



**MOLÉCULAS INFLAMATORIAS  
Y  
MARCADORES DE LESIÓN ENDOTELIAL  
EN LA ISQUEMIA CEREBRAL:  
PARTICIPACIÓN EN EL DETERIORO NEUROLÓGICO  
Y  
LA TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA**

**María del Mar Castellanos Rodrigo**

**Mayo 2004**



**MOLÉCULAS INFLAMATORIAS  
Y  
MARCADORES DE LESIÓN ENDOTELIAL  
EN LA ISQUEMIA CEREBRAL:  
PARTICIPACIÓN EN EL DETERIORO NEUROLÓGICO  
Y  
LA TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA**

**Memoria presentada por  
MARÍA DEL MAR CASTELLANOS RODRIGO  
para optar al Grado de Doctor en Medicina  
por la Universidad Autònoma de Barcelona**

**Barcelona, Mayo 2004**



Hospital Universitari de Girona  
Doctor Josep Trueta



Universitat Autònoma de Barcelona

**ANTONI DÁVALOS ERRANDO**, Director Científico del Hospital Universitari Doctor Josep Trueta de Girona y **AGUSTÍ CODINA PUIGGRÓS**, Profesor Titular de la Universidad Autónoma de Barcelona,

CERTIFICAN:

que los estudios recogidos en esta memoria, bajo el título “**Moléculas inflamatorias y marcadores de lesión endotelial en la isquemia cerebral: Participación en el deterioro neurológico y la transformación hemorrágica**”, han sido realizados bajo nuestra dirección y co-dirección respectivamente, por María del Mar Castellanos Rodrigo, licenciada en Medicina y Cirugía, y que constituyen su Tesis para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona.

Y para que así conste y tenga los efectos oportunos, firmamos este certificado.

Dr. Antoni Dávalos

Dr. Agustí Codina

*A Juanma*

La elaboración de esta memoria y de las publicaciones que la constituyen es el resultado de un trabajo en equipo en el que han colaborado, además de los co-autores de los trabajos publicados, muchas otras personas a las que nunca he agradecido su ayuda. Todas ellas han hecho posible la realización de esta Tesis y por ello no quiero dejar pasar la oportunidad de expresar ahora mi agradecimiento:

Al Dr. Antoni Dávalos, director de esta Tesis, por iniciarme en la investigación y enseñarme la metodología científica sin la que este trabajo no hubiera podido realizarse, por su constante consejo profesional, su apoyo incondicional, su paciencia y su amistad.

Al Dr. José Castillo, por su ayuda en éste y otros muchos trabajos y por su constante empuje científico desde la distancia.

Al Dr. Joaquín Serena, por ser compañero infatigable de alegrías y “reniegos”, por su capacidad para enseñar, y su contagiosa obsesión por las cosas bien hechas.

A los mis compañeros adjuntos en el Departamento de Neurología (Dr. Genís, Dr. Molins y Dra. Meléndez), porque si soy neuróloga es gracias a todo lo que me que me enseñaron durante mi residencia y lo que me siguen enseñando cada día.

A la Dra. Silva por compartir inquietudes científicas en el mismo campo y al Dr. Ramió por impartir esa calma que a mí muchas veces me falta.

A la Dra. Osuna por estar siempre ahí cuando la he necesitado.

A Montse Puigdemont por su constante apoyo, por su ayuda tanto científica como personal, por su excelente disposición para el trabajo y por tener siempre el móvil encendido.

A Jordi Puijula, por compartir el trabajo diario y su colaboración inestimable.

A la Dra. Judith Mallolas, por su constante buen estado de ánimo, por su paciencia enseñándome qué es eso de los genes, por compartir conmigo su sabiduría científica y por su amistad.

A los residentes (Dres. Ustrell y Márquez), por aguantar los momentos de stress que éste y otros trabajos generan.

A Rosa Suñer, por su ayuda para hacer todo siempre menos complicado y por su disponibilidad.

Al personal de enfermería, auxiliares y celadores, y a nuestra secretaria Gloria, por hacer mucho más fácil mi trabajo diario.

A los miembros del gps.com, por compartir las ideas científicas, y la comida y el vino que las hacen mucho más llevaderas.

A Andy, por compartir su exquisito inglés conmigo y hacer que quede reflejado en publicaciones, y por estar disponible siempre.

A mis padres y a mis hermanos, porque siempre me apoyaron en mis inquietudes científicas, por aguantar todo lo bueno y lo malo de mí, por contar conmigo y porque yo siempre podré contar con ellos.

A Juanma, por su comprensión, su cariño, su paciencia, porque nadie como él ha padecido y sobrellevado los sinsabores y las alegrías durante la elaboración de esta Tesis.

Por último, a los pacientes y sus familiares, sin cuya colaboración inestimable no se podrían llevar a cabo ésta ni otras investigaciones.

I.	Introducción.....	1
1.	Deterioro neurológico asociado a la isquemia cerebral .....	2
1.1.	Concepto y clasificación .....	2
1.2.	Factores predictores de deterioro neurológico.....	3
1.3.	Inflamación e isquemia cerebral .....	5
1.4.	Inflamación y deterioro neurológico asociado a la isquemia cerebral .....	11
2.	Transformación hemorrágica del infarto cerebral.....	13
2.1.	Concepto y clasificación .....	13
2.2.	Factores asociados a la aparición de transformación hemorrágica .....	15
2.3.	Mecanismos moleculares y transformación hemorrágica del infarto cerebral .....	16
II.	Objetivo del estudio.....	21
III.	Material y método del estudio.....	24
IV.	Resultados .....	34
V.	Discusión.....	45
1.	Comentario general a las publicaciones del estudio .....	46
2.	Limitaciones de los estudios realizados.....	52
3.	Contribuciones de cada publicación a la literatura.....	55
VI.	Conclusiones finales .....	57
VII.	Bibliografía .....	60
VIII.	Anexos .....	75
IX.	Artículos originales .....	81

## GLOSARIO DE ACRÓNIMOS

---

EC	.....	Escala Canadiense
ECASS	.....	European Cooperative Acute Stroke Study
DNP	.....	Deterioro neurológico precoz
DNT	.....	Deterioro neurológico tardío
Fn-c	.....	Fibronectina celular
HP	.....	Hemorragia parenquimatosa
ICAM	.....	Molécula de adhesión intercelular
IH	.....	Infarto hemorrágico
IL	.....	Interleucina
LCR	.....	Líquido cefalorraquídeo
LPMN	.....	Leucocitos polimorfonucleares
MMP	.....	Metaloproteasa de matriz
NIHSS	.....	National Institute of Health Stroke Scale
NINDS	.....	National Institute of Neurological Disorders and Stroke
PECAM	.....	Molécula de adhesión celular endotelial plaquetaria
PET	.....	Tomografía por emisión de positrones
RMN	.....	Resonancia magnética nuclear
rt-PA	.....	Activador recombinante tisular del plasminógeno
TC	.....	Tomografía computarizada
TH	.....	Transformación hemorrágica
TNF	.....	Factor de necrosis tumoral
TOAST	.....	Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment
VCAM	.....	Molécula de adhesión celular vascular
VPP	.....	Valor predictivo positivo
VPN	.....	Valor predictivo negativo



## I. Introducción

---

## **1. Deterioro neurológico asociado a la isquemia cerebral**

### **1.1. Concepto y clasificación**

El deterioro neurológico asociado a la enfermedad vascular cerebral, también conocido como ictus progresivo o ictus en evolución, se define como un empeoramiento de la sintomatología neurológica que acontece en las primeras horas de evolución y se produce como consecuencia del empeoramiento de los síntomas iniciales o la adición de nuevos síntomas deficitarios neurológicos que corresponden al mismo territorio arterial inicialmente afecto.<sup>1</sup>

La frecuencia de deterioro neurológico asociado a la isquemia cerebral varía entre un 26% y un 43%.<sup>1</sup> Este amplio margen de porcentajes es debido a la falta de uniformidad en las diferentes series publicadas en cuanto a factores tales como el criterio de definición de deterioro neurológico, la sensibilidad de la escala neurológica utilizada en la evaluación clínica o el tiempo transcurrido entre el momento de inicio de la sintomatología y la primera exploración neurológica. Las escalas neurológicas permiten cuantificar de forma objetiva la gravedad del déficit neurológico así como el empeoramiento del mismo. La Escala Canadiense (EC) y la escala del *National Institute of Health* americano (NIHSS) se utilizan de forma rutinaria en la práctica clínica diaria (ver Anexos 1 y 2), y en base a las mismas se considera que un paciente ha presentado progresión del déficit neurológico si se ha producido un descenso  $\geq 1$  punto en la EC (excluyendo el área de la orientación)<sup>2</sup> ó un aumento  $\geq 4$  puntos en la NIHSS.<sup>3</sup> En cuanto al tiempo de evolución de los síntomas, estudios previos han demostrado que aproximadamente la mitad de los pacientes que se deterioran lo hacen dentro de las primeras 24 horas de evolución, y aproximadamente un 90% dentro de los tres primeros días,<sup>4</sup> existiendo además

una pequeña proporción de pacientes que se deterioran más allá de las 72 horas y dentro de la primera semana de evolución de la isquemia. Esta distribución temporal ha permitido distinguir el **deterioro neurológico precoz** (DNP) que se produce en las primeras 72 horas de evolución de la isquemia cerebral, del **deterioro neurológico tardío** (DNT) que se produce entre las 72 horas y el día 7 de evolución.<sup>5</sup> Esta distinción es importante porque los mecanismos implicados en el DNP y DNT parecen ser diferentes. Así, cuando el deterioro se produce más allá de 72 horas es frecuente la participación de fenómenos sistémicos tales como infecciones, cambios metabólicos, hipotensión, o alteraciones respiratorias y cardíacas, mientras que en el DNP parecen más implicadas las causas intracerebrales como el edema cerebral o la transformación hemorrágica (TH) de la lesión isquémica.

Dado que el deterioro neurológico, especialmente cuando es precoz, empeora de forma notable el pronóstico de los pacientes,<sup>2</sup> es fundamental la investigación de los mecanismos fisiopatológicos implicados en el mismo, y de forma secundaria, la búsqueda de posibles intervenciones terapéuticas encaminadas a la prevención y/o interrupción de la progresión del déficit neurológico en las primeras horas de evolución de los síntomas.

## **1.2. Factores predictores de deterioro neurológico**

En los últimos años, numerosos estudios han demostrado la asociación entre determinados factores clínicos, analíticos y de neuroimagen, y el deterioro neurológico en pacientes con ictus isquémico. Así, la historia previa de diabetes mellitus y la enfermedad arterial coronaria,<sup>6,7</sup> las cifras elevadas de glucemia,<sup>2,8</sup> la fiebre,<sup>9,10</sup> los niveles elevados de fibrinógeno,<sup>9</sup> y los niveles de presión

arterial sistólica tanto elevados<sup>2</sup> como bajos<sup>6</sup> han resultado ser predictores independientes de deterioro neurológico en diferentes estudios. Entre los factores detectados mediante técnicas de neuroimagen, la presencia de cualquier signo precoz de infarto (hiperdensidad de la arteria cerebral media, hipodensidad focal en el territorio cerebral afecto, oscurecimiento del cortex cerebral, oscurecimiento del núcleo lenticular, efecto de masa, borramiento de surcos corticales y/o desplazamiento de estructuras de la línea media) en la tomografía computarizada (TC) cerebral realizada en las primeras 24 horas de evolución de los síntomas es significativamente más frecuente en pacientes con DNP.<sup>9</sup> De hecho, la presencia de hipodensidad en el territorio afecto y la hiperdensidad de la arteria cerebral media son factores predictores independientes de deterioro neurológico en las primeras 24 horas de evolución, en tanto que el borramiento de los surcos corticales es predictor del deterioro neurológico que acontece entre las primeras 24 horas y el día 7 de evolución de los síntomas.<sup>7</sup> Además la hipodensidad extensa en la TC craneal en las primeras 5 horas de evolución de los síntomas multiplica por 8.9 el riesgo de presentar deterioro neurológico.<sup>8</sup> Por otro lado, volúmenes de infarto grande con edema cerebral acompañante y efecto de masa secundario son hallazgos de neuroimagen que frecuentemente se asocian al deterioro neurológico tanto precoz como tardío,<sup>7</sup> lo que concuerda con el hecho de que el edema cerebral es máximo hacia el 5° día de evolución de la isquemia. Por último, la asociación entre el deterioro neurológico y la TH de la lesión isquémica cerebral depende de la extensión del componente hemorrágico. En efecto, si bien no existe asociación entre el componente hemorrágico de pequeño tamaño (infarto hemorrágico) y el deterioro neurológico,<sup>7,11</sup> se ha demostrado

que la aparición de un hematoma intraparenquimatoso con efecto de masa (hematoma intraparenquimatoso tipo 2) dentro de la lesión isquémica cerebral se asocia con el deterioro neurológico<sup>12,13</sup> (ver más adelante clasificación de TH de la lesión isquémica cerebral).

A pesar de los numerosos factores mencionados, la progresión del déficit neurológico sólo es parcialmente predecible en base a datos clínicos, de laboratorio o de neuroimagen, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos implicados. En efecto, aproximadamente una tercera parte de los pacientes con DNP no presentan aumento del tamaño del infarto cerebral en pruebas de neuroimagen seriadas, lo que sugiere que además del edema cerebral, probablemente otros mecanismos participan en la aparición de deterioro neurológico de pacientes con isquemia cerebral.

### **1.3. Inflamación e isquemia cerebral**

En la actualidad se acepta que la isquemia cerebral es un proceso dinámico que comporta la muerte neuronal progresiva en la denominada zona de penumbra isquémica.<sup>14</sup> La zona de penumbra isquémica rodea a la zona de necrosis o zona lesionada irreversiblemente por la isquemia cerebral, y se caracteriza porque aunque en ella el flujo cerebral está disminuido, es todavía una zona funcional y no lesionada de forma irreversible. La expansión progresiva de la zona de necrosis por reclutamiento de la zona de penumbra depende de varios factores entre los que se incluye la disminución del flujo sanguíneo cerebral. En modelos experimentales se ha observado que cuando la reducción focal del flujo cerebral es prolongada, y el flujo colateral insuficiente para mantener un metabolismo neuronal adecuado en la periferia

de la zona central de isquemia, aparece un aumento en la demanda metabólica en la zona circundante que, al no poder incrementar la perfusión, evoluciona hacia la necrosis. Por este mecanismo, el volumen del área de penumbra isquémica, que se ha estimado en el 50% de la lesión isquémica inicial, disminuye en la medida en que la zona central de necrosis se expande para ocupar un mayor porcentaje de la lesión isquémica total.<sup>15</sup> Este concepto de expansión del infarto hacia la zona de penumbra se ha demostrado también en el ictus isquémico en humanos. Mediante tomografía por emisión de positrones (PET) se ha observado que en las primeras horas desde el inicio del ictus existen amplias zonas de tejido cerebral metabólicamente activo pero con características de penumbra isquémica (flujo cerebral disminuido y fracción de extracción de oxígeno aumentada) que finalmente quedan incluidas dentro del área de infarto demostrada por TC cerebral, lo que confirma que algunos pacientes presentan zonas de tejido isquémico viable que evolucionan hacia la necrosis.<sup>16</sup> Sin embargo, la magnitud de la disminución del flujo sanguíneo cerebral en la zona de penumbra no distingue qué región evolucionará hacia el infarto y qué región escapará de la necrosis, por lo que la disminución sostenida del flujo sanguíneo cerebral en la penumbra isquémica no explica la progresión de la necrosis por sí misma y plantea la posibilidad de otros factores implicados.

En los últimos años, numerosos estudios clínicos y experimentales han demostrado la participación de los mecanismos bioquímicos en la fisiopatología de la isquemia cerebral y particularmente en el DNP de pacientes con isquemia cerebral. La consecuencia inicial de la isquemia a nivel cerebral es una disminución del aporte energético neuronal que origina una despolarización de

las membranas celulares y alteraciones en la permeabilidad celular con acúmulo intracelular de  $[Na^+]$ ,  $[Ca^{2+}]$  y  $[Cl^-]$ , y extracelular de  $[K^+]$ , así como la liberación masiva de glutamato y de otros aminoácidos excitadores. Se ha demostrado que la liberación de glutamato secundaria a la isquemia se debe, en gran parte, a la inversión de los transportadores neuronales de ácido glutámico secundaria al propio fallo energético asociado a la isquemia.<sup>17</sup> Los transportadores de ácido glutámico tanto a nivel glial (EAAT1 y EAAT2) como a nivel neuronal (EAAT3, EAAT4 y EAAT5) cotransportan  $Na^+$  y  $H^+$  con ácido glutámico por  $K^+$  y básicamente, a través de mecanismos ATP dependientes, recaptan glutamato hacia el interior de la célula. Como consecuencia de la caída de ATP secundaria a la isquemia los transportadores de ácido glutámico se invierten y, en consecuencia, se produce un aumento de la concentración extracelular de glutamato. De forma secundaria al aumento de glutamato así como al propio aumento intracelular de  $[Ca^{2+}]$  se produce, por un lado, una liberación masiva de aminoácidos excitadores (fundamentalmente glutamato) que a su vez desencadena una serie de fenómenos celulares que contribuyen a la expansión de la lesión neuronal, y en consecuencia al empeoramiento neurológico, y que incluyen la formación de radicales libres, la síntesis de óxido nítrico y la apoptosis o muerte celular retardada.<sup>14,15,18,19,20,21,22</sup> Por otro lado, el aumento de la concentración intracelular de  $[Ca^{2+}]$  también desencadena la puesta en marcha de la denominada cascada inflamatoria de la isquemia cerebral, que se inicia con la expresión local de citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  y la interleukina (IL)-1 $\beta$ , que a su vez estimulan la liberación de otras citocinas (IL-6 e IL-8) así como de factores quimiotácticos y de moléculas de adhesión leucocitarias como las selectinas

(P-selectina, E-selectina y L-selectina), la molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1, la molécula de adhesión celular vascular (VCAM)-1 y la molécula de adhesión celular plaquetaria endotelial (PECAM).<sup>23</sup> La liberación de estas moléculas promueve el reclutamiento y la migración de leucocitos polimorfonucleares (LPMN) hacia la zona isquémica. Aunque los datos en humanos son escasos, mediante técnicas de marcaje isotópico de leucocitos se ha demostrado un elevado número de estas células en zonas cerebrales hipoperfundidas, entre 6-12 horas después del episodio ictal.<sup>24</sup> Asimismo, se ha demostrado la existencia de un aumento del número de leucocitos en el líquido cefalorraquídeo (LCR) en pacientes con ictus isquémico, entre el segundo y tercer día de evolución,<sup>25</sup> y estudios autopsícos han comprobado el acúmulo leucocitario existente en el parénquima cerebral tras el ictus isquémico.<sup>26</sup> Aunque durante mucho tiempo se creyó que los leucocitos ejercían una función de limpieza del tejido necrótico infartado en fases tardías de la isquemia cerebral, en el momento actual se considera que desempeñan un papel fundamental en la lesión neuronal secundaria a la isquemia y en la posible extensión del área de infarto. De hecho, en modelos experimentales de isquemia cerebral se ha demostrado que los LPMN se encuentran ya en los microvasos cerebrales a los 30 minutos de evolución de la isquemia.<sup>27</sup> Existen diferentes mecanismos a través de los cuales los LPMN pueden ejercer su efecto deletéreo en la isquemia cerebral. En primer lugar, los LPMN pueden obstruir la microvasculatura cerebral originando lo que se conoce como “fenómeno de no reflujo” o imposibilidad para la recuperación completa del flujo sanguíneo cerebral en el área isquémica tras la recanalización del trombo fibrinoplaquetar<sup>28</sup> que se produciría fundamentalmente como consecuencia de



la interacción de los LPMN con las células endoteliales mediada por moléculas de adhesión leucocitaria.<sup>29</sup> Por otro lado, los leucocitos pueden estimular la liberación de sustancias vasoconstrictoras con alteración secundaria de la vasoreactividad cerebral,<sup>30</sup> así como de enzimas proteolíticos citotóxicos que pueden dañar el endotelio vascular facilitando el paso de agua y eritrocitos, lo que puede contribuir a la aparición de edema cerebral y TH del infarto cerebral, respectivamente.<sup>31,32</sup>

Numerosos trabajos han puesto de manifiesto la participación de diferentes moléculas inflamatorias y de adhesión leucocitaria en la isquemia cerebral aguda y, particularmente en el deterioro neurológico secundario al fenómeno isquémico. Se mencionan a continuación aquellas con implicación más relevante en la fisiopatología isquémica cerebral.

### ***IL-1 $\beta$ y TNF- $\alpha$***

En modelos de isquemia experimental se ha demostrado un incremento en la síntesis de RNA mensajero de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  que se evidencia ya a la hora de evolución de la isquemia, alcanza el pico máximo a las 12 horas, y posteriormente disminuye en las siguientes 12 a 48 horas de evolución.<sup>33,34</sup>

Además, la administración intraventricular tanto de TNF- $\alpha$ <sup>35</sup> como de IL-1 $\beta$ <sup>36</sup> produce un incremento en el tamaño del infarto, efecto que se bloquea mediante la administración de antagonistas de los mismos (anticuerpo monoclonal anti-TNF- $\alpha$  y receptor soluble de TNF- $\alpha$ ,<sup>35</sup> y antagonista del receptor de IL-1, respectivamente).<sup>37</sup>

En estudios clínicos se ha demostrado además la existencia de niveles plasmáticos significativamente mayores de TNF- $\alpha$  en pacientes con ictus

isquémico comparados con los niveles detectados en controles sanos.<sup>38,39</sup> No se han podido analizar, sin embargo, los niveles de IL-1 en sangre periférica de pacientes con ictus, debido probablemente a los bajos niveles plasmáticos de esta molécula.<sup>40</sup>

### ***IL-6***

La IL-6 es una molécula pleiotrópica que posee efectos tanto proinflamatorios<sup>41,42</sup> como antiinflamatorios.<sup>43</sup> La expresión de IL-6 aumenta de forma secundaria a la de TNF- $\alpha$  por lo que se cree que el aumento de esta molécula podría ejercer un feedback negativo sobre la respuesta inflamatoria. En modelos experimentales de isquemia cerebral se ha demostrado un aumento de su expresión que aparece a las 3 horas y persiste hasta 96 horas post-isquemia.<sup>44</sup> Datos clínicos demuestran que los niveles plasmáticos de IL-6 son significativamente mayores en pacientes con ictus isquémico agudo que en controles sanos.<sup>40,45</sup> Además, los niveles plasmáticos y en LCR de pacientes con ictus isquémico se correlacionan con el volumen de infarto<sup>46,47</sup> y el peor pronóstico funcional de los pacientes,<sup>40</sup> aunque no se sabe si este efecto simplemente es debido al mayor volumen de infarto o realmente refleja el efecto nocivo de los niveles más elevados de IL-6.

### ***Moléculas de adhesión leucocitaria***

La ICAM-1 se expresa de forma constitutiva en las células endoteliales y aumenta en respuesta al estímulo ejercido por las citocinas proinflamatorias<sup>48</sup> de forma paralela a la migración leucocitaria.<sup>49</sup> En modelos de isquemia experimental se ha demostrado un aumento de la expresión de ICAM-1 a nivel de la microvasculatura cerebral que se produce ya a la hora de evolución de la

isquemia y persiste durante varios días.<sup>50,51</sup> En un modelo de cultivo de células endoteliales de microvasculatura cerebral humana se ha demostrado también el aumento de la expresión del RNA mensajero de la ICAM-1 en respuesta a la hipoxia-reperfusión y que no se produce si sólo existe hipoxia sin perfusión, lo que sugiere que la perfusión es esencial para el incremento del nivel de moléculas de adhesión leucocitaria post-isquemia.<sup>52</sup> Datos clínicos también han demostrado niveles elevados de moléculas de adhesión leucocitaria en pacientes con ictus isquémico.<sup>53,54,55,56</sup>

#### **1.4. Inflamación y deterioro neurológico asociado a la isquemia cerebral**

El deterioro neurológico durante las horas iniciales de evolución independientemente del mecanismo de producción del fenómeno ictal se asocia a un incremento de la mortalidad y de la discapacidad funcional a largo plazo.<sup>2,8</sup> En este punto conviene aclarar el ictus isquémico puede ser de mecanismo aterotrombótico, cardioembólico, lacunar e indeterminado (ver Anexo 3 para criterios de clasificación según el *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment –TOAST-*).<sup>57</sup> Aunque son numerosos los factores que pueden estar implicados en el deterioro neurológico de pacientes con isquemia cerebral (ver apartado Factores predictores de deterioro neurológico) no se conocen todavía con exactitud los mecanismos implicados en esta complicación de la isquemia cerebral ni si podrían existir diferentes factores implicados en función del mecanismo ictal. No obstante, como se ha mencionado en el apartado anterior, la investigación llevada a cabo en los últimos años ha puesto de manifiesto la participación de las moléculas inflamatorias en la fisiopatología de la isquemia cerebral y más recientemente se han obtenido datos acerca de la

participación de la inflamación en el ictus progresivo. Así, Vila et al.<sup>58</sup> han demostrado que los niveles de TNF- $\alpha$  son significativamente mayores en los pacientes que sufren deterioro neurológico, y lo que es más importante, que niveles de IL-6 > 21.5 pg/mL en plasma y > 6.3 pg/mL en LCR de pacientes con ictus isquémico en las primeras 24 horas de evolución de los síntomas, son predictores de DNP, independientemente del tamaño de la lesión isquémica, su localización o el mecanismo ictal. A pesar de estos datos, el limitado número de pacientes incluido en cada subgrupo de pacientes considerado en función del mecanismo ictal y, especialmente en el subgrupo de pacientes con infarto lacunar cuyo tamaño y fisiopatología son diferentes al resto de subgrupos considerados en función de la clasificación TOAST, planteaba la duda acerca de si los mecanismos inflamatorios mencionados participaban de igual manera en la progresión neurológica en función del mecanismo ictal implicado. Por este motivo, como investigación inicial de la presente Tesis Doctoral se analizó la participación de determinadas moléculas inflamatorias en el DNP y el pronóstico de pacientes con infarto lacunar. Este trabajo completaba una investigación iniciada con anterioridad acerca de la participación de los mecanismos bioquímicos en la progresión de los pacientes con infarto lacunar, como resultado de la cual se había demostrado que los mecanismos excitotóxicos a través de sus mediadores fundamentales, glutamato y GABA, participaban en el DNP de estos pacientes de forma similar a lo que ocurría en la isquemia de otros mecanismos.<sup>59</sup>

## **2. Transformación hemorrágica del infarto cerebral**

### **2.1. Concepto y clasificación**

La TH del infarto cerebral, o aparición de componente hemático en el área isquémica, constituye en el momento actual uno de los principales puntos de interés dentro de la investigación de la patología vascular isquémica cerebral debido fundamentalmente a que es la complicación principal y más temida de la administración de terapia fibrinolítica,<sup>60,61</sup> única terapia eficaz y aceptada en el momento actual como tratamiento en las 3 primeras horas de evolución del infarto cerebral.<sup>61</sup>

La TH aparece hasta en un 43% de pacientes con infarto cerebral del territorio carotídeo<sup>11</sup> y su efecto sobre el pronóstico funcional del paciente depende fundamentalmente del volumen de sangre acumulado en el interior de la lesión isquémica, en función del cual y en base a criterios radiológicos en la TC craneal se distinguen los siguientes tipos de sangrado:<sup>62</sup>

**Infarto hemorrágico tipo 1** (IH-1): pequeñas petequias localizadas en los márgenes del infarto.

**Infarto hemorrágico tipo 2** (IH-2): petequias más confluentes dentro del área de infarto pero sin efecto masa acompañante.

**Hemorragia intraparenquimatosa tipo 1** (HP-1): hematoma que ocupa un tamaño  $\leq 30\%$  del área infartada con leve efecto de masa acompañante.

**Hemorragia intraparenquimatosa tipo 2** (HP-2): hematoma que ocupa un tamaño  $> 30\%$  del área infartada y se acompaña de efecto de masa importante, o cualquier lesión hemorrágica que aparece fuera del territorio infartado.

En base a datos obtenidos en autopsias, Fisher y Adams<sup>63</sup> sugirieron que la TH del infarto cerebral se producía como consecuencia de la fragmentación del trombo o émbolo que ocluía la arteria, y la reperfusión secundaria del tejido isquémico. Si bien, la restauración de la llegada de flujo sanguíneo pudiera presuponerse en principio como un fenómeno favorable, en la actualidad se sabe que la reperfusión del tejido isquémico puede llevar implícitos efectos nocivos debidos, entre otros fenómenos, a la posibilidad de aparición de una lesión hemorrágica dentro de la lesión isquémica. El efecto nocivo potencial de la reperfusión que sigue a la isquemia cerebral parece depender en gran medida del tiempo de duración de la oclusión arterial, que también influye de manera notable en el tipo de TH que puede aparecer como complicación asociada a la reperfusión. En efecto, experimentalmente se ha demostrado que los microvasos cerebrales se dilatan y rompen de manera progresiva en función de la duración de la oclusión arterial.<sup>64</sup> De acuerdo con este hecho, en estudios clínicos llevados a cabo más recientemente se ha demostrado que la aparición de IH se asocia con la reperfusión precoz de la arteria ocluida así como con un menor volumen de infarto y mejor pronóstico funcional en pacientes que recibieron terapia fibrinolítica con factor recombinante activador del plasminógeno tisular (rt-PA), mientras que la aparición de HP se asoció con la reperfusión tardía, volúmenes de infarto mayores y peor pronóstico funcional.<sup>65</sup> La importancia del volumen de sangrado en el pronóstico de los pacientes se ha observado también en estudios clínicos que parecen demostrar que sólo la aparición de HP-2 en pacientes que recibieron terapia fibrinolítica se asocia con la aparición de deterioro neurológico.<sup>13</sup>

Los factores participantes en la aparición de TH de los infartos cerebrales no se conocen con exactitud, y la reapertura de la arteria ocluida no parece explicar en todos los casos la aparición de esta complicación de la isquemia cerebral ya que el sangrado en el interior de la lesión isquémica puede aparecer también en aquellos casos en que no se produce la reperfusión arterial. En efecto, experimentalmente se ha demostrado que un porcentaje elevado de animales en los que la arteria cerebral se mantiene ocluida presentan también TH.<sup>66</sup> En autopsias llevadas a cabo en pacientes en los que se visualizaba todavía la oclusión arterial durante la realización de la autopsia, se han evidenciado también sangrados de en la zona isquémica a pesar de la persistencia de la oclusión.<sup>67</sup>

## **2.2. Factores asociados a la aparición de transformación hemorrágica**

Aunque la TH puede aparecer como parte de la evolución natural de la lesión isquémica cerebral,<sup>11</sup> determinados factores pueden incrementar de forma significativa la posibilidad de su aparición. Entre ellos, los más importantes son la administración de tratamiento anticoagulante y, fundamentalmente, como ya se ha mencionado anteriormente, la administración de tratamiento fibrinolítico, tanto por vía intraarterial<sup>68,69</sup> como intravenosa.<sup>60,61</sup> En efecto, un 6.4% de los pacientes que recibieron rt-PA en el estudio NINDS (*National Institute of Neurological Disorders and Stroke*),<sup>61</sup> y un 7% de los que recibieron el fármaco en el estudio ECASS II (*European Cooperative Acute Stroke Study II*)<sup>60</sup> presentaron hemorragias intracraneales sintomáticas, es decir, acompañadas de deterioro neurológico, porcentajes significativamente mayores al de aparición de esta complicación en el grupo de pacientes que no recibió el

fármaco activo. La aparición de esta complicación empeoró de forma notable el pronóstico de los pacientes de forma que la mitad de los pacientes que presentaron TH en el estudio NINDS fallecieron. La gravedad del déficit neurológico en el momento del ingreso hospitalario del paciente,<sup>61,70</sup> la edad,<sup>70</sup> las cifras tensionales elevadas,<sup>71</sup> la dosis del trombolítico administrado,<sup>71,72,73</sup> la hiperglucemia,<sup>74,75</sup> o la presencia de signos precoces de infarto<sup>59,68</sup> como el edema cerebral (definido con la existencia de hipodensidad en la TC craneal realizada en el momento del ingreso hospitalario) o la existencia de efecto masa en la TC inicial, son factores que se incrementan el riesgo de TH en pacientes que reciben terapia fibrinolítica.

A pesar de los numerosos factores mencionados, no se conocen con exactitud los mecanismos relacionados con la aparición de la TH. Dado que, como se ha mencionado anteriormente, la terapia fibrinolítica con rt-PA es la única terapia efectiva en el tratamiento de la isquemia cerebral cuya administración está aprobada en las primeras 3 horas de evolución de la isquemia, la investigación sobre los posibles mecanismos relacionados con la aparición de la TH es en la actualidad de crucial importancia.

### **2.3. Mecanismos moleculares y transformación hemorrágica del infarto cerebral**

La aparición de sangre extravasada sobre la lesión isquémica cerebral es el resultado de la pérdida de la integridad de la microvasculatura cerebral. En efecto, experimentalmente se ha demostrado que la isquemia cerebral origina una pérdida de los antígenos de los componentes de la membrana basal del



endotelio vascular (laminina, colágeno tipo IV, heparán sulfato y fibronectina)<sup>31</sup> y que este efecto se relaciona con la aparición de TH de la lesión isquémica.<sup>32</sup> La pérdida de integridad de la microvasculatura cerebral parece estar relacionada, al menos en parte, con la acción sobre dicha microvasculatura de las denominadas metaloproteasas de matriz (MMP), grupo de enzimas proteolíticas dependientes del zinc capaces de degradar la membrana basal de los microvasos cerebrales.<sup>76</sup> Datos clínicos<sup>77,78,79</sup> y experimentales<sup>80,81,82,83,84</sup> demuestran que la expresión de las MMPs aumenta en respuesta a la isquemia cerebral. Asimismo, se ha demostrado la participación de MMPs, fundamentalmente MMP-2 y MMP-9, en la TH asociada a la isquemia cerebral. En modelos experimentales de isquemia cerebral se ha demostrado que la inyección intraventricular de MMP-2 produce disrupción de la membrana basal endotelial y secundariamente, necrosis y hemorragia de la región cerebral isquémica, efecto que se reduce mediante la administración de un inhibidor de MMP-2.<sup>85</sup> Asimismo, se ha demostrado un incremento en la expresión de MMP-9 que se produce en fases muy tempranas de la isquemia cerebral en los ganglios basales de primates que presentan TH.<sup>80</sup> Además, la administración de inhibidores de las MMPs redujo la incidencia y también la gravedad de las lesiones hemorrágicas secundarias a la administración de rt-PA en un modelo experimental de ictus isquémico tromboembólico, sin modificar el porcentaje de lesiones hemorrágicas aparecidas en animales a los que no se administró el tratamiento fibrinolítico,<sup>86</sup> lo que sugiere el incremento en la expresión de las MMPs secundario a la isquemia puede ser responsable, al menos en parte, de la aparición de TH asociadas a la administración de rt-PA. Clínicamente se ha demostrado la relación existente entre niveles elevados de MMP-9 y la

aparición de TH en pacientes con isquemia cerebral de origen cardioembólico,<sup>79</sup> y más recientemente, se ha publicado la relación existente entre niveles elevados de MMP-9 y la aparición de TH en pacientes con ictus de origen no lacunar que recibieron tratamiento fibrinolítico.<sup>87</sup> Sin embargo, dado que los datos de que se dispone demuestran la eficacia del tratamiento fibrinolítico con rt-PA no sólo en pacientes con ictus de origen cardioembólico o no lacunar, sino en todos los grupos de ictus isquémico independientemente de su mecanismo etiológico, se planteaba la cuestión acerca de la posible relación entre los niveles de MMP-9 y la posibilidad de desarrollo de TH en pacientes con ictus de mecanismo no cardioembólico. El análisis de esta relación constituyó la base de la investigación inicial realizada en la segunda fase de la presente Tesis Doctoral.

Por otro lado, dado que el mecanismo por el cual se produce la extravasación de componente hemático hacia el foco isquémico es la desaparición de los componentes de la membrana basal endotelial que permite el paso de los hematíes hacia la zona de isquemia, la investigación sobre dichos componentes permitirá probablemente conocer con mayor profundidad los mecanismos biológicos implicados en la TH de pacientes con isquemia cerebral. Experimentalmente se ha demostrado que la administración de péptidos derivados de laminina<sup>88</sup> y del péptido V de la fibronectina<sup>89</sup> disminuye de forma significativa el tamaño del infarto cerebral, en ambos casos a través de una disminución del acúmulo leucocitario en el foco isquémico. La fibronectina es una proteína dimérica de elevado peso molecular y características fundamentalmente adhesivas ya que es responsable de la unión entre diferentes tipos celulares así como entre células y matrices

extracelulares. Esta molécula se encuentra localizada en el plasma y a nivel del tejido conectivo y las matrices extracelulares.<sup>90</sup> La fibronectina localizada en el plasma es producida fundamentalmente por los hepatocitos y se conoce como fibronectina plasmática. Además el plasma también contiene pequeñas cantidades de fibronectina diferente a la plasmática desde el punto de vista estructural (contiene el denominado dominio ED1 que no contiene la fibronectina sintetizada por hepatocitos) que se localiza fundamentalmente a nivel del endotelio de los vasos sanguíneos y en las plaquetas y que se conoce como fibronectina celular (Fn-c).<sup>91</sup> Dada esta localización predominante a nivel endotelial, los niveles de Fn-c en plasma pueden ser indicativos del estado del endotelio. En efecto, en estudios clínicos se ha demostrado que los niveles plasmáticos de esta molécula son significativamente mayores en pacientes con procesos que cursan con alteración del endotelio vascular, tales como vasculitis, sepsis, traumatismos graves, diabetes mellitus y también en pacientes con ictus isquémico, comparados con el nivel plasmático en controles sanos.<sup>92,93</sup> Por otro lado, y debido a sus propiedades adhesivas comentadas anteriormente, la fibronectina media la adhesión de las plaquetas a la fibrina, por lo que ejerce un papel fundamental en la formación del coágulo de fibrina que actúa como mecanismo limitante del sangrado.<sup>90</sup> Por ello y por su localización a nivel del endotelio, la Fn-c podría ser un marcador de daño endotelial y de TH secundaria. Dada la importancia del hallazgo de marcadores predictores de aparición de TH asociada a isquemia cerebral especialmente en pacientes que reciben tratamiento fibrinolítico, en la segunda fase de esta Tesis Doctoral se investigó la posible relación entre niveles elevados de esta molécula y el desarrollo de sangrado secundario asociado a la isquemia en

pacientes que recibieron tratamiento fibrinolítico con rt-PA independientemente del mecanismo ictal.

## **II. Objetivo del estudio**

---

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es investigar la participación de mecanismos bioquímicos estudiados a través de la determinación en sangre de los niveles de determinadas moléculas en el DNP y en la TH como complicaciones evolutivas de la isquemia cerebral. Se desglosan a continuación los objetivos específicos en cada una de las investigaciones llevadas a cabo.

**Investigación I:**

**Mecanismos inflamatorios y deterioro neurológico asociado a la isquemia cerebral**

**Participación de los mecanismos inflamatorios en la progresión del infarto lacunar**

1. Analizar los niveles de moléculas inflamatorias previamente relacionadas con el DNP del infarto cerebral (TNF- $\alpha$ , IL-6 e ICAM-1) en pacientes con infarto lacunar evaluado en fase aguda.
2. Establecer puntos de corte de los niveles de moléculas inflamatorias analizadas como predictores de DNP en este grupo de pacientes.
3. Determinar si existe relación entre los niveles de las moléculas inflamatorias analizadas y el pronóstico funcional.
4. Establecer la capacidad predictiva de DNP de las moléculas inflamatorias en comparación con la de moléculas neurotransmisoras previamente relacionadas con esta complicación.

**Investigación II:**

**Mecanismos moleculares y transformación hemorrágica de la lesión  
isquémica cerebral**

**Fase I: Participación de enzimas proteolíticas que actúan sobre el  
endotelio vascular en la transformación hemorrágica del infarto cerebral**

1. Analizar los niveles de MMP-9 en pacientes con TH del infarto cerebral evaluado en fase aguda.
2. Analizar los niveles de MMP-9 en cada uno de los subtipos de TH del infarto cerebral.
3. Establecer puntos de corte de los niveles de MMP-9 como predictores de TH del infarto cerebral.

**Fase II: Participación de enzimas proteolíticas que actúan sobre el  
endotelio vascular y moléculas endoteliales en la transformación  
hemorrágica del infarto cerebral en pacientes que reciben tratamiento  
fibrinolítico**

1. Analizar los niveles de MMP-9 y Fn-c en pacientes tratados con rt-PA y que presentaron TH del infarto cerebral.
2. Analizar los niveles de MMP-9 y Fn-c en cada uno de los subtipos de TH del infarto cerebral.
4. Establecer puntos de corte de los niveles de Fn-c como predictores de TH del infarto cerebral.
3. Comparar la capacidad predictiva de los niveles de Fn-c y MMP-9 para los subtipos de TH de mayor volumen y relevancia clínica (IH-2 y HP).

### **III. Material y método**

---



Dado que la presente Tesis Doctoral tiene por objeto el estudio de la participación de mecanismos bioquímicos en complicaciones neurológicas de la isquemia cerebral de diferente naturaleza (DNP y TH), el trabajo se ha desarrollado en grupos de pacientes diferentes en función del objetivo específico de cada investigación.

El desarrollo del proyecto y las publicaciones resultado de cada investigación se especifican a continuación:

### **Investigación I.**

*Inflammation-Mediated Damage in Progressing Lacunar Infarctions. A Potential Therapeutic Target. **Stroke** 2002;33:982-987*

### **Investigación II: Fase I**

*Plasma Metalloproteinase-9 Concentration Predicts Hemorrhagic Transformation in Acute Ischemic Stroke. **Stroke** 2003;34:40-46*

### **Investigación II: Fase II**

*Plasma Cellular-Fibronectin Concentration Predicts Hemorrhagic Transformation After Thrombolytic Therapy in Acute Ischemic Stroke. **Stroke** 2004 (en prensa)*

Cada uno de los trabajos fue aprobado por los comités éticos de los hospitales participantes (Hospital Universitari Doctor Josep Trueta de Girona y Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela) y se obtuvo consentimiento de los controles sanos y de los pacientes (en caso de incapacidad de los

mismos el consentimiento se obtuvo de los representantes legales) para la participación en el mismo.

Como parte del protocolo de estudio general de los pacientes con ictus isquémico ingresados en los hospitales mencionados, en todos los pacientes incluidos se llevó a cabo el siguiente protocolo diagnóstico común:

- Historia clínica, incluyendo factores precipitantes potenciales de ictus así como factores de riesgo vascular
- Exploración física
- VSG, hemograma, bioquímica y coagulación.
- Electrocardiograma de 12 derivaciones
- TC cerebral sin contraste
- Eco-Doppler color de troncos supraaórticos
- Doppler transcraneal
- Obtención de 4 alicuotas con muestra de plasma que se almacenaron a -80°C

Se especifican a continuación con mayor detalle algunos puntos diferenciales del protocolo de actuación seguido en función de la investigación realizada.

### **Población de estudio**

#### **Investigación I**

Se incluyeron en el estudio de forma prospectiva un total de 113 pacientes con ictus lacunar dentro de las primeras 24 horas de evolución de la sintomatología que habían ingresado en dos hospitales universitarios (Hospital Doctor Josep

Trueta de Girona y Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela) entre Octubre 1997 y Diciembre 1999.

El ictus lacunar se definió en base a criterios clínicos y radiológicos, de modo que los pacientes incluidos en el estudio habían presentado sintomatología clínica compatible con uno de los cinco síndromes lacunares (síndrome motor puro, síndrome sensitivo puro, síndrome sensitivo-motor, hemiparesia-ataxia y disartria-mano torpe)<sup>94</sup> con una persistencia de los síntomas > 24 horas y con una prueba diagnóstica de neuroimagen (TC cerebral o resonancia magnética nuclear -RMN- cerebral) sin alteraciones o con evidencia de lesión isquémica de localización profunda cerebral y con un tamaño  $\leq 15$  mm (ver protocolo de neuroimagen).

Con el objetivo de comparar los niveles de moléculas inflamatorias con los valores de referencia en la población normal, en el estudio se incluyeron además 43 sujetos sanos sin historia previa ni evidencia de enfermedad neurológica o inflamatoria.

## **Investigación II**

### **Fase I.**

Se incluyeron en este estudio 250 pacientes con ictus hemisférico cerebral en las primeras 24 horas de evolución de la sintomatología, ingresados de forma consecutiva en los hospitales universitarios Doctor Josep Trueta de Girona y Clínico de Santiago de Compostela entre Marzo de 1999 y Febrero de 2000. El estudio también incluyó 34 controles sanos sin historia previa de enfermedad inflamatoria y/o neurológica.

## **Fase II**

En la última fase de la investigación que constituye la presente Tesis Doctoral se incluyeron 87 pacientes ingresados de forma consecutiva en los dos hospitales mencionados en la Investigación I y la fase inicial de la Investigación II que recibieron tratamiento fibrinolítico con rt-PA de acuerdo a los criterios del estudio ECASS II en función de los cuales el fármaco se administró en las 6 primeras horas de evolución de la sintomatología. Se incluyeron además en esta fase 30 controles sanos sin historia de enfermedad inflamatoria y/o neurológica previa y 100 pacientes con ictus isquémico que no habían recibido tratamiento trombolítico. Se presentan además los resultados del análisis de las moléculas en 36 pacientes con ictus isquémico que no recibieron tratamiento trombolítico y que presentaron TH del infarto cerebral y que no fueron introducidos en la publicación.

## **Protocolo de examen neurológico**

A todos los pacientes se les realizó un examen neurológico inicial en el momento del ingreso hospitalario, en función del cual se cuantificó de forma objetiva el déficit neurológico existente en el momento del ingreso mediante la utilización de escalas neurológicas. En la investigación I el examen se llevó a cabo utilizando la EC que había sido ya utilizada y validada en estudios previos que evaluaban el deterioro neurológico y los factores relacionados. Posteriormente, la publicación de los resultados de los ensayos clínicos que evaluaban la eficacia del tratamiento trombolítico y en los que la escala neurológica utilizada fue la NIHSS, incrementó la generalización de uso de esta escala, motivo por el cual se decidió su utilización en la Investigación II.

La EC evalúa el nivel de conciencia, el lenguaje, la orientación, la paresia facial y el déficit motor existente en brazo y pierna del paciente (ver Anexo 1).

La NIHSS es una escala más amplia que evalúa, además de los puntos mencionados en el caso de la EC, la motilidad ocular, la existencia de déficit visual, el déficit sensitivo, la coordinación de las extremidades y la existencia de alteraciones corticales como la anosognosia o la asomatognosia, que no son evaluadas en la EC (ver Anexo 2)

### **Investigación I**

La exploración neurológica se llevó a cabo en el momento del ingreso y se repitió a las 48 horas. Se definió la existencia de DNP como la disminución  $\geq 1$  punto de la EC (de acuerdo con los criterios de definición de ictus lacunar, la disminución de la puntuación suponía sólo una variación en el déficit motor existente al ingreso).

### **Investigación II**

#### **Fase I**

La exploración neurológica se llevó a cabo en el momento del ingreso y a las 72 horas de evolución de los síntomas. Se definió la existencia de DNP como el incremento  $\geq 4$  puntos de la NIHSS entre ambas exploraciones.

#### **Fase II**

La exploración neurológica se llevó a cabo en el momento del ingreso y a las 24-36 horas de evolución de los síntomas, momento en que se realizaba la segunda TC craneal (ver protocolo de neuroimagen) y por tanto en caso de existir deterioro neurológico se conocía si podía estar o no relacionado con la posible existencia de TH. Del mismo modo que la Fase I, se definió la

existencia de DNP como el incremento  $\geq 4$  puntos de la NIHSS entre ambas exploraciones.

### **Protocolo de neuroimagen**

#### **Investigación I**

El estudio incluyó la realización de TC craneal en el momento del ingreso hospitalario junto con la realización de una segunda prueba de neuroimagen (TC cerebral o RMN cerebral) que se llevó a cabo entre el 4º y 7º día de evolución de la sintomatología con el objetivo de visualizar la lesión isquémica. La topografía de la lesión se determinó en el segundo examen radiológico y se clasificó en función de las siguientes localizaciones profundas: cápsula interna, corona radiata, centro semioval, núcleo putamen y globo pálido, tálamo, bulbo, protuberancia y mesencéfalo. Como se ha mencionado anteriormente, y de acuerdo al criterio de definición de ictus lacunar, el diámetro de la lesión lacunar fue siempre  $\leq 15$  mm.

#### **Investigación II**

Se realizó TC cerebral a todos los pacientes incluidos en el estudio en el momento del ingreso hospitalario con el objetivo de confirmar el diagnóstico de ictus isquémico, descartar la existencia de lesiones hemorrágicas y evaluar la existencia de signos precoces de infarto (hiperdensidad de la arteria cerebral media, hipodensidad focal de localización compatible con el cuadro clínico, oscurecimiento del núcleo lenticular, oscurecimiento del córtex cerebral, efecto de masa con borramiento de surcos corticales y/o desplazamiento de estructuras de línea media).

Con el objetivo de evaluar el volumen de la lesión isquémica así como la presencia y el tipo de TH, se realizó una segunda TC craneal que en la Fase I de esta investigación se llevó a cabo entre los días 4º y 7º de evolución, y en la Fase II, y según lo establecido en pacientes que reciben tratamiento fibrinolítico, se llevó a cabo entre 24 y 36 horas después de la administración de dicho tratamiento. El volumen de infarto se calculó mediante la fórmula  $axbxc/2$  donde “a” es el diámetro longitudinal mayor de la lesión, “b” es el diámetro mayor perpendicular a “a” y “c” es el número de cortes en los que se visualiza la lesión. El tipo de TH se clasificó de acuerdo con los criterios ECASS II en IH 1 y 2, y HP 1 y 2 (ver Introducción).

### **Valoración del pronóstico funcional**

El pronóstico funcional de los pacientes fue evaluado en la Investigación I a los 3 meses de evolución mediante la utilización del índice de Barthel. Este índice evalúa la capacidad funcional del paciente en base a determinadas actividades de la vida diaria sobre una puntuación mínima de 0 (paciente totalmente dependiente) y máxima de 100 (paciente independiente para sus actividades de la vida diaria) (ver anexo 4). Una puntuación < 85 supone un mal pronóstico funcional (este es el punto de corte en que los pacientes refieren necesitar ayuda para llevar a cabo sus actividades de la vida diaria con una sensibilidad del 85% y una especificidad > 80%).<sup>95</sup>

### **Análisis de marcadores bioquímicos**

Los niveles plasmáticos de moléculas estudiadas (IL-6, TNF- $\alpha$  e ICAM-1 en la Investigación I, MMP-9 en la Fases I y II de la Investigación II, y Fn-c en la

Fase II de la Investigación II) se analizaron en muestras obtenidas en el momento del ingreso hospitalario de los pacientes. Las muestras se recogieron en tubos de bioquímica de 3 ml que contenían EDTA (Venosafe™ VK-053SDK). Una vez realizada la extracción sanguínea, la muestra se dejaba reposar durante 10' a temperatura ambiente para la formación del botón celular y posteriormente se centrifugaba a 3000 g durante 5 minutos, obteniéndose así 1.5 ml de plasma que era alicuotado e inmediatamente congelado y almacenado a -80° hasta el momento del análisis. Los niveles plasmáticos se analizaron en todos los casos mediante la utilización de kits comerciales de ELISA (Quantikine, R&D Systems para el análisis de IL-6, TNF- $\alpha$  e ICAM-1; Biotrak, Amersham Pharmacia UK para el análisis de MMP-9; y Biotrak, Amersham Pharmacia UK y Adeza Biomedical para el análisis de Fn-c).

### **Análisis estadístico de los resultados**

El análisis estadístico se inició en todas las investigaciones realizando un análisis bivariado con el objetivo de determinar las variables relacionadas con el DNP/TH. Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$ . Para la comparación de proporciones aplicó el test  $\chi^2$ . Los valores de las variables continuas se expresaron como media  $\pm$  desviación típica y se compararon mediante el test  $t$  de Student. Dado que los niveles de las moléculas analizadas no seguían una distribución normal los valores se expresaron como mediana y cuartiles, y los test que se utilizaron para realizar la comparación fueron el test Mann-Whitney (cuando la comparación se realizaba entre 2 grupos) o el test Kruskal-Wallis (cuando la comparación se realizaba entre más de 2 grupos).



Una vez realizado el análisis bivariado y con el objetivo de conocer las variables relacionadas de forma independiente con el DNP/TH, se realizó un análisis de regresión logística en el que se introducían todas las variables significativamente relacionadas en el análisis bivariado. De esta forma el programa utilizado selecciona las variables independientemente relacionadas con los factores a estudiar, obteniéndose además la denominada odds ratio (OR) o el incremento de riesgo que cada variable significativamente relacionada supone para el factor en estudio (DNP/TH). El análisis se realizó utilizando el programa informático *SPSS 8.0*.

En el caso de las moléculas analizadas se realizó además el cálculo del punto de corte del valor plasmático de la molécula con mayor sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo (VPN) y valor predictivo positivo (VPP) para la predicción de cada complicación (DNP/TH). El cálculo se realizó utilizando el método de Robert<sup>96</sup> en función del cual a partir del valor de la media y desviación típica de cada una de las moléculas en cada grupo de estudio (DNP sí/no, TH sí/no) y de la proporción de pacientes en cada grupo de estudio (DNP sí/no, TH sí/no) se realiza un cálculo logarítmico que permite determinar el punto de corte con la máxima sensibilidad, especificidad, VPN y VPP.

## **IV. Resultados**

---

## Investigación I

*Inflammation-Mediated Damage in Progressing Lacunar Infarctions. A Potential Therapeutic Target. **Stroke** 2002;**33**:982-987*

En este estudio se analizaron las concentraciones plasmáticas de moléculas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6 e ICAM-1) en pacientes con ictus isquémico lacunar en fase aguda con el objetivo principal de determinar la posible asociación de los niveles de estas moléculas con el DNP y el pronóstico funcional de los pacientes incluidos en el estudio.

Los principales resultados de la esta investigación se resumen a continuación:

- La tablas 1 y 2 recogen los factores clínicos, radiológicos y analíticos evaluados y su relación con el DNP y el mal pronóstico funcional, respectivamente. En ellas se puede observar que los pacientes con ictus lacunar progresivo presentaban más frecuentemente historia de hipertensión arterial, un recuento leucocitario más elevado en el momento del ingreso hospitalario, y una mayor frecuencia de localización de la lesión isquémica a nivel de los ganglios basales y el tronco cerebral. Por otro lado, el tratamiento previo con aspirina resultó ser un factor protector frente al deterioro neurológico. Los pacientes con mal pronóstico presentaron mayor gravedad del déficit neurológico en el momento del ingreso hospitalario, así como cifras más elevadas de presión arterial sistólica, glucosa y temperatura corporal.

**Tabla 1.** Factores de riesgo vascular, características clínicas, mecanismo ictal y parámetros bioquímicos en pacientes con infarto lacunar con y sin deterioro neurológico precoz.

	DNP (n=26)	No DNP (n=87)	<i>p</i>
Sexo, varón	13 (48.1)	51 (59.3)	0.30
Edad, años	69.8 ± 8.7	69.6 ± 9.4	0.77
Tiempo medio inicio ictus-toma de muestra sanguínea, horas	9.1 ± 6.3	10.8 ± 7.1	0.35
<b>Factores de riesgo ictal</b>			
Hipertensión arterial	20 (74.1)	41 (47.7)	0.01
Tabaquismo	5 (18.5)	22 (25.6)	0.45
Enolismo (> 40 g/día)	5 (18.5)	22 (25.6)	0.45
Fibrilación auricular	2 (7.4)	11 (12.8)	0.73
Diabetes mellitas	8 (29.6)	27 (31.4)	0.86
Historia previa de ictus o AIT	9 (34.6)	24 (28.6)	0.55
Tratamiento previo con aspirina	0	15 (17.4)	0.03
<b>Características clínicas</b>			
Escala Canadiense al ingreso	8.0 ± 1.1	7.8 ± 1.2	0.27
Síndrome lacunar al ingreso:			0.30
• Síndrome motor puro	12 (44.4)	47 (54.7)	
• Síndrome sensitivo puro	4 (14.8)	8 (9.3)	
• Ataxia-hemiparesia	0	5 (5.8)	
• Disartria-mano torpe	0	4 (4.7)	
• Síndrome sensitivo-motor	11 (40.7)	22 (25.6)	
Etiología ictal:			0.85
• Aterotrombótico	4 (14.8)	11 (12.8)	
• Cardioembólico	4 (14.8)	19 (22.1)	
• Enfermedad de pequeño vaso	18 (66.7)	54 (62.8)	
• Indeterminado	1 (3.7)	2 (2.3)	
<b>Bioquímica y signos vitales al ingreso</b>			
Glucemia plasmática, mg/dL	165.2 ± 46.8	153.1 ± 47.1	0.25
Fibrinógeno plasmático, mg/dL	378.9 ± 77.5	406.1 ± 95.7	0.52
Hematocrito, %	37.9 ± 6.3	38.9 ± 5.9	0.46
Leucocitos, n° x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	8.9 ± 1.95	8.04 ± 1.85	0.036
Plaquetas, n° x 10 <sup>5</sup> /mm <sup>3</sup>	215 ± 67.2	201 ± 82.7	0.43
Presión arterial sistólica, mmHg	193.07 ± 27.6	176.5 ± 26.12	0.27
Presión arterial diastólica, mmHg	92.03 ± 15.68	92.2 ± 13.4	0.77
Temperatura axilar, °C	36.7 ± 0.66	36.7 ± 0.66	0.95

Las variables continuas se han expresado como media ± desviación standard. Los valores entre paréntesis son porcentajes.

DNP=Deterioro neurológico precoz

**Tabla 2.** Factores de riesgo vascular, características clínicas, mecanismo ictal y parámetros bioquímicos en pacientes con infarto lacunar en función del buen o mal pronóstico funcional

	Mal pronóstico (n=26)	Buen pronóstico (n=87)	P
Sexo, varón	12 (46.2)	52 (59.8)	0.26
Edad, años	71.5 ± 8.3	69.1 ± 9.5	0.25
Tiempo inicio ictus-obtención de muestra sanguínea, horas	11.0 ± 7.2	10.1 ± 6.8	0.56
<b>Factores de riesgo ictal</b>			
Hipertensión arterial	15 (52.7)	46 (52.9)	0.83
Tabaquismo	6 (23.1)	21 (24.1)	1.00
Enolismo (> 40 g/día)	4 (15.4)	23 (26.4)	0.30
Fibrilación auricular	6 (23.1)	7 (8.0)	0.07
Diabetes mellitas	9 (34.6)	26 (29.9)	0.64
Historia previa de ictus o AIT	8 (30.8)	25 (29.8)	1.00
Tratamiento previo con aspirina	2(7.7)	13 (14.9)	0.51
<b>Características clínicas</b>			
Escala Canadiense al ingreso	7.2 ± 1.0	8.0 ± 1.2	0.003
Síndrome lacunar al ingreso:			0.32
• Síndrome motor puro	13 (50)	46 (52.9)	
• Síndrome sensitivo puro	1 (3.8)	11 (12.6)	
• Ataxia-hemiparesia	1 (3.8)	4 (4.6)	
• Disartria-mano torpe	0	4 (4.6)	
• Síndrome sensitivo-motor	11 (42.3)	22 (25.3)	
Etiología ictal:			0.95
• Aterotrombótico	4 (15.4)	11 (12.6)	
• Cardioembólico	5 (19.2)	18 (20.7)	
• Enfermedad de pequeño vaso	16 (61.5)	56 (64.4)	
• Indeterminado	1 (3.8)	2 (2.3)	
<b>Bioquímica y signos vitales al ingreso</b>			
Glucemia plasmática, mg/dL	177.1 ± 39.2	149.7 ± 47.6	0.009
Fibrinógeno plasmático, mg/dL	413.6 ± 97.8	395.5 ± 90.6	0.41
Hematocrito, %	38.4 ± 6.1	39.2 ± 5.7	0.56
Leucocitos, n° x 10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	8.7 ± 1.98	8.14 ± 1.88	0.226
Plaquetas, n° x 10 <sup>5</sup> /mm <sup>3</sup>	204.4 ± 61.4	204.5 ± 84.13	0.99
Presión arterial sistólica, mmHg	190.62 ± 26.36	174.38 ± 25.53	0.006
Presión arterial diastólica, mmHg	95.65 ± 17.64	91.16 ± 12.30	0.145
Temperatura axilar, °C	37.03 ± 0.73	36.7 ± 0.62	0.013

Las variables continuas se han expresado como media ± desviación standard. Los valores entre paréntesis son porcentajes.

- Los niveles plasmáticos de moléculas inflamatorias (IL-6, TNF- $\alpha$  e ICAM-1) fueron significativamente más elevados en el momento del ingreso hospitalario tanto en los pacientes que presentaron DNP como en los que presentaron mal pronóstico funcional (Figura 1 de la publicación). La

mediana de los niveles de cada una de las moléculas en pacientes con y sin DNP, y con buen y mal pronóstico se muestra en la Tabla 3. Aunque los niveles de las moléculas analizadas fueron significativamente más elevadas independientemente del grado de empeoramiento neurológico, como se puede observar en la Figura 2 de la publicación, no existía una relación lineal entre el grado de deterioro y el incremento de nivel plasmático de las moléculas evaluadas sino que se observó un punto de corte en el valor plasmático de cada una de las moléculas relacionado con el deterioro neurológico.

**Tabla 3.** Mediana de las concentraciones de IL-6, TNF- $\alpha$  e ICAM-1 en función de la aparición o no de deterioro neurológico precoz, y el pronóstico a los 3 meses.

		IL-6, pg/mL	TNF- $\alpha$ , pg/mL	ICAM-1, pg/mL
<b>DNP</b>	Sí (n= 27)	28.8 [22.5,35.7]	16.5 [13.7,21.2]	285 [219,315]
	No (n= 86)	11.5 [8.5,16.2]	7.5 [6.2,8.9]	158 [137,187]
	<i>P</i>	0.000	0.000	0.000
<b>Mal pronóstico</b>	Sí (n= 26)	23.8 [15.6,30.8]	15.3 [8.05,18.8]	195 [142,280]
	No (n= 87)	12.6 [8.6,18.7]	7.8 [6.3,11.5]	163 [138,203]
	<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

DNP=Deterioro neurológico precoz. Los valores entre corchetes son cuartiles.

- Por último, el análisis de regresión logística demostró que los niveles de TNF- $\alpha$  > 14 pg/mL y de ICAM-1 > 208 pg/mL predecían de manera independiente tanto el DNP como el mal pronóstico funcional en los pacientes con infarto lacunar evaluados en fase aguda. Además, la capacidad predictiva de DNP de estas moléculas se mantuvo tras incluir en el modelo de análisis las neurotransmisoras (glutamato y GABA) (Ver Tabla 4 de la publicación). La sensibilidad, especificidad, VPP y VPN

para la predicción del DNP y del mal pronóstico funcional para los puntos de corte calculados de TNF- $\alpha$  e ICAM-1 se muestran en las Tablas 4 y 5.

**Tabla 4.** Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la capacidad predictiva de deterioro neurológico precoz del TNF- $\alpha$  e ICAM-1 en pacientes con infarto lacunar.

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
TNF- $\alpha$ > 14 pg/mL	76%	87%	63%	90%
ICAM-1 > 208 pg/mL	81%	93%	78%	94%

**Tabla 5.** Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de la capacidad predictiva de mal pronóstico del TNF- $\alpha$  e ICAM-1 en pacientes con infarto lacunar.

	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
TNF- $\alpha$ > 14 pg/mL	54%	82%	47%	86%
ICAM-1 > 208 pg/mL	46%	82%	43%	83%

## Investigación II.

### Fase I.

*Plasma Metalloproteinase-9 Concentration Predicts Hemorrhagic Transformation in Acute Ischemic Stroke. Stroke 2003;34:40-46*

En este estudio se analizaron los niveles plasmáticos de MMP-9 en fase aguda de pacientes con infarto cerebral con el objetivo principal de determinar su posible relación con la aparición de TH.

Los principales resultados de este trabajo se resumen a continuación:

- La Tabla 1 de la publicación recoge los factores demográficos, clínicos, radiológicos y analíticos así como el mecanismo ictal y los signos vitales en el momento del ingreso hospitalario en pacientes con y sin TH del

infarto. En ella puede observarse que los pacientes con ictus cardioembólicos así como aquellos que recibieron tratamiento anticoagulante presentaron TH con mayor frecuencia. Además, los pacientes con TH presentaban cifras tensionales y de temperatura corporal significativamente más elevadas que los pacientes sin TH. Por último, los pacientes con TH presentaron más frecuentemente signos precoces de infarto en la TC craneal realizada en el momento del ingreso hospitalario y el volumen final de infarto fue también significativamente mayor en este grupo de pacientes que en aquellos lesión hemorrágica.

- Los niveles de MMP-9 fueron significativamente mayores en pacientes que presentaron TH del infarto cerebral globalmente considerado que en pacientes sin TH y que en el grupo control. Los niveles de MMP-9 fueron también significativamente mayores en cada uno de los subgrupos de TH (IH 1 y 2, y HP 1 y 2) que en el grupo de pacientes sin sangrado tal y como se puede apreciar en la Figura 2 de la publicación. La mediana de los niveles de MMP-9 en cada uno de los subgrupos mencionados se especifica en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Mediana de las concentraciones de IL-6, TNF- $\alpha$  e ICAM-1 en función de la aparición o no de deterioro neurológico precoz, y el pronóstico a los 3 meses.

	No TH (n=212)	IH-1 (n=8)	IH-2 (n=16)	PH-1 (n=12)	PH-2 (n=2)
<b>MMP-9, ng/mL</b>	62 [39,93]	187 [112,213]	199 [184,215]	199 [184,215]	156 [101,211]

Los valores entre corchetes son cuartiles.



- La diferencia en los niveles de MMP-9 se mantuvo independientemente del tiempo de evolución de la isquemia, de forma que en pacientes que fueron evaluados en < 3 h (y por tanto, potenciales candidatos a recibir tratamiento fibrinolítico) los niveles de MMP-9 también fueron significativamente mayores en aquellos pacientes que posteriormente desarrollaron TH (ver Figura 1 de la publicación).
- No se observó un incremento lineal de los niveles de MMP-9 en función de la gravedad de la TH. De hecho, los niveles de MMP-9 fueron similares en pacientes que desarrollaron IH y en aquellos pacientes que desarrollaron HP.
- Los niveles de MMP-9 tampoco discriminaron entre pacientes que presentaron deterioro neurológico asociado a la TH (TH sintomática) y aquellos que no se deterioraron (TH asintomática).
- Los niveles plasmáticos de MMP-9  $\geq 140$  ng/mL fueron los que predijeron con mayor sensibilidad (87%), especificidad (90%), VPP (61%) y VPN (97%) la aparición de TH asociada al infarto cerebral, y resultaron ser predictores independientes de TH una vez realizado el análisis de regresión logística en el que también se incluyeron el resto de factores clínicos, analíticos y radiológicos relacionados con la aparición de sangrado (administración de tratamiento anticoagulante, la presión arterial sistólica y diastólica y la temperatura en el momento del ingreso hospitalario, y la presencia de signos precoces de infarto en la TC inicial).

**Fase II.**

*Plasma Cellular-Fibronectin Concentration Predicts Hemorrhagic Transformation After Thrombolytic Therapy in Acute Ischemic Stroke. **Stroke** 2004 (en prensa)*

En este estudio se analizaron los niveles plasmáticos de Fn-c en el momento del ingreso hospitalario en pacientes que recibieron tratamiento fibrinolítico con rt-PA en las primeras 6 horas de evolución de los síntomas, con el objetivo principal de investigar su posible relación con la aparición de TH en estos pacientes. Dado que en la Fase I de esta investigación los niveles de MMP-9 habían resultado ser predictores independientes de TH en pacientes con isquemia cerebral, en la presente investigación se analizaron también estos niveles y se comparó la capacidad predictiva de ambas moléculas.

Los resultados más destacados de esta investigación se resumen a continuación:

- Los niveles de Fn-c y MMP-9 determinados previamente a la administración de tratamiento fibrinolítico fueron significativamente mayores en pacientes con TH que en el grupo control sin ictus, tal y como se refleja en la publicación. La Tabla 7 recoge los niveles plasmáticos de Fn-c y MMP-9 en cada grupo de pacientes estudiado. Como se puede apreciar, los niveles de Fn-c y MMP-9 determinados previamente a la administración de tratamiento fibrinolítico fueron significativamente más elevados en los pacientes con TH que en el grupo sin TH y que en el grupo de pacientes con ictus isquémico que no

recibieron tratamiento trombolítico y que no presentaron TH del infarto. Los niveles fueron muy similares en los grupos de pacientes con TH independientemente de si recibieron o no terapia fibrinolítica. Sin embargo, en el grupo de pacientes sin TH, los niveles de Fn-c y MMP-9 fueron significativamente mayores en los pacientes que recibieron tratamiento fibrinolítico que el grupo de paciente que no recibió rt-PA. Estas diferencias podrían estar en relación con una mayor gravedad del infarto en el momento del ingreso en pacientes que no recibieron tratamiento fibrinolítico, ya que este grupo presentó un volumen final de infarto final significativamente mayor que el grupo de pacientes que sí lo recibió ( $86.1 \pm 67.1$  cc vs  $29.5 \pm 59.7$  cc, respectivamente;  $p < 0.001$ ).

**Tabla 7.** Mediana de los niveles plasmáticos de Fn-c y MMP-9 en pacientes con y sin transformación hemorrágica en función de la administración o no de tratamiento trombolítico.

		Tratamiento trombolítico		<i>P</i>
		Sí	No	
Fn-c ( $\mu\text{g/mL}$ )	TH presente	4.8 [3.4,5.8]	4.8 [3.6,5.9]	0.808
	TH ausente	1.7 [1.4,2.5]	1.4 [1.1,1.9]	0.001
	<i>P</i>	0.000	0.000	
MMP-9 (ng/mL)	TH presente	170.3 [101.4,196.2]	192.9 [165,213.2]	0.072
	TH ausente	87.2 [54.8,115.1]	62.6 [40.8,87.5]	0.001
	<i>P</i>	0.000	0.000	

Los valores entre corchetes son cuartiles.

- Los niveles de Fn-n fueron mayores cuanto mayor fue la gravedad del sangrado. Este efecto se apreció tanto en el grupo de pacientes con TH tratados dentro de las 6 primeras horas de evolución de la sintomatología (ver Figura 1A de la publicación) como en el subgrupo de

pacientes tratados en las primeras 3 horas de evolución (ver Figura 1B de la publicación). El mismo efecto se observó con los niveles plasmáticos de MMP-9 (ver Figuras 2A y 2B de la publicación), aunque como se puede observar en la figuras el efecto fue mucho más lineal con los niveles de Fn-c.

- A diferencia de lo que se observó en la investigación previa con los niveles plasmáticos de MMP-9, y aunque las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas, los niveles de Fn-c fueron más elevados en los pacientes con deterioro neurológico asociado a la TH en pacientes tratados con rt-PA. De forma similar a lo observado en la Fase I de este investigación, los niveles plasmáticos de MMP-9 no fueron diferentes en los pacientes con TH sintomática y asintomática que recibieron rt-PA.
- El análisis de regresión logística demostró que los niveles plasmáticos de Fn-c fueron el único factor predictor independiente de TH tanto en los pacientes tratados en las 6 primeras horas como en el subgrupo de pacientes tratados en las 3 primeras horas.
- Un post-hoc análisis de los resultados obtenidos demostró que los niveles plasmáticos de Fn-c  $\geq 3.6$   $\mu\text{g/mL}$  presentaron mejor sensibilidad (100%), especificidad (96%), VPP (44%) y VPN (100%) para la predicción de IH 2 y HP que los niveles plasmáticos de MMP-9  $\geq 140$  ng/mL (81%, 88%, 41% y 98%, respectivamente).

## V. Discusión

---

### **1. Comentario general a las publicaciones del estudio**

La investigación llevada a cabo demuestra la participación de diferentes mecanismos bioquímicos en el DNP y la TH de pacientes con isquemia cerebral. En efecto, en pacientes con infarto lacunar los niveles de  $TNF\alpha$ , IL-6 e ICAM-1, mediadores de la reacción inflamatoria que se desencadena como consecuencia de la isquemia cerebral, fueron significativamente más elevados en el momento del ingreso hospitalario en aquellos pacientes que posteriormente presentaron DNP así como en aquellos pacientes con mal pronóstico funcional evaluado a los 3 meses de evolución. Por otro lado, los niveles de MMP-9, enzima proteolítica que destruye la membrana basal endotelial y que se activa también como consecuencia de la isquemia cerebral, y de Fn-c, molécula localizada a nivel del endotelio vascular y por tanto, probablemente marcador más específico de lesión endotelial secundaria a la isquemia, fueron significativamente más elevados en el momento del ingreso hospitalario en un grupo no seleccionado de pacientes con isquemia cerebral así como en un grupo seleccionado de pacientes que recibieron terapia fibrinolítica con rt-PA y que posteriormente presentaron TH de la lesión isquémica.

Los mecanismos involucrados en la aparición de DNP y TH como complicaciones evolutivas de la isquemia cerebral no se conocen con exactitud. No obstante, numerosos datos sugieren la participación de determinados mecanismos bioquímicos que se desencadenan como resultado de la isquemia en la aparición de dichas complicaciones. La isquemia cerebral produce una despolarización de las membranas neuronales con alteración del funcionamiento de las bombas iónicas y acúmulo de calcio intracelular que

origina un aumento del glutamato a nivel extracelular, molécula excitotóxica que participará en la muerte neuronal. Asimismo se produce un aumento de GABA, neurotransmisor inhibitorio cuyos efectos serían neuroprotectores para la zona isquémica. El aumento de calcio intracelular es también responsable de la puesta en marcha de la denominada cascada inflamatoria que comienza con la liberación muy rápida y transitoria de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  que a su vez desencadenarán la liberación de otras interleukinas (como la IL-6 e IL-8) y secundariamente la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria entre las que se encuentra la ICAM-1 que facilitarían el acúmulo leucocitario en el foco isquémico originando el fenómeno de “no reflujo” y la reducción del flujo sanguíneo.<sup>23,29</sup> El aumento de calcio intracelular y los propios mecanismos inflamatorios estimulan la expresión de MMP-2 y MMP-9 con la consiguiente disrupción endotelial que facilitará el paso de hematíes hacia el foco isquémico y, en consecuencia, la aparición de TH.<sup>80,85</sup>

En pacientes con ictus isquémico se han demostrado niveles elevados de TNF- $\alpha$  en cerebro ya a las 15 horas del inicio de la isquemia<sup>39</sup> y niveles plasmáticos elevados de ICAM-1 en fases tempranas de la isquemia que alcanzan el pico máximo de expresión en las primeras 24 horas de evolución.<sup>54,55</sup> Estos datos coinciden con los obtenidos en la primera publicación de la presente Tesis Doctoral ya que los resultados demuestran niveles elevados de TNF- $\alpha$  e ICAM-1 en nuestros pacientes en las primeras 24 horas de evolución de la isquemia. Por otro lado, estudios previos han demostrado la participación de mecanismos inflamatorios en el deterioro neurológico de pacientes con isquemia cerebral independientemente del mecanismo ictal. Así, los niveles de IL-6 tanto en

plasma como en LCR son más elevados en pacientes con ictus isquémico que posteriormente presentaron deterioro neurológico y peor pronóstico independientemente del mecanismo ictal,<sup>58</sup> resultados que se han corroborado en el presente estudio en pacientes con infarto lacunar. Dada la correlación significativa existente entre los niveles de moléculas inflamatorias y de neurotransmisores (glutamato y GABA) en el estudio llevado a cabo así como el hecho de que los niveles de moléculas inflamatorias fueran mayores en aquellos pacientes con lesiones localizadas a nivel de ganglios basales y de tronco cerebral (como ocurre también con los neurotransmisores), es posible que ambos mecanismos (inflamación y excitotoxicidad) cooperen y participen de forma secuencial en la progresión neurológica de los pacientes con infarto lacunar. De hecho, datos experimentales sugieren que las citocinas podrían modificar la excitotoxicidad mediada por glutamato. Así, los efectos excitotóxicos derivados del glutamato parecen disminuir mediante anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  en cultivos de neuronas embrionarias, la administración de antagonistas de la IL-1 reduce el volumen de infarto inducido por la activación de receptores glutamatérgicos y la administración de IL-10, interleucina con efectos neuroprotectores, produce una disminución de la muerte neuronal inducida por glutamato.<sup>37,97,98</sup> No obstante, en la investigación llevada a cabo, los mecanismos inflamatorios parecen jugar un papel más relevante en la aparición de esta complicación dado que el riesgo de deterioro asociado a niveles de TNF- $\alpha$  > 14 pg/mL y niveles de ICAM-1 > 208 pg/mL es mayor que el asociado a niveles de glutamato > 200  $\mu$ mol/L y niveles de GABA > 240 nmol/L (ver Tabla 4 de la publicación 1). Un aspecto interesante de la investigación es que el tratamiento previo con aspirina previno la aparición de



deterioro neurológico. Este posible efecto neuroprotector de la aspirina podría estar relacionado con la inhibición tanto de mecanismos excitotóxicos<sup>99,100</sup> como inflamatorios,<sup>101</sup> tal y como se discute en la publicación original.

Como se ha comentado anteriormente, los propios mecanismos inflamatorios pueden estimular la expresión de MMPs que ejercen su acción proteolítica a nivel de la membrana basal endotelial produciendo la desaparición de los antígenos constituyentes de la misma,<sup>31</sup> entre los cuales se encuentra la Fn-c, y la aparición de TH secundaria.<sup>32</sup> La participación de MMP-9 en la aparición de sangrado en la zona isquémica se ha demostrado en modelos experimentales de isquemia.<sup>80</sup> así como en pacientes con ictus de origen cardioembólico.<sup>79</sup> Los resultados de la segunda publicación que constituye esta Tesis Doctoral confirman y extienden los datos clínicos existentes, ya que demuestran la existencia de niveles significativamente más elevados de MMP-9 en el momento del ingreso hospitalario en pacientes con TH e ictus isquémico independientemente del mecanismo ictal. Por otro lado, estudios previos parecían demostrar que la Fn-c como molécula localizada en el propio endotelio vascular, podía ser un marcador de daño endotelial.<sup>92,93</sup> Con la hipótesis de que una molécula localizada a nivel del propio endotelio sería probablemente un marcador más específico de disrupción endotelial, se llevó a cabo una tercera investigación en la que se determinó la relación entre los niveles de Fn-c y la aparición de TH. Esta última investigación se llevó a cabo en pacientes en los que se administró tratamiento trombolítico con rt-PA, dado que en estos pacientes existe un incremento iatrogénico del riesgo de sangrado que puede disminuir el beneficio potencial de este tratamiento en el ictus isquémico. No obstante, se analizaron también los niveles de Fn-c en pacientes

con ictus isquémico que no recibieron dicha terapia y se compararon los niveles entre ambos grupos. Los resultados de este estudio demostraron niveles significativamente más elevados de Fn-c en pacientes con TH que en controles sanos y también que en pacientes con ictus isquémico que no recibieron tratamiento trombolítico y que no tuvieron TH. Sin embargo, los niveles en pacientes que no recibieron rt-PA pero que presentaron posteriormente TH fueron muy similares al grupo de pacientes con sangrado que habían recibido tratamiento fibrinolítico. A diferencia de lo que ocurría con los niveles de MMP-9 tanto en la segunda como en la tercera publicación, los niveles de Fn-c parecían aumentar de forma lineal en relación con la gravedad del sangrado (Figura 1 de la tercera publicación) y eran significativamente mayores en pacientes con HP que en aquellos con IH. Los resultados fueron similares en pacientes que habían recibido el tratamiento fibrinolítico en las tres primeras horas de evolución de la sintomatología, aspecto importante dado que en el momento actual la administración de rt-PA se realiza solamente dentro de este intervalo de tiempo. Los niveles de Fn-c eran mayores en pacientes con TH sintomática, es decir, acompañada de deterioro neurológico, mientras que los de MMP-9 fueron similares en pacientes con y sin deterioro neurológico acompañante. Por último, y de acuerdo con la idea de que la Fn-c puede ser un marcador más específico de lo que acontece a nivel del endotelio, sólo los niveles de Fn-c resultaron ser predictores independientes de TH tras la administración de tratamiento trombolítico. Además, niveles de Fn-c  $\geq 3.6$   $\mu\text{g/mL}$  predijeron con una sensibilidad y VPN de un 100% la aparición de IH-2 y HP en pacientes que habían recibido tratamiento con rt-PA, mientras que la

capacidad predictiva de niveles MMP-9  $\geq$  140 ng/mL para los mismos tipos de TH fue menor.

El origen de la MMP-9 y Fn-c en plasma en pacientes con isquemia cerebral no se conoce con exactitud. Los LPMN y los macrófagos que llegan al foco isquémico durante la reperfusión arterial podrían liberar MMP-9 que degradaría la membrana basal.<sup>102</sup> Entre los mecanismos implicados en el aumento de los niveles de Fn-c habría que considerar la ruptura de la membrana basal endotelial con la consiguiente liberación al plasma de la Fn-c allí localizada, así como un posible incremento de la síntesis de esta molécula por las propias células del endotelio así como por los LPMN<sup>103</sup> que están llegando al foco isquémico como parte de la cascada inflamatoria desencadenada por la propia isquemia.<sup>23</sup> Además, algunas interleukinas y el factor de crecimiento  $\beta$ , mediadores inflamatorios cuya expresión aumenta como resultado de la isquemia, estimulan la síntesis de Fn-c.<sup>104</sup> La administración de análogos como el péptido de la laminina y el péptido V del la fibronectina disminuye el tamaño de la lesión cerebral secundaria a la isquemia a través de una disminución del número de leucocitos que llega al foco isquémico,<sup>88,89</sup> lo que apoya la posible relación existente entre los fenómenos inflamatorios y la pérdida de integridad de la membrana basal del endotelio. El incremento de la síntesis de Fn-c podría interpretarse como un mecanismo de defensa frente al endotelio dañado por la acción de la MMPs, lo que explicaría la correlación positiva existente entre los niveles de Fn-c y de MMP-9 en nuestro estudio.

## 2. Limitaciones de los estudios realizados

### **Investigación I: *Inflammation-Mediated Damage in Progressing Lacunar Infarctions. A potential Therapeutic Target***

- No es posible conocer con exactitud si el aumento de los niveles plasmáticos de las moléculas analizadas es el resultado de lo que acontece a nivel cerebral como consecuencia de la isquemia o es simplemente el resultado de una reacción de fase aguda secundaria a la propia isquemia. Sin embargo, la correlación fuertemente positiva existente entre los niveles plasmáticos de las moléculas analizadas y los niveles existentes en LCR de pacientes con isquemia cerebral demostrada en estudios previos,<sup>58</sup> así como la ausencia de diferencias significativas en cuanto a la existencia de factores de riesgo cardiovascular, gravedad del déficit neurológico, mecanismo ictal, parámetros bioquímicos o los signos vitales evaluados en el momento en que se obtuvieron las muestras de sangre para análisis de moléculas inflamatorias apoyarían la primera hipótesis. No obstante, la posible participación de factores sistémicos o una reacción de fase aguda en la elevación de los niveles no se puede descartar totalmente.
- En el presente estudio no se han analizado sólo parte las moléculas participantes en la cascada isquémica inflamatoria.
- La determinación de los niveles plasmáticos se ha llevado a cabo mediante técnicas de ELISA que no son apropiadas para obtener un resultado rápido en base al cual poder establecer diferentes pautas terapéuticas.

---

**Investigación II. Fase I: *Plasma Metalloproteinase-9 Predicts Hemorrhagic Transformation in Acute Ischemic Stroke.***

- De la misma manera que se ha comentado en la Investigación I, no es posible descartar con total seguridad que el aumento de los niveles de MMP-9 pueda estar relacionado con una reacción de fase aguda secundaria a la propia isquemia cerebral. Sin embargo, la gravedad del déficit neurológico en el momento del ingreso hospitalario o el volumen del infarto, que podrían ser determinantes de una mayor reacción de fase aguda, fueron similares en pacientes que posteriormente presentaron TH y cuyos niveles de MMP-9 estaban más elevados en el momento del ingreso, lo que apoya la idea de que los niveles de MMP-9 no se elevan simplemente en respuesta a una reacción de fase aguda más intensa.
- En este estudio, el escaso número de pacientes incluidos dentro de las tres primeras horas de evolución de los síntomas (y por tanto, candidatos potenciales a recibir tratamiento fibrinolítico y en consecuencia con mayor riesgo iatrogénico de TH), no permitía establecer conclusiones con respecto a la capacidad predictiva de la MMP-9 en este grupo concreto de pacientes. Este aspecto pudo ser analizado en la segunda fase de esta investigación que incluyó un mayor número de pacientes en las tres primeras horas de evolución de la isquemia.

---

**Investigación II. Fase II: *Plasma Cellular-Fibronectin Concentration Predicts Hemorrhagic Transformation after Thrombolytic Therapy in Acute Ischemic Stroke***

- Aunque los resultados obtenidos permiten conocer la alta capacidad predictiva de los niveles de Fn-c  $\geq 3.6$   $\mu\text{g/mL}$  IH-2 y HP, estos datos se obtuvieron en un post-hoc análisis y por tanto los datos deben confirmarse en un estudio posterior incluyendo un mayor número de pacientes especialmente en el subgrupo de pacientes con HP-2 que son aquellos en que el componente hemorrágico se asocia con mayor frecuencia a deterioro neurológico.
- El escaso número de pacientes con HP-2 en el estudio no permite obtener conclusiones acerca de la capacidad predictiva de los niveles de Fn-c sobre este subgrupo particular de pacientes que, como se ha mencionado anteriormente, son aquellos en los que el componente hemorrágico habitualmente se asocia a deterioro neurológico y, en consecuencia, a un peor pronóstico.
- De la misma manera que en las publicaciones previas, no es posible descartar con total seguridad que el aumento de los niveles de Fn-c sea secundario, al menos en parte, a una reacción de fase aguda asociada a la isquemia cerebral. No obstante, de nuevo, la ausencia de diferencias entre el grupo de pacientes que posteriormente presentó sangrado y el que no en cuanto a factores radiológicos, bioquímicos y constantes vitales evaluados previamente a la obtención de la muestra sanguínea para el análisis de Fn-c, y que pueden modificarse como consecuencia de la respuesta al estrés,

sugiere que las diferencias en las concentraciones de Fn-c en plasma no son simplemente el resultado de una reacción de fase aguda.

### **3. Contribuciones de cada publicación a la literatura**

#### **Investigación I: *Inflammation-Mediated Damage in Progressing Lacunar Infarctions. A potential Therapeutic Target***

- El estudio presentado confirma la participación de los mecanismos inflamatorios en el DNP y el pronóstico de pacientes con infarto lacunar
- Se establecen puntos de corte de las moléculas evaluadas como predictores de DNP y mal pronóstico en pacientes con infarto lacunar.
- La participación de los mecanismos inflamatorios como mediadores de DNP y mal pronóstico en pacientes con infarto lacunar permite establecer la hipótesis de que estos pacientes podrían beneficiarse de la administración de terapias antiinflamatorias. Este punto es importante dado que con frecuencia este grupo particular de pacientes con ictus es excluido en ensayos clínicos terapéuticos que evalúan la eficacia neuroprotectora de fármacos con efecto antiinflamatorio.

#### **Investigación II. Fase I: *Plasma Metalloproteinase-9 Predicts Hemorrhagic Transformation in Acute Ischemic Stroke.***

- El estudio presentado confirma la relación existente entre niveles elevados de MMP-9 en el momento del ingreso hospitalario y la aparición posterior de TH en un grupo no seleccionado de pacientes con ictus isquémico.

- Los niveles de MMP-9  $\geq$  140 ng/mL se establecen como predictores de TH en pacientes con ictus isquémico independientemente del mecanismo ictal.

**Investigación II. Fase II: *Plasma Cellular-Fibronectin Concentration Predicts Hemorrhagic Transformation after Thrombolytic Therapy in Acute Ischemic Stroke***

- El estudio demuestra por primera vez la relación existente entre los niveles elevados de Fn-c en plasma en el momento del ingreso hospitalario y la aparición de TH en pacientes que reciben tratamiento fibrinolítico con rt-PA.
- Se confirma también la relación entre niveles elevados de Fn-c y la aparición de TH en un grupo no seleccionado de pacientes que no reciben tratamiento trombolítico.
- Los niveles de Fn-c son más elevados en pacientes con mayor gravedad del sangrado y, por tanto, más elevados en pacientes con HP que en aquellos con IH.
- Los niveles de Fn-c son más elevados en pacientes con TH sintomática y, por tanto, con deterioro neurológico acompañante.
- Los niveles de Fn-c  $\geq$  3.6  $\mu$ g/mL predicen con la máxima sensibilidad y VPN la aparición de IH-2 y HP en el grupo de pacientes estudiados, siendo la capacidad predictiva de estos niveles de Fn-c superior a la de niveles de MMP-9  $\geq$  140 ng/mL.



## **VI. Conclusiones finales**

---

1. Existe una asociación entre niveles plasmáticos elevados de las moléculas inflamatorias analizadas en la presente Tesis Doctoral y el DNP y mal pronóstico de pacientes con infarto lacunar.
  - La existencia de niveles de TNF- $\alpha$  > 14 pg/mL en las primeras 24 horas de evolución constituye un factor de riesgo independiente de DNP y de mal pronóstico funcional con una OR ajustada de 511 (95% IC, 17-14937) y 3.0 (95% IC, 1.0-8.5), respectivamente.
  - La existencia de niveles de ICAM-1 > 208 pg/mL en las primeras 24 horas de evolución constituye un factor de riesgo independiente de DNP y de mal pronóstico funcional con una OR ajustada de 325 (95% IC, 17-5748) y 4.2 (95% IC, 1.3-13.6), respectivamente.
2. Existe una asociación entre niveles plasmáticos elevados de MMP-9 y la aparición de TH de la lesión isquémica cerebral en pacientes con ictus isquémico independientemente del mecanismo ictal. Sin embargo, los niveles de MMP-9 no permiten discriminar la gravedad del sangrado ni tampoco si la TH será o no sintomática.
  - La existencia de niveles de MMP-9  $\geq$  140 ng/mL en las primeras 12 horas de evolución constituye un factor de riesgo independiente de TH con una OR ajustada de 22 (95% IC, 2.6-194).
3. Existe una asociación entre los niveles elevados de Fn-c y la aparición de TH en pacientes con ictus isquémico que reciben terapia trombolítica intravenosa con rt-PA. A diferencia de los niveles de MMP-9, los niveles de Fn-c permiten discriminar la gravedad del sangrado y son más elevados en pacientes con TH sintomática. Al ser una molécula localizada casi exclusivamente en el endotelio vascular, la Fn-c es

probablemente un marcador más específico de lesión endotelial que la MMP-9, y su capacidad predictiva de TH es mayor que la de la MMP-9.

- La Fn-c en plasma es la única variable independientemente asociada a TH en pacientes que han recibido tratamiento fibrinolítico tanto en las primeras 6 horas de evolución [OR, 2.1 (95% IC, 1.3-3.4)] como en las primeras 3 horas de evolución [OR, 1.9 (95% IC, 1.2-3.3)].
  - La existencia de niveles de Fn-c  $\geq 3.6$   $\mu\text{g/mL}$  previa a la administración de tratamiento trombolítico permite predecir la aparición de IH-2 y HP con una sensibilidad y VPN del 100%.
4. La demostración de la participación de mecanismos bioquímicos en la aparición de complicaciones asociadas a la isquemia cerebral establece la posibilidad de ensayo de nuevas alternativas terapéuticas encaminadas a bloquear los mecanismos bioquímicos implicados.

## VII. Bibliografía

---

1. Antoni Dávalos & José Castillo. Progressing Stroke. Chap 16. In *Current Review of Cerebrovascular Disease*. Fourth Edition. Ed: Marc Fisher and Julien Bogousslavsky. Philadelphia: Current Medicine, Inc;2001:169-181
2. Dávalos A, Cendra E, Teruel J, Martínez M, Genís D. Deteriorating ischemic stroke: risk factors and prognosis. *Neurology* 1990;40:1865-1869
3. DeGraba TJ, Hallenbeck JM, Pettigrew KD, Dutka Aj, Kelly BJ. Progression of acute stroke: value of the initial NIH stroke scale score on patient stratification in future trials. *Stroke* 1999;30:1208-1212
4. Röden-Jüllig A. Progressing stroke: Epidemiology. *Cerebrovasc Dis* 1997;7(suppl 5):2-5
5. Castillo J, Leira R. Predictors of deteriorating cerebral infarct: role of inflammatory mechanisms. Would its early treatment be useful? *Cerebrovasc Dis* 2001;11(suppl 1):40-48
6. Jorgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS. Effect of blood pressure and diabetes on stroke in progresión. *Lancet* 1994;344:156-159
7. Dávalos A, Toni D, Iweins F, Lesaffre E, Bastianello S, Castillo J. Neurological deterioration in acute ischemic stroke. Potential predictors and associated factors in the European Cooperative Acute Stroke Study. *Stroke* 1999;30:2631-2636
8. Toni D, Fiorelli M, Gentile M, Bastianello S, Sacchetti ML, Argentino C, Pozzilli C, Fieschi C. Progressing neurological deficit secondary to acute ischemic stroke. *Arch Neurol* 1995;52:670-675

9. Dávalos A, Castillo J, Pumar JM, Noya M. Body temperature and fibrinogen are related to early neurological deterioration in acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 1997;7:64-69
10. Castillo J, Dávalos A, Noya M. Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet* 1997;349:79-83
11. Toni D, Fiorelli M, Bastianello S, Sacchetti ML, Sette G, Argentino C, Montinaro E, Bozazo L. Hemorrhagic transformation of brain infarcts: predictability in the first 5 hours from stroke onset and influence on clinical outcome. *Neurology* 1996;46:341-345
12. Fiorelli M, Bastianello S, von Kummer R, del Zoppo GJ, Larrue V, Lesaffre E, Ringleb AP, Lorenzano S, Manelfe C, Bozzao L. Hemorrhagic transformation within 36 hours of a cerebral infarct: relationships with early clinical deterioration and 3-month outcome in the European Cooperative Acute Stroke Study I (ECASS I) cohort. *Stroke* 1999;30:2280-2284
13. Berger C, Fiorelli M, Steiner T, Schabitz WR, Bozazo L, Bluhmki E, Hacke W, von Kummer R. Hemorrhagic transformation of ischemic brain tissue: asymptomatic or symptomatic? *Stroke* 2001;32:1330-1335
14. Fisher M, García JH. Evolving stroke and the ischemic penumbra. *Neurology* 1996;47:884-888
15. Ginsberg MD. Injury mechanisms in the ischaemic penumbra approaches to neuroprotection in acute ischaemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 1997;7 (Suppl 2):7-12
16. Marshal G, Beaudouin V, Rioux P, De la Sayette V, Le Doze F, Viader F, Derlon JM, Baron JC. Prolonged persistence of substancial volumes

- of potentially viable brain tissue after stroke. A correlative PET-CT study with voxel based data analysis. *Stroke* 1996;27:599-606
17. Rossi DJ, Oshima T, Atwell D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 2000;403:36-321
  18. Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke* 1990;25:7-12
  19. Morimoto T, Globus MY-T, Busto R, Martínez E, Ginsberg MD. Simultaneous measurement of salicylate hydroxylation and glutamate release in the penumbral cortex following transient middle cerebral artery occlusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:92-99
  20. Linink MD, Zobrist RH, Hatfield MD. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1993;24:2002-2009
  21. Dávalos A, Castillo J, Marrugat J, Fernández-Real JM, Armengou A, Cacabelos P, Rama R. Body iron stores and early neurologic deterioration in acute cerebral infarction. *Neurology* 2000;54:1568-1574
  22. Castillo J, Rama R, Dávalos A. Nitric oxide-related brain damage in acute ischemic stroke. *Stroke* 2000;31:852-857
  23. Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. Inflammatory mediators and brain injury. The role of cytokines and chemokines in stroke and CNS diseases. IN: Ginsberg MD and Bogousslavsky J, eds. *Cerebrovascular Disease. Pathophysiology, Diagnosis, and Management. Vol I. Chapter 36.* Blackwell Science, 1998;507-531
  24. Akopov SE, Simonian NA, Griforian GS. Dynamics of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction

- and their correlation with brain tissue damage. *Stroke* 1996;27:1739-1743
25. Sornas R, Ostlund H, Muller R. Cerebrospinal fluid cytology after stroke. *Arch Neurol* 1972;26:489-501
  26. Chuaqui R, Tapia J. Histologic assessment of the age of recent brain infarcts in man. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993;52:481-489
  27. García JH, Liu KF, Yoshida Y, Lian J, Chen S, del Zoppo GJ. Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol* 1994;144:188-189
  28. Ames A, Wright LW, Kowade M, Thurston JM, Majors G. Cerebral ischemia, II: the no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* 1968;52:437-453
  29. Schmid-Schönbein GW, Usami S, Skalk R, Chien S. The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary. *Microvasc Res* 1980;19:45-70
  30. Härtl R, Schürer L, Schmid-Schönbein GW, del Zopo G. Experimental antileukocyte interventions in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:1108-1119
  31. Hamman GF, Okada Y, Fitridge R, del Zopo GJ. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 1995;26:2120-2126
  32. Hamann GF, Okada Y, del Zoppo GJ. Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:1373-1378
  33. Wang X, Yue TL, Barone FC, White RF, Gagnon RC, Feuerstein GZ. Concomitant cortical expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA follows



- early response gene expresión in transient focal ischemia. *Mol Chem Neuropathol* 1994;23:103-114
34. Liu T, Clark RK, McDonell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in ischemic neurons. *Stroke* 1994;25:1481-1488
  35. Barone FC, Harbin B, White RF, Miller A, Webb CL, Gillette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor- $\alpha$ : a mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke* 1997;28:1233-1244
  36. Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. Interleukin-1 as a pathogenic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke* 1995;26:676-680
  37. Relton JK, Rothwell NJ: Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. *Brain Res Bull* 1992;29:243-246
  38. Elneihoum AM, Falke P, Axelsson L, Lundberg E, Lindgärde F, Ohlsson K. Leukocyte activation detected by increased plasma levels of inflamamatory mediators in patients with ischemic cerebrovascular diseases. *Stroke* 1996;27:1734-1738
  39. Sairanen T, Carpén O, Karjalainen-Lindsberg ML, Paetau A, Turpeinen U, Kaste M, Lindsberg P. Evolution of cerebral tumor necrosis factor- $\alpha$  production during human ischemic stroke. *Stroke* 2001;32:1750-1758
  40. Fassbender K, Rossol S, Kammer T, Daffertshofer M, Wirth S, Dollman M, Hennerici M. Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia: kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome disease. *J Neurol Sci* 1994;122:135-139

41. Benveniste EN. Inflammatory cytokines within the central nervous system: sources, function, and mechanism of action. *Am J Physiol* 1992;263:C1-16
42. Gauldie J, Northemann W, Fey GH. IL-6 functions as an exocrine hormone in inflammation. Hepatocytes undergoing acute phase responses require exogenous IL-6. *J Immunol* 1990;144:3804-3808
43. Xing Z, Gauldie J, Cox G, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 1998;101:311-320
44. Wang X, Yue TL, Young PR, Barone FC, Feuerstein GZ. Expression of interleukin-6, c-fos, and zif268 mRNA in rat ischemic cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15:166-171
45. Kim JS, Ion SS, Kim YH, Ryu JS. Serial measurement of interleukin-6, transforming growth factor- $\beta$  and S-100 protein in patients with acute stroke. *Stroke* 1996;27:1553-1557
46. Beamer NB, Coull BM, Clark WM, Hazle JS, Silberger JR. Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke. *Ann Neurol* 1995;37:800-805
47. Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelsö C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A. Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the size of brain lesion in stroke. *Stroke* 1995;26:1393-1398
48. DeGrabba T. The role of inflammation after acute stroke. Utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology* 1998;51(Suppl 3):S62-S68

49. Lindsberg PJ, Carpen O, Paetau A, Larjalainen-Lindsberg ML, Kaste M. Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke. *Circulation* 1996;94:939-945]
50. Clark WM, Lauten JD, Lessov N, Soodward W, Coull BM. Time course of ICAM-1 expression and leukocyte subset infiltration in rat forebrain ischemia. *Mol Chem Neuropathol* 1995;26:213-230
51. Okada Y, Copeland BR, Mori E, Tung MM; Thomas WS, del Zoppo GJ. P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke* 1994;25:202-211
52. Hess DC, Zhao W, Carroll J, McEachin M, Buchanan K. Increased expression of ICAM-1 during reoxygenation in brain endothelial cells. *Stroke* 1994;25:1463-1467
53. Clark WM, Coull BM, Briley DP, Mainolfi E, Rothlein R. Circulating intercellular adhesion molecule-1 levels and neutrophil adhesion in stroke. *J Neuroimmunol* 1993;44:123-126
54. Fassbender K, Mössner R, Motsch L, Kischka U, Grau A, Hennerici M. Circulating selectin- and immunoglobulin-type adhesion molecules in acute ischemic stroke. *Stroke* 1995;26:1361-1364
55. Bistch A, Klene W, Murtada L, PrangeH, Rieckmann P. A longitudinal prospective study of soluble adhesion molecules in acute ischemic stroke. *Stroke* 1998;29:2129-2135
56. Shyu K-G, Chang H, Lin C-C. Serum levels of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in patients with acute ischaemic stroke. *J Neurol* 1997;244:90-93

57. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE. Classification of subtype of acute ischemic stroke: definitions for use in a multicenter clinical trial: TOAST: Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke* 1993;24:35-41
58. Vila N, Castillo J, Dávalos A, Chamorro A. Proinflammatory Cytokines and Early Neurological Worsening in Ischemic Stroke. *Stroke* 2000;31:2325-2329
59. Serena J, Leira R, Castillo J, Pumar JM, Castellanos M, Dávalos A. Neurological deterioration in acute lacunar infarctions: the role of excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Stroke* 2001;32:1154-1161
60. Hacke W, Kaste M, Fiesch C et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke: The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA* 1995;274:1017-1025
61. NINDS rt-PA Stroke Study Group: Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 1995;333:1581-1587
62. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Dávalos A, Deier D, Larrue V, Bluhmki E, Davis S, Donan J, Scheneider D, Díez-Tejedor E, Trovillas P, for the Second European-Australian Stroke Study Investigators. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). *Lancet* 1998;352:1245-1251
63. Fisher CM, Adams RD. Observations on brain embolism with special reference to the mechanism of hemorrhagic infarction. *J Neuropathol Exp Neurol* 1951;10:92-94

64. García GH, Lowry SL, Briggs L et al. Brain capillaries expand and rupture in areas of ischemia and reperfusion. pp. 169-179. In Revich M, Hurtin HI (eds): Cerebrovascular Diseases. Thirteenth Conference. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1983
65. Molina C, Álvarez-Sabín J, Montaner J, Abilleira S, Arenillas JF, Coscojuela P, Romero F, Codina A. Thrombolysis-Related Hemorrhagic Infarction. A marker of Early Reperfusion, Reduced Infarct Size, and Improved Outcome in Patients With Proximal Middle Cerebral Artery Occlusion. *Stroke* 2002;33:1551-1556
66. Pantoni L, Hagiwara M, Gutierrez JA, García JH. Hemorrhagic transformation of cerebral infarcts in a rat model. *Cerebrovasc Dis* 1996;6:187 (abstract)
67. Ogata J, Yutani C, Imakita M et al. Hemorrhagic infarct of the brain without a reopening of the occluded arteries in cardioembolic stroke. *Stroke* 1989;20:76-83
68. Furlan A, Higashida R, Wechsler L, Gent M, Rowley H, Kase C, Pessin M, Ahuja A, Callahan F, Clark WM, Silver F, Rivera F. Intra-arterial prourokinase for acute ischemic stroke: the PROACT II study: a randomised controlled trial: Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism. *JAMA* 1999;282:2003-2011
69. Kase C, Furlan A, Wechsler L, Higashida RT, Rowley HA, Hart RG, Molinari GF, Frederick LS, Roberts HC, Gebel JM, Sila CA, Schulz GA, Roberts RS, Gent M. Symptomatic intracranial hemorrhage after intra-arterial thrombolysis with recombinant prourokinase in acute ischemic stroke. The PROACT II study. *Neurology* 2000;54:A260-A261

70. Larrue V, von Kummer R, del Zopo G. Hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke: potential contributing factors in the European Cooperative Acute Stroke Study. *Stroke* 1997;28:957-960
71. Levy DE, Brott TG, Haley EC Jr, Marler JR, Sheppard GL, Barsan W, Broderick JP. Factors related to intracerebral hematoma formation in patients receiving tissue-type plasminogen activator for acute ischemic stroke. *Stroke* 1994;25:291-297
72. Brott TG, Haley EC, Levy DE, Barsan W, Broderick J, Sheppard GL, Spilker J, Kongable GL, Massey S, Reed R, et al. Urgent therapy for stroke, I: pilot study of tissue plasminogen activator administered within 90 minutes. *Stroke* 1992;23:632-640
73. Haley EC, Levy DE, Brott TG, Sheppard GL, Melvin CWW, Kongable GL, Torner JC, Marler JR. Urgent therapy for stroke, II: pilot study of tissue plasminogen activator administered within 91-180 minutes from onset. *Stroke* 1992;23:641-645
74. Tanne D, Kasner SE, Demchuk AM, Koren-Morag N, Hanson S, Grond M, Levine SR. Markers of increased risk of intracerebral hemorrhage after intravenous recombinant tissue plasminogen activator therapy for acute ischemic stroke in clinical practice: the Multicenter rt-PA Stroke Survey. *Circulation* 2002;105:1679-1685
75. Álvarez-Sabín J, Molina CA, Montaner J, Arenillas JF, Huertas R, Ribo M, Codina A, Quintana M. Effects of admisión hyperglycemia on stroke outcome in reperfused tissue plasminogen activator-treated patients. *Stroke* 2003;34:1235-1241

76. Romanic AM, Madri JA. Extracellular matrix-degrading proteinases in the nervous system. *Brain Pathol* 1994;4:145-156
77. Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miler KM; Esiri MM; Pery VH. Differential matrix metalloproteinases expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997;23:406-415
78. Clark AW, Krekoski CA, Bou S-S, Chapman KR, Edwards DR. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett* 1997;238:53-56
79. Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina C, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, González MA, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* 2001;32:1759-1766
80. Hoe Hoe J, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zopo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:624-633
81. Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:360-366
82. Romanic AM, White RF, Arlet AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinases expression increases after focal cerebral ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke* 1998;29:1020-1030
83. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPS are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rats. *Stroke* 1998;29:2189-2195

84. Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin J-C, Kainrath M, Massengale J, Chan PH. Early appearance of activated metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:1020-1028
85. Rosenberg GA, Kornfeld M, Estrada E, Kelley RO, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain barrier by type IV collagenase. *Brain Res* 1992;576:203-207
86. Lapchak PA, Chapman D, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic tissue plasminogen activator-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke* 2000;31:3034-3040
87. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribó M, Quintana M, Alvarez-Sabín J. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* 2003;107:598-603
88. Yanaka K, Camarata PJ, Spellman SR, Skubitz AP, Furcht LT, Low WC. Laminin peptide ameliorates brain injury by inhibiting leukocyte accumulation in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17:605-611
89. Yanaka K et al. Antagonism of Leukocyte Adherence by Synthetic Fibronectin peptide V in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *Neurosurgery* 1997;40:557-564
90. Hynes RO. Fibronectins. *Sci Am* 1986;254:42-51



91. Peters JH, Sporn LA, Ginsberg MH, Wagner DD. Human endothelial cells synthesize, process, and secrete fibronectin molecules bearing an alternatively spliced type II homology (ED1). *Blood* 1990;75:1801-1808
92. Peters JH, Maunder RJ, Woolf AD, Cochrane GH, Ginsberg MH. Elevated plasma levels of ED1+ ("cellular") fibronectin in patients with vascular injury. *J Lab Clin Med* 1989;113:586-597
93. Kanters SD, Banga JR, Algra A, Frijns RC, Beutler JJ, Fijnheer R. Plasma levels of cellular fibronectin in diabetes. *Diabetes Care* 2000;24:323-327
94. Fisher CM. Lacunar strokes and infarcts: a review. *Neurology* 1982;32:871-876
95. Sluter G, Steen C, De Keyser J. Use of Barthel Index and modified Rankin Scale in acute stroke trials. *Stroke* 1999;30:1538-1541
96. Robert C, Vermont J, Bosson JL. Formulas for threshold computations. *Comput Biomed Res* 1991;24:514-519
97. Chao CC, Hu S. Tumor necrosis factor-alpha potentiates glutamate neurotoxicity in human fetal brain cell cultures. *Dev Neurosci* 1994;16:172-179
98. Grilli M, Barbieri I, Basudev H, Brusa R, Casti C, Loza G, Ongini E. Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage. *Eur J Neurosci* 2000;12:2265-2272
99. De Cristóbal J, Moro MA, Dávalos A, Castillo J, Leza JC, Camarero J, Colado MI, Lorenzo P, Lizasoain I. Neuroprotective effect of aspirin by inhibition of glutamate release after permanent focal cerebral ischaemia in rats. *J Neurochem* 2001;79:1-5

100. Castillo J, Leira R, Moro MA, Lizasoain I, Serena J, Dávalos A. Neuroprotective effects of aspirin in patients with acute cerebral infarction. *Neurosci Lett* 2003;339(3):248-250
101. Cechetto DF. Role of nuclear factor kappa B in neuropathological mechanisms. *Prog Brain Res* 2001;132:401-414
102. Rantola-Ryhänen S, Ryhänen L, Nowak FV, Vitto J. Proteinases in human polymorphonuclear leukocytes: purification and characterization of an enzyme which leaves denatured collagen and a synthetic peptide with a Gly-Ile sequence. *Eur J Biochem* 1983;134:129-137
103. Macarak EJ, Gorfin S, MacGregor RR. Modulation of endothelial fibronectin synthesis by polymorphonuclear granulocytes. *J Cell Physiol* 1989;139:517-523
104. Roberts CJ, Birkenmeier TM, McQuillar JJ; Akiyama SK, Yamada SS, Chen WT, Yamada KM, McDonald JA. Transforming growth factor beta stimulates the expression of fibronectin and of both subunits of the human fibronectin receptor by cultured human lung fibroblast. *J Biol Chem* 1998;263(10):4586-4592

## VIII. Anexos

---

**Anexo 1.****ESCALA CANADIENSE****A. Funciones mentales**

Nivel de conciencia		
Alerta		3
Somnoliento		1.5
Orientación		
Orientado		1
Desorientado o no valorable		0
Lenguaje		
Normal		1
Déficit de expresión		0.5
Déficit de comprensión		0

Si existe afectación del hemisferio derecho (extremidades izquierdas) aplicar B1. Si existe afectación del hemisferio izquierdo, con afectación del lenguaje, aplicar B2.

**B.1. Funciones motoras**

Cara		
Ninguna		0.5
Presente		0
Brazo (proximal)		
Ninguna		1.5
Moderado		1
Significativa		0.5
Total		0
Brazo (distal)		
Ninguna		1.5
Moderado		1
Significativa		0.5
Total		0
Pierna		
Ninguna		1.5
Moderado		1
Significativa		0.5
Total		0

**B.2. Funciones motoras**

Cara		
Ninguna		0.5
Presente		0
Brazo		
Ninguna		1.5
Presente		0
Pierna		
Ninguna		1.5
Presente		0

## Anexo 2.

### ESCALA NIH

---

#### 1a. Nivel de concidencia

- 0= Alerta, respuestas normales
- 1= No alerta pero responde a mínimos estímulos verbales para obedecer o responder
- 2= No alerta. Requiere estímulos repetidos o dolorosos para realizar movimientos (no estereotipados o reflejos)
- 3= Sólo respuestas reflejas o falta total de respuestas

#### 1b. Nivel de conciencia-Preguntas orales

- 0= Ambas respuesta son correctas
- 1= Una respuesta correcta
- 2= Ninguna respuesta correcta

#### 1c. Nivel de conciencia-Órdenes motoras

- 0= Ambas órdenes son correctas
- 1= Una orden correcta
- 2= Ninguna orden correcta

#### 2. Mirada conjugada

- 0= Normal
- 1= Paresia parcial de la mirada. Ausencia de paresia total o desviación forzada
- 2= Paresia total o desviación forzada de la mirada conjugada

#### 3. Visual

- 0= No alteración visual
- 1= Hemianopsia parcial
- 2= Hemianopsia completa
- 3= Ceguera total

#### 4. Paresia facial

- 0= Movimiento normal y simétrico
- 1= Borramiento del surco nasogeniano o mínima asimetría al sonreír
- 2= Parálisis total o casi total de la zona inferior de la hemicara
- 3= Parálisis completa con ausencia de movimiento en la zona superior e inferior de la hemicara o bilateral

#### 5. Paresia del brazo (evaluar derecho e izquierdo y puntuar por separado)

- 0= Mantiene la posición durante 10 segundos
- 1= Claudicación en menos de 10 segundos, aunque la extremidad no llega a contactar con la cama.
- 2= No puede levantar la extremidad pero esta contacta con la cama en menos de 10 segundos
- 3= Existe movimiento de la extremidad pero no la levanta contra gravedad o cae inmediatamente
- 4= Ausencia total de movimiento
- 5= Extremidad amputada a nivel proximal o inmovilizada. No sumar en la puntuación global

#### 6. Paresia de la pierna (evaluar derecho e izquierdo y puntuar por separado)

- 0= Mantiene la posición durante 5 segundos
- 1= Claudicación en menos de 5 segundos, aunque la extremidad no llega a contactar con la cama.
- 2= No puede levantar la extremidad pero esta contacta con la cama en menos de 5 segundos
- 3= Existe movimiento de la extremidad pero no la levanta contra gravedad o cae inmediatamente
- 4= Ausencia total de movimiento
- 5= Extremidad amputada a nivel proximal o inmovilizada. No sumar en la puntuación global

#### 7. Dismetría

- 0= Ausente
- 1= Presente en una extremidad
- 2= Presente en 2 extremidades

**8. Sensibilidad**

0= Normal

1= Leve o moderada hipoestesia (posible anestesia algésica pero el paciente nota que se le toca)

2= Anestesia severa o total (no nota que se le toca)

**9. Lenguaje**

0= Normal, no afasia

1= Afasia leve o moderada

2= Afasia severa (imposible entenderse con el interlocutor)

3= Mudo con comprensión nula

**10. Disartria**

0= Normal

1= Leve o moderada, puede ser entendido aunque con dificultad

2= Severa, ininteligible o mudo/anártrico (con independencia de la presencia de afasia)

9= Intubado u otras barreras físicas. No sumar en la puntuación global

**11. Extinción-Negligencia-Inatención**

0= Sin alteraciones

1= Inatención o extinción en una de las modalidades visual, táctil, espacial o corporal

2= Hemi-inatención o negligencia severa, o a más de una modalidad. No reconoce su propia mano (asomatognosia) o sólo reconoce una parte del espacio

**\*Fuerza motora distal** (evaluada en mano derecha e izquierda. No se incluye en la puntuación total)

0= Normal sin flexión de los dedos en 5 segundos

1= Alguna extensión aunque no completa y menos de 5 segundos de duración

2= No extensión voluntaria en 5 segundos

---

## Anexo 3.

### CLASIFICACIÓN TOAST

---

#### Criterios de ictus isquémico aterotrombótico (aterosclerosis de grandes arterias)

- Estenosis > 50% o placa ulcerada mayor de 2 mm de profundidad en arteria intracraneal o extracraneal ipsilateral, demostrada mediante dúplex/doppler, arteriografía, angio-resonancia o TC helicoidal.
- Ausencia de cardiopatía embolígena u otra posible causa para el ictus después de realizadas las exploraciones paraclínicas necesarias

#### Criterios de ictus isquémico cardioembólico

- Cuadro compatible con embolia de origen cardíaco.
- Presencia de una cardiopatía embolígena.
- Exclusión de lesiones ateromatosas vasculares cerebrales significativas (ver criterios de infarto aterotrombótico), u otra posible etiología para el ictus.

#### Criterios de ictus isquémico lacunar (enfermedad arterial de pequeño vaso)

- Infarto de origen presumiblemente isquémico y diámetro máximo de 1.5 cm, localizado en el territorio de las arterias perforantes cerebrales, causados por lipohialinosis o microateromatosis de dichas arterias y que cursan clínicamente en forma de uno de los síndromes lacunares clásicos (hemiparesia pura, síndrome sensitivo puro, síndrome sensitivo-motor, hemiparesia-ataxia, o disartria-mano torpe). La existencia de hipertensión arterial o diabetes mellitus apoya el diagnóstico. No deben existir fuentes potenciales de embolismo de origen cardíaco ni estenosis > 50% en arterias extracraneales ipsilaterales.

#### Criterios de ictus isquémico de causa indeterminada

El infarto cerebral de causa desconocida se define como aquel infarto no lacunar que ha ocurrido en ausencia de accidentes isquémicos transitorios previos, signos físicos o evidencia angiográfica de enfermedad oclusiva aterotrombótica, o embolismo de origen cardíaco o arterial.

Incluye los siguientes casos:

- Evaluación inadecuada o insuficiente.
- Ausencia de una etiología determinada pese a un estudio exhaustivo.
- Datos conflictivos por la existencia simultánea de dos o más etiologías posibles de infarto cerebral.

#### Criterios de ictus isquémico de otras etiologías determinadas

En esta categoría se incluyen los pacientes con ictus isquémico debido a etiologías poco frecuentes, tales como vasculopatías no ateroscleróticas, estados de hipercoagulabilidad, alteraciones hematológicas, arteriopatías no inflamatorias, arteriopatías inflamatorias no infecciosas, arteriopatías infecciosas, migraña-infarto, vasoespasma, enfermedades hereditarias y enfermedades metabólicas.

---

---

**Anexo 4.****ÍNDICE DE BARTHEL**

---

<b>Alimentación</b>		
Independiente		10
Necesita ayuda		5
Totalmente dependiente		0
<b>Baño</b>		
Independiente		10
Totalmente dependiente		0
<b>Aseo personal</b>		
Independiente		10
Totalmente dependiente		0
<b>Vestirse</b>		
Independiente		10
Necesita ayuda		5
Totalmente dependiente		0
<b>Control anal</b>		
Sin problemas		10
Algún accidente		5
Accidentes frecuentes		0
<b>Control vesical</b>		
Sin problemas		10
Algún accidente		5
Accidentes frecuentes		0
<b>Manejo en el inodoro</b>		
Independiente		10
Necesita ayuda		5
Totalmente dependiente		0
<b>Desplazamiento silla/cama</b>		
Independiente		15
Puede sentarse		10
Precisa ayuda		5
Totalmente dependiente		0
<b>Desplazamientos</b>		
Independiente		15
Necesita ayuda		10
Independiente con silla de ruedas		5
Incapaz de desplazarse		0
<b>Subir escaleras</b>		
Independiente		10
Necesita ayuda		5
Incapaz de subir escaleras		0

---



## **IX. Publicaciones originales**

---

# Inflammation-Mediated Damage in Progressing Lacunar Infarctions

## A Potential Therapeutic Target

Mar Castellanos, MD; José Castillo, MD, PhD; María M. García, MD, PhD; Rogelio Leira, MD, PhD; Joaquín Serena, MD, PhD; Angel Chamorro, MD, PhD; Antoni Dávalos, MD, PhD

**Background and Purpose**—The mechanisms underlying neurological deterioration in patients with lacunar infarction are not completely understood. In this study, we sought to investigate the role of proinflammatory molecules in the early worsening and outcome of acute lacunar stroke.

**Methods**—We performed a secondary analysis of 113 consecutive patients with lacunar infarction included within the first 24 hours of the onset of symptoms in a previous study aimed at investigating clinical and biochemical factors of early neurological deterioration (END). END was defined as a fall of  $\geq 1$  points in the motor items of Canadian Stroke Scale between inclusion and 48 hours. Poor outcome at 3 months was considered death or Barthel Index  $< 85$ . Interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay in blood samples obtained on admission.

**Results**—END was recorded in 27 patients (23.9%); poor outcome was noted in 26 (23%). Median (quartiles) concentrations in plasma of TNF- $\alpha$  [16.5 pg/mL (13.7 and 21.2 pg/mL)] versus 7.5 pg/mL (6.2 and 9.0 pg/mL), IL-6 [28.8 pg/mL (22.5 and 35.7 pg/mL)] versus 11.5 pg/mL (8.5 and 16.2 pg/mL), and ICAM-1 [285 pg/mL (219 and 315 pg/mL)] versus 158 pg/mL (137 and 187 pg/mL) were significantly higher in patients who had END than in those with nonprogressing strokes ( $P < 0.001$ ). Significant differences were also observed between patients with poor and good outcome at 3 months. Logistic regression analysis after adjustment for potential confounders showed that TNF- $\alpha > 14$  pg/mL and ICAM-1  $> 208$  pg/mL were independently associated with both END (OR, 511; 95% CI, 17 to 4937;  $P < 0.001$ ; and OR, 315; 95% CI, 17 to 5748;  $P < 0.001$ , respectively) and poor outcome at 3 months (OR, 3.0; 95% CI, 1.0 to 8.5;  $P = 0.042$ ; and OR, 4.2; 95% CI, 1.3 to 13.6;  $P < 0.015$ , respectively).

**Conclusions**—High concentrations of inflammatory markers in blood are associated with END and poor functional outcome in lacunar infarctions. These findings suggest that inflammation contributes to brain injury in lacunar stroke. (*Stroke*. 2002;33:982-987.)

**Key Words:** cytokines ■ inflammation ■ lacunar infarction ■ stroke outcome

Approximately 30% of all ischemic stroke patients have lacunar infarctions, and between 25% and 35% of them suffer neurological deterioration within the first few hours of the onset of symptoms and have a worse prognosis.<sup>1-8</sup> Although some clinical factors have been associated with progressing lacunar stroke,<sup>4-7</sup> the mechanisms involved in this progression have not been clearly established. Clinical and experimental research over the last few years has shown that inflammatory mechanisms participate in stroke-induced brain damage.<sup>9-11</sup> Increased levels of cytokines such as interleukin (IL)-1, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and IL-6,<sup>12-15</sup> as well as adhesion molecules such as intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1),<sup>16-18</sup> have been observed

after experimental brain ischemia. Clinical studies have reported increased levels of proinflammatory cytokines<sup>19-22</sup> and adhesion molecules<sup>23-25</sup> in the peripheral blood and cerebrospinal fluid (CSF) of patients with ischemic stroke. High IL-6 concentrations in CSF and plasma have been associated with larger infarct size, neurological deterioration, and poor outcome independently of the stroke subtype.<sup>19,22,26-29</sup>

However, although accumulating evidence suggests that inflammatory-mediated damage plays a role in brain ischemia, it remains unclear whether inflammation also intervenes in lacunar stroke progression and outcome. In this study, we sought to investigate the potential association between high

Received October 18, 2001; final revision received December 12, 2001; accepted December 12, 2001.

From the Section of Neurology (M.C., J.S., A.D.) and Unit of Biostatistics (M.M.G.), Hospital Universitari Doctor Josep Trueta, Girona, Spain; Service of Neurology, Hospital Clínico Universitario (J.C., R.L.), Santiago de Compostela, Spain; and Service of Neurology, Hospital Clinic Universitari (A.C.), Barcelona, Spain.

Partial results of this investigation were presented at the 26th International Stroke Conference, Fort Lauderdale, Fla, February 14-16, 2001.

Correspondence to Dr Antoni Dávalos, Sección de Neurología, Hospital Universitari Doctor Josep Trueta, 17007 Girona, Spain. E-mail adavalos@meditex.es

© 2002 American Heart Association, Inc.

Stroke is available at <http://www.strokeaha.org>

concentrations of proinflammatory molecules in blood and the poor prognosis of lacunar infarctions.

## Subjects and Methods

We performed a secondary analysis of 113 consecutive patients (mean age,  $69.7 \pm 9.3$  years; 57% male) with lacunar infarction included within the first 24 hours of the onset of symptoms in a previous study aimed at investigating clinical and biochemical factors of early neurological deterioration (END) in lacunar stroke.<sup>30</sup> The control group included 43 healthy subjects (60.4% male; age,  $55 \pm 17$  years) without neurological disorders or inflammatory diseases. Patients with inflammatory or infectious diseases, cancer, hematological diseases, and severe renal and liver failure, as well as those who were under treatment with antiinflammatory drugs, were excluded. The study was approved by the ethics committees of both hospitals, and informed consent was obtained from patients or their relatives. A detailed description of the protocol has been published elsewhere.<sup>30</sup> In summary, it included a medical history with recording of potential stroke risk factors, clinical examination, blood and coagulation tests, 12-lead ECG, chest radiography, arterial supraaortic trunk examination, and transcranial Doppler. Cranial CT was carried out at admission, and CT or MRI was repeated between the third and seventh days of the onset of symptoms. The second neuroimaging study was taken as the gold standard for the identification of lacunar infarction. Evaluation of all CT scans and MRI was carried out by the same neuroradiologist who was blinded to the clinical and biochemical results. Topographic classification of lacunar infarctions was assessed according to our previously defined criteria.<sup>30</sup> Lacunar stroke was diagnosed when the patient had 1 of the clinical lacunar syndromes<sup>1,31</sup> lasting  $>24$  hours, no evidence of cortical dysfunction, and a normal or deep focal infarction with a diameter  $\leq 15$  mm in an appropriate location visualized by CT scan and/or MRI.

Stroke severity was quantified by an experienced neurologist using the Canadian Stroke Scale (CSS)<sup>32</sup> at admission and 48 hours after inclusion. The CSS measures level of consciousness (alert=3, drowsy=1.5); speech (normal=1, expressive deficit=0.5, receptive deficit=0); orientation (oriented=1, disoriented or not applicable=0); facial paresis (none=0.5, present=0); and weakness in arm, hand, and leg (none=1.5, mild=1, significant=0.5, total=0, scored individually for each item), with a total score ranging from 1.5 (maximum deficit) to 10 (absence of deficit). A fall of  $\geq 1$  points in the motor items of the CSS between admission and 48 hours was considered neurological deterioration. In accordance with the diagnostic criteria for lacunar stroke, only changes in the motor items of CSS were considered. The Barthel Index was used to evaluate the functional condition of patients at 3 months. Poor outcome was defined as death or a Barthel Index score of  $<85$ , which is the level at which patients report that they need help performing day-to-day activities, with a sensitivity of 95% and specificity of  $>80\%$ .<sup>33</sup>

## Laboratory Tests

On admission, blood samples were collected in tubes with potassium edetate, centrifuged at 3000g for 5 minutes, and immediately frozen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Plasma IL-6, TNF- $\alpha$ , and ICAM-1 levels were measured with commercially available quantitative sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay kits (Quantikine; R&D Systems). These determinations were blinded to clinical and radiological data. Plasma glutamate and GABA levels were quantified by high-performance liquid chromatography as previously described.<sup>30</sup>

## Statistical Analysis

Proportions between groups were compared by use of the  $\chi^2$  test. Given that proinflammatory molecules were not normally distributed, they were expressed as median (quartiles) and compared between 2 groups by the Mann-Whitney test. The Kruskal-Wallis test was used to compare the inflammatory molecule concentrations of 5 groups of patients with different degrees of improvement or worsening in CSS score between admission and 48 hours (absolute

differences: group 1,  $\geq 2$ ; group 2, 1.5 and 1.0; group 3, 0.5, 0, and  $-0.5$ ; group 4,  $-1.0$  and  $-1.5$ ; and group 5,  $\leq 2.0$ ).

Spearman's correlation coefficient was used to analyze the association between inflammatory molecules and baseline continuous variables, including age, time from onset to inclusion, CSS score, systolic and diastolic blood pressures, body temperature, hematological and biochemical parameters, and glutamate and GABA concentrations.

Logistic regression analysis was used to determine the importance of the inflammatory markers in END and poor outcome of lacunar stroke. The first models were fitted to assess the adjusted odds ratios (ORs) of END and poor outcome for the proinflammatory molecules. Those clinical variables that reached a value of  $P < 0.15$  in the bivariate analysis were included as covariates. The parallel kinetic of release between TNF- $\alpha$  and IL-6 probably determines the high correlation that exists between these 2 molecules. This high correlation did not permit us to perform the analysis including TNF- $\alpha$ , IL-6, and ICAM-1 in the same model. Because TNF- $\alpha$  seems to act

**TABLE 1. Baseline Clinical Characteristics and Biochemical Parameters**

Male sex, n (%)	64 (56.6)
Age, y	$69.7 \pm 9.2$
Mean time from stroke onset to blood sampling, h	$10.3 \pm 6.9$
History of stroke risk factors, n (%)	
Arterial hypertension	61 (54)
Cigarette smoking	27 (23.9)
Alcohol intake ( $>40$ g/d)	27 (23.9)
Atrial fibrillation	13 (11.5)
Diabetes mellitus	35 (31)
Prior stroke or transient ischemic attack	33 (29.2)
Aspirin intake before stroke	15 (13.3)
Clinical characteristics	
CSS on admission	$7.8 \pm 1.2$
Lacunar syndrome on admission, n (%)	
Pure motor hemiparesis	59 (52.2)
Pure sensory stroke	12 (10.6)
Ataxic hemiparesis	5 (4.4)
Dysarthria or clumsy hand	4 (3.5)
Sensory-motor stroke	33 (29.2)
Suspected cause, n (%)	
Large-artery atherosclerosis	15 (13.3)
Cardioembolism	23 (20.4)
Small-vessel disease	72 (63.7)
Undetermined*	3 (2.7)
Biochemistry and vital signs at admission	
Plasma glucose, mg/dL	$156 \pm 47$
Plasma fibrinogen, mg/dL	$399 \pm 92$
Hematocrit, %	$39.0 \pm 5.8$
Leucocyte count, $10^3/\text{mm}^3$	$8.3 \pm 1.9$
Platelet count, $10^5/\text{mm}^3$	$204 \pm 79$
Systolic blood pressure, mm Hg	$178 \pm 26$
Diastolic blood pressure, mm Hg	$92 \pm 14$
Body temperature, $^\circ\text{C}$	$36.7 \pm 0.7$

Continuous variables are expressed as mean  $\pm$  SD.

\*Coexistence of 2 potential causes of stroke: atrial fibrillation and severe ipsilateral carotid or middle cerebral artery stenosis.

**TABLE 2. Median Concentrations of Inflammatory Markers in Patients With Lacunar Infarctions and Control Subjects**

	Patients (n=113)	Control Subjects (n=43)	P
IL-6, pg/mL	13.9 (9.2, 23.8)	3.1 (1.3, 4.1)	<0.001
TNF- $\alpha$ , pg/mL	8.2 (6.4, 15.3)	7.0 (5.7, 8.4)	0.001
ICAM-1, pg/mL	187 (172, 223)	167 (140, 207)	0.015

Numbers in parentheses are quartiles.

as the primary "trigger" of the inflammatory cascade,<sup>13</sup> a first analysis was carried out including only plasma TNF- $\alpha$  and ICAM-1 concentrations. Inflammatory markers were included as categorical variables because the cutoffs meant that there was a lack of linearity of the ORs (1=high, 0=low). Cutoff values were calculated by the method described by Robert et al.<sup>34</sup> Because we previously found a relationship between neurotransmitter amino acids and the progression of lacunar infarctions,<sup>30</sup> the odds of END for TNF- $\alpha$  and ICAM-1 were further adjusted for plasma glutamate and GABA concentrations.

## Results

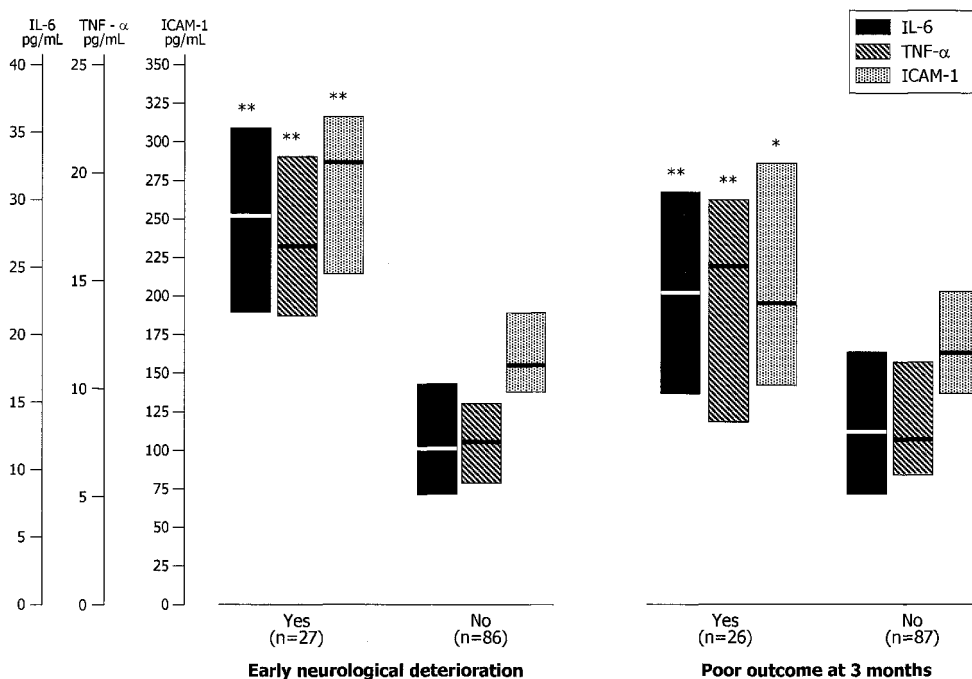
The main characteristics of the studied population are summarized in Table 1. Plasma IL-6, TNF- $\alpha$ , and ICAM-1 concentrations were significantly higher in patients with lacunar infarctions than in the control group (Table 2). Similar levels of proinflammatory molecules were found between groups classified by the suspected cause of lacunar stroke, lacunar syndromes, and the presence or absence of the main stroke risk factors such as hypertension, diabetes mellitus, atrial fibrillation, and prior stroke or transient ischemic attack (data not shown). However, significantly lower levels of IL-6 [11.2 pg/mL (7.2 and 13.8 pg/mL) versus 15.8 pg/mL (9.8 and 26.2 pg/mL),  $P<0.01$ ], TNF- $\alpha$  [7.6 pg/mL (6.5 and 9.4 pg/mL) versus 8.3 pg/mL (6.4 and 16.2

pg/mL),  $P<0.05$ ], and ICAM-1 [141 pg/mL (129 and 166) versus 169 pg/mL (143 and 213 pg/mL),  $P<0.01$ ] were found in the 15 patients who were under aspirin treatment at stroke onset compared with those who did not take aspirin.

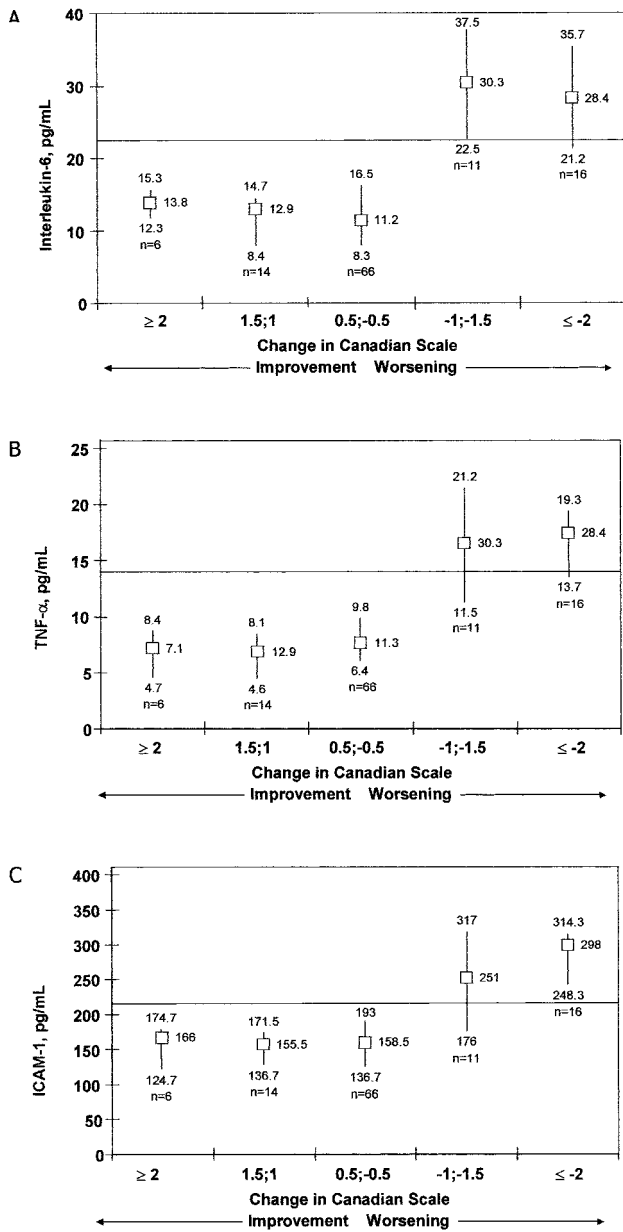
TNF- $\alpha$  [11.5 pg/mL (7.8 and 16.2 pg/mL) versus 7.6 pg/mL (6.2 and 13.3 pg/mL),  $P<0.01$ ] and ICAM-1 [193 pg/mL (153 and 264 pg/mL) versus 162 pg/mL (138 and 196 pg/mL),  $P=0.01$ ] but not IL-6 concentrations were significantly higher in patients with lacunar infarctions located at the basal ganglia and brainstem than in those with normal CT/MRI or lacunar infarctions located at the white matter.

Plasma concentrations of the proinflammatory molecules did not correlate with age, time from stroke onset to inclusion, baseline CSS score, body temperature, systolic and diastolic blood pressures, hematocrit, platelet and leukocyte count, and fibrinogen and glucose levels (data not shown). However, significant correlations were found between glutamate and GABA levels and concentrations of IL-6 ( $r=0.46$  and  $r=-0.47$ ), TNF- $\alpha$  ( $r=0.39$  and  $r=-0.42$ ), and ICAM-1 ( $r=0.34$  and  $r=-0.44$ ) (all  $P<0.001$ ).

END was recorded in 27 patients (23.9%), and poor outcome at 3 months was found in 26 (23%). Thirteen patients (48%) with END and 13 patients (15%) without END had poor outcome ( $P=0.001$ ). As previously described, baseline clinical and radiological factors associated with subsequent END were history of hypertension, high leukocyte count, and basal ganglia or brainstem location of lacunar infarction, whereas prior treatment with aspirin prevented worsening.<sup>30</sup> Patients with poor outcome showed a significantly higher baseline stroke severity (mean $\pm$ SD CSS score,  $7.2\pm 1.0$  versus  $8.0\pm 1.2$ ;  $P=0.003$ ), systolic blood pressure ( $191\pm 26$  versus  $174\pm 25$  mm Hg,  $P=0.006$ ), serum glucose ( $177\pm 39$  versus  $150\pm 48$  mg/dL,  $P=0.009$ ), and body tem-



**Figure 1.** Median values and quartiles (25% and 75%) of plasma inflammatory markers by early clinical course and outcome at 3 months. \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.001$ .



**Figure 2.** Median values and quartiles of plasma inflammatory molecule levels by absolute difference in CSS score between admission and 48 hours. A, IL-6 concentrations (Kruskal-Wallis test,  $P < 0.001$ ); B, TNF- $\alpha$  concentrations (Kruskal-Wallis test,  $P < 0.001$ ); C, ICAM-1 concentrations (Kruskal-Wallis test,  $P < 0.001$ ). Horizontal lines indicate cutoff values as selected by the method of Robert et al.<sup>34</sup>

perature ( $37.0 \pm 0.7^\circ\text{C}$  versus  $36.7 \pm 0.6^\circ\text{C}$ ,  $P = 0.013$ ) compared with those with good outcome.

As shown in Figure 1, median plasma levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , and ICAM-1 on admission were significantly higher in patients with END than in patients who remained stable or improved during the first 48 hours. The levels of the inflammatory molecules were also significantly higher in those patients with poor outcome at 3 months. Although the median values of these biochemical compounds were higher in those patients with any degree of END, we did not observe a graded relationship between concentrations of IL-6, TNF- $\alpha$ , and ICAM-1 and the degree of change in the CSS score (Figure 2).

**TABLE 3.** Adjusted ORs of END for Baseline Clinical, CT, and Biochemical Variables

Variable	OR (95% CI)	P
History of hypertension	79 (4.2–1475)	0.003
Leukocyte count, $10^3/\text{mm}^3$	1.2 (0.70–2.05)	0.517
Topography on CT*	7.7 (0.6–97)	0.113
TNF- $\alpha > 14$ pg/mL	511 (17–14937)	$< 0.001$
ICAM-1 $> 208$ pg/mL	315 (17–5748)	$< 0.001$

Cutoff values of TNF- $\alpha$  and ICAM-1 were calculated by the method of Robert et al.<sup>34</sup> (see Subjects and Methods).

\*Infarct location in basal ganglia or brainstem.

Logistic regression analysis showed that plasma TNF- $\alpha > 14$  pg/mL and ICAM-1  $> 208$  pg/mL were significantly associated with neurological deterioration independently of the history of arterial hypertension, leukocyte count, and infarct location (Table 3). All patients taking aspirin at the onset of stroke had a subsequent nonprogressing course, so the model could not be adjusted for this particular factor. However, the results of the logistic model were not modified after the exclusion of patients under prior treatment with aspirin. The ORs of END for TNF- $\alpha$  and ICAM-1 did not change after adjustment for plasma glutamate and GABA concentrations (Table 4). Plasma TNF- $\alpha > 14$  pg/mL (OR, 3.0; 95% CI, 1.0 to 8.5;  $P = 0.042$ ), ICAM-1  $> 208$  pg/mL (OR, 4.2; 95% CI, 1.3 to 13.6;  $P < 0.001$ ), and baseline CSS score (OR, 0.48; 95% CI, 0.29 to 0.79;  $P = 0.004$ ) were independently associated with poor outcome at 3 months.

### Discussion

This study demonstrates in a large series of patients with lacunar infarctions an independent association of high levels of inflammatory molecules in blood with END and poor outcome. The effect of these compounds on END was stronger because the outcome depends particularly on baseline stroke severity. The mechanisms involved in END of lacunar infarctions have not been clearly established, and it seems unlikely that those factors currently accepted as contributing to worsening in other stroke subtypes offer a full explanation in the case of lacunar stroke. Increase in infarct volume has been proposed as the main cause of neurological deterioration,<sup>6,35</sup> a fact that could be explained by a delayed propagation of neuronal death mediated by multiple molec-

**TABLE 4.** ORs of END for Inflammatory Markers After Adjustment for Serum Glutamate and GABA Concentrations

Variables	OR (95% CI)		
	Model A	Model B	Model C
TNF- $\alpha > 14$ pg/mL	39 (4.6–336)	28 (3.0–266)	37 (1.6–863)
ICAM-1 $> 208$ pg/mL	125 (14.7–1067)	76 (8.1–712)	70 (3.0–1594)
Glutamate $> 200$ $\mu\text{mol/L}$	...	11 (2.1–59)	...
GABA $< 240$ nmol/L	...	...	184 (11.7–2893)

Model A was not adjusted for neurotransmitters; model B was adjusted for serum glutamate concentrations; model C was adjusted for serum GABA concentrations. Cutoff values were calculated by the method of Robert et al.<sup>34</sup> (see Subjects and Methods).

ular and cellular mechanisms such as excitotoxicity and inflammation. We have recently reported that excitotoxicity may play a role in the pathophysiology of progressing lacunar infarctions.<sup>30</sup> High plasma glutamate concentrations and low GABA levels on admission were significantly associated with subsequent neurological worsening. The present findings support the hypothesis that inflammation may also have an important role in the progression of lacunar infarctions.

TNF- $\alpha$  promotes the expression of adhesion molecules such as ICAM-1 on the endothelium, facilitating leukocyte adherence and migration from capillaries into the brain, microvessel occlusion, and subsequently a progressive reduction in blood flow.<sup>13,36</sup> The accumulation of polymorphonuclear neutrophil leukocytes in the ischemic area as a result of the inflammatory process has been proved in a few clinical observations with brain scintigraphy or brain SPECT with labeled leukocytes.<sup>37,38</sup> High levels of TNF- $\alpha$  have been detected as soon as 15 hours in brain samples of stroke victims, peaking during days 2 and 3,<sup>39</sup> and plasma determinations after acute stroke have demonstrated an early activation of ICAM-1, which peaks within 24 hours of cerebral ischemia.<sup>23,25</sup> These findings are in accordance with our results because we found increased TNF- $\alpha$  and ICAM-1 levels within 24 hours (mean, 11 hours) of the onset of lacunar stroke. High levels of adhesion molecules may reflect a prior condition of chronic endothelial activation secondary to risk factors for atherosclerosis<sup>40</sup> such as hypertension, which was significantly more frequent in our patients who had END. In this study, however, high ICAM-1 levels remained independently associated with subsequent END after controlling for the history of hypertension in the logistic analysis.

An interesting finding in this study is that inflammatory molecules contributed to END after adjustment for glutamate and GABA concentrations in blood and that the ORs for TNF- $\alpha$  and ICAM-1 were even higher than that for glutamate concentrations (see Table 4). These results suggest that inflammation may have an additional and stronger role than excitotoxicity in END of lacunar infarctions.<sup>30</sup> On the other hand, inflammatory and excitatory mechanisms might cooperate in the progression of lacunar stroke because we have found a significant correlation between glutamate or GABA concentration and inflammatory markers in blood. Furthermore, as occurred with amino acid concentrations,<sup>30</sup> we have observed higher levels of inflammatory molecules in patients with lacunar infarctions located in basal ganglia and brainstem than in those with white matter infarctions, so excitotoxicity and inflammation might represent sequential and interacting processes in the progression of lacunar stroke, particularly in brain areas with a high density of glutamatergic neurons.<sup>41</sup> This hypothesis is supported by experimental data suggesting that cytokines influence glutamate receptor-mediated excitotoxicity. The addition of TNF- $\alpha$  to human brain cell cultures of embryonic neurons previously treated with glutamate resulted in an increase in neuronal loss, which was blocked with anti-TNF- $\alpha$  antibodies and with the addition of NMDA-receptor antagonists.<sup>42</sup> Other experiments have shown that the infusion of a low dose of IL-1 receptor antagonist causes a 71% reduction in the volume of infarction

induced by NMDA-receptor activation,<sup>43</sup> whereas the administration of IL-10, which has been related to neuroprotective actions, results in a reduction in glutamate-induced neuronal death.<sup>44</sup>

One of the major questions in our study is whether increased inflammatory molecules in blood are the expression of brain ischemia or originate as a result of the acute-phase reaction or systemic causes. Several facts support the idea that plasma levels of IL-6, TNF- $\alpha$ , and ICAM-1 within the first 24 hours of acute stroke reflect the total release of these molecules in the ischemic brain tissue. Although in this work we have not performed CSF determinations, previous studies have shown a good correlation between CSF and plasma levels of inflammatory molecules.<sup>22,27</sup> As we previously reported in this series of patients,<sup>30</sup> END and non-END groups did not show differences with respect to cardiovascular risk factors, stroke severity, pathophysiology, biochemical parameters, and vital signs evaluated at the moment in which blood samples were taken, so we cannot attribute the differences in levels of inflammatory molecules to a different acute-phase response or a distinct prior comorbidity. Although potential asymptomatic infections were not excluded by appropriate serological investigations, fever and other medical conditions were similar in frequency in both groups. However, a possible participation of systemic causes or an acute-phase reaction in the serum levels of inflammatory molecules cannot be totally ruled out.

A further point of interest is that prior treatment with aspirin was associated with lower levels of proinflammatory molecules in blood and with a lack of END in lacunar stroke. Some clinical studies have demonstrated that aspirin may reduce the severity and size of cerebral infarction, as well as the frequency of END.<sup>45,46</sup> Recently, a neuroprotective effect of aspirin has been proposed because low doses of aspirin, at the antiplatelet range, have been related to inhibition of glutamate release in both clinical and experimental conditions of focal cerebral ischemia.<sup>47,48</sup> Furthermore, high doses of aspirin may inhibit the activation of necrosis factor- $\kappa$ B and, in turn, the inflammatory cytokines.<sup>49</sup> However, a confounder effect of aspirin in this study may be reasonably ruled out because the association between high levels of proinflammatory molecules and END or poor outcome remained after exclusion of patients taking aspirin.

Although our work has only partially evaluated the effects of the inflammatory cascade, the present findings suggest that inflammation contributes to the END and poor prognosis of lacunar infarctions. Further studies are needed to confirm these promising results, which open new therapeutic avenues in lacunar infarctions.

### Acknowledgments

This study was partially supported by a grant from the Programa da Promoción Xeral da Investigación do Plan Galego de IDT da Xunta de Galicia (PGIDT99PX120803B) and by the Fundació Doctor Josep Trueta.

### References

1. Fisher CM. Lacunar strokes and infarcts: a review. *Neurology*. 1982;32:871-876.

2. Rascol A, Clanet M, Manelfe C, Guiraud B, Bonafe A. Pure motor hemiplegia: CT study of 30 cases. *Stroke*. 1982;13:11–17.
3. Wisberg LA. Lacunar infarcts: clinical and computed tomographic correlations. *Arch Neurol*. 1982;39:37–40.
4. Lodder J, Gorsselink EL. Progressive stroke caused by CT-verified small deep infarcts; relation with the size of the infarct and clinical outcome. *Acta Neurol Scand*. 1985;71:328–330.
5. Kinataka C, Teraoka A. Conical features of progressive lacunar infarction: retrospective analysis of patients with motor syndromes. *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 1995;35:663–666.
6. Nakamura K, Saku Y, Ibayashi S, Fujishima M. Progressive motor deficits in lacunar infarction. *Neurology*. 1999;52:29–33.
7. Yamamoto H, Bogousslavsky J, van Melle G. Different predictors of neurological worsening in different causes of stroke. *Arch Neurol*. 1998;55:481–486.
8. Petty GW, Brown RD, Whisnant JP, Sicks JD, O'Fallon WM, Wiebers DO. Ischemic stroke subtypes: a population-based study of functional outcome, survival, and recurrence. *Stroke*. 2000;31:1062–1068.
9. Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. Inflammatory mediators and brain injury: the role of cytokines and chemokines in stroke and CNS diseases. In: Ginsberg MD, Bogousslavsky J, eds. *Cerebrovascular Disease: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. Boston, Mass: Blackwell Science; 1998;1:507–531.
10. Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke*. 1995;26:676–681.
11. Barone FC, Arvin B, White RF, Miller A, Webb CL, Willette RN, Lysko PG, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor- $\alpha$ : a mediator of focal ischemic brain injury. *Stroke*. 1997;28:1233–1244.
12. Liu T, McDonnell PC, Young PR, White RF, Siren AL, Hallenbeck JM, Barone FC, Feuerstein GZ. Interleukin-1 $\beta$  expression in ischemic rat cortex. *Stroke*. 1993;24:1746–1752.
13. Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ. Tumor necrosis factor- $\alpha$  in ischemic neurons. *Stroke*. 1994;25:1481–1488.
14. Wang X, Yue T-L, Barone FC, White RF, Gagnon RC, Feuerstein GZ. Concomitant cortical expression of TNF  $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA following transient focal ischemia. *Mol Chem Neuropathol*. 1994;23:103–114.
15. Wang X, Yue T-L, Young PR, Barone FC, Feuerstein GZ. Expression of interleukin-6, *c-fos* and *zif268* mRNA in rat ischemic cortex. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995;15:166–171.
16. Wang X, Siren A-L, Liu Y, Yue T-L, Barone FC, Feuerstein GZ. Upregulation of intracellular adhesion molecule-1 on brain microvascular endothelial cells in ischemic cortex. *Mol Brain Res*. 1994;26:61–68.
17. Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Shozuhara H, Ninomiya M, Kihara T, Tamatani T, Miyasaka M, Kaguro K. Role of cell adhesion molecules in brain injury after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Brain Res*. 1994;656:344–352.
18. Okada Y, Copeland BR, Mori E, Tung MM, Thomas WS, del Zoppo GJ. P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 expression after focal brain ischemia and reperfusion. *Stroke*. 1994;25:202–211.
19. Fassbender K, Rossol S, Kammer T, Daffertshofer M, Wirth S, Dollman M, Hennerici M. Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia: kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease. *J Neurol Sci*. 1994;122:135–139.
20. Farrarrese C, Mascarucci P, Zoia C, Cavarretta R, Frigoo M, Begni B, Sarinella F, Frattola L, De Simoni MG. Increased cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19:1004–1009.
21. Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelsö C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A. Intrathecal release of pro- and anti-inflammatory cytokines during stroke. *Clin Exp Immunol*. 1997;110:492–499.
22. Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Wikkelsö C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A. Early intrathecal production of interleukin-6 predicts the volume of brain lesion in stroke. *Stroke*. 1995;26:1393–1398.
23. Bitsch A, Klene W, Murtada L, Prange H, Rieckmann P. A longitudinal prospective study of soluble adhesion molecules in acute stroke. *Stroke*. 1998;29:2129–2135.
24. Clark WM, Coull BM, Briley DP, Mainolfi E, Rothlein R. Circulating intercellular adhesion molecule-1 levels and neutrophil adhesion in stroke. *J Neuroimmunol*. 1993;44:123–126.
25. Fassbender K, Mössner R, Motsch L, Kischka U, Grau A, Hennerici M. Circulating selectin- and immunoglobulin-type adhesion molecules in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1995;26:1361–1364.
26. Vila N, Filella X, Deulofeu R, Ascaso C, Abellana R, Chamorro A. Cytokine-induced inflammation and long-term stroke functional outcome. *J Neurol Sci*. 1999;162:185–188.
27. Vila N, Castillo J, Dávalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke*. 2000;31:2325–2329.
28. Clark W, Hazel JS, Beamer N, Wynn M, Coull B. The initial acute phase response predicts long term stroke recovery. *Stroke*. 1996;27(pt 2):186. Abstract.
29. Elneihoum AM, Falke P, Axelsson L, Lundberg E, Lindgärde F, Ohlsson K. Leukocyte activation detected by increased plasma levels of inflammatory mediators in patients with ischemic cerebrovascular diseases. *Stroke*. 1996;27:1734–1738.
30. Serena J, Leira R, Castillo J, Pumar J, M, Castellanos M, Dávalos A. Neurological deterioration in acute lacunar infarctions: the role of excitatory and inhibitory neurotransmitters. *Stroke*. 2001;32:1154–1161.
31. Bamford J, Sandercock P, Jones L, Warlow C. The natural history of lacunar infarction: the Oxfordshire Community Stroke Project. *Stroke*. 1987;18:545–551.
32. Cote R, Battista RN, Wolfson C, Boucher J, Adam J, Hachinski V. The Canadian Neurological Scale: validation and reliability assessment. *Neurology*. 1989;39:638–643.
33. Sluter G, Steen C, De Keyser J. Use of Barthel Index and modified Rankin Scale in acute stroke trials. *Stroke*. 1999;30:1538–1541.
34. Robert C, Vermont J, Bosson JL. Formulas for threshold computations. *Comput Biomed Res*. 1991;24:514–519.
35. Terai S, Hori T, Miale S, Tamaki K, Saishoji A. Mechanism in progressive lacunar infarction: case report with magnetic resonance imaging. *Arch Neurol*. 2000;57:255–258.
36. Feuerstein GZ, Liu T, Barone FC. Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1994;6:341–360.
37. Pozzilli C, Lenzi GL, Argentino C, Carole A, Rasura M, Signore A, Bozzano L, Pozzilli P. Imaging of leukocyte accumulation in human cerebral infarcts. *Stroke*. 1985;16:251–255.
38. Akopov SE, Simonian NA, Grigorian GS. Dynamic of polymorphonuclear leukocyte accumulation in acute cerebral infarction and their correlation with brain tissue damage. *Stroke*. 1996;27:1739–1743.
39. Sairanen T, Carpen O, Karjalainen-Lindsberg ML, Paetau A, Turpeinen U, Kaste M, Lindsberg P. Evolution of cerebral tumor necrosis factor- $\alpha$  production during human ischemic stroke. *Stroke*. 2001;32:1750–1758.
40. Davies MJ, Gordon JL, Gearin AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A. The expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol*. 1993;171:223–229.
41. Greenamyre JT, Porter RHP. Anatomy and physiology of glutamate in the CNS. *Neurology*. 1994;44:S7–S13.
42. Chao CC, Hu S. Tumor necrosis factor-alpha potentiates glutamate neurotoxicity in human fetal brain cell cultures. *Dev Neurosci*. 1994;16:172–179.
43. Relton JK, Rothwell NJ. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. *Brain Res Bull*. 1992;29:243–246.
44. Grilli M, Barbieri I, Basudev H, Brusa R, Casti C, Lozza G, Ongini E. Interleukin-10 modulates neuronal threshold of vulnerability to ischaemic damage. *Eur J Neurosci*. 2000;12:2265–2272.
45. Grotta JC, Welch KMA, Fagan SC, Lu M, Frankel MR, Brott T, Levine SR, Lyden PD, for the NINDS rt-PA Stroke Study Group. Clinical deterioration following improvement in the NINDS rt-PA Stroke Trial. *Stroke*. 2001;32:661–668.
46. Grotta JC, Lernak NA, Gary H, Fields WS, Vital D. Does platelet antiaggregant therapy lessen the severity of stroke? *Neurology* 1985;35:632–636.
47. Castillo J, Moro MA, Serena J, Leira R, Lizasoain I, Dávalos A. Neuroprotective effects of aspirin in acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2000;10:85. Abstract.
48. De Cristóbal J, Moro MA, Dávalos A, Castillo J, Leza JC, Camarero J, Colado MI, Lorenzo P, Lizasoain I. Neuroprotective effect of aspirin by inhibition of glutamate release after permanent focal cerebral ischaemia in rats. *J Neurochem*. 2001;79:1–5.
49. Cechetto DF. Role of nuclear factor kappa B in neuropathological mechanisms. *Prog Brain Res*. 2001;132:401–414.

# Plasma Metalloproteinase-9 Concentration Predicts Hemorrhagic Transformation in Acute Ischemic Stroke

Mar Castellanos, MD; Rogelio Leira, MD, PhD; Joaquín Serena, MD, PhD; José M. Pumar, MD, PhD; Ignacio Lizasoain, MD, PhD; José Castillo, MD, PhD; Antoni Dávalos, MD, PhD

**Background and Purpose**—Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity has been associated with hemorrhagic transformation (HT) in experimental models of cerebral ischemia. Our aim was to investigate the relationship between MMP-9 concentrations in blood within 24 hours of stroke onset and subsequent HT of cerebral infarction.

**Methods**—We studied 250 patients with a hemispheric ischemic stroke of  $7.8 \pm 4.5$  hours' duration. Early CT signs of cerebral infarction were evaluated on admission. The HT and infarct volume were analyzed from the CT performed on days 4 through 7. MMP-9 levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay in blood samples obtained on admission.

**Results**—HT was observed in 38 patients (15.2%); 24 (63.2%) had a hemorrhagic infarction, and 14 (36.8%) had a parenchymal hematoma. A total of 108 patients (43%) received anticoagulants before the second CT scan. Systolic and diastolic blood pressures, body temperature, frequency of early CT signs of ischemia (92% versus 22%), and treatment with anticoagulants (79% versus 37%) were significantly higher in the group with HT ( $P < 0.001$ ). Mean infarct volume was  $126 \pm 60$  cm<sup>3</sup> in the HT group and  $90 \pm 68$  cm<sup>3</sup> in the group without HT ( $P = 0.003$ ). Median (quartiles) plasma MMP-9 concentrations were higher in the HT group (193 [163, 213] versus 62 [40, 93] ng/mL,  $P < 0.001$ ), even in the 24 patients seen within 3 hours of symptom onset ( $P = 0.014$ ). MMP-9 levels  $\geq 140$  ng/mL had a positive and negative predictive value of HT of 61% and 97%, respectively. MMP-9  $\geq 140$  ng/mL was associated with HT (odds ratio, 12; 95% confidence interval, 3 to 51;  $P < 0.001$ ) after adjustment for potential confounders and final infarct volume.

**Conclusions**—High plasma MMP-9 concentration in the acute phase of a cerebral infarct is an independent biochemical predictor of HT in all stroke subtypes. (*Stroke*. 2003;34:40-46.)

**Key Words:** metalloproteinases ■ stroke, acute ■ stroke, hemorrhagic ■ thrombolytic therapy

The risk of hemorrhagic transformation (HT) after cerebral ischemia is of great concern to the clinician. Although it may develop as part of the natural evolution of ischemic brain injury,<sup>1</sup> HT frequently occurs as a result of the use of anticoagulants or thrombolytic therapy in the acute phase of stroke.<sup>2,3</sup> Factors such as the severity of stroke,<sup>4</sup> hypertension,<sup>5</sup> age,<sup>4</sup> the dosage of the thrombolytic agent administered,<sup>5-7</sup> and the presence of early ischemic changes on the cranial CT on admission<sup>4</sup> have been related to HT after the ischemic event. However, the underlying mechanisms mediating the occurrence of the HT of an ischemic area are not completely understood.

The loss of integrity of the endothelial basal lamina seems to be the primary cause of hemorrhage after focal cerebral ischemia.<sup>8</sup> Matrix metalloproteinases (MMPs), a group of proteolytic zinc-dependent enzymes whose expression has been shown to be significantly increased during stroke in humans<sup>9-11</sup> and in experimental models of focal ische-

## See Editorial Comment, page 45

mia,<sup>12-16</sup> are able to degrade the endothelial basal lamina.<sup>17</sup> In fact, it has been demonstrated that MMP-9 contributes to edema and hemorrhage after disruption of the basal lamina in an experimental model using bacterial collagenase,<sup>18</sup> and a significant increase in MMP-9 levels has also been reported in nonhuman primates with HT of the brain infarction.<sup>12</sup> Moreover, administration of an MMP inhibitor in rats significantly reduces the incidence<sup>19</sup> and severity<sup>20</sup> of tissue plasminogen activator (TPA)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke without altering the rate of hemorrhage in the absence of TPA administration.<sup>19</sup> This finding might suggest that increased expression of MMPs in cerebral ischemia may account, at least in part, for the increased rate of hemorrhagic events associated with the administration of TPA as a therapy in stroke patients.

Received April 5, 2002; final revision received July 25, 2002; accepted August 1, 2002.

From Hospital Universitari Doctor Josep Trueta, Girona (M.C., J.S., A.D.); Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid (I.L.); and Hospital Clínico Universitario, Santiago de Compostela (R.L., J.M.P., J.C.), Spain.

Presented in part at the 27th International Stroke Conference in San Antonio, Tex, February 2002.

Correspondence to Dr Antoni Dávalos, Section of Neurology, Hospital Universitari Doctor Josep Trueta, E-17007 Girona, Spain. E-mail min.adavalos@htrueta.scs.es

© 2003 American Heart Association, Inc.

Stroke is available at <http://www.strokeaha.org>

DOI: 10.1161/01.STR.0000046764.57344.31



Montaner et al<sup>21</sup> have recently demonstrated an association between serum MMP-9 expression and late hemorrhagic infarction after human cardioembolic stroke. Given that thrombolysis has proved to be effective in the treatment of all stroke subtypes, our aim in the present study was to investigate the potential association between plasma MMP-9 concentrations and the subsequent HT of cerebral infarct in a large series of patients with all subtypes of acute ischemic stroke, particularly in those patients seen within 3 hours of symptom onset, given the time frame for TPA infusion.

## Subjects and Methods

Between March 1999 and February 2000, we prospectively studied 250 patients with a first episode of hemispheric ischemic stroke admitted within the first 24 hours of symptom onset to the stroke unit of a university hospital. A control group of 34 healthy subjects (male, 56%; mean age, 59±13 years) without neurological disorders or inflammatory diseases was also studied. All patients had a persistent focal neurological deficit and an absence of cerebral hemorrhage on the cranial CT performed before inclusion. Patients with inflammatory or infectious diseases, cancer, hematological diseases, and severe renal and liver failure and those who were previously dependent were excluded. The study was approved by the ethics committee, and informed consent was obtained from the patients or their relatives. The time from symptom onset to neurological attention (inclusion delay) was 7.8±4.5 hours (range, 1 to 23 hours). Medical history and stroke risk factors were recorded for all patients. Clinical examination, blood and coagulation tests, 12-lead ECG, chest radiography, and cranial CT were carried out on admission. Stroke subtype was classified according to the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) criteria.<sup>22</sup> Stroke severity was quantified by an experienced neurologist using the Canadian Stroke Scale (CSS) on admission and at 72 hours. Early neurological deterioration was defined as a drop of ≥1 points in the CSS score between the 2 evaluations. After admission to the stroke unit, only patients who had a systolic blood pressure ≥220 mm Hg or a diastolic blood pressure ≥120 mm Hg received antihypertensive treatment. Subcutaneous low-dose heparin was given as prophylaxis against pulmonary thromboembolism, and antiplatelet drugs (aspirin or clopidogrel) were prescribed during hospitalization in atherothrombotic and lacunar infarctions. Intravenous heparin was administered only to patients with a major cardioembolic source and when cranial CT and clinical examination excluded a large cerebral infarction. The activated partial thromboplastin time was maintained below 2.0 times the control value. No patients received thrombolytic therapy.

Early CT signs of infarction, which included the presence of focal hypodensity consistent with the clinical picture, obscuration of the lenticular nucleus, obscuration of the cortex, and mass effect with effacement of the cortical sulci and/or shifting of the structures of the median line, were evaluated in the first radiological examination. To measure the infarct volume and to evaluate the presence of HT, a second cranial CT was performed between days 4 and 7 of hospitalization or earlier in the case of neurological deterioration. Infarct volume was determined by the formula  $0.5 \times a \times b \times c$ , where *a* and *b* are the largest perpendicular diameters measured on CT and *c* is the slice thickness. The type of HT was classified according to the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS)-II criteria.<sup>23</sup> Hemorrhagic infarction type 1 (HI-1) was defined as small petechiae along the margins of the infarct, and HI type 2 (HI-2) was defined as more confluent petechiae within the infarcted area but without a space-occupying effect. Parenchymal hemorrhage type 1 (PH-1) was defined as hematoma in ≤30% of the infarcted area but with some slight space-occupying effect; PH type 2 (PH-2) was defined as dense hematoma >30% of the infarcted area with substantial space-occupying effect or as any hemorrhagic lesion outside the infarcted area. All CT evaluations were made by the same neuroradiologist (J.M.P.) who was blinded to the clinical and analytical

results. For the purpose of this investigation, we considered symptomatic HT those associated with early neurological deterioration.

## Laboratory Tests

Blood samples were collected on admission to the Emergency Department in glass test tubes containing potassium edetate. Suspensions of plasma were centrifuged at 3000g for 5 minutes and immediately frozen and stored at -80°C. Plasma MMP-9 was measured with commercially available quantitative sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay kits obtained from Biotrack, Amersham Pharmacia UK. MMP-9 determinations were performed by researchers blinded to clinical and radiological data.

## Statistical Analysis

Proportions between groups were compared by use of the  $\chi^2$  test. Continuous variables are expressed as mean±SD and were compared by use of Student's *t* test. Given that MMP-9 levels were not normally distributed, they were expressed as median (quartiles) and compared between the 2 groups by the Mann-Whitney test.

Spearman's correlation coefficient was used to analyze the association between MMP-9 concentration and baseline continuous variables, including age, time from onset to inclusion, CSS score, systolic and diastolic blood pressures, and body temperature.

We used cutoff values, as described by Robert et al,<sup>24</sup> to estimate the sensitivity, specificity, and predictive values of a specific concentration of plasma MMP-9 for HT. Logistic regression analysis was used to determine the importance of MMP-9 for HT after adjustment for those variables related to HT in the univariate analysis. To test whether the odds of HT for MMP-9 were substantially modified by the stroke subtype effect, we performed 2 different logistic models: Model A was not adjusted for stroke subtype, whereas model B included the selected variables in model A plus the stroke subtype. MMP-9 was included as a categorical variable because the cutoff value meant that there was a lack of linearity of the odds ratios (OR; 1=high, 0=low).

## Results

Thirty-eight (15.2%) of the 250 patients included in the study showed HT on the second cranial CT. Eight patients (21.1%) had HI-1, 16 (42.1%) had HI-2, 12 (31.6%) had PH-1, and 2 (5.3%) had PH-2. Table 1 shows the main characteristics of patients with and without HT. Cardioembolic stroke and treatment with anticoagulants were significantly more frequent, and systolic and diastolic blood pressures and body temperature were significantly higher in patients with HT. Early CT signs of cerebral infarction were more frequent in the group with secondary bleeding, and these patients showed larger infarct volumes than those without HT. Neurological deterioration was observed in 41% of patients with HT and in 22% of those without ( $P=0.013$ ). Fifty-seven percent of PH were symptomatic compared with 33% of HI ( $P=0.18$ ). Systolic and diastolic blood pressures on admission showed a trend to be higher in PH than in HI ( $P<0.1$ ), whereas anticoagulant treatment and early signs on CT were not different between the 2 types of HT (data not shown).

Plasma MMP-9 concentrations on admission were significantly higher in patients with subsequent HT (193 [163, 213] ng/mL) than in those without HT (62 [40, 93] ng/mL) and in the control group (56 [39, 79] ng/mL;  $P<0.001$ ). This effect was found for each stroke subtype (Table 2). Among the 24 patients (9.6%) who arrived at the hospital within the first 3 hours from symptom onset, MMP-9 concentrations on admission were also significantly higher in patients with HT than in those without HT ( $P=0.028$ ) (Figure 1). We did not find

**TABLE 1. Baseline Vascular Risk Factors, Clinical Characteristics, Stroke Subtype, Biochemical Parameters, and Neuroimaging Findings in Patients With and Without Hemorrhagic Transformation**

	Hemorrhagic Transformation (n=38)	Nonhemorrhagic Transformation (n=212)	P Value
Male, n (%)	20 (52.6)	114 (53.8)	0.897
Age, y	72.3±9.2	72.2±8.3	0.927
Time from stroke onset to blood sampling, h	8.4±4.4	7.7±4.5	0.424
Clinical characteristics			
Canadian Stroke Scale on admission	4.5±1.7	4.9±1.8	0.262
Stroke subtype, n (%)			<0.001
Large-artery atherosclerosis	4 (10.5)	92 (43.4)	
Cardioembolism	28 (73.7)	70 (33.0)	
Small-vessel disease	0	41 (19.3)	
Undetermined etiology	6 (15.8)	9 (4.2)	
Anticoagulant treatment, n (%)	30 (78.9)	78 (36.8)	<0.001
Biochemistry and vital signs at admission			
Plasma glucose, mg/dL	158±48	153±65	0.664
Systolic blood pressure, mm Hg	218±27	172±32	<0.001
Diastolic blood pressure, mm Hg	120±17	93±22	<0.001
Body temperature, °C	37.2±0.64	36.9±0.66	<0.001
Partial thromboplastin time, s	26.0±2.9	26.1±2.9	0.965
Plasma fibrinogen, mg/dL	395±114	369±96	0.165
Platelets (×1000 mm <sup>3</sup> )	180±60	181±65	0.944
Neuroimaging findings			
Early signs of infarction, n (%)	35 (92.1)	46 (21.7)	<0.001
Ultimate infarct volume, cm <sup>3</sup>	126±60	91±68	0.003

Continuous variables are expressed as mean±SD.

significant differences in MMP-9 levels between each subtype of HT (Figure 2) or between symptomatic and asymptomatic HT (186 [165, 206] versus 204 [156, 215] ng/mL;  $P=0.23$ ). The sensitivity, specificity, positive predictive value, and negative predictive value of plasma MMP-9 levels of  $\geq 140$  ng/mL for HT were 87%, 90%, 61%, and 97%, respectively.

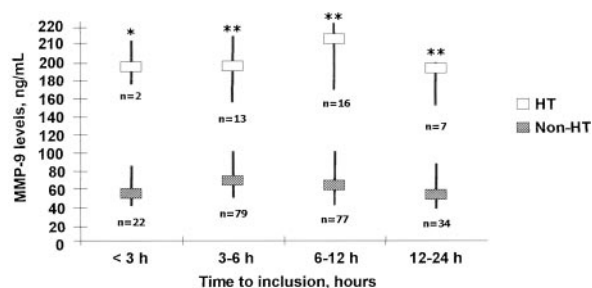
A highly significant correlation was found between plasma MMP-9 levels and systolic and diastolic blood pressures on admission ( $r=0.70$ ,  $P<0.001$  and  $r=0.63$ ,  $P<0.001$ , respectively) but not between MMP-9 concentrations and other prognostic variables such as body temperature, serum glucose, and stroke severity (all  $r<0.05$ ). Early signs of ischemia

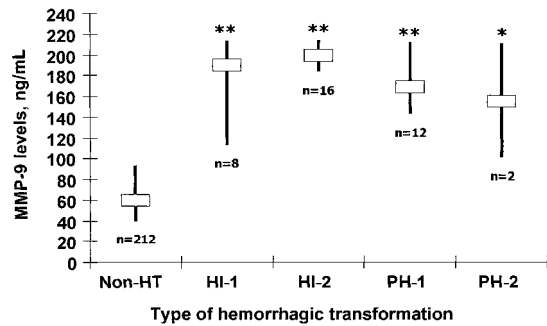
on cranial CT were associated with high levels of MMP-9 (163 [110, 193] versus 54 [38, 74] ng/mL;  $P<0.001$ ), but MMP-9 did not correlate with the ultimate infarct volume ( $r=0.01$ ).

Plasma MMP-9  $\geq 140$  ng/mL was significantly associated with subsequent HT in the logistic regression analysis after adjustment for body temperature, systolic and diastolic blood pressures, treatment with anticoagulants, presence of early signs of infarction on cranial CT, and ultimate infarct volume (OR, 12; 95% CI, 3 to 51;  $P<0.001$ ). Further adjustment for stroke subtype (cardioembolic or cryptogenic versus atherothrombotic or lacunar) did not substantially change the OR

**TABLE 2. Median [Quartiles] Plasma Concentrations of MMP-9 (ng/mL) on Admission by Stroke Subtype in Patients With and Without Hemorrhagic Transformation**

Stroke Subtype	Hemorrhagic Transformation (n=38)	Nonhemorrhagic Transformation (n=212)	P Value
Large-artery atherosclerosis	213 [137,217]	50 [38,99]	0.002
Cardioembolic	193 [169,212]	64 [43,88]	0.000
Small-vessel disease		64 [50,88]	
Cryptogenic	165 [93,217]	68 [50,124]	0.025

**Figure 1.** Median values and quartiles of plasma MMP-9 levels by intervals of time to inclusion. \* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.001$ .



**Figure 2.** Median values and quartiles of plasma MMP-9 levels in each subgroup of HT. Comparisons have been made between each subgroup of HT and the group of patients without HT. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.001$ .

for plasma MMP-9  $\geq 140$  ng/mL (OR, 16; 95% CI, 3 to 79;  $P < 0.001$ ; Table 3).

## Discussion

Although thrombolytic treatment has proved to be the only effective therapy in acute ischemic stroke,<sup>3</sup> the risk of cerebral hemorrhage often precludes its use in clinical practice. Therefore, it is extremely important to find early specific markers heralding HT in cerebral infarction. The present study has shown a significant association between high levels of MMP-9 in blood within 24 hours from stroke onset and subsequent HT in a large and nonselected series of patients. MMP-9  $< 140$  ng/mL had a 97% negative predictive value, so this cut point might be used in clinical practice as an indicator of a low risk of secondary bleeding. Our findings also confirm the previously reported association between MMP-9 expression and HT in a small series of patients with cardioembolic stroke<sup>21</sup> but extend this effect to those with large-artery atherosclerosis and cryptogenic stroke. Interestingly, the odds of HT for MMP-9 in the logistic model were even higher after adjustment for stroke subtype.

The role of MMP-9 in HT may be linked to its actions on microvascular integrity.<sup>25</sup> It has been shown that the antigens of the basal lamina components such as laminin, collagen IV, and fibronectin disappear during experimental focal cerebral

ischemia,<sup>26</sup> and this effect has been associated with cerebral bleeding after middle cerebral artery occlusion in nonhuman primates.<sup>8</sup> The activation of MMPs appears to play a primary role in basal lamina degradation and secondary HT of the ischemic area.<sup>9–14</sup> Rosenberg et al<sup>27</sup> reported that the intracerebral injection of MMP-2 provokes the disruption of the endothelial basal lamina and secondary necrosis and hemorrhage of the brain region that, in turn, are reduced by the administration of an MMP-2 inhibitor. Expression of MMP-9 but not MMP-2 occurs very early in the ischemic basal ganglia of nonhuman primates displaying HT.<sup>12</sup> In rat stroke models, MMP-9 activity increases by 6 to 24 hours after cerebral ischemia, whereas MMP-2 activity increases by 5 days after the ischemic event.<sup>13,20</sup> Clinical data have also demonstrated an association between MMP-9 in blood and HT but failed to obtain any association between MMP-2 and secondary bleeding.<sup>21</sup> From these findings and the temporal profile of release of MMP-9 and MMP-2, we decided to analyze only plasma MMP-9 concentrations.

MMP-9 values in our patients did not discriminate between HI and PH, because we found similar levels in both types of HT (see Figure 2). Therefore, we hypothesize that other factors such as anticoagulant or thrombolytic treatment and high systolic blood pressure might contribute to the severity of the HT after basal lamina disruption. Interestingly, we found a highly significant correlation between MMP-9 concentrations and systolic blood pressure on admission. Hypertension might lead to blood extravasation as a result of abrupt reperfusion, resulting in the enhanced generation of free radicals that damage the microvasculature, or simply as a result of the higher pressure of blood passing through microvessels debilitated by the ischemic process.<sup>28</sup> This fact might be particularly important in patients treated with TPA, because it has recently been shown in an experimental model of thromboembolic stroke in rats that TPA-induced hemorrhage depends on blood pressure and that the risk of HT is reduced by pharmacologically decreasing hypertension during fibrinolysis.<sup>28</sup> Hypertension, like other vascular risk factors related to atherosclerosis, is responsible for chronic endothelial activation secondary to a high level of inflammatory molecules that may attack the microvasculature, making the vessels much more vulnerable to the proteolytic action of MMPs.<sup>29</sup> Moreover, a close relationship between the release of MMPs and cytokines, especially tumor necrosis factor- $\alpha$ , has been demonstrated,<sup>30–33</sup> so the high correlation between systolic blood pressure and MMP-9 levels might reflect the interaction between inflammatory and proteolytic mechanisms, together leading to the HT of the ischemic area.

Although not supported by angiographic studies, recanalization of the occluded vessel and secondary reperfusion after embolic stroke have classically been accepted as the mechanisms responsible for HT.<sup>34</sup> Other authors have suggested that HT might also occur through reperfusion via pial collaterals initially occluded by the pressure secondary to edema and reopened when the edema decreases.<sup>1,35</sup> In agreement with this hypothesis, we have observed a significant relationship between the presence of early signs of cerebral ischemia on CT, which likely reflects cytotoxic and vasogenic edema, and HT. The strong association between MMP-9 and early signs

**TABLE 3. Adjusted Odds Ratios of Hemorrhagic Transformation for Baseline Clinical, CT, and Biochemical Variables, Ultimate Infarct Volume, and Stroke Mechanism**

Variables	Odds Ratio (95% CI)	
	Model A	Model B
Temperature	1.4 (0.5–3.7)	
Volume of infarction	1.0 (0.99–1.01)	
Diastolic blood pressure	0.94 (0.88–1.02)	
Systolic blood pressure	1.05 (1.00–1.11)	1.02 (1.00–1.04)
Early signs of ischemia	8.0 (1.2–51.6)	0.4 (0.07–2.38)
Anticoagulant treatment	3.7 (1.1–11.8)	2.6 (0.4–118)
MMP-9 $\geq 140$ ng/mL	12 (2.9–50)	16 (3.3–79)
Stroke subtype*		22 (2.6–194)

\*Cardioembolic or cryptogenic stroke versus atherothrombotic or lacunar stroke.

of ischemia but not between MMP-9 and the ultimate infarct volume suggests that increased MMP-9 is not an epiphenomenon of larger cerebral infarcts and that it may be responsible mainly for vasogenic edema. The lack of collateral circulation could also explain the lack of HT for small-vessel disease infarctions located in terminal areas of vascularization.

Because this study was conducted before the lack of data on the indication of anticoagulant treatment was pointed out,<sup>36</sup> and in agreement with its extensive use in clinical routine for cardioembolic stroke, arterial dissections, intracranial stenosis, etc.,<sup>37</sup> a large number of patients in this study received intravenous heparin in the acute phase of stroke. Moreover, data from Adams et al<sup>36</sup> were based mainly on the results of clinical trials with low-molecular-weight heparin and heparinoids published after 1999. Anticoagulant therapy was an independent predictor of subsequent HT, although this effect disappeared after adjustment for the stroke mechanism. In this study, we did not find an association between anticoagulants and PH or symptomatic HT, so a potential interaction of these drugs with MMP-9 on the severity of HT was unlikely. Anticoagulants were administered after the blood samples for MMP-9 determination were drawn, so we can reasonably exclude a drug effect on MMP-9 levels.

The present study has some limitations. First, we included 24 patients within 3 hours from symptom onset, but only 2 of them subsequently developed HT. These numbers are too small to conclude that MMP-9 is a good predictor for HT within this time frame. Second, although the effect of MMP-9 on HT was independent of other well-known risk factors for secondary bleeding, we cannot completely rule out an increase of plasma MMP-9 levels as a result of the acute-phase reaction or prior systemic causes. However, we hypothesize that high plasma MMP-9 concentrations were related to HT, because increased MMP-9 levels were detected on admission in patients who subsequently developed HT in whom initial stroke severity and final infarct volume were similar to those without HT. Therefore, we cannot attribute plasma MMP-9 increases to the extent of brain damage or to tissue destruction after HT. Although the origin of MMP-9 in plasma is difficult to assess, neutrophils and macrophages arriving at the ischemic area during reperfusion might release MMP-9, resulting in the degradation of the basement membranes and in high plasma concentrations of these molecules.<sup>38</sup> On the other hand, because the generation of thrombin during hemorrhage may stimulate MMP release from myointimal smooth muscle cells,<sup>39</sup> the increase of MMP-9 in patients with HT could be, at least in part, the consequence and not the cause of secondary bleeding after stroke. However, because MMP-9 concentrations were determined in blood samples taken on admission before HT appeared on CT scans, we can reasonably exclude high MMP-9 levels secondary to intracerebral bleeding. A further point of interest is that in contrast with a previous study,<sup>11</sup> MMP-9 concentrations in patients without HT were similar to those in the control group, a fact that might indicate no or a minor pathophysiological role of MMP-9 in the early acute phase of cerebral ischemia. Prolonged arterial occlusions<sup>11</sup> or a genetic susceptibility to overexpress MMP-9 in response to ischemia<sup>40</sup> could explain increased concentrations in patients with secondary bleeding.

In conclusion, we have demonstrated that high plasma levels of MMP-9 are independently associated with HT in acute ischemic stroke. Importantly, MMP-9 <140 ng/dL had a very high negative predictive value for HT. Further studies are needed to clarify whether MMP-9 assessed within 3 hours from stroke onset may predict HT in patients treated with TPA. If this is confirmed, MMP-9 determination could be used in routine clinical practice to improve the risk-to-benefit ratio of thrombolytic treatment.

### Acknowledgments

This study was financed in part by the Programa da Promoción Xeral da Investigación do Plan Galego de IDT da Xunta de Galicia (PGIDT99PX120803B), Fondo de Investigaciones Sanitarias (01/0960), and Fundació Doctor Josep Trueta. We acknowledge Dr Maria García, Research Unit, Hospital Universitari Doctor Josep Trueta, Girona, Spain, for statistical support for this work.

### References

1. Toni D, Fiorelli M, Bastianello S, Sacchetti ML, Sette G, Argentino C, Montinaro E, Bozzao L. Hemorrhagic transformation of brain infarct: predictability in the first 5 hours from stroke onset and influence on clinical outcome. *Neurology*. 1996;46:341–345.
2. Babikian VL, Kase CS, Pessin MS, Norrving B, Gorelick PB. Intracerebral hemorrhage in stroke patients anticoagulated with heparin. *Stroke*. 1989;20:1500–1503.
3. National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*. 1995;333:1581–1587.
4. Larue V, von Kummer R, del Zoppo G. Hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke: potential contributing factors in the European Cooperative Acute Stroke Study. *Stroke*. 1997;28:957–960.
5. Levy DE, Brott TG, Haley EC Jr, Marler JR, Sheppard GL, Barsan W, Broderick JP. Factors related to intracerebral hematoma formation in patients receiving tissue-type plasminogen activator for acute ischemic stroke. *Stroke*. 1994;25:291–297.
6. Brott TG, Haley EC, Levy DE, Barsan W, Broderick J, Sheppard GL, Spilker J, Kongable GL, Massey S, Reed R, et al. Urgent therapy for stroke, I: pilot study of tissue plasminogen activator administered within 90 minutes. *Stroke*. 1992;23:632–640.
7. Haley EC, Levy DE, Brott TG, Sheppard GL, Melvin CWW, Kongable GL, Torner JC, Marler JR. Urgent therapy for stroke, II: pilot study of tissue plasminogen activator administered within 91–180 minutes from onset. *Stroke*. 1992;23:641–645.
8. Hamann GF, Okada Y, del Zoppo GJ. Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16:1373–1378.
9. Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miler KM, Esiri MM, Perry VH. Differential matrix metalloproteinases expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1997;23:406–415.
10. Clark AW, Krokoski CA, Bou S-S, Chapman KR, Edwards DR. Increased gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) activities in human brain after focal ischemia. *Neurosci Lett*. 1997;238:53–56.
11. Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina C, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, González MA, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke*. 2001;32:1759–1766.
12. Hoe Heo J, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19:624–633.
13. Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16:360–366.
14. Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke*. 1998;29:1020–1030.
15. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rats. *Stroke*. 1998;29:2189–2185.

16. Gasche Y, Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin J-C, Kainrase M, Massengale J, Chan PH. Early appearance of activated metalloproteinase-9 after focal cerebral ischemia in mice: a possible role in blood-brain barrier dysfunction. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19:1020–1028.
17. Romanic AM, Madri JA. Extracellular matrix-degrading proteinases in the nervous system. *Brain Pathol.* 1994;4:145–156.
18. Rosenberg GA, Mun-Bryce S, Wesley M, Kornfeld M. Collagenase-induced intracerebral hemorrhage in rats. *Stroke.* 1990;21:801–807.
19. Lapchak PA, Chapman D, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (tissue plasminogen activator)-induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke.* 2000;31:3034–3040.
20. Sumii T, Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke.* 2002;33:831–836.
21. Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina CA, Anglés A, Abilleira S, Arenillas J, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression is related to hemorrhagic transformation after cardioembolic stroke. *Stroke.* 2001;32:2762–2767.
22. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE. Classification of subtype of acute ischemic stroke: definitions for use in a multicenter clinical trial: TOAST: Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke.* 1993;24:35–41.
23. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Dávalos A, Deier D, Larrue V, Bluhmki E, Davis S, Donan J, Schneider D, Díez-Tejedor E, Trovillas P, for the Second European-Australian Acute Stroke Study Investigators. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). *Lancet.* 1998;352:1245–1251.
24. Robert C, Vermont J, Bosson JL. Formulas for threshold computations. *Comput Biomed Res.* 1991;24:514–519.
25. Hamman GF, del Zoppo GJ, von Kummer R. Hemorrhagic transformation of cerebral infarction: possible mechanisms. *Thromb Haemost.* 1999;82(suppl 1):92–94.
26. Hamann GI, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo GJ. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke.* 1995;26:2120–2126.
27. Rosenberg GA, Kornfeld M, Estrada E, Kelley RO, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. TIMP-2 reduces proteolytic opening of blood-brain barrier by type IV collagenase. *Brain Res.* 1992;576:203–207.
28. Tejima E, Katayama Y, Suzuki Y, Kano T, Lo EH. Hemorrhagic transformation after fibrinolysis with tissue plasminogen activator: evaluation of role of hypertension with rat thromboembolic stroke model. *Stroke.* 2001;32:1336–1340.
29. Davis MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol.* 1993;171:223–229.
30. Gearing AJ, Beckett P, Christodoulou M, Churchill M, Clemens J, Davidson AH, Drummond AH, Galloway WA, Gilber L, Gordon JL, Leber TM, Mangan M, Miller K, Nayee P, Owen K, Patel S, Thomas W, Wells G, Wood LM, Woolley K. Processing of tumour necrosis factor- $\alpha$  precursor by metalloproteinases. *Nature.* 1994;370:555–557.
31. McGeehan GM, Becherer JD, Bast RC Jr, Boyer CM, Champion B, Connolly KM, Conway JG, Furdon P, Karp S, Kidao S. Regulation of tumour necrosis factor- $\alpha$  processing by a metalloproteinase inhibitor. *Nature.* 1994;470:558–561.
32. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE, Stetler-Stevenson WG. Tumour necrosis factor- $\alpha$ -induced gelatinase B causes delayed opening of the blood-brain barrier: an expanded therapeutic window. *Brain Res.* 1995;703:151–155.
33. Mun-Bryce S, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18:1163–1172.
34. Fisher CM, Adams RD. Observations on brain embolism with special reference to the mechanism of hemorrhagic transformation. *J Neuro-pathol Exp Neurol.* 1951;10:92–94.
35. Ogada J, Yutani C, Imakita M, Ishibashi-Ueda H, Saku Y, Minematsu K, Sawada T, Yamaguchi T. Hemorrhagic infarct of the brain without a reopening of the occluded arteries in cardioembolic stroke. *Stroke.* 1989;20:876–883.
36. Adams HP. Emergent use of anticoagulation for treatment of patients with ischemic stroke. *Stroke.* 2002;33:856–861.
37. Grau AJ, Hacke W. Is there still a role for intravenous heparin in acute stroke? Yes. *Arch Neurol.* 1999;56:1159–1160.
38. Rantola-Ryhänen S, Ryhänen L, Nowak FV, Vitto J. Proteinases in human polymorphonuclear leukocytes: purification and characterization of an enzyme which cleaves denatured collagen and a synthetic peptide with a Gly-Ile sequence. *Eur J Biochem.* 1983;134:129–137.
39. Fabunmi RP, Baker AH, Murray EJ, Booth RFG, Newby AC. Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 Kda and 72 Kda gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases 1, -2, and -3 in rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem J.* 1996;315:335–342.
40. Ye S. Polymorphism in matrix metalloproteinase gene promoters: implication in regulation of gene expression and susceptibility of various diseases. *Matrix Biol.* 2000;19:623–629.

## Editorial Comment

### Unriddling the Role of Matrix Metalloproteinases in Human Cerebral Stroke

Robust experimental data from various groups indicate that matrix metalloproteinases (MMPs) are highly relevant in the development of both blood-brain barrier damage<sup>1,2</sup> and microvascular damage,<sup>3,4</sup> which lead to subsequent brain edema<sup>2</sup> and secondary hemorrhagic complications.<sup>4,5</sup> More clinical evidence is needed to link these experimental findings with theoretical considerations and the clinical reality of our stroke patients.

Thanks to newly published work,<sup>6</sup> the current gap between experimental and clinical data on the role of MMPs is slowly closing. Castellanos and colleagues<sup>6</sup> found that the high MMP-9 concentrations in the acute phase of stroke in 250 patients were an independent predictor of subsequent hemorrhagic complications. Any bias resulting from patient selection was reduced by the large number of patients in their study. The authors have presented strong proof that enzyme-

linked immunosorbent assay-measured MMP-9 levels exceeding 140 ng/mL in the peripheral blood on admission are predictive of a later hemorrhagic complication with an odds ratio of 12 (95% CI, 3 to 51).

Their findings, nevertheless, raise other questions. First, what is the time course of the MMPs? It is rather surprising that the initial, single measurement of MMP values proved significant for later hemorrhages. Secondary elevations in the later time course of the MMPs would logically seem more important. Because patients with hemorrhagic complications had a higher mean infarct volume than the stroke group without any bleedings, could the elevated MMP level be the result of a more severe disease that causes larger infarction? Does an elevation of the MMPs cause hemorrhagic complications to develop, or is it itself a consequence of an underlying, very basic pathophysiological event that results in

both hemorrhage and MMP elevation? Are the MMP levels in the authors' patient population with acute ischemic stroke comparable to those seen in patients with myocardial infarction, intracerebral hemorrhage, or head trauma? Finally, is the relation between MMP-9 and hemorrhagic findings unique to ischemic stroke, or is this pathophysiological pattern also relevant for various brain diseases?

The experimental groundwork for the authors' clinical findings has been well prepared. Other groups have shown that substantial damage of the microvascular basal lamina occurs in rats and nonhuman primates after transient cerebral ischemia and reperfusion.<sup>7,8</sup> Secondary hemorrhagic complications are due to these losses of microvascular basal lamina.<sup>5</sup> The implications of such findings are relevant not only for elucidating the proteolytic changes after ischemia but also for devising strategies to prevent edema or hemorrhage.<sup>3,4</sup>

While providing a substructure for endothelial cells and astrocytes, the basal lamina constitutes the second element of the blood-brain barrier in addition to the well-known interendothelial cell tight junctions. Intact microvascular basal lamina and integrin-mediated matrix adhesion are required for cell survival. Once they are dissolved, hemorrhage can occur.<sup>3-5</sup> During experimental focal cerebral ischemia, important changes in the microvascular basal lamina may also involve the plasmin system, the MMP system, and leukocyte activation.<sup>3</sup> MMPs, especially MMP-2 and MMP-9, may also play an important role in the blood-brain barrier function and extracellular matrix remodeling after stroke.<sup>1,2</sup> In a permanent middle cerebral artery occlusion model in the rat, MMP-2 and MMP-9 were shown to increase in neutrophils, endothelial cells, and macrophages.<sup>9</sup> Activated MMP-9 (88 kDa) appeared as early as 3 hours after 60 minutes of transient focal cerebral ischemia. Pro-MMP9 (92 kDa) was significantly increased in endothelial cells in a time-dependent manner during reperfusion.<sup>10</sup> A constitutive expression of pro-MMP-9 in the control specimens was evident. Activated MMP-9 further increased 23 hours after reperfusion. Pro-MMP-9 was shown to be significantly elevated 48 hours after 2 hours of middle cerebral artery occlusion; however, the activated form of MMP-9 was not detected.<sup>11</sup>

On the one hand, systemic administration of neutralizing antibodies to MMP-9 appeared to reduce brain injury after middle cerebral artery occlusion,<sup>9</sup> suggesting that MMP-9 is involved in neuronal damage after stroke. Also, the administration of BB-94, an MMP inhibitor, before recombinant tissue plasminogen activator produced a trend to reduced infarct rates and bleeding events.<sup>12</sup> Newer data also showed that MMP-9 is involved in neuronal cell death cascades.<sup>13</sup> Therefore, larger infarct volume in patients with higher MMP-9 levels can also be seen as a result of this proteolytic activation. On the other hand, a recent review<sup>14</sup> draws attention to the Janus-faced nature of MMPs: They have potentially beneficial (eg, mediation of parenchymal and vascular recovery) as well as deleterious effects.

Despite the above-mentioned questions, the study of Castellanos and coworkers<sup>6</sup> goes further than previous studies based on small patient groups.<sup>15</sup> The authors have laid the groundwork for a better understanding of the role of proteolytic mechanisms in acute human stroke. Although their data would be expected in an experimental setting, the authors have finally provided sound clinical evidence for the important role of MMPs. Unfortunately, a marker for the risk of hemorrhage in thrombolysis still eludes us.

**Gerhard F. Hamann, MD**

*Department of Neurology  
Ludwig-Maximilians University, Munich  
Munich, Germany*

## References

- Rosenberg GA, Navratil M. Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology*. 1997;48:921-926.
- Rosenberg GA. Ischemic brain edema. *Prog Cardiovasc Dis*. 1999;42:209-216.
- Hamann GF, del Zoppo GJ, von Kummer R. Hemorrhagic transformation of cerebral infarction: possible mechanisms. *Thromb Haemost*. 1999;82(suppl):92-94.
- del Zoppo GJ, von Kummer R, Hamann GF. Ischaemic damage of brain microvessels: inherent risks for thrombolytic treatment in stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998;65:1-9.
- Hamann GF, Okada Y, del Zoppo GJ. Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16:1373-1378.
- Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain I, Castello J, Davalos A. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2003;34:40-45.
- Hamann GF, Okada Y, Fitridge R, del Zoppo GJ. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke*. 1995;26:2120-2126.
- Hamann GF, Liebetrau M, Martens H, Burggraf D, Kloss CU, Bultemeier G, Wunderlich N, Jager G, Pfefferkorn T. Microvascular basal lamina injury following experimental focal cerebral ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002;22:526-533.
- Romanic AM, White RF, Arleth AJ, Ohlstein EH, Barone FC. Matrix metalloproteinase expression increases after cerebral focal ischemia in rats: inhibition of matrix metalloproteinase-9 reduces infarct size. *Stroke*. 1998;29:1020-1030.
- Rosenberg GA, Cunningham LA, Wallace J, Alexander S, Estrada EY, Grossetete M, Razhagi A, Miller K, Gearing A. Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures. *Brain Res*. 2001;893:104-112.
- Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*. 1998;29:2189-2195.
- Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Metalloproteinase inhibition reduces thrombolytic (t-PA) induced hemorrhage after thromboembolic stroke. *Stroke*. 2000;31:3034-3040.
- Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal death. *Science*. 2002;297:1186-1190.
- Lo EH, Wang X, Cuzner ML. Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J Neurosci Res*. 2002;69:1-9.
- Montaner J, Alvarez-Sabin J, Molina C, Angles A, Abilleira S, Arenillas J, Gonzales MA, Monasterio J. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke. *Stroke*. 2001;32:1759-1766.

# Plasma Cellular-Fibronectin Concentration Predicts Hemorrhagic Transformation After Thrombolytic Therapy in Acute Ischemic Stroke

Mar Castellanos, MD; Rogelio Leira, MD, PhD; Joaquín Serena, MD, PhD; Miguel Blanco, MD, PhD; Salvador Pedraza, MD; José Castillo, MD, PhD; Antoni Dávalos, MD, PhD

**Background and Purpose**—Elevated plasma levels of cellular fibronectin (c-Fn) reflect vascular damage, so c-Fn might be a marker of secondary bleeding risk in cerebral ischemia. We investigated whether high plasma levels of c-Fn were associated with hemorrhagic transformation (HT) after treatment with tissue plasminogen activator (tPA) in patients with acute stroke.

**Methods**—Eighty-seven patients (mean age:  $67 \pm 12$ ) received tPA after the ECASS II criteria (mean time to infusion:  $160 \pm 46$  minutes; median NIHSS: 12). HT and hypodensity volume were studied on computed tomography (CT) performed 24 to 36 hours after treatment. HT was classified according to the ECASS II definitions. c-Fn and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) levels were determined by ELISA in blood samples obtained before treatment and in 30 healthy subjects.

**Results**—HT was found in 26 patients (30%); 15 patients had hemorrhagic infarction type 1 (HI-1), 7 had HI-2, and 4 had parenchymal hemorrhage (PH). Median c-Fn concentrations were 1.3, 1.7, 4.2, 5.4, and  $7.3 \mu\text{g/mL}$  in controls, non-HT, HI-1, HI-2, and PH groups, respectively ( $P < 0.001$ ); median MMP-9 values were 54, 87, 154, 176, and  $225 \text{ ng/mL}$  ( $P < 0.001$ ). Logistic regression analysis showed that only c-Fn plasma levels remained independently associated with HT after adjusting for potential confounders (OR, 2.1; 95% CI, 1.3 to 3.4;  $P = 0.002$ ). Similar results were obtained in the 71 patients treated within 3 hours.

**Conclusions**—High plasma c-Fn levels are significantly associated with subsequent HT in stroke patients treated with tPA, so plasma c-Fn determinations might be useful in clinical practice to improve the risk/benefit ratio of thrombolytic treatment. (*Stroke*. 2004;35:000-000.)

**Key Words:** stroke ■ stroke, acute ■ hemorrhage ■ thrombolytic therapy

Thrombolytic therapy has been proven to be effective for the treatment of acute ischemic stroke, but the increased risk of hemorrhagic transformation (HT) associated with tissue plasminogen activator (tPA) administration is still of great clinical concern.<sup>1,2</sup> HT after cerebral ischemia seems to be related to the disruption of the vascular endothelium.<sup>3</sup> In patients who receive tPA treatment, endothelial injury may be the result of free radical generation secondary to thrombolytic-induced reperfusion,<sup>4</sup> as well as of the upregulation of matrix metalloproteinases (MMPs),<sup>5</sup> a group of enzymes that are able to degrade the basal membrane components. The association between high levels of MMP-9 and the risk of HT in patients with acute ischemic stroke who have<sup>6</sup> and have not<sup>7</sup> received tPA have been previously reported. However, despite the available data, the underlying molecular mechanisms related to HT after thrombolytic treatment have yet to be fully elucidated.

Fibronectins are adhesive dimeric glycoproteins that promote cell-cell and cell-matrix interactions.<sup>8</sup> Plasma fibronectin (p-Fn) is primarily produced by hepatocytes,<sup>8</sup> but plasma also contains small quantities of cellular fibronectin (c-Fn), which is mainly synthesized by endothelial cells.<sup>9</sup> Because c-Fn is largely confined to the vascular endothelium, high plasma levels of this molecule might be indicative of endothelial damage. In fact, plasma c-Fn levels have been reported to be increased in patients with vascular injury secondary to vasculitis, sepsis, acute major trauma, diabetes, and patients with ischemic stroke.<sup>10,11</sup>

Because HT after cerebral ischemia seems to be the result of the continuous disappearance of basal membrane components,<sup>3</sup> in the present study we sought to investigate whether high levels of plasma c-Fn were associated with HT in patients who received thrombolytic treatment with tPA.

Received November 7, 2003; final revision received March 9, 2004; accepted April 6, 2004.

From the Departments of Neurology (M.C., J.S., A.D.) and Neuroradiology (S.P.), Hospital Universitari Doctor Josep Trueta, Girona, Spain; and the Department of Neurology, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Santiago de Compostela (R.L., M.B., J.C.), Spain.

Correspondence to Dr Mar Castellanos, Department of Neurology, Hospital Universitari Doctor Josep Trueta in affiliation with the UAB, Avda Francia s/n, Girona-17007, Spain. E-mail nrl.mcastellanos@htrueta.scs.es

© 2004 American Heart Association, Inc.

Stroke is available at <http://www.strokeaha.org>

DOI: 10.1161/01.STR.0000131656.47979.39

## Subjects and Methods

We prospectively studied 87 patients (59% men; mean age  $67 \pm 12$  years) admitted consecutively into 2 university hospitals between October 1999 and July 2001 who received intravenous tPA following the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS) II criteria.<sup>12</sup> Thrombolytic therapy was administered within 6 hours from the beginning of the symptoms at a dose of 0.9 mg/kg body weight, with an upper dose limit of 90 mg per patient. Ten percent of the total dose was given as a bolus over 1 to 2 minutes, followed by a 60-minute infusion of the remaining dose. The mean time to the infusion of the drug was  $160 \pm 46$  minutes. Seventy-one patients received the treatment within 3 hours from onset of symptoms, whereas 16 patients received tPA between 3 and 6 hours within onset of symptoms. Thirty healthy control subjects matched by age and sex (male: 57%; mean age:  $63 \pm 9$  years) and without history of neurological disorders or vascular risk factors were also included in the study. To determine the effect of stroke on the levels of the molecules, plasma c-Fn and MMP-9 concentrations were also determined in 100 patients with acute ischemic stroke who did not receive tPA treatment and in whom HT did not develop (male: 59%; mean age:  $67 \pm 6$  years; mean time to inclusion:  $7.2 \pm 3.9$  hours). Neither the patients nor the controls had inflammatory, hematological, or infectious diseases, cancer, or severe renal or liver failure. The ethics committee approved the protocol in each center, and informed consent was obtained from patients or their relatives.

Medical history recording potential stroke risk factors, clinical examination, blood and coagulation tests, 12-lead electrocardiogram, chest radiography, and noncontrast cranial computed tomography (CT) scan were performed at admission. Stroke subtype was classified according to the Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment (TOAST) criteria.<sup>13</sup> Stroke severity was assessed by a certified neurologist using the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) at admission and at 24 to 36 hours. Neurological deterioration was defined as death or an increase of  $\geq 4$  points in the NIHSS score between the 2 examinations.

Early CT signs of infarction were evaluated in the first radiological examination. The volume of hypodensity and the presence of HT were evaluated on a second cranial CT, which was performed 24 to 36 hours after treatment. Hypodensity volume was determined by using the formula  $0.5 \times a \times b \times c$ , where  $a$  and  $b$  are the largest perpendicular diameters measured on CT and  $c$  is the slice thickness. The HT type was classified according to the ECASS II criteria.<sup>12</sup> Hemorrhagic infarction type 1 (HI-1) was defined as small petechiae along the margins of the infarct, and HI type 2 (HI-2) was defined as more confluent petechiae within the infarct area but without a space-occupying effect. Parenchymal hemorrhage type 1 (PH-1) was defined as blood clots in  $\leq 30\%$  of the infarcted area with some slight space-occupying effect, and PH type 2 (PH-2) as blood clots in  $>30\%$  of the infarcted area with substantial space-occupying effect. All CT examinations were performed by 1 investigator in each center blinded to the clinical and analytical data. We considered symptomatic HT as being associated with neurological deterioration.

## Laboratory Tests

Blood samples were taken from all patients at admission before tPA administration. Samples were collected in glass test tubes containing EDTA. Suspension of plasma was centrifuged at  $3000g$  for 5 minutes and immediately frozen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Plasma MMP-9 and c-Fn levels were measured with commercially available quantitative sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay kits obtained from Biotrack, Amersham Pharmacia UK, and Adeza Biomedical, respectively. Determinations were performed in an independent laboratory blinded to clinical and radiological data. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were  $<5\%$  for MMP-9 and c-Fn determinations.

## Statistical Analysis

Proportions between groups were compared using the  $\chi^2$  test. Continuous variables are expressed as mean  $\pm$  SD and were compared using the Student  $t$  test. Given that MMP-9 and c-Fn

concentrations are not normally distributed, their levels were expressed as median (quartiles), and comparisons were made using the Mann-Whitney test or Kruskal-Wallis test as appropriate.

The association between c-Fn levels and baseline continuous variables was assessed by calculating the Spearman correlation coefficient.

We used cutoff values, as described by Robert et al,<sup>14</sup> to estimate the sensitivity, specificity, and predictive values of a specific concentration of plasma MMP-9 and c-Fn for HT. The importance of MMP-9 and c-Fn in the development of HT after tPA administration was determined by logistic regression analysis after adjusting for those variables evaluated at admission that were related to HT in the univariate analysis. Because plasma levels of c-Fn have been reported to increase with age<sup>10</sup> and in patients with diabetes,<sup>11</sup> these 2 variables were forced into the analysis. To test whether the odds of HT for c-Fn was modified by the volume of hypodensity, a second analysis was performed including this factor into the model. Plasma MMP-9 and c-Fn were included as continuous variables because the cutoff values meant that there was a linearity of the odds ratios.

## Results

Twenty-six (30%) of the 87 patients included in the study had HT. Fifteen patients (17.2%) had HI-1, 7 (8%) had HI-2, 2 (2.3%) had PH-1, and 2 (2.3%) had PH-2. Table 1 shows the main characteristics of patients with and without HT. The severity of neurological deficit at admission evaluated by the NIHSS score was significantly higher in patients with HT, who also displayed significantly greater volumes of hypodensity on the second cranial CT. Both clinical groups presented with similar systolic and diastolic blood pressures and glucose levels before tPA administration. No statistically significant differences were found in the presence of early signs of cerebral infarction at admission or in the stroke mechanism in patients with and without HT.

Neurological deterioration was observed in 15 patients (17.2%). In 8 patients, the neurological worsening was associated with HT: 2 patients had HI-1, 3 displayed HI-2, and 3 had PH.

Plasma c-Fn concentrations before tPA administration were significantly higher in patients with HT ( $4.8 [3.4, 5.9] \mu\text{g/mL}$ ) than in those without HT ( $1.7 [1.4, 2.5] \mu\text{g/mL}$ ) and both the healthy subjects ( $1.3 [0.9, 1.6] \mu\text{g/mL}$ ) and the patients not treated with tPA ( $1.4 [1.1, 1.8] \mu\text{g/mL}$ ) (all  $P < 0.001$ ). Moreover, we found that the greater the severity of the bleeding the higher the levels of c-Fn (Figure 1A). A similar effect was found in those patients who were treated within 3 hours of onset of symptoms ( $n=71$ ) (Figure 1B). The levels of c-Fn were not statistically different in patients with symptomatic and asymptomatic HT, although there was a clear trend for the levels to be higher in patients with symptomatic HT ( $5.8 [4.0, 6.9] \mu\text{g/mL}$  versus  $4.5 [2.7, 5.4] \mu\text{g/mL}$ ;  $P=0.054$ ).

Plasma MMP-9 concentrations before tPA administration were also significantly higher in those patients with HT ( $170.3 [101.4, 196.2] \text{ ng/mL}$ ) than in those without HT ( $87.2 [54.8, 115.1] \text{ ng/mL}$ ) and in both the healthy subjects ( $53.7 [39.5, 79.4] \text{ ng/mL}$ ) and the patients not treated with tPA ( $62 [40, 93.8] \text{ ng/mL}$ ) (all  $P < 0.001$ ). As observed with c-Fn levels, the greater the severity of the bleeding, the higher the levels of MMP-9, both in patients treated within 6 (Figure 2A) and 3 hours (Figure 2B). No differences were found in MMP-9 levels between symptomatic and asymptomatic HT



**TABLE 1. Baseline Vascular Risk Factors, Clinical Characteristics, Stroke Subtype, Biochemical Parameters, and Neuroimaging Findings in Patients With and Without Hemorrhagic Transformation**

	Hemorrhagic Transformation (n=26)	Nonhemorrhagic Transformation (n=61)	<i>P</i>
Male, n (%)	11 (46.2)	37 (63.9)	0.156
Age, y	69.6±10.2	66.5±12.5	0.232
Time from stroke onset to treatment, min	158.6±32.4	159.8±50.4	0.897
Clinical characteristics			
NIHSS score at admission	15.9±4.1	12.4±5.4	0.003
Stroke subtype, n (%)			0.331
Large-artery atherosclerosis	8 (30.8)	16 (26.2)	
Cardioembolism	13 (50)	27 (44.3)	
Small-vessel disease	0	3 (4.9)	
Undetermined cause	4 (15.4)	15 (24.6)	
Others	1 (3.8)	0	
Previous treatment with aspirin, n (%)	5 (19.2)	7 (11.5)	0.332
Biochemistry and vital signs at admission			
Plasma glucose, mg/dL	147±41	151±60	0.736
Systolic blood pressure, mm Hg	157±24	163±25	0.274
Diastolic blood pressure, mm Hg	85±15	86±76	0.691
INR	1.1±0.1	1.1±0.1	0.670
Platelet count, 10 <sup>5</sup> /mm <sup>3</sup>	218±60	217±59	0.976
Neuroimaging findings			
Early signs of infarction, n (%)	16 (61.5)	21 (34.4)	0.059
Volume of hypodensity at 24–36 h, mL	107±163	29±60	0.002

Continuous variables are expressed as mean±SD.  
INR indicates International Normalized Ratio.

(170[121, 214] ng/mL versus 170[87, 194] ng/mL;  $P=0.338$ ).

Plasma c-Fn concentrations were significantly higher in patients with early signs of ischemia (n=37) on cranial CT (2.8 [1.7, 5.0]  $\mu\text{g/mL}$ ) than in those without (1.9 [1.4, 2.9]  $\mu\text{g/mL}$ ) ( $P=0.012$ ). Plasma c-Fn correlated positively with MMP-9 levels ( $r=0.671$ ,  $P<0.001$ ) and the hypodensity volume ( $r=0.364$ ,  $P<0.001$ ). No correlation was found between plasma c-Fn levels and other variables related to HT such as serum glucose concentrations, blood pressure levels, or the severity of neurological deficit at admission.

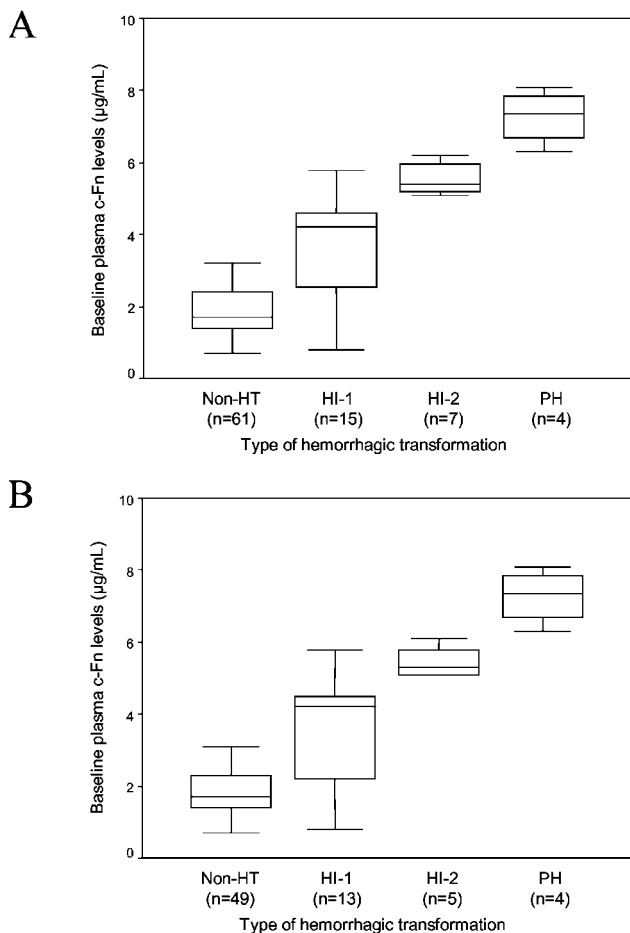
As shown in Table 2, only plasma c-Fn levels remained independently associated with HT after adjustment for age, history of diabetes, baseline NIHSS score, and plasma MMP-9 levels. The odds of c-Fn levels for HT did not substantially change after the inclusion of the volume of hypodensity into the analysis (OR, 2.1; 95% CI, 1.3 to 3.4;  $P=0.002$ ). Plasma c-Fn level was also the only factor independently associated with HT after adjustment for potential confounders when the analysis was limited to the 71 patients treated within 3 hours (OR, 1.9; 95% CI, 1.2 to 3.3;  $P=0.006$ ). No interaction was found between MMP-9 and c-Fn.

Because it has been reported that HI-2 and PH occur more often in patients who receive tPA treatment,<sup>15</sup> and also based on the observation of our own results in Figure 1 that clearly

demonstrate higher levels of c-Fn in patients with HI-2 and PH, we calculated the c-Fn and MMP-9 cutoff values with the highest sensitivity and specificity for these types of HT. This post-hoc explanatory analysis showed that plasma MMP-9 concentrations  $\geq 140$  ng/mL predicted the development of HI-2 and PH with a sensitivity of 81%, specificity of 88%, positive predictive value of 41%, and negative predictive value of 98%. More interestingly, the sensitivity, specificity, and positive and negative predictive values of plasma c-Fn  $\geq 3.6$   $\mu\text{g/mL}$  for the prediction of HI-2 and PH were 100%, 96%, 44%, and 100%, respectively.

## Discussion

Because thrombolytic therapy is the only treatment for ischemic stroke proven to be effective,<sup>1</sup> the investigation of the underlying mechanisms responsible for HT, the most feared complication associated with this therapy, as well as the identification of factors that can improve the benefit/risk ratio of tPA administration is of critical importance. This study demonstrates that plasma c-Fn levels are significantly higher in patients in whom HT develops after tPA administration and suggests that c-Fn levels  $\geq 3.6$   $\mu\text{g/mL}$  can predict the development of HI-2 and PH after tPA administration with a sensitivity and negative predictive value of 100%. Therefore, c-Fn might be a useful marker of those patients



**Figure 1.** Box plots show median values (horizontal line inside the box), quartiles (box boundaries), and the largest and smallest observed values (lines drawn from the end of the box) of baseline plasma c-Fn levels at admission in patients who received tPA within 6 hours (A) and 3 hours (B). \* $P < 0.001$  (Kruskal-Wallis test). HT indicates hemorrhagic transformation; HI-1, hemorrhagic infarction type 1; HI-2, hemorrhagic infarction type 2; PH, parenchymal hematoma.

who are at greatest risk for HT after the administration of thrombolytic treatment.

The loss of microvascular integrity secondary to the continuous disappearance of the antigens of the endothelial components has been reported as being responsible for HT after ischemic injury.<sup>3</sup> Among these antigens, c-Fn is espe-

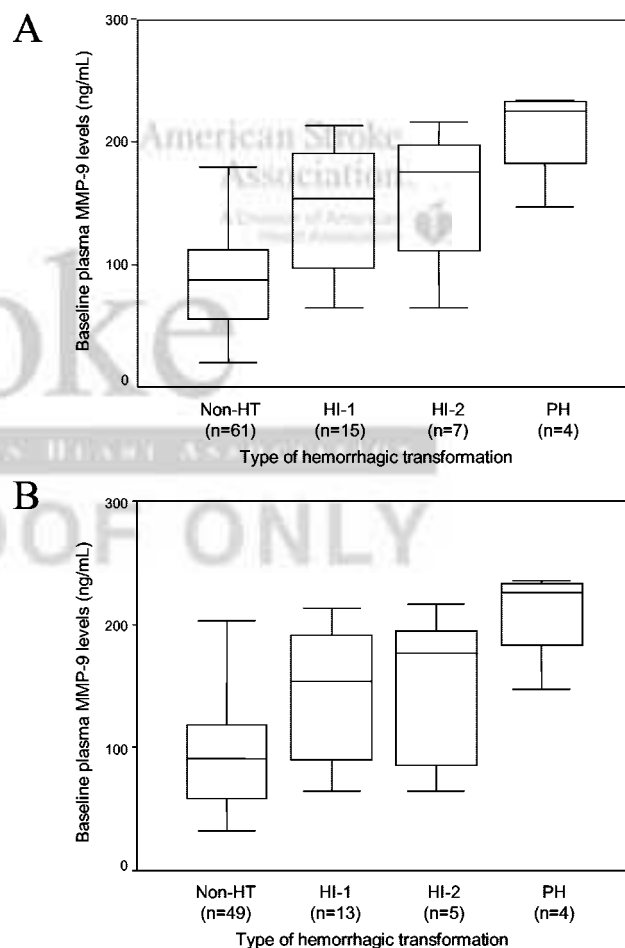
**TABLE 2. Adjusted Odds Ratios of Hemorrhagic Transformation in Patients Treated Within 6 Hours From Symptoms Onset**

Variables	OR (95% CI)	P
Age	1.0 (0.9–1.1)	0.780
History of diabetes	0.8 (0.2–3.6)	0.740
NIHSS score at admission	1.1 (0.9–1.3)	0.071
MMP-9 levels (by 10-unit increase, ng/mL)	1.1 (0.9–1.3)	0.086
c-Fn levels (µg/mL)	2.1 (1.3–3.3)	0.006

Age and history of diabetes were forced into the analysis. CI indicates confidence interval.

cially important because it mediates the interaction between the endothelium and blood cells as well as other blood components.<sup>8</sup> Moreover, Fn plays an important role in blood clot formation by mediating the adhesion of platelets to fibrin,<sup>8</sup> so the disappearance of the c-Fn of the vascular endothelium secondary to ischemia might damage this clotting mechanism, facilitating HT development. Although high c-Fn levels have been previously reported in patients with ischemic stroke,<sup>10</sup> no previous data are available on the association between c-Fn levels and HT in patients with acute ischemic stroke.

The increase of vascular permeability and subsequent extravasation of serum components leading to HT after tPA administration may be the result of several mechanisms including the activation of MMPs, which is secondary to ischemia,<sup>16</sup> and the administration of tPA.<sup>5</sup> The present study confirms the significant association between MMP-9 levels and HT previously reported both in patients who received tPA<sup>6</sup> and in a nonselected series of ischemic stroke patients.<sup>7</sup> However, the fact that c-Fn is almost exclusively located at the endothelium suggests that this



**Figure 2.** Box plots show median values (horizontal line inside the box), quartiles (box boundaries), and the largest and smallest observed values (lines drawn from the end of the box) of baseline plasma MMP-9 levels at admission in patients who received tPA within 6 hours (A) and 3 hours (B). \* $P < 0.001$  (Kruskal-Wallis test).

molecule could be a more specific marker of a high risk for HT. This hypothesis is supported by our finding that c-Fn levels, but not MMP-9 levels, remained independently associated with HT in the logistic regression analysis. Moreover, the predictive capacity of plasma c-Fn levels for the development of HI-2 and PH was higher than the predictive capacity of MMP-9 levels. However, although the difference did not reach statistical significance, probably because of the small sample size, there was a clear trend for the levels of c-Fn to be higher in patients with symptomatic HT, whereas MMP levels were similar in symptomatic and asymptomatic bleedings. Because neurological deterioration usually occurs in patients with more severe HT, c-Fn levels probably reflect not only endothelial damage but also the degree of endothelial damage. In agreement with this hypothesis, we have observed a positive correlation between c-Fn levels and hypodensity volume at 24 to 36 hours of evolution of the ischemia, which probably reflects the relationship between endothelial and brain injuries. This positive correlation could lead us to argue that c-Fn levels are just an epiphenomenon of the extent of brain damage. However, we find that it is the plasma c-Fn concentrations rather than infarct volume that independently predicted HT.

The origin of the elevated plasma levels of c-Fn after brain ischemic injury remains to be elucidated. The basal lamina disruption and the subsequent release of this molecule into the plasma, as well as accelerated Fn synthesis by endothelial cells and other cells such as polymorphonuclear leukocytes<sup>17</sup> arriving at the ischemic tissue as part of the ischemic inflammatory cascade,<sup>18</sup> could be among the participating mechanisms. Interleukins and transforming growth factor  $\beta$ , whose expression is increased as a result of ischemia,<sup>18</sup> have been shown to stimulate Fn synthesis.<sup>19</sup> Increased c-Fn synthesis could be an attempt to decrease endothelial destruction by MMPs, which might explain the positive correlation between c-Fn and MMP-9 we observed. Experimental studies have demonstrated that endothelial cell injury leads to an increase in Fn production to provide re-endothelialization,<sup>20</sup> and that the administration of synthetic Fn peptide V reduces the final infarct volume of cerebral ischemia when administered within 3 hours after reperfusion.<sup>21</sup>

The present study has some limitations. First, although we have demonstrated the accuracy of plasma c-Fn levels  $\geq 3.6 \mu\text{g/mL}$  for the prediction of HI-2 and PH, these data were obtained from a post-hoc analysis, so they should be considered as hypothesis-generating and confirmed in a prospective study including a large number of patients, especially in the subgroup with PH2, which has been reported to experience neurological deterioration more often.<sup>15</sup> The small number of patients with PH-2 in our study prevented us from obtaining conclusive data for the prediction of this particular type of HT. Second, although the effect of c-Fn was independent of other well-known risk factors related to HT, an increase of plasma c-Fn levels as a result of an acute phase reaction or previous systemic diseases cannot be completely ruled out. How-

ever, a direct relationship is likely because increased c-Fn levels were detected at admission before HT in patients in whom radiological findings, biochemical parameters, and vital signs evaluated at the moment the blood samples were taken were not different from those in patients in whom secondary bleeding did not develop, so we cannot attribute the differences in c-Fn levels to a different acute-phase response or a distinct previous comorbidity. Finally, the enzyme-linked immunoabsorbent assay is a slow analytical method, so it would be desirable to develop a faster test to determine c-Fn levels for patients being considered for tPA treatment.

In conclusion, this study demonstrates that high plasma c-Fn levels are independently associated with tPA-induced HT. Further studies including a larger sample of patients are needed to confirm these promising results and to clarify whether c-Fn concentrations may predict PH development in patients treated with t-PA. If this is found to be the case, then c-Fn determination may prove useful in clinical practice to improve the risk/benefit ratio of tPA treatment.

### Acknowledgments

Partial results of this investigation were presented at the 28th International Stroke Conference in Phoenix, Ariz (February 2003). We thank Dr. María García (Biostatistics Unit, Hospital Universitari Doctor Josep Trueta, Girona, Spain) for her comments on the design and interpretation of the statistical analysis.

### References

1. The National Institutes of Neurological Disorders, and Stroke rt-PA Stroke Study Group. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 1995;333:1581-1587.
2. NINDS rt-PA Stroke Study Group. Intracerebral hemorrhage after intravenous tPA therapy for ischemic stroke. *Stroke.* 1997;28:2109-2118.
3. Hamann GF, Okada Y, del Zoppo GJ. Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16:1373-1378.
4. Lapchak PA, Chapman DF, Zivin JA. Pharmacological effects of the spin trap agents *N*-t-butyl-phenyl nitron (PBN) and 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxyl (TEMPO) in a rabbit thromboembolic stroke model: combination studies with the thrombolytic tissue plasminogen activator. *Stroke.* 2001;32:147-152.
5. Sumii T, Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinase in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke.* 2002;33:831-836.
6. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abillera S, Arenillas JF, Ribó M, Quintana M, Alvarez-Sabin J. Matrix metalloproteinase-9 pretreatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation.* 2003;107:598-603.
7. Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain I, Castillo J, Dávalos A. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke.* 2003;34:40-46.
8. Hynes RO. Fibronectins. *Sci Am.* 1986;254:42-51.
9. Peters JH, Sporn LA, Ginsberg MH, Wagner DD. Human endothelial cells synthesize, process, and secrete fibronectin molecules bearing an alternatively spliced type II homology (ED1). *Blood.* 1990;75:1801-1808.
10. Peters JH, Maunder RJ, Woolf AD, Cochrane GH, Ginsberg MH. Elevated plasma levels of ED1+ ("cellular") fibronectin in patients with vascular injury. *J Lab Clin Med.* 1989;113:586-597.
11. Kanters SD, Banga JD, Algra A, Frijns RC, Beutler JJ, Fijnheer R. Plasma levels of cellular fibronectin in diabetes. *Diabetes Care.* 2000;24:323-327.
12. Kake W, Kaste M, Fieschi C, von Kummer R, Davalos A, Meier D, Larue V, Bluhmki E, Davis S, Donnan G, Schneider D, Diez-Tejedor E, Trouillas P. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous Alteplase in acute ischemic stroke

- (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet*. 1998;352:1245–1251.
13. Adams HP Jr, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE. Classification of subtype of acute ischemic stroke: definitions for use in a multicenter clinical trial. *Stroke*. 1993;24:35–41.
  14. Robert C, Vermont J, Bosson JL. Formulas for threshold computations. *Comput Biomed Res*. 1991;24:514–519.
  15. Berger C, Fiorelli M, Steiner T, Schabitz WR, Bozzao L, Bluhmki E, Hacke W, von Kummer R. Hemorrhagic transformation of ischemic brain tissue: asymptomatic or symptomatic? *Stroke*. 2001;32:1330–1335.
  16. Rosenberg TA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996;16:360–366.
  17. Macarak EJ, Gorfin S, MacGregor RR. Modulation of endothelial fibronectin synthesis by polymorphonuclear granulocytes. *J Cell Physiol*. 1989;139:517–523.
  18. Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. Inflammatory mediators and brain injury: the role of cytokines and chemokines in stroke and CNS diseases. In: Ginsberg MD, Bogousslavsky J, eds. *Cerebrovascular Disease: Pathophysiology, Diagnosis, and Management*. Boston, Mass: Blackwell Science; 1998:507–531.
  19. Roberts CJ, Birkenmeier TM, McQuillar JJ, Akiyama SK, Yamada SS, Chen WT, Yamada KM, McDonald JA. Transforming growth factor beta stimulates the expression of fibronectin and of both subunits of the human fibronectin receptor by cultured human lung fibroblast. *J Biol Chem*. 1988;263:4586–4592.
  20. Kang Y-H, Williams R. Endotoxin-induced endothelial injury and subendothelial accumulation of fibronectin in rat aorta. *Anat Rec*. 1991;229:86–102.
  21. Yanaka K, Camarata PJ, Spellman SR, McCarthy JB, Furcht LT, Low WC. Antagonism of leukocyte adherence by synthetic fibronectin peptide V in a rat model of transient focal cerebral ischemia. *Neurosurgery*. 1997;40:557–564.



# Stroke

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

FIRST PROOF ONLY