Doree C, Hyde C, Watt S, Mathur A, Stanworth S 2008 Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev*CD006536
68. Lara-Hernandez R, Lozano-Vilardell P, Blanes P, Torreguitart-Mirada N, Galmes A, Besalduch J 2010 Safety and efficacy of therapeutic angiogenesis as a novel treatment in patients with critical limb ischemia. *Ann Vasc Surg* 24:287-294
69. Wang XX, Zhang FR, Shang YP, Zhu JH, Xie XD, Tao QM, Zhu JH, Chen JZ 2007 Transplantation of autologous endothelial progenitor cells may be beneficial in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension: a pilot randomized controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 49:1566-1571
70. Zhu JH, Wang XX, Zhang FR, Shang YP, Tao QM, Zhu JH, Chen JZ 2008 Safety and efficacy of autologous endothelial progenitor cells transplantation in children with idiopathic pulmonary arterial hypertension: open-label pilot study. *Pediatr Transplant* 12:650-655
71. Deng YB, Ye WB, Hu ZZ, Yan Y, Wang Y, Takon BF, Zhou GQ, Zhou YF 2010 Intravenously administered BMSCs reduce neuronal apoptosis and promote neuronal proliferation through the release of VEGF after stroke in rats. *Neurol Res* 32:148-156
72. Fan Y, Shen F, Frenzel T, Zhu W, Ye J, Liu J, Chen Y, Su H, Young WL, Yang GY 2010 Endothelial progenitor cell transplantation improves long-term stroke outcome in mice. *Ann Neurol* 67:488-497
73. Hess DC, Hill WD, Martin-Studdard A, Carroll J, Brailer J, Carothers J 2002 Bone marrow as a source of endothelial cells and NeuN-expressing cells After stroke. *Stroke* 33:1362-1368
74. Moubarik C, Guillet B, Youssef B, Codaccioni JL, Piercecchi MD, Sabatier F, Lionel P, Dou L, Foucault-Bertaud A, Velly L, Dignat-George F, Pisano P 2010 Transplanted Late Outgrowth Endothelial Progenitor Cells as Cell Therapy Product for Stroke. *Stem Cell Rev*
75. Ohta T, Kikuta K, Imamura H, Takagi Y, Nishimura M, Arakawa Y, Hashimoto N, Nozaki K 2006 Administration of ex vivo-expanded bone marrow-derived endothelial progenitor cells attenuates focal cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Neurosurgery* 59:679-686
76. Chu K, Jung KH, Lee ST, Park HK, Sinn DI, Kim JM, Kim DH, Kim JH, Kim SJ, Song EC, Kim M, Lee SK, Roh JK 2008 Circulating endothelial progenitor cells as a new marker of endothelial dysfunction or repair in acute stroke. *Stroke* 39:1441-1447

77. Ghani U, Shuaib A, Salam A, Nasir A, Shuaib U, Jeerakathil T, Sher F, O'Rourke F, Nasser AM, Schwindt B, Todd K 2005 Endothelial progenitor cells during cerebrovascular disease. *Stroke* 36:151-153
78. Yip HK, Chang LT, Chang WN, Lu CH, Liou CW, Lan MY, Liu JS, Youssef AA, Chang HW 2008 Level and value of circulating endothelial progenitor cells in patients after acute ischemic stroke. *Stroke* 39:69-74
79. Sobrino T, Hurtado O, Moro MA, Rodriguez-Yanez M, Castellanos M, Brea D, Moldes O, Blanco M, Arenillas JF, Leira R, Davalos A, Lizasoain I, Castillo J 2007 The increase of circulating endothelial progenitor cells after acute ischemic stroke is associated with good outcome. *Stroke* 38:2759-2764
80. Taguchi A, Matsuyama T, Moriwaki H, Hayashi T, Hayashida K, Nagatsuka K, Todo K, Mori K, Stern DM, Soma T, Naritomi H 2004 Circulating CD34-positive cells provide an index of cerebrovascular function. *Circulation* 109:2972-2975
81. Cesari F, Nencini P, Nesi M, Caporale R, Giusti B, Abbate R, Gori AM, Inzitari D 2009 Bone marrow-derived progenitor cells in the early phase of ischemic stroke: relation with stroke severity and discharge outcome. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:1983-1990
82. Koolwijk P, van Erck MG, de Vree WJ, Vermeer MA, Weich HA, Hanemaaijer R, van Hinsbergh VW 1996 Cooperative effect of TNFalpha, bFGF, and VEGF on the formation of tubular structures of human microvascular endothelial cells in a fibrin matrix. Role of urokinase activity. *J Cell Biol* 132:1177-1188
83. Shimamura M, Sato N, Oshima K, Aoki M, Kurinami H, Waguri S, Uchiyama Y, Ogihara T, Kaneda Y, Morishita R 2004 Novel therapeutic strategy to treat brain ischemia: overexpression of hepatocyte growth factor gene reduced ischemic injury without cerebral edema in rat model. *Circulation* 109:424-431
84. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, Wu Y, Bono F, Devy L, Beck H, Scholz D, Acker T, DiPalma T, Dewerchin M, Noel A, Stalmans I, Barra A, Blacher S, Vandendriessche T, Ponten A, Eriksson U, Plate KH, Foidart JM, Schaper W, Charnock-Jones DS, Hicklin DJ, Herbert JM, Collen D, Persico MG 2001 Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med* 7:575-583
85. Sugiura S, Kitagawa K, Tanaka S, Todo K, Omura-Matsuoka E, Sasaki T, Mabuchi T, Matsushita K, Yagita Y, Hori M 2005 Adenovirus-mediated gene transfer of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor enhances neurogenesis and angiogenesis after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 36:859-864

86. Brizzi MF, Battaglia E, Montrucchio G, Dentelli P, Del Sorbo L, Garbarino G, Pegoraro L, Camussi G 1999 Thrombopoietin stimulates endothelial cell motility and neoangiogenesis by a platelet-activating factor-dependent mechanism. *Circ Res* 84:785-796
87. Shyu WC, Lin SZ, Yen PS, Su CY, Chen DC, Wang HJ, Li H 2008 Stromal cell-derived factor-1 alpha promotes neuroprotection, angiogenesis, and mobilization/homing of bone marrow-derived cells in stroke rats. *J Pharmacol Exp Ther* 324:834-849
88. Sadohara T, Sugahara K, Urashima Y, Terasaki H, Lyama K 2001 Keratinocyte growth factor prevents ischemia-induced delayed neuronal death in the hippocampal CA1 field of the gerbil brain. *Neuroreport* 12:71-76
89. Rege TA, Fears CY, Gladson CL 2005 Endogenous inhibitors of angiogenesis in malignant gliomas: nature's antiangiogenic therapy. *Neuro Oncol* 7:106-121
90. O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J 1997 Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* 88:277-285
91. Faye C, Chautard E, Olsen BR, Ricard-Blum S 2009 The first draft of the endostatin interaction network. *J Biol Chem* 284:22041-22047
92. Morimoto T, Aoyagi M, Tamaki M, Yoshino Y, Hori H, Duan L, Yano T, Shibata M, Ohno K, Hirakawa K, Yamaguchi N 2002 Increased levels of tissue endostatin in human malignant gliomas. *Clin Cancer Res* 8:2933-2938
93. Hou Q, Ling L, Wang F, Xing S, Pei Z, Zeng J 2010 Endostatin expression in neurons during the early stage of cerebral ischemia is associated with neuronal apoptotic cell death in adult hypertensive rat model of stroke. *Brain Res* 1311:182-188
94. Rege TA, Fears CY, Gladson CL 2005 Endogenous inhibitors of angiogenesis in malignant gliomas: nature's antiangiogenic therapy. *Neuro Oncol* 7:106-121
95. Abdollahi A, Hlatky L, Huber PE 2005 Endostatin: the logic of antiangiogenic therapy. *Drug Resist Updat* 8:59-74
96. Rege TA, Stewart J, Jr., Dranka B, Benveniste EN, Silverstein RL, Gladson CL 2009 Thrombospondin-1-induced apoptosis of brain microvascular endothelial cells can be mediated by TNF-R1. *J Cell Physiol* 218:94-103
97. Gertz K, Priller J, Kronenberg G, Fink KB, Winter B, Schrock H, Ji S, Milosevic M, Harms C, Bohm M, Dirnagl U, Laufs U, Endres M 2006 Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial

- nitric oxide synthase-dependent augmentation of neovascularization and cerebral blood flow. *Circ Res* 99:1132-1140
98. Biomarkers Definition Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. 2010 *Clin Pharmacol Ther* 69:89-95
 99. Foerch C, Montaner J, Furie KL, Ning MM, Lo EH 2009 Invited Article: Searching for oracles? Blood biomarkers in acute stroke. *Neurology* 73:393-399
 100. Whiteley W, Chong WL, Sengupta A, Sandercock P 2009 Blood markers for the prognosis of ischemic stroke: a systematic review. *Stroke* 40:e380-e389
 101. Pessin MS, Del Zoppo GJ, Estol CJ 1990 Thrombolytic agents in the treatment of stroke. *Clin Neuropharmacol* 13:271-289
 102. Burgin WS, Malkoff M, Felberg RA, Demchuk AM, Christou I, Grotta JC, Alexandrov AV 2000 Transcranial doppler ultrasound criteria for recanalization after thrombolysis for middle cerebral artery stroke. *Stroke* 31:1128-1132
 103. Beck H, Plate KH 2009 Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* 117:481-496
 104. Pinard E, Nallet H, MacKenzie ET, Seylaz J, Roussel S 2002 Penumbra microcirculatory changes associated with peri-infarct depolarizations in the rat. *Stroke* 33:606-612
 105. Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelso C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A 1997 Intrathecal release of pro- and anti-inflammatory cytokines during stroke. *Clin Exp Immunol* 110:492-499
 106. Krupinski J, Issa R, Bujny T, Slevin M, Kumar P, Kumar S, Kaluza J 1997 A putative role for platelet-derived growth factor in angiogenesis and neuroprotection after ischemic stroke in humans. *Stroke* 28:564-573
 107. Guo H, Huang L, Cheng M, Jin X, Zhao Y, Yi M 2006 Serial measurement of serum basic fibroblast growth factor in patients with acute cerebral infarction. *Neurosci Lett* 393:56-59
 108. Slevin M, Krupinski J, Slowik A, Kumar P, Szczudlik A, Gaffney J 2000 Serial measurement of vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-beta1 in serum of patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 31:1863-1870
 109. Tian HL, Chen H, Cui YH, Xu T, Zhou LF 2007 Increased protein and mRNA expression of endostatin in the ischemic brain tissue of rabbits after middle cerebral artery occlusion. *Neurosci Bull* 23:35-40
 110. Zhang ZG, Zhang L, Tsang W, Soltanian-Zadeh H, Morris D, Zhang R, Goussev A, Powers C, Yeich T, Chopp M 2002 Correlation of VEGF and

- angiopoietin expression with disruption of blood-brain barrier and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:379-392
111. Hermann DM, Zechariah A 2009 Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:1620-1643
112. Sobrino T, Arias S, Rodriguez-Gonzalez R, Brea D, Silva Y, de la Ossa NP, Agulla J, Blanco M, Pumar JM, Serena J, Davalos A, Castillo J 2009 High serum levels of growth factors are associated with good outcome in intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:1968-1974
113. Hill WD, Hess DC, Martin-Studdard A, Carothers JJ, Zheng J, Hale D, Maeda M, Fagan SC, Carroll JE, Conway SJ 2004 SDF-1 (CXCL12) is upregulated in the ischemic penumbra following stroke: association with bone marrow cell homing to injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:84-96
114. Parissis JT, Adamopoulos S, Venetsanou K, Kostakis G, Rigas A, Karas SM, Kremastinos D 2004 Plasma profiles of circulating granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and soluble cellular adhesion molecules in acute myocardial infarction. Contribution to post-infarction left ventricular dysfunction. *Eur Cytokine Netw* 15:139-144
115. Hebbbar M, Peyrat JP, Hornez L, Hatron PY, Hachulla E, Devulder B 2000 Increased concentrations of the circulating angiogenesis inhibitor endostatin in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 43:889-893
116. Perkins GD, Nathani N, Richter AG, Park D, Shyamsundar M, Heljasvaara R, Pihlajaniemi T, Manji M, Tunnicliffe W, McAuley D, Gao F, Thickett DR 2009 Type XVIII collagen degradation products in acute lung injury. *Crit Care* 13:R52
117. Funatsu H, Yamashita H, Noma H, Shimizu E, Yamashita T, Hori S 2001 Stimulation and inhibition of angiogenesis in diabetic retinopathy. *Jpn J Ophthalmol* 45:577-584
118. Ratel D, Nasser V, Dupre I, Benabid AL, Berger F 2000 Antibodies to endostatin in a multifocal glioblastoma patient. *Lancet* 356:1656-1657
119. Isobe K, Kuba K, Maejima Y, Suzuki J, Kubota S, Isobe M 2010 Inhibition of endostatin/collagen XVIII deteriorates left ventricular remodeling and heart failure in rat myocardial infarction model. *Circ J* 74:109-119
120. Akita T, Murohara T, Ikeda H, Sasaki K, Shimada T, Egami K, Imaizumi T 2003 Hypoxic preconditioning augments efficacy of human endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Lab Invest* 83:65-73
121. Rosell A, Arai K, Lok J, He T, Guo S, Navarro M, Montaner J, Katusic ZS, Lo EH 2009 Interleukin-1beta augments angiogenic responses of

- murine endothelial progenitor cells in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:933-943
122. Yoder MC 2009 Defining human endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost* 7 Suppl 1:49-52
 123. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, Rutten H, Fichtlscherer S, Martin H, Zeiher AM 2001 HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 108:391-397
 124. Di Santo S, Yang Z, Wyler vB, Voelzmann J, Diehm N, Baumgartner I, Kalka C 2009 Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. *PLoS One* 4:e5643
 125. Zacharek A, Shehadah A, Chen J, Cui X, Roberts C, Lu M, Chopp M 2010 Comparison of bone marrow stromal cells derived from stroke and normal rats for stroke treatment. *Stroke* 41:524-530
 126. Sadohara T, Sugahara K, Urashima Y, Terasaki H, Lyama K 2001 Keratinocyte growth factor prevents ischemia-induced delayed neuronal death in the hippocampal CA1 field of the gerbil brain. *Neuroreport* 12:71-76
 127. Bath PM, Sprigg N 2007 Colony stimulating factors (including erythropoietin, granulocyte colony stimulating factor and analogues) for stroke. *Cochrane Database Syst Rev*CD005207
 128. Hasselblatt M, Ehrenreich H, Siren AL 2006 The brain erythropoietin system and its potential for therapeutic exploitation in brain disease. *J Neurosurg Anesthesiol* 18:132-138
 129. Sprigg N, Bath PM, Zhao L, Willmot MR, Gray LJ, Walker MF, Dennis MS, Russell N 2006 Granulocyte-colony-stimulating factor mobilizes bone marrow stem cells in patients with subacute ischemic stroke: the Stem cell Trial of recovery EnhanceMent after Stroke (STEMS) pilot randomized, controlled trial (ISRCTN 16784092). *Stroke* 37:2979-2983
 130. Chopp M, Li Y, Zhang ZG 2009 Mechanisms underlying improved recovery of neurological function after stroke in the rodent after treatment with neurorestorative cell-based therapies. *Stroke* 40:S143-S145



www.lin-bcn.com