

Depósitos corporales de hierro y pronóstico de los pacientes
con ictus isquémico agudo tratados con activador
recombinante tisular del plasminógeno (r-tPA)

Doctorando:

Mónica Millán Torné

Dirección:

Antoni Dávalos Errando

Teresa Gasull Dalmau

Tutor:

Celestino Rey-Joly Barroso

Departament de Medicina
Universitat Autònoma de Barcelona



El **Dr. Antoni Dávalos Errando** y la **Dra. Teresa Gasull Dalmau** como directores de la tesis y el **Dr. Celestino Rey-Joly Barroso** como tutor de la misma

CERTIFICAN:

Que **Mónica Millán Torné** ha realizado el trabajo de investigación correspondiente a la tesis doctoral titulada: "Depósitos corporales de hierro y pronóstico de los pacientes con ictus isquémico agudo tratados con activador recombinante tisular del plasminógeno (r-tPA)", la cual se ha desarrollado en el Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Y para que así conste y a los efectos oportunos, firman el certificado en Barcelona a 30 de Junio de 2010

Firmado:

Dr. Antoni Dávalos Errando

Dra. Teresa Gasull Dalmau

Dr. Celestino Rey-Joly Barroso

CANTARES

*Todo pasa y todo queda,
pero lo nuestro es pasar,
pasar haciendo caminos,
caminos sobre el mar.*

*Nunca perseguí la gloria,
ni dejar en la memoria
de los hombres mi canción;
yo amo los mundos sutiles,
ingrávidos y gentiles,
como pompas de jabón.*

*Me gusta verlos pintarse
de sol y grana, volar
bajo el cielo azul, temblar
súbitamente y quebrarse...
Nunca perseguí la gloria.*

*Caminante, son tus huellas
el camino y nada más;
caminante, no hay camino,
se hace camino al andar.*

*Al andar se hace camino
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.*

*Caminante no hay camino
sino estelas en la mar...*

*Hace algún tiempo en ese lugar
donde hoy los bosques se visten de espinos
se oyó la voz de un poeta gritar:
"Caminante no hay camino,
se hace camino al andar..."*

Golpe a golpe, verso a verso...

*Murió el poeta lejos del hogar.
Le cubre el polvo de un país vecino.
Al alejarse, le vieron llorar.
"Caminante no hay camino,
se hace camino al andar..."*

Golpe a golpe, verso a verso...

*Cuando el jilguero no puede cantar.
Cuando el poeta es un peregrino,
cuando de nada nos sirve rezar.
"Caminante no hay camino,
se hace camino al andar..."*

Golpe a golpe, verso a verso.

*Joan Manuel Serrat,
canción basada en el poema "Proverbios y Cantares"
de la obra "Campos de Castilla" de Antonio Machado*

Per tu Jordi, company de viatge.
Per vosaltres Sira, Georgina i Clara.
Junts caminem sempre endavant.

Agraïments/Agradecimientos

Sempre que escolto la cançó "Cantares" de Joan Manuel Serrat s'activen dins meu profunds sentiments en els que s'hi barregen persones, llocs, objectes i diferents situacions viscudes. El dia que vaig acabar d'escriure aquesta tesi vaig sentir una barreja d'alegria i satisfacció, i sense adonar-me'n vaig començar a cantar, inclús amb veu alta i amb el permís de la meva família, aquesta cançó. Només caminant, caminant i tornant a caminar s'aconsegueixen els objectius, però crec que la seva consecució no és mai un mèrit estrictament individual. Tot el que he après de les experiències personals i professionals viscudes i de totes aquelles persones que en qualsevol àmbit de la meva vida han establert llaços amb mi, m'han ajudat segur a l'assoliment d'aquesta fita.

Procedeixo d'una llarga família de comerciants, en la que tots els seus membres menys jo, és clar, s'han dedicat des de fa molts anys i es dediquen al comerç del peix. Sempre em va impressionar veure com la meva àvia i la meva mare dissecionaven amb rapidesa i precisió aquells peixos, a la vegada que recollien una comanda, explicaven una recepte de "suquet de peix" o simplement escoltaven aquelles persones que potser només havien entrat a la botiga per tenir una mica de companyia. Així, a la botiga vaig aprendre entre d'altres coses, que es pot treballar i a la vegada fer un servei a aquelles persones que el busquen o que el necessiten.

Jo vaig decidir ser metge, i més tard neuròleg. En seré capaç ? – em preguntava inicialment. Els pares em deien "amb esforç tot és possible" i "voler és poder". Sempre van confiar en les meves possibilitats professionals, però sobretot em van animar a ser feliç, a valorar les petites coses del dia a dia i a no buscar la glòria personal. Professionalment els he intentat fer cas, però he de reconèixer que la sort m'ha acompanyat. He compartit la meva vida d'estudiant i més tard professional amb persones excepcionals, de les que he après moltíssim, i no només des del punt de vista científic. Tots ells m'han ajudat d'alguna manera ha poder desenvolupar aquest projecte d'investigació que ha resultat en la tesi que us presento a continuació. Com diu la cançó de Serrat, no pretenc que els resultats d'aquesta tesi perdurin en la memòria científica, sinó que em conformo en que puguin contribuir en el petitíssim bocí que els hi pertoca a millorar el coneixement de la malaltia vascular cerebral.

Vull expressar el meu agraïment a totes i cadascuna de les persones que d'alguna manera han ajudat a que aquesta tesi sigui una realitat.

Vull remarcar el meu agraïment:

Al Dr. Antoni Dávalos, per la teva orientació, direcció i inesgotable col.laboració en el desenvolupament d'aquest treball. Gràcies per ensenyar-me a tenir rigor i honestedat científica. Gràcies per els consells, per la paciència, per escoltar-me, per estimular-me a millorar. Gràcies per la infinita confiança que m'has donat des de que vas arribar, t'ho agraeixo profundament. Per mi ets i sempre seràs un referent des del punt de vista professional. Personalment, saps que vas arribar a l'hospital en un moment emocionalment molt difícil per mi. En aquells dies era difícil llevar-se i venir a treballar. El teu suport i la teva comprensió em van ajudar enormement i això no es pot oblidar. Gràcies per la teva generositat il.limitada. Crec que sóc molt afortunada de poder treballar amb una persona com tu. Simplement, gràcies Toni.

A la Dra. Teresa Gasull, per la teva direcció des d'una perspectiva més bàsica i per ajudar-me a capbussar-me en els aspectes menys macroscòpics de la medicina, més allà del que és visible a simple vista dels nostres pacients. Sempre he admirat la teva capacitat de superació i de no defalliment davant de les múltiples dificultats que van sorgint en la investigació bàsica. Tere, gràcies per tot.

Al Dr. Celestino Rey-Joly, por tu revisión científica, asesoramiento de estilo y consejos prácticos para la correcta presentación de esta tesis.

A les noies del "vascular" Natàlia, Meri, Laura, Cristina, Elena i Aitziber. Perquè treballar amb vosaltres és ben senzill, perquè feu que venir a treballar sigui per mi com una festa i perquè sempre hi sou quan us necessito. Per mi sou més que companyes de feina. Gràcies per la vostra amistat. Esteu en el meu cor.

A Domingo Escudero, perquè vas ser el primer que va confiar amb mi i em vas donar la primera oportunitat professional quan les inseguretats afloren. Mai ho oblidaré.

A la resta de companys del Servei de Neurologia, per l'estima i el suport que em mostreu diàriament. És un plaer compartir amb vosaltres aquesta feina que tant ens agrada i ens motiva.

A Sílvia Reverté, per el teu inacabable suport en totes les tasques diàries i per la teva bondat.

A les infermeres del Servei de Neurologia, per la vostra col.laboració desinteressada en l'extracció de les mostres sanguínies i per el vostre esforç constant per millorar el dia a dia dels pacients que han patit un ictus.

A Xavi Ferrer i a Nicolás Vila. Allà on sigueu, no us oblidó.

A mis compañeros del Servicio de Neurología del Hospital Dr. Josep Trueta de Girona, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela y Hospital La Princesa de Madrid, por su colaboración en el proyecto, por los lazos científicos que hemos establecido en los últimos años y por la amistad que nos une.

Des del punt de vista personal:

A tu Jordi, perquè crec que ets la peça clau per la que jo he aconseguit arribar fins aquí. Gràcies per ser tant optimista, per fer petits els problemes, per la teva humilitat, per la teva generositat, per saber estimar tant, per buscar sempre la felicitat, per el teu sentit de l'humor, per defensar amb respecte les teves idees, per ser tant amic dels teus amics. Gràcies per ser com ets, company de viatge!

A vosaltres, filles, Sira, Georgina i Clara. Quan penso amb vosaltres el meu cor es fa enorme i no puc parar de somriure. Gràcies per entendre la meva feina, per perdonar les meves absències, per preocupar-vos també dels pacients, per ser tant bona gent. Vosaltres m'heu ensenyat a veure les coses amb ulls innocents i a ser millor persona. Us estimo sense límits, sou la meva passió.

Als meus pares, per demostrar-me cada dia que la seva estimació és incondicional. Per transmetre'm valors fonamentals com l'amor, el respecte, la solidaritat, l'empatia, la constància, l'esforç i sobretot, la recerca constant de la felicitat. Sóc com sóc perquè sou el meu mirall.

Al meu avi Serafí, perquè mentre hi vas ser el teu suport fou immens. No puc oblidar els cafès amb llet que em preparaves quan em llevava a les 5 del matí per estudiar i quan em venies a buscar 30 minuts abans de l'hora pactada a la facultat. Com sempre et dèiem, ets un crack!

A la meua àvia Lola, perquè la teva fortalesa i saber fer és un exemple per mi. Jo vull ser com tu quan sigui "gran".

A mi yaya Araceli, porque tus 104 años son para mi una lección de la historia contemporánea de nuestro país. Por tus ganas de vivir y tu ilusión de no perderte nada importante.

A vosaltres Jordi i Blai, perquè sempre heu estat, esteu i estareu al meu costat. Perquè gràcies a vosaltres no sé el que és estar o sentir-se sola.

Als meus oncles, Josep i Rosita. Un segons pares per mi.

Finalment, un especial agraïment a tots els pacients i familiars que han consentit formar part d'aquesta tesi. Per vosaltres continuarem treballant i avançant en el coneixement de la malaltia vascular cerebral.

I. Introducción	12
1. Trombólisis en el ictus isquémico agudo: limitaciones y fracasos	13
2. Estrés oxidativo y daño potencial por reperfusión en el ictus isquémico agudo	24
3. Depósitos de hierro, radicales libres, daño cerebral y microvascular en la isquemia cerebral	31
II. Hipótesis	49
III. Objetivos del estudio	53
IV. Material y métodos del estudio	56
V. Resultados	64
VI. Discusión	83
1. Comentario general	84
2. Limitaciones de los estudios	92
3. Contribución de las publicaciones originadas por esta tesis	94
VII. Conclusiones	97
VIII. Bibliografía	100
IX. Anexos	120
X. Publicaciones originales	128

GLOSARIO DE ACRÓNIMOS

ACM	Arteria cerebral media
BHE	Barrera hematoencefálica
ECASS	European Cooperative Acute Stroke Study
c-Fn	Fibronectina celular
DTC	Doppler transcraneal
DWI	Secuencia de difusión
HP	Hematoma parenquimatoso
IH	Infarto hemorrágico
IL	Interleucina
IRP	Proteínas reguladoras de hierro
IV	Intravenoso
LCR	Líquido cefalorraquídeo
mRS	Escala de Rankin modificada
MMP	Metaloproteasas de matriz
NIHSS	National Institute of Health Stroke Scale
NMDA	N-metil-D-aspartato
NTBI	Hierro no unido a la transferrina
RM	Resonancia magnética
r-tPA	Activador recombinante tisular del plasminógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
TC	Tomografía computerizada
TOAST	Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment

I. INTRODUCCIÓN

El ictus representa un problema social y sanitario de gran importancia en los países industrializados, ya que es la segunda causa de mortalidad y la primera causa de discapacidad a largo plazo. Además, es esperable un aumento significativo de su incidencia con el incremento progresivo de la población anciana. Por estas razones, el estudio de los mecanismos fisiopatológicos subyacentes al ictus isquémico y al daño neuronal secundario debería ser prioritario en la investigación clínica y básica, con el objetivo de obtener nuevas dianas terapéuticas para la mejora del pronóstico de los pacientes con ictus [1].

1. Trombólisis en el ictus isquémico agudo: limitaciones y fracasos

Las investigaciones terapéuticas en el ictus agudo en los últimos años han fracasado o han tenido escaso impacto en la recuperación de los pacientes, con la excepción del tratamiento trombolítico intravenoso. Así, se estima que la aspirina incrementa en sólo un 1% la recuperación funcional, y la neuroprotección farmacológica en sentido estricto (proteger neuronas) no ha sido eficaz en múltiples ensayos clínicos en humanos, aunque recientemente existen investigaciones prometedoras con estrategias terapéuticas que actuarían a diferentes niveles de la cascada isquémica y de la reparación celular, en un ámbito de protección/plasticidad más amplio, con efectos no sólo en las neuronas, sino también en la glía, astrocitos y células endoteliales promoviendo la neurogénesis, angiogénesis, formación de axones y sinaptogénesis en el tejido cerebral isquémico [2,3].

El tratamiento trombolítico con activador recombinante tisular del plasminógeno (r-tPA) por vía intravenosa (IV) ha demostrado un importante efecto beneficioso cuando se administra dentro de las primeras 4,5 horas desde el inicio de los síntomas de un infarto cerebral [4-7]. La terapia con r-tPA por vía sistémica ha supuesto un cambio radical en el abordaje terapéutico del ictus isquémico agudo durante la última década, pero en la actualidad gran parte de los retos en el tratamiento del ictus se centran en cómo obtener terapias de reperfusión más eficaces, y en cómo mejorar la respuesta de los individuos tratados protegiendo al cerebro del daño potencial que se asocia a la reperfusión post-isquémica [8,9].

El tratamiento trombolítico IV con r-tPA ha comportado respecto al grupo placebo en los principales ensayos clínicos randomizados, un incremento de 2,8 veces en la probabilidad de evolucionar favorablemente cuando se administra dentro de los primeros 90 minutos desde el inicio de los síntomas, de 1,6 veces en la ventana de 91 a 180 minutos y de 1,4 veces en la de 181 a 270 minutos, con una incidencia de hemorragia intracraneal sintomática del 5,9% frente a un 1,1% en el grupo control [4,7]. Sin embargo, aproximadamente un 50% de los pacientes tratados con r-tPA IV permanecen con una dependencia funcional moderada o importante [10]. La recuperación incompleta se ha atribuido a lesiones cerebrales iniciales ya extensas o a la ausencia de recanalización o recanalización tardía después de la administración de la terapia trombolítica, ya que el objetivo principal de las terapias de reperfusión cerebral es conseguir la recanalización precoz de la arteria ocluida. Aunque el beneficio de la terapia

trombolítica en los ensayos clínicos randomizados es independiente de la presencia o no de una oclusión arterial, ya que en estos estudios no se monitorizó el estado de la arteria, datos obtenidos de importantes estudios clínicos prospectivos en diferentes modalidades de terapias de reperfusión cerebral muestran una fuerte asociación entre la recanalización arterial y el pronóstico funcional favorable a largo plazo (OR 4,43; 95% IC 3,32-5,91) junto a una reducción en la mortalidad (OR 0,24; 95% IC 0,16-0,35) [11]. La monitorización por Doppler transcraneal (DTC) en el tratamiento trombolítico IV demuestra que los pacientes que consiguen una rápida (dentro de las dos horas desde el bolus de r-tPA) recanalización arterial completa o parcial presentan una mejor evolución neurológica precoz y a largo plazo que aquellos que no recanalizan [12,13]. Sin embargo, aunque la oclusión de la arteria cerebral media (ACM) recanaliza de forma parcial o completa en el 67% de pacientes tratados, solamente un 39% de ellos presentan una recuperación neurológica completa [12]. Por tanto, la reperfusión precoz no evita en muchos casos un pronóstico desfavorable, lo que sugiere que otros mecanismos de daño cerebral pueden intervenir incluso en las mejores condiciones hemodinámicas.

La ausencia de respuesta favorable al tratamiento trombolítico en más de un tercio de pacientes que recanalizan precozmente no siempre se explica por la re-oclusión arterial, ya que ésta ocurre en una pequeña proporción de pacientes [14,15], ni por el desarrollo de una transformación hemorrágica sintomática [16]. Existen numerosas evidencias clínicas que apoyan el "aturdimiento isquémico", el deterioro neurológico precoz o el daño neuronal

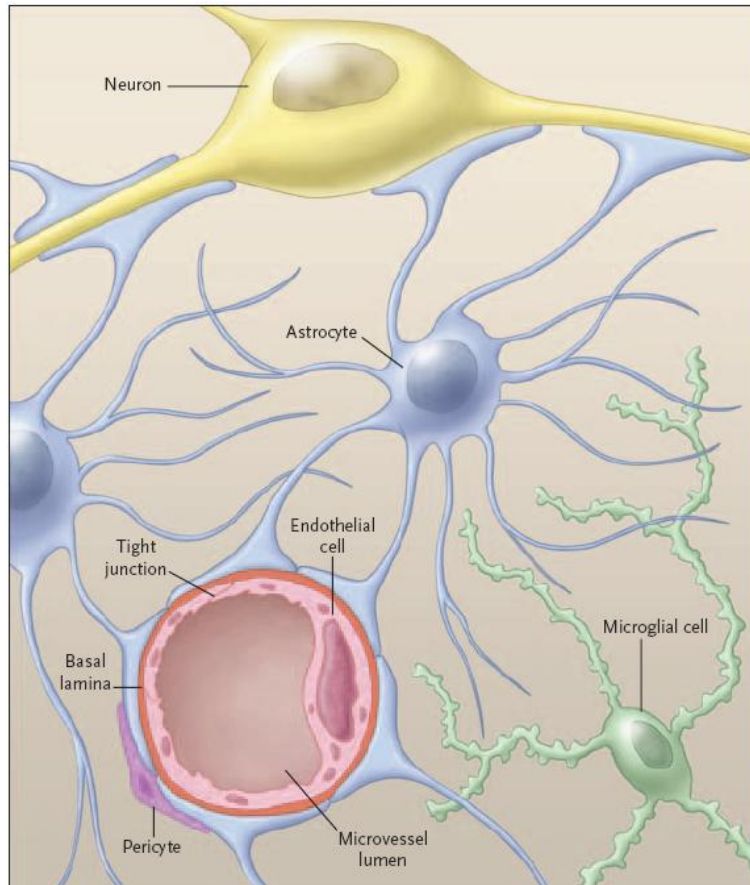
secundario tardío en algunos pacientes tras haber obtenido una reperfusión cerebral efectiva. El 37% de los pacientes que tienen una recanalización precoz no presentan mejoría clínica inmediata [17], una pequeña proporción de ellos experimenta deterioro neurológico tras la mejoría inicial por razones no relacionadas con la re-oclusión arterial o la transformación hemorrágica [18] y un 28% presentan daño cerebral tardío, definido como la resolución inicial de la lesión en la secuencia de difusión (DWI) de la RM cerebral seguida de la reaparición parcial o completa de la lesión en el día 7 [19]. Asimismo, las técnicas de neuroimagen multimodal nos han permitido comprobar que algunos pacientes presentan un crecimiento del tamaño de la lesión en la secuencia de DWI a pesar de haber conseguido la recanalización arterial [20], aunque como limitación de este estudio debe destacarse la falta de conocimiento sobre el momento exacto en el que se produjo la recanalización arterial en estos pacientes. La constatación del daño por reperfusión podría realizarse mediante una RM con secuencia de DWI inmediatamente después de la recanalización arterial y una nueva secuencia de DWI de control en días posteriores si se demostrara un aumento del tamaño de la lesión en la RM de control respecto a la RM post-recanalización. Esta investigación pendiente aportaría información fisiopatológica de gran relevancia en el ictus isquémico agudo. Existen además algunos condicionantes como determinados factores metabólicos, las infecciones recientes o estados pro-inflamatorios, que podrían contrarrestar el efecto beneficioso de la restauración precoz del flujo sanguíneo cerebral, incrementando el daño por reperfusión [21]. La hiperglicemia en el momento del ingreso o la historia previa de diabetes mellitus en pacientes tratados con r-

tPA intravenoso se han asociado a un peor pronóstico funcional respecto a los pacientes no diabéticos o con normoglicemia basal [22,23]. Las cifras elevadas de glicemia al ingreso comportarían una mayor atenuación del efecto beneficioso del tratamiento trombolítico en aquellos pacientes que recanalizan respecto a los que no lo hacen, sugiriendo que la hiperglicemia aumenta el daño cerebral post-reperfusión [24]. En la misma línea, la temperatura axilar >37°C a las 24 horas de la administración del tratamiento trombolítico se ha relacionado con una mayor resistencia a la recanalización arterial, un mayor volumen de infarto cerebral, un incremento de la transformación hemorrágica y un peor pronóstico funcional a largo plazo [25,26].

Otras razones importantes por las que los pacientes con ictus isquémicos tratados con r-tPA por vía sistémica pueden tener un pronóstico desfavorable podrían estar relacionadas con la neurotoxicidad del r-tPA en la unidad neurovascular y con el daño cerebral por reperfusión post-isquémica [27,28]. La unidad neurovascular está integrada por las neuronas, los microvasos que las abastecen de oxígeno y nutrientes y por sus células de soporte como son los astrocitos, otras células gliales y las células inflamatorias residentes [29,30] (*Figura 1*). El insulto isquémico no sólo afecta las neuronas, sino que afecta globalmente la unidad neurovascular de forma que la lesión en cualquier parte de la unidad podría afectar a los otros componentes de la misma [29,30]. Las células endoteliales participan también en la homeostasis de la sustancia blanca, ya que recientemente se ha observado en cultivos celulares que las células endoteliales secretan factores tróficos que participan en la proliferación

y supervivencia de los oligodendrocitos, en lo que se ha denominado unidad oligovascular [31].

Figura 1.- Unidad neurovascular

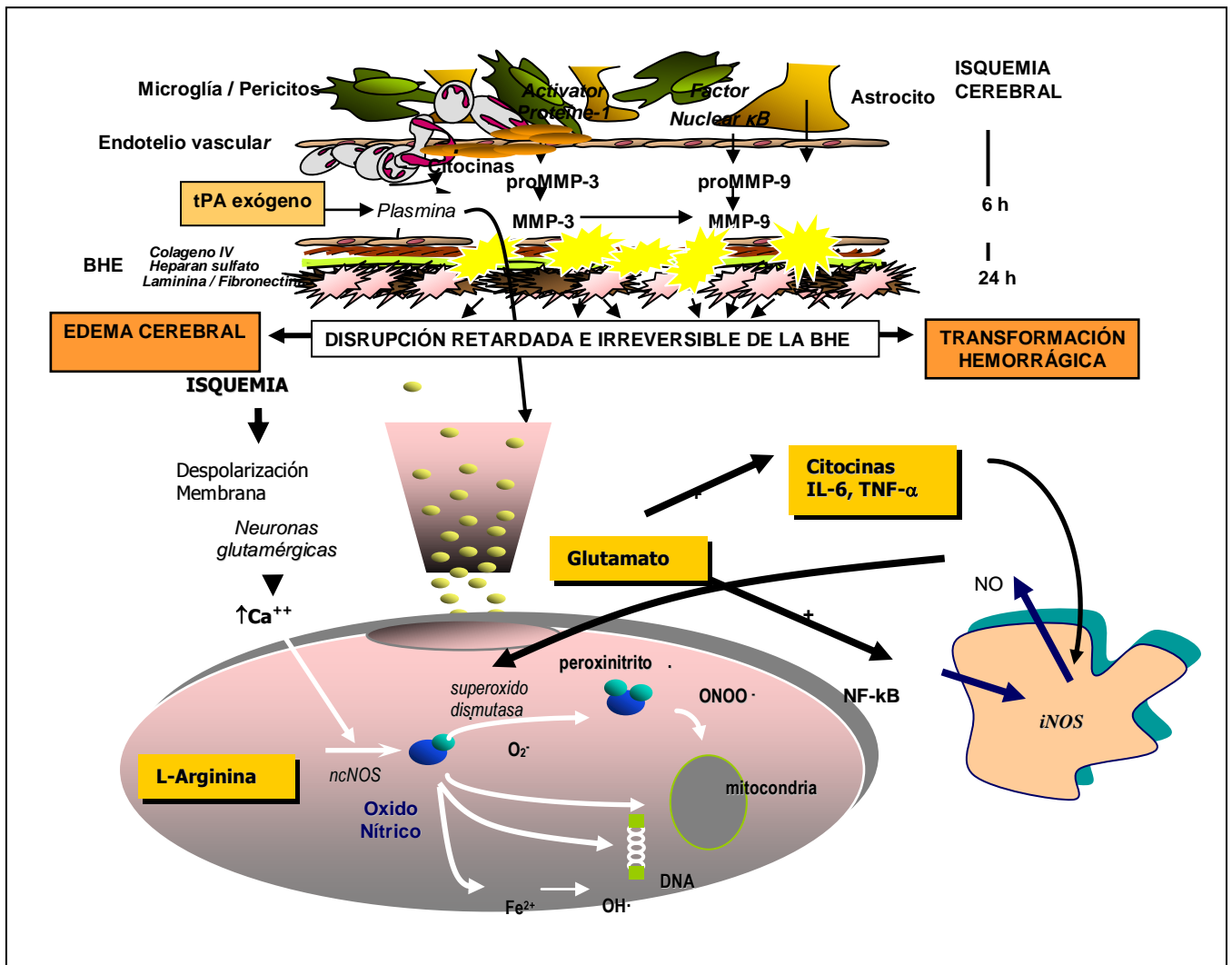


Tomada de Del Zoppo GJ. N Engl J Med 2006; 354: 553-555. La Unidad Neurovascular está integrada por las neuronas, los microvasos que las abastecen y sus células de soporte. La interacción entre las neuronas y los microvasos se establece a través de los astrocitos.

Durante la isquemia cerebral se produce un fallo energético con descenso del ATP que conduce a la alteración de los gradientes iónicos celulares favoreciendo la salida al espacio extracelular de potasio y la entrada de iones, principalmente de calcio a nivel intracelular. Este hecho provoca una liberación masiva de aminoácidos excitatorios, sobretodo de glutamato por

parte de las neuronas presinápticas que activarán los receptores glutamatérgicos AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazolpropiónico) y NMDA (N-metil-D-aspartato) postsinápticos. La activación de estos receptores, principalmente de los NMDA, condiciona la entrada de grandes cantidades de calcio en la célula ocasionando edema citotóxico y la activación de diferentes sistemas enzimáticos (fosfolipasas, proteasas, endonucleasas) que comportan la formación de radicales libres de oxígeno y nitrógeno altamente tóxicos para la célula, y la activación de genes de respuesta inmediata y de muerte celular retardada por apoptosis [32]. Al mismo tiempo, en el interior de la luz vascular se liberan citocinas pro-inflamatorias y moléculas de adhesión que conducen a la migración de los leucocitos que infiltran el parénquima cerebral y a la activación de las células microgliales y astrocitos. Esta respuesta inflamatoria genera una mayor producción de radicales libres que actuarán sobre factores de transcripción como el NF- κ B promoviendo la sobreexpresión de metaloproteasas de matriz (MMP) y también la destrucción de las membranas celulares, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos en el interior de las células [32]. Las MMP actuarán degradando los diferentes componentes de la matriz neurovascular y de la barrera hematoencefálica (BHE) favoreciendo el edema cerebral y la transformación hemorrágica del infarto [31]. En estas condiciones de disrupción de la BHE, el r-tPA exógeno administrado para el tratamiento del ictus isquémico agudo puede penetrar con una mayor facilidad desde el espacio intravascular al extracelular, y con ello potenciar sus efectos pleiotrópicos neurotóxicos sobre el tejido cerebral isquémico [27,28] (*Figura 2*).

Figura 2.- Cascada isquémica

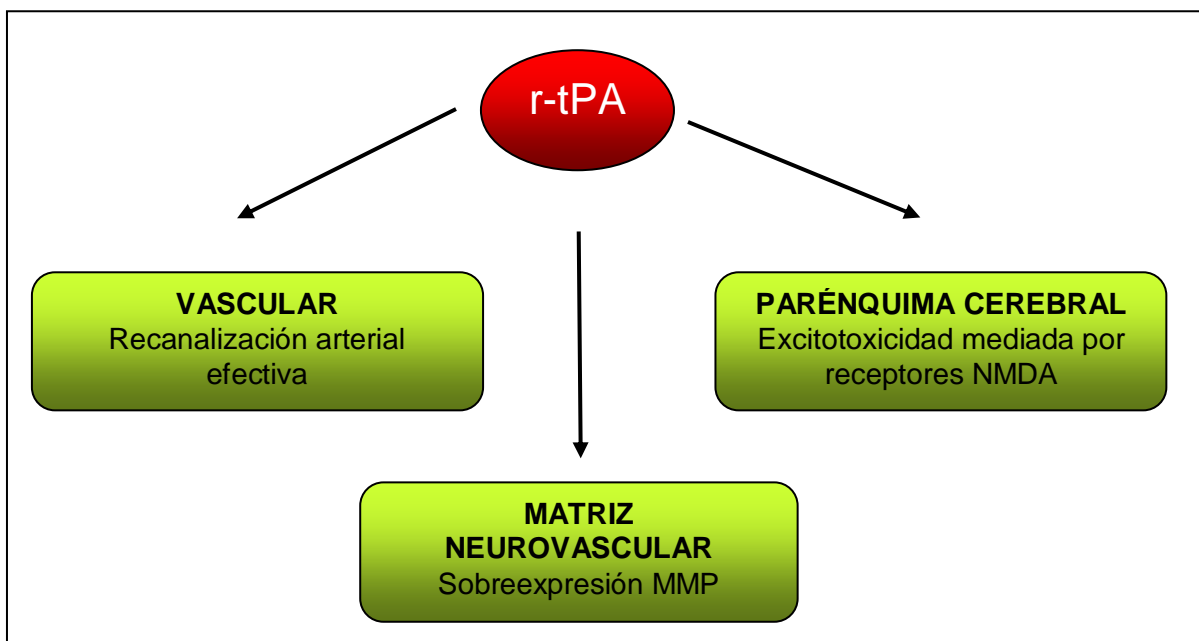


Modificado de J. Castillo. Neurología 2004; 19: 312-320. Ver texto páginas 18 y 19.

La neurotoxicidad del r-tPA ha sido ampliamente estudiada en modelos animales (Figura 3). En 1998, Wang et al demostraron que en un modelo de isquemia focal transitoria de 3 horas con reperfundación mantenida posterior de 21 horas, el tamaño del infarto cerebral fue significativamente menor en el ratón *knockout* para r-tPA respecto al ratón *wild-type* [33]. Además, la administración intravenosa de r-tPA exógeno en el ratón *wild-type* incrementó

considerablemente el tamaño del infarto cerebral [33]. Aunque en la literatura existen algunos datos contradictorios [34,35], la mayoría de estudios apoyan una acción perjudicial del r-tPA fuera del compartimento vascular [33,36]. Se ha observado que el tratamiento con r-tPA activa la subunidad NR1 de los receptores de glutamato NMDA, incrementando la corriente intracelular de calcio y, por tanto, favoreciendo el daño excitotóxico [37]. El efecto neurotóxico del r-tPA viene determinado además por su acción lesiva sobre la BHE, ya que existen datos consistentes de que el r-tPA incrementa la expresión de las MMP, especialmente la MMP-9, proteasas que desempeñan un papel crucial en la degradación de los componentes de la matriz neurovascular durante la isquemia cerebral [38,39].

Figura 3.- Efectos pleiotrópicos del r-tPA



El r-tPA ejerce un efecto beneficioso en el compartimento vascular activando el plasminógeno para conseguir una trombólisis efectiva y restaurar el flujo sanguíneo cerebral, pero también ejerce un efecto perjudicial mediante la activación de los receptores NMDA en el parénquima cerebral y la sobreexpresión de MMP en la matriz

neurovascular que conducen a un acúmulo de leucocitos y radicales libres, y en consecuencia, a un mayor daño cerebral mediado por la excitotoxicidad y la rotura de la BHE.

Las MMP son una familia de endopeptidasas que se encargan en condiciones fisiológicas del remodelado de la matriz extracelular. Resultados de estudios experimentales y clínicos demuestran que las MMP juegan un papel fisiopatológico relevante en la isquemia cerebral. La expresión de MMP aumenta rápidamente tras el insulto isquémico [40,41], mientras que la inhibición farmacológica o genética de la actividad de las MMP comporta una reducción del edema cerebral y del volumen de infarto cerebral en modelos animales [42]. La sobreexpresión de MMP-9 en la zona de infarto y en el tejido cerebral circundante ha sido confirmada en cerebros de pacientes fallecidos por un ictus [43], especialmente en las zonas con transformación hemorrágica del infarto [44]. Datos obtenidos de estas necropsias sugieren que el origen celular mayoritario de la MMP-9 en estas áreas es la importante infiltración neutrofílica que acontece alrededor de los microvasos cerebrales dañados [44]. Las concentraciones basales elevadas de MMP-9 en sangre de pacientes con ictus isquémico se han asociado a la gravedad del ictus y al desarrollo de transformación hemorrágica y edema cerebral [45,46]. El aumento de las concentraciones séricas de MMP-9 al ingreso es un predictor independiente de disrupción de la BHE en pacientes con ictus isquémico, tal como ha sido recientemente demostrado en secuencias específicas de RM en las que se detecta una captación de contraste del espacio subaracnoideo de los surcos hemisféricos, indicando la presencia de rotura de BHE [47]. Además, la

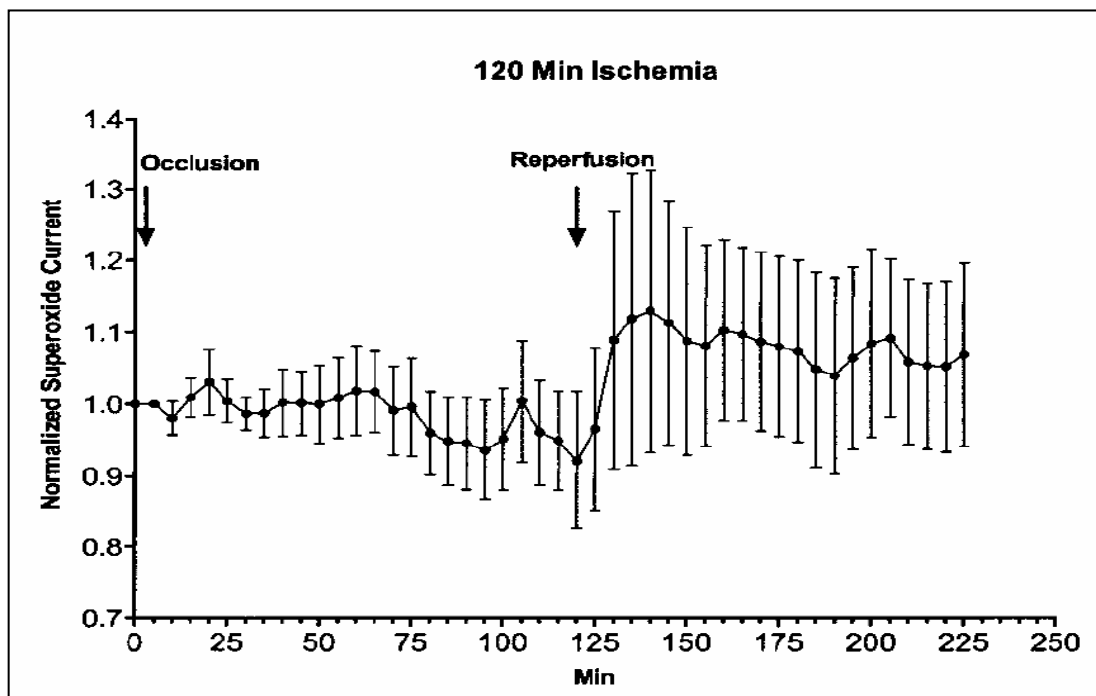
elevación de los valores en plasma de MMP-9 ha mostrado una estrecha correlación con las concentraciones cerebrales de MMP-9 dentro de las primeras 24 horas de isquemia cerebral en un modelo animal en rata [48], por lo que la determinación de las concentraciones de MMP-9 en sangre al ingreso de un paciente con ictus parece ser un marcador fiable de disrupción de la BHE y, en consecuencia, del riesgo de transformación hemorrágica y edema cerebral tras el infarto. Datos experimentales y clínicos demuestran que el papel deletéreo de las MMP en la isquemia cerebral podría aumentar ostensiblemente en el contexto de la administración de tratamiento trombolítico con r-tPA. En modelos animales de isquemia cerebral focal, la administración de r-tPA se ha asociado a un incremento en la expresión de MMP-9 en el cerebro isquémico, mientras que la asociación al r-tPA de una antagonista de las MMP o el bloqueo genético de las mismas, disminuye de forma significativa el volumen de hemorragia cerebral relacionado con el tratamiento trombolítico [38,49,50]. En pacientes con ictus isquémico agudo, las concentraciones en sangre de MMP-9 fueron significativamente mayores en aquellos que fueron tratados con r-tPA IV respecto a los pacientes que no recibieron dicho fármaco [51]. Así, las concentraciones pre-tratamiento de MMP-9 y de fibronectina celular (un componente de la lámina basal del endotelio) predicen el riesgo de transformación hemorrágica del infarto y edema cerebral grave en pacientes tratados con r-tPA IV [52-55]. Datos experimentales recientes en sangre humana indican que el r-tPA promueve la degranulación de los granulocitos y la liberación rápida de MMP-9, sugiriendo un rol potencial de los neutrófilos en la

hemorragia cerebral relacionada con el tratamiento trombolítico IV por r-tPA [56].

2. Estrés oxidativo y daño potencial por reperusión en el ictus isquémico agudo

El estrés oxidativo es uno de los mecanismos principales de daño cerebral en la isquemia/reperusión [57]. La reperusión después de la isquemia cerebral puede exacerbar la generación de radicales libres a partir del oxígeno, sustancias altamente tóxicas tanto a nivel celular como vascular [58,59] (Figura 4).

Figura 4.- Formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en la isquemia/reperusión cerebral



Tomada de Kent TA, et al. Stroke 2001; 32: 2318-2327. Concentración de anión superóxido en el córtex cerebral de rata en un modelo de oclusión transitoria de la arteria cerebral media. La concentración de ROS aumenta de forma súbita tras la reperusión cerebral.

El desequilibrio entre la producción de radicales libres y la capacidad antioxidante endógena de enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la glutatión peroxidasa (Gpx) o la catalasa entre otros, comportará la magnitud del estrés oxidativo a nivel cerebral [59]. El efecto tóxico de los radicales libres, especialmente las especies reactivas de oxígeno (ROS), afecta diversas funciones celulares ya que estas sustancias producen peroxidación lipídica, desnaturalización proteica, inactivación enzimática, lesión del DNA, liberación de calcio desde los depósitos intracelulares, lesión del citoesqueleto y alteración de la quimiotaxis celular. Además, la generación de ROS es crucial en la pérdida de la integridad microvascular ya que pueden alterar la vasorreactividad cerebral, aumentan la agregabilidad plaquetaria y lesionan la membrana celular endotelial incrementando la permeabilidad del endotelio [58,59].

Datos experimentales muestran que la liberación de aminoácidos excitatorios como el glutamato puede estimular la generación de ROS, mientras que las ROS pueden exacerbar la liberación de glutamato, lo que indica que ambos procesos están interrelacionados [60]. Así, la administración previa de antioxidantes a la oclusión arterial ha demostrado un efecto neuroprotector a través de la inhibición del incremento de glutamato inducido por la isquemia cerebral [61]. Por otro lado, la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria en la isquemia cerebral incrementa la migración de células inflamatorias a

través de la pared vascular que contribuyen a la lesión por reperfusión, favoreciendo la producción de radicales superóxido [62]. Sin embargo, un factor crucial del daño por estrés oxidativo en la isquemia/reperfusión cerebral viene determinado por la regulación de la actividad de las MMP por parte de los radicales libres [63]. En ratones *knockout* que no expresan SOD, la disrupción de la BHE después de la isquemia/reperfusión cerebral está íntimamente ligada al incremento en la expresión de MMP-9 en la pared vascular, un efecto que se revierte en ratones transgénicos que sobreexpresan la SOD [64]. La formación de radicales superóxido y peroxinitrito inducidos por la reperfusión es particularmente intensa en los microvasos y en los pericitos que los rodean, donde los radicales libres coinciden con marcadores de disrupción de la BHE y con la expresión de MMP-9 [65]. El daño cerebral y la rotura de la BHE relacionados con el estrés oxidativo ha sido replicado también en otros modelos animales *knockout* para otros antioxidantes endógenos [66].

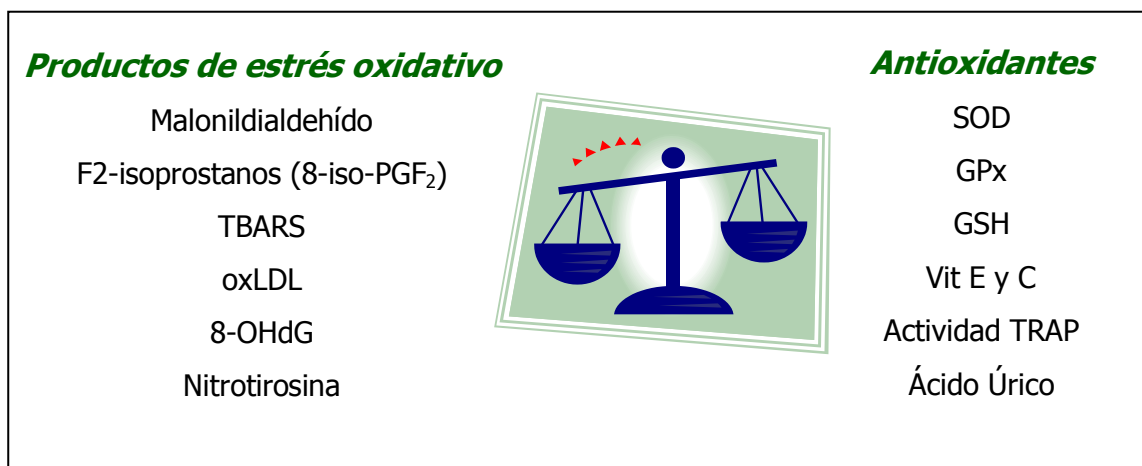
El estrés oxidativo en la unión neurovascular podría agravarse por la excitotoxicidad y la sobreexpresión de MMP-9 inducidas por r-tPA [37,38], y por factores metabólicos como la hipertermia y la hiperglucemia [67,68]. En este contexto, datos experimentales sugieren que los antagonistas de los receptores NMDA bloquean los efectos neurotóxicos del r-tPA [69], mientras que la disrupción de la BHE está significativamente reducida cuando la reperfusión es mecánica en comparación con la reperfusión inducida por r-tPA [50] y cuando r-tPA se administra en combinación con PBN, un atrapador de radicales libres, en un modelo tromboembólico de ictus isquémico en rata [70]. En diferentes modelos animales de isquemia cerebral, otros agentes neutralizadores de

radicales libres, y también los antioxidantes, han demostrado que reducen el volumen de infarto, la respuesta inflamatoria, la transformación hemorrágica y el edema cerebral y, en consecuencia, mejoran el pronóstico funcional [71-74]. Además, cuando se administran en combinación con fármacos trombolíticos como tenecteplasa o r-tPA muestran un efecto sinérgico favorable sobre el pronóstico funcional, aumentando la acción neuroprotectora del trombolítico sobre todo cuando la terapia de reperfusión se retrasa más allá de 60 minutos o bien es administrada a dosis bajas [71-74]. Uno de los mecanismos fisiopatológicos responsables del efecto beneficioso de los agentes atrapadores de radicales libres y/o antioxidantes se basa en la atenuación de la expresión de las MMP-9 y de la activación del factor de transcripción NF-κB generada por el r-tPA [74,75].

El daño por reperfusión no ha sido nunca demostrado en humanos, pero la importancia del estrés oxidativo en pacientes con un ictus isquémico agudo está sustentada por diversos estudios clínicos en los que se demuestra, durante la isquemia cerebral, un aumento de la concentración en sangre de productos de la oxidación de los lípidos y las proteínas, y variaciones en las concentraciones de antioxidantes endógenos, ya en las primeras 24 horas [76-79]. El incremento de biomarcadores de estrés oxidativo o la disminución de la actividad antioxidante endógena después del ictus isquémico se ha asociado a mayor gravedad del déficit neurológico, mayor volumen de infarto cerebral y peor pronóstico funcional [78-85]. La determinación en sangre de las concentraciones de radicales libres, tanto de ROS como de especies reactivas

de nitrógeno, conlleva una gran dificultad debido a sus bajas concentraciones intracelulares, su corta vida media y la presencia de sistemas endógenos eficientes de antioxidantes o de atrapadores de radicales que dificultan su medida directa [59]. Se han investigado varias sustancias biológicas como potenciales marcadores séricos de estrés oxidativo, pero en la actualidad no se conoce el biomarcador ideal que permita cuantificar el grado de toxicidad por radicales libres en la isquemia cerebral aguda. El equilibrio entre antioxidantes endógenos (ácido úrico, Cu-Zn SOD, glutatión peroxidasa, vitaminas C y E) y productos del estrés oxidativo (malonildialdehído, TBARS, F2-isoprostanos, 8-OHdG) podría constituir la mejor aproximación a la evaluación del estrés oxidativo en pacientes con ictus isquémico [86] (Figura 5).

Figura 5.- Determinación de la magnitud del estrés oxidativo



Durante la isquemia cerebral se producen variaciones en las concentraciones séricas de productos del estrés oxidativo y sustancias antioxidantes endógenas. El equilibrio entre ambos parece el mejor indicador de la magnitud del estrés oxidativo.

El papel del estrés oxidativo en los pacientes tratados con r-tPA ha sido hasta el momento escasamente estudiado. En un estudio caso-control, el

incremento rápido (dentro de las primeras 8 horas), de las concentraciones séricas de F2-isoprostanos (producto de la oxidación del ácido araquidónico) no mostró diferencias entre los pacientes con ictus tratados con r-tPA y los no tratados. En cambio, los valores en sangre de F2-isoprostanos mostraron una correlación positiva significativa con los niveles de MMP-9 únicamente en los pacientes que recibieron el tratamiento trombolítico [87]. En un estudio con un reducido tamaño muestral en pacientes tratados con r-tPA intravenoso dentro de las primeras 3 horas desde el inicio de los síntomas, la perfusión endovenosa de ácido úrico como agente antioxidante se asoció a un menor incremento de MMP-9 activadas al final de la infusión (<5,5 h), que a su vez comportó un mejor pronóstico funcional a largo plazo [88]. Las concentraciones en sangre de ácido úrico en el ictus isquémico agudo muestran un patrón fluctuante en forma de U con una rápida disminución en las primeras 48 horas y un progresivo aumento hasta las concentraciones basales en las dos semanas siguientes [89]. La mayor diferencia entre las concentraciones basales y las concentraciones a las 48 horas, y por tanto el consumo de ácido úrico, se ha asociado a la recanalización arterial y a la mejoría neurológica precoz [89]. Recientemente, en un estudio con un mayor número de pacientes con ictus isquémico tratados con terapia trombolítica con r-tPA en menos de 3 horas, y con oclusión de la ACM documentada por DTC, la recanalización arterial y, por tanto, la reperfusión cerebral, no se asoció a un incremento de la concentración sérica de los productos de estrés oxidativo (malonildialdehído, productos avanzados de la oxidación proteica y mieloperoxidasa) respecto a aquellos pacientes que no recanalizaron. Sin embargo, los pacientes con concentraciones más elevadas

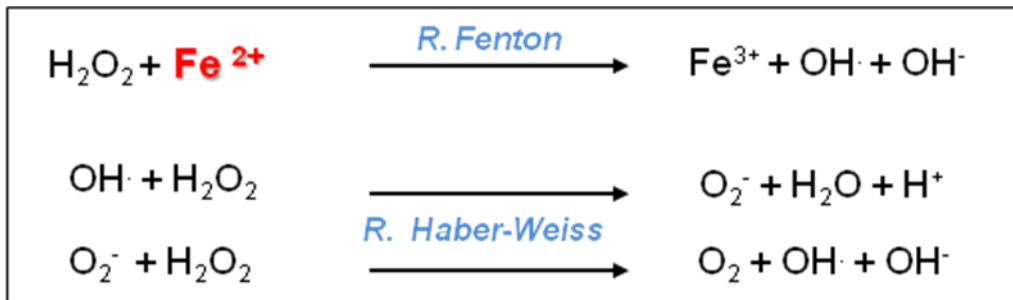
de malonildialdehído (producto de la peroxidación lipídica) al ingreso mostraron mayor resistencia a la recanalización arterial a las 24 horas, mayor frecuencia de transformación hemorrágica y peor pronóstico funcional [90]. Un importante estudio experimental ha demostrado recientemente que la isquemia cerebral produce la contracción mantenida de los pericitos de los microvasos a pesar de la recanalización precoz a las 2 horas de la arteria ocluida, y que la contracción de los pericitos provoca estenosis segmentarias de los capilares que obstruyen el flujo eritrocitario impidiendo la microcirculación. La supresión del estrés oxidativo mediante agentes neutralizadores de ROS o de especies reactivas de nitrógeno revierte la contracción de los pericitos y restaura la microcirculación cerebral, mientras que la administración de peroxinitrito ocasiona la contracción de los pericitos [91].

Estos hallazgos sugieren que el daño cerebral por estrés oxidativo en pacientes con ictus isquémico agudo tratado con r-tPA podría ser especialmente importante en aquellos pacientes no respondedores al tratamiento, al actuar el r-tPA como un agente potenciador del daño por reperfusión, sobre todo si la recanalización arterial se consigue tardíamente. Los resultados del proyecto de investigación del ISC III (FIS PI060788) titulado " Sobrecarga de hierro y toxicidad neurovascular: estudio clínico y experimental en la isquemia y reperfusión cerebral", cuya fase final se está analizando actualmente en nuestro departamento, podrán responder sobre la existencia de un efecto perjudicial del estrés oxidativo en la recanalización arterial, la disrupción de la BHE y, en consecuencia, en el pronóstico de los pacientes con ictus isquémico tratados

con r-tPA IV mediante la determinación de las concentraciones en suero de productos oxidados y sustancias antioxidantes en diferentes tiempos de evolución desde el inicio de la isquemia cerebral. Asimismo, estos resultados permitirán conocer el perfil temporal de estos biomarcadores en dichos pacientes, y su relación con el momento de la recanalización evaluada por exámenes seriados de DTC.

3. Depósitos de hierro, radicales libres, daño cerebral y microvascular en la isquemia cerebral

En las células de mamíferos existen dos fuentes principales para la formación de radicales libres, el oxígeno (O_2) y el óxido nítrico (NO), que determinan la formación de radical superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH^-), peroxinitritos ($ONNO^-$) y radicales lipídicos (LOO^-) [92]. El radical hidroxilo es el más tóxico y reactivo, y su formación a partir de peróxido de hidrógeno es catalizada por la presencia de hierro en forma ferrosa (Fe^{2+}) mediante la reacción de Fenton. El radical hidroxilo producido en la reacción de Fenton reaccionará con más peróxido de hidrógeno para generar radical superóxido, radical que a su vez reacciona con peróxido de hidrógeno para generar más radical hidroxilo en la reacción de Haber-Weiss [92] (*Figura 6*).

Figura 6.- El hierro participa en la formación de radicales libres

La reacción de Fenton consiste en la formación de radical hidroxilo a partir del peróxido de hidrógeno mediante la adición de hierro en su forma ferrosa. El radical hidroxilo es tremendamente reactivo y puede producir procesos de oxidación en cascada, como por ejemplo en la reacción de Haber-Weiss donde se generan nuevos radicales libres como el anión superóxido, que a su vez puede generar más radical hidroxilo al reaccionar con el peróxido de hidrógeno.

El hierro es, por tanto, un metal ampliamente distribuido en el organismo que puede participar como catalizador de reacciones químicas de oxidación. Las alteraciones en el metabolismo y homeostasis del hierro que incrementan la biodisponibilidad celular de hierro ferroso pueden condicionar un aumento en la producción de radicales libres favoreciendo el estrés oxidativo [93].

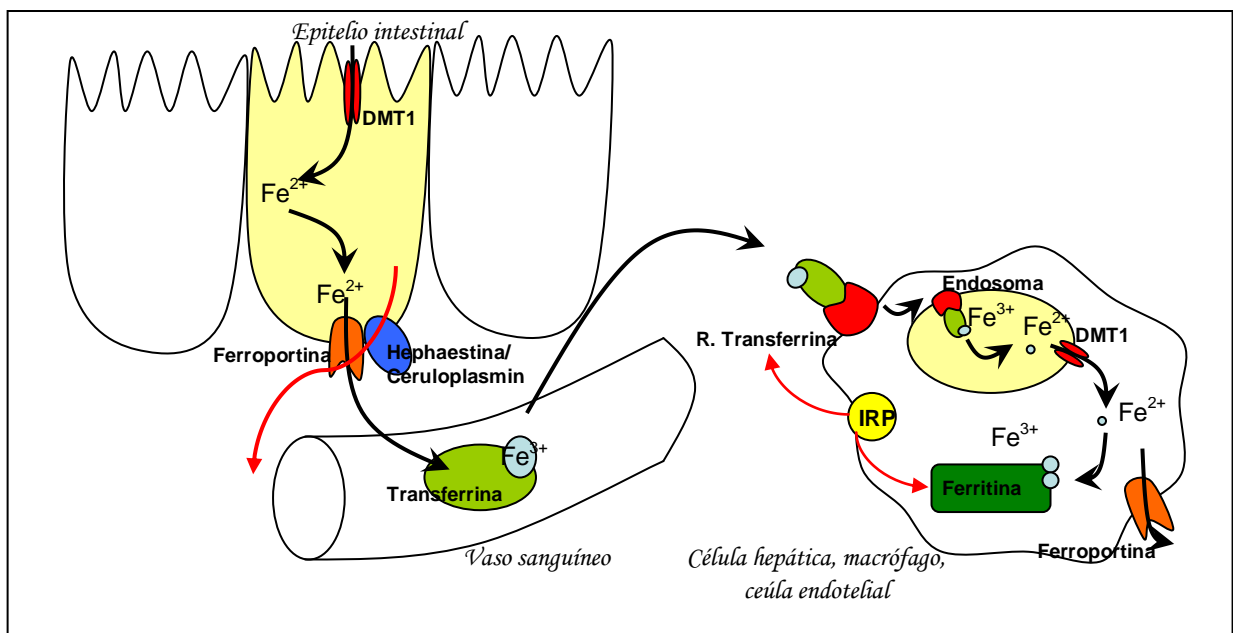
En la dieta habitual se ingieren unos 10 mg de hierro diarios, de los cuales se absorben un 10% (1 mg/día). El hierro ingerido por la dieta en forma férrica (Fe^{3+}) es absorbido en el duodeno y primer segmento de yeyuno a través de la membrana apical del enterocito, previa reducción a forma ferrosa (Fe^{2+}) por el citocromo b reductasa (Dcytb). El transporte a través de la membrana apical del enterocito está facilitado por la proteína DMT-1 (*divalent metal transporter*). También se absorbe hierro desde la forma hemo, a través

del receptor HCO-1 (*heme-carrier protein-1*), que es metabolizado a ion férrico por la HO-1 (*heme oxygenasa-1*). En la membrana basolateral del enterocito, el hierro es exportado a la circulación a través de la proteína ferroportina y es oxidado a forma férrica en la membrana celular por ferroxidasas como la heparina en las células intestinales y la ceruloplasmina en las células no intestinales. En el plasma, el hierro se une a la proteína transferrina que lo transporta a través de la circulación sanguínea. Cada molécula de transferrina se une a dos moléculas de hierro en forma férrica. En la membrana celular de diversos tipos celulares se localizan los receptores de transferrina, que se unen a la transferrina sérica unida a hierro y permiten su internalización mediante un mecanismo de endocitosis. En el interior celular, la reducción del pH del endosoma permite la liberación del hierro unido a transferrina y, tras su reducción a forma ferrosa, es exportado del endosoma a través del DMT-1. El hierro puede entrar entonces en el ciclo mitocondrial para formar el grupo hemo, o puede ser almacenado en forma de ferritina a nivel intracelular. Cada molécula de ferritina puede almacenar entre 2000-4000 átomos de hierro en su forma férrica. La ferroportina está implicada también en la excreción de hierro desde la célula al espacio extracelular [93, 94] (*Figura 7*) (*Tabla 1*).

Existe un sistema de autoregulación del equilibrio del hierro de manera que, cuando el pool de hierro intracelular aumenta, como en situaciones de sobrecarga de hierro, se produce una inhibición de la síntesis de receptores de transferrina para evitar su recaptación y se induce la expresión de ferritina para facilitar su almacenamiento. Las IRP (proteínas reguladoras de hierro) son

capaces de unirse a sitios específicos del mRNA de la ferritina o del receptor de la transferrina para realizar esta función reguladora. Por otra parte, las concentraciones de transferrina sérica o su saturación regulan la absorción de hierro a nivel intestinal induciendo o inhibiendo la expresión de las proteínas implicadas en su absorción y paso a la sangre. Finalmente, la hepcidina, una proteína sintetizada principalmente en el hígado, actúa sobre la proteína exportadora ferroportina promoviendo su internalización y degradación, ocasionando una menor secreción del hierro absorbido por el enterocito y una menor secreción de hierro desde los depósitos intracelulares [93-95] (Tabla 1).

Figura 7.- Metabolismo sistémico del hierro



Cortesía de Isaac García de Yébenes. El metabolismo sistémico del hierro es un proceso complejo en el que intervienen diversas proteínas con función transportadora, de almacenaje y autorreguladoras de los valores celulares de hierro (ver texto).

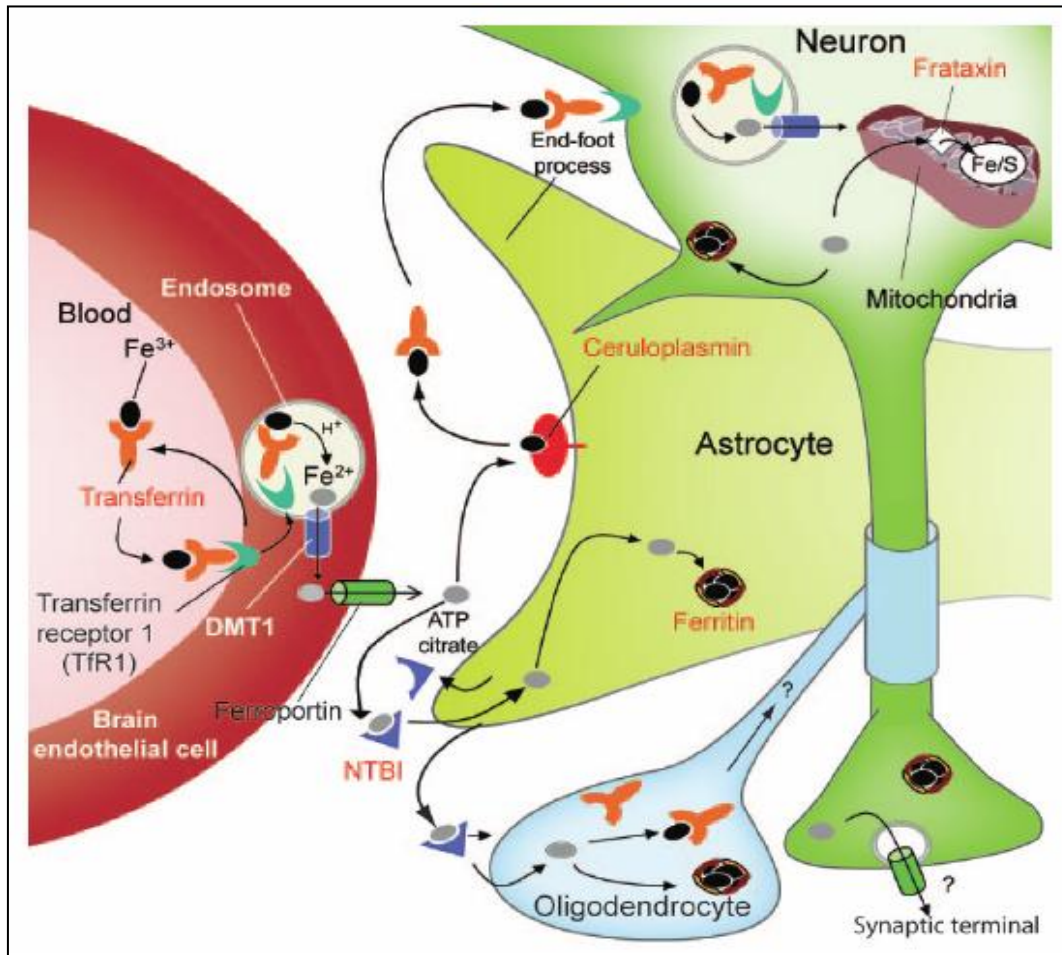
En el cerebro, el hierro es el metal transicional más abundante y es fundamental para la síntesis de varios neurotransmisores, la formación de la

mielina, el desarrollo de las conexiones dendríticas y para diferentes sistemas enzimáticos que regulan la energía celular [96]. Aunque existen aspectos aun no bien conocidos, la homeostasis cerebral del hierro tiene bastantes similitudes con la homeostasis del hierro a nivel sistémico, ya que las principales proteínas reguladoras del hierro a nivel sistémico también se expresan en el SNC [96,97]. La principal diferencia es que la BHE concede una independencia relativa del hierro cerebral respecto al contenido total de hierro del organismo y que la mayoría de proteínas que se unen al hierro tienen una menor capacidad de saturación en el cerebro que en otros órganos [96-98]. El hierro plasmático unido a la transferrina entra en el cerebro por endocitosis a partir de los receptores de la transferrina que se encuentran sobretodo en la superficie de las células endoteliales de la BHE, y en una menor proporción, en las células epiteliales de los plexos coroideos. El pH ácido de los endosomas contribuye a la reducción del hierro férrico a ferroso [96,98]. El mecanismo de transporte del hierro ferroso desde el endosoma al citosol de las células endoteliales y posteriormente al fluido extracelular es controvertido, ya que a diferencia de otras células no se ha detectado la expresión de DMT-1 en las células endoteliales. Existen dos hipótesis más aceptadas: 1) el hierro ferroso sería transportado al citosol a través del DMT-1 y posteriormente exportado al fluido extracelular mediante la ferroportina y 2) el hierro ferroso es transportado dentro de vesículas desde el endosoma al citosol y desde el citosol al intersticio sin pasos intermedios [98]. Los astrocitos que contactan con las células endoteliales pueden liberar citrato, ATP y otros nucleótidos al fluido intersticial. El hierro ferroso en el intersticio se puede unir a la transferrina tras ser oxidado

a hierro férrico por la ceruloplasmina expresada en la superficie de los astrocitos, o bien se puede unir a moléculas como el citrato, ATP o ácido ascórbico formando el hierro no unido a transferrina (NTBI), el cual puede entrar al citosol de todas las líneas celulares cerebrales [98]. La afinidad por el hierro de la transferrina es pH dependiente, de forma que en ambientes ácidos como el fluido extracelular durante la isquemia cerebral, pueden favorecer su disociación y aumentar la disponibilidad de hierro libre para las diferentes líneas celulares cerebrales [97,98]. Las neuronas expresan receptores de transferrina, DMT-1 y ferroportina, por lo que el hierro entra en las neuronas a través de la endocitosis del complejo transferrina-receptor de la transferrina, es liberado al citosol mediante el DMT-1 y exportado al espacio extracelular a través de la ferroportina [97,98]. Los astrocitos y los oligodendrocitos no expresan receptores de transferrina. Sin embargo, los oligodendrocitos y las células del plexo coroideo sintetizan transferrina para la movilización y distribución de este hierro libre dentro del cerebro [97,98]. Aproximadamente un tercio del hierro cerebral está almacenado en forma de ferritina, predominantemente en las células gliales como los oligodendrocitos y en las neuronas [99,97]. La principal función de la ferritina es atrapar hierro libre para proteger a las células del daño oxidativo [97], aunque podría actuar también como proteína transportadora de hierro a nivel intracelular [99]. Las necesidades celulares de hierro regularán la liberación de hierro desde la ferritina. Las proteínas IRP, ferroportina y probablemente la hepcidina ejercen también a nivel cerebral una función reguladora de las concentraciones intracelulares de hierro, permitiendo una respuesta adaptativa a situaciones que alteran la homeostasis normal del hierro

como la hipoxia, anemia, déficit o sobrecarga de hierro e inflamación [96] (Figura 8) (Tabla 1).

Figura 8.- Metabolismo cerebral del hierro



Tomada de Benarroch, EE. Neurology 2009; 72:1436-40. El receptor de la transferrina en la membrana luminal de la célula endotelial se une al complejo transferrina- Fe^{3+} , el cual es internalizado mediante endosomas en los que se reduce el Fe^{3+} a Fe^{2+} . El Fe^{2+} podría ser transportado al citosol de la célula endotelial mediante el DMT-1 y luego ser exportado al fluido extracelular a través de la ferroportina. La ceruloplasmina que se expresa en los astrocitos oxida de nuevo Fe^{2+} a Fe^{3+} , que se une de nuevo a la transferrina. La transferrina es la principal fuente de hierro para las neuronas. Parte del Fe^{2+} puede unirse al ATP o citrato liberado desde los astrocitos y ser transportado como hierro no unido a la transferrina (NTBI), el cual es el principal origen de hierro de los oligodendrocitos y astrocitos. Los oligodendrocitos también sintetizan transferrina que participa en el transporte de hierro dentro de la misma

célula. La ferritina se expresa en el citosol de todas las líneas celulares cerebrales para secuestrar y almacenar el Fe^{2+} libre.

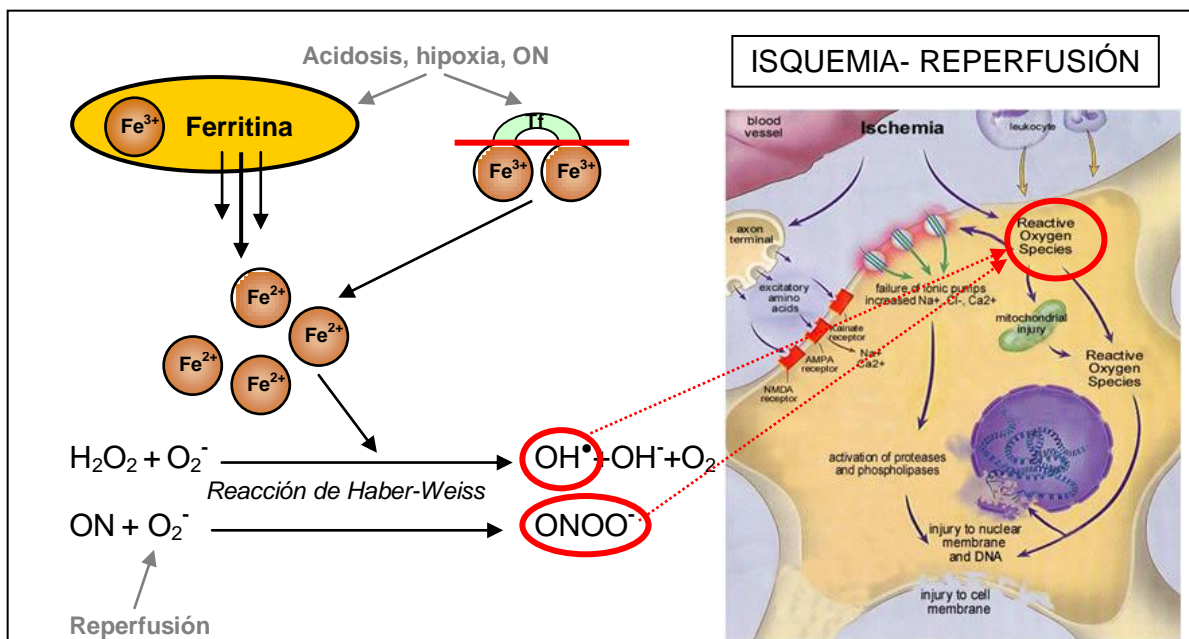
Tabla 1. Proteínas implicadas en el metabolismo sistémico y cerebral del hierro

Proteínas	Expresión celular	Función principal	Sobrecarga de hierro
DMT-1	Enterocito, células periféricas SNC: neurona, astrocito, endotelio?	Transporte de hierro ferroso no unido a transferrina al interior de la célula	- DMT-1 del enterocito (- absorción hierro)
Hepastina	Enterocito	Ferroxidasa (oxidación Fe^{2+} a Fe^{3+})	
Ceruloplasmina	Células periféricas SNC: astrocito	Ferroxidasa (oxidación Fe^{2+} a Fe^{3+})	
Ferroportina	Enterocito, células periféricas SNC: neurona, oligodendrocito, astrocito?, endotelio ?	Excreción de hierro intracelular al torrente sanguíneo y/o fluido extracelular	+ expresión
Transferrina	Suero SNC: oligodendrocito, neurona	Transporte sérico del hierro Transporte intracelular del hierro	- expresión
Receptor de Transferrina	Células periféricas SNC: endotelio, neurona	Internalización celular del hierro unido a transferrina	- expresión
Ferritina	Células periféricas SNC: neurona, oligodendrocito, astrocito, endotelio	Almacenaje intracelular de hierro Ferroxidasa	+ expresión
IRP	Citosol células periféricas y SNC	Modulación concentración intracelular de hierro	- mRNA ferritina y rTF
Hepcidina	Hepatocito, suero, SNC: ?	Principal proteína reguladora del hierro Degradación ferroportina	+ expresión

DMT-1: divalent metal ion transporter-1, IRP: proteínas reguladoras de hierro, rTF: receptor de la transferrina, -: inhibición, +: inducción

Durante la isquemia cerebral se produce liberación de hierro en su forma ferrosa desde los depósitos intracelulares de ferritina, que se ve favorecida por la situación de acidosis, incremento de catecolaminas y la presencia de radicales libres como el anión superóxido y el óxido nítrico [100-102]. La afinidad de la transferrina por el hierro también disminuye, aumentando la concentración cerebral de hierro libre intra y extracelular [100-102]. El hierro en su forma ferrosa está especialmente implicado en la formación de radicales libres como el radical hidroxilo (OH^\bullet) y el radical superóxido (O_2^\bullet), que junto a otros radicales como el peroxinitrito (ONOO^-) se consideran inductores del daño tisular en la isquemia y reperfusión cerebral [100-102] (Figura 9).

Figura 9.- Metabolismo del hierro en la isquemia cerebral



La acidosis y presencia de óxido nítrico durante la isquemia cerebral permite la reducción del hierro férrico a ferroso y su liberación tanto desde la ferritina como de la transferrina, aumentando la concentración cerebral de hierro libre, el cual participa como catalizador de reacciones químicas en las que se generan radicales libres. Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno participan en el daño por estrés oxidativo, favoreciendo la activación de la vía excitotóxica, una mayor respuesta inflamatoria y

mayor disrupción de la barrera hematoencefálica, aumentando aún más el daño y muerte celular.

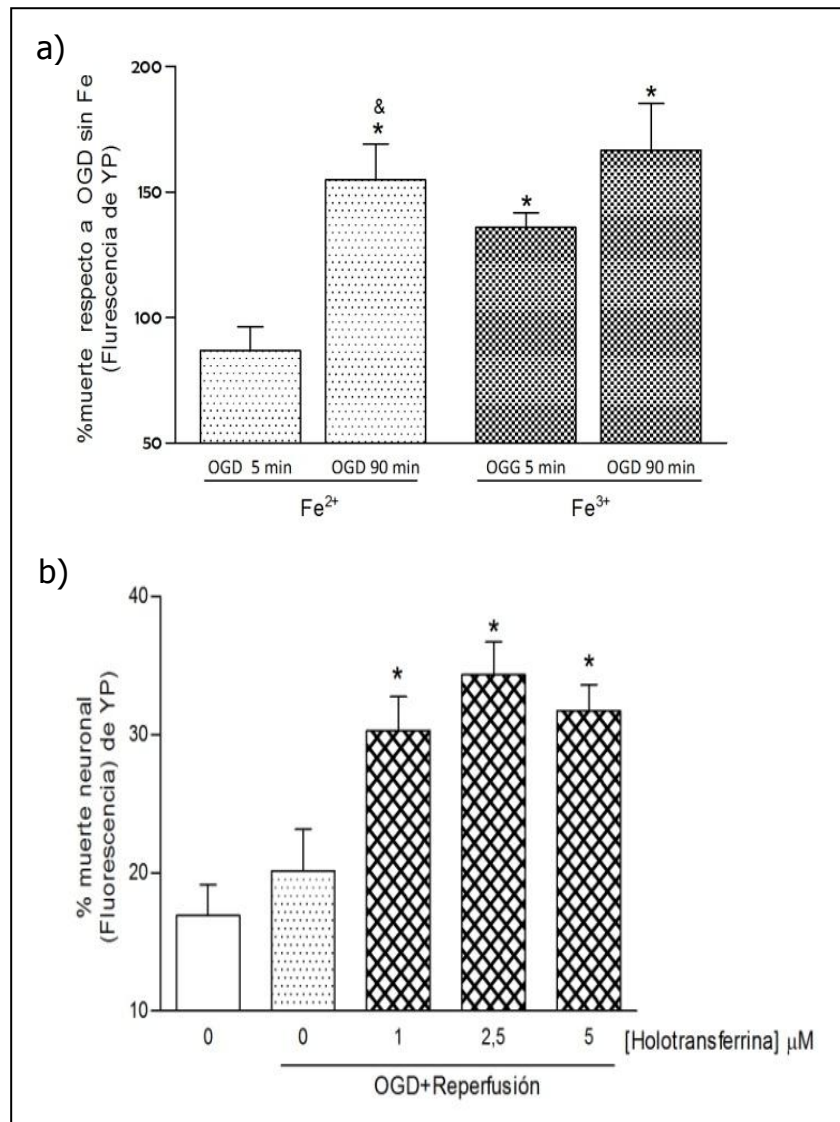
Existe una extensa evidencia científica que apoya el papel causal del hierro en el daño isquémico cerebral [103]. Numerosos hallazgos experimentales aportan datos relevantes en este sentido. En modelos animales de isquemia cerebral focal se ha demostrado un acúmulo rápido (a la hora) y transitorio (menor a 4 horas) de hierro libre en el core y zona de penumbra isquémica, con concentraciones de hierro libre indetectables en plasma, lo que sugiere que el hierro libre cerebral no procede en su mayor parte del torrente sanguíneo como tal, aunque podría difundir en forma de holotransferrina (transferrina unida a hierro) [104]. Nuestro grupo observó que la ingesta de una dieta con alto contenido en hierro se asociaba a mayor volumen de infarto cerebral después de la oclusión permanente de la ACM en la rata [105], mientras que otros autores han demostrado que la dieta con bajo contenido en hierro o los quelantes de hierro administrados antes o precozmente después de la isquemia cerebral ejercen un efecto neuroprotector sobre el tejido isquémico reduciendo el tamaño del infarto, el edema cerebral y el fracaso metabólico en modelos animales de isquemia/reperfusión cerebral [104,106-110]. Los mecanismos moleculares de daño cerebral asociados a la sobrecarga de hierro en modelos animales parecen estar relacionados con una mayor excitotoxicidad, mayor reacción inflamatoria y mayor estrés oxidativo ya que se han detectado concentraciones significativamente más elevadas de glutamato, citocinas pro-inflamatorias y productos de la peroxidación lipídica a nivel

plasmático [105], y un importante acúmulo de ROS en el cerebro [111] de los animales sobrealimentados con hierro respecto al grupo control. La importancia del estrés oxidativo secundario a la sobrecarga de hierro está sustentada por estudios *in vitro* e *in vivo* en los que se demuestra que la producción de TBARS (*thiobarbituric acid-reactive species*) en homogeneizados de cerebro de rata aumenta de forma proporcional al grado de acidosis del medio y con la adición de hierro ferroso [112], mientras que la pre-administración de antioxidantes y atrapadores de radicales libres disminuyen la generación de ROS y atenúa el tamaño del infarto y daño cerebral relacionado con la sobrecarga de hierro [111-113]. La neurotoxicidad inducida por el hierro podría deberse fundamentalmente al acúmulo de ROS en la interfase sangre/endotelio, ya que el hierro se deposita en la pared de los vasos [111] y no en el cerebro [105, 111] en animales sanos sin disrupción de la BHE a los que se les ha administrado hierro por vía oral o parenteral. Estos datos sugieren que durante la isquemia cerebral, con la rotura de la BHE, se incrementaría el paso de hierro y ROS al cerebro desde la vasculatura, que se sumaría al hierro libre y ROS liberados desde las diferentes líneas celulares cerebrales aumentando el daño isquémico cerebral [111]. El hierro liberado durante la isquemia cerebral podría seguir dañando las neuronas y al resto de componentes de la unidad neurovascular durante varios días o semanas, ya que se ha observado que la inyección intracortical de hierro en el cerebro de rata conduce a la degeneración progresiva de las neuronas circundantes al punto de inyección y al incremento de la expresión celular de ferritina desde las primeras 24 horas hasta al menos el día 7 [114], mientras que la peroxidación lipídica generada

tras la isquemia/reperfusión cerebral se mantiene en la regiones cerebrales en la que se depositó previamente hierro hasta incluso 6 meses más tarde [115]. Es parca la literatura que muestra datos contrarios en relación al efecto perjudicial del hierro en la isquemia cerebral, pero en un estudio de Millerot et al, la pre-administración durante varios días de hierro dextrano por vía intraperitoneal no aumentó el volumen de infarto en un modelo de oclusión fototrombótica en ratas [116]. Sin embargo, en este estudio y en la misma línea que en investigaciones previas [105,111], se observó que la sobrecarga de hierro no condiciona un aumento de la concentración de hierro ni de la expresión de ferritina a nivel cerebral en ratas sanas, mientras que sí en otros órganos como el corazón o el hígado [116]. Estos hallazgos indican que, en situaciones de sobrecarga de hierro, el cerebro sería vulnerable a la toxicidad del hierro en situaciones en las que se produce la rotura endotelial o la disrupción de la BHE. Datos aun no publicados de nuestro grupo de investigación básica en cultivos neuronales indican que no existe muerte inducida por concentraciones fisiológicas de hierro en neuronas normóxicas y que solamente la isquemia las hace vulnerables a la toxicidad del hierro, de forma que cuando los cultivos neuronales se someten a privación combinada de oxígeno y glucosa (OGD) y a una posterior reperfusión, la presencia de concentraciones fisiológicas de hierro y de hierro unido a la transferrina (holotransferrina) incrementa la muerte inducida por OGD, aún en presencia de sustancias antioxidantes. Además, no se observa muerte neuronal durante el periodo de isquemia, sino que se induce muerte neuronal rápida en los minutos

siguientes a la reperfusion, muerte neuronal que es concentración hierro-dependiente [117] (Figura 10).

Figura 10.- Neurotoxicidad por hierro y holotransferrina en cultivos de neuronas corticales en condiciones de OGD y posterior reperfusion



Cultivos de neuronas corticales maduras fueron incubados en medio DMEM sin oxígeno ni glucosa (OGD) durante 90 minutos. Después de la OGD, se restablecieron las condiciones de normoglicemia y normoxia retornando al medio condicionado o medio de reperfusion, en presencia o ausencia de 50 μM de FeSO₄ y FeCl₃ (a), o de diferentes concentraciones (1-5 μM) de holotransferrina (b). La muerte celular fue evaluada mediante fluorescencia de YP después de 15 minutos de reperfusion. FeSO₄ y

FeCl₃ fueron añadidos en el medio de reperusión durante 5 o 90 minutos antes de iniciar la reperusión. (a) Los datos se expresan como media ± desviación estándar de 3 experimentos independientes y reflejan la diferencia de porcentaje respecto a OGD sin tratamiento con hierro. *: Diferencia significativa respecto OGD 0. $p < 0,05$; &: Diferencia significativa respecto 5 minutos de incubación; mediante test de t student. (b) Los datos se expresan como media ± desviación estándar de 4 experimentos independientes. *: Diferencia significativa respecto OGD 0. $p < 0,05$; mediante test de ANOVA seguido del test de Student-Newman-Keuls.

Pocos estudios clínicos han investigado el papel del hierro en los pacientes con ictus isquémico. Estudios realizados por nuestro grupo [118,119] y por otros autores [120] han relacionado las concentraciones elevadas de ferritina en suero (como medida de los depósitos corporales de hierro) y en líquido cefalorraquídeo (LCR) en las primeras 24 horas del ictus isquémico agudo con el deterioro neurológico posterior, mayor volumen de infarto y peor pronóstico neurológico a los 3 meses. Las concentraciones de ferritina en plasma al ingreso >275 ng/mL aumentaron en 33,5 veces la probabilidad de evolucionar a una dependencia funcional o muerte a largo plazo [119]. Las concentraciones de ferritina se correlacionaron con las de glutamato tanto en plasma como en LCR, por lo que el efecto deletéreo de la sobrecarga de hierro podría estar mediado en parte por mecanismos que incrementan la excitotoxicidad tras la isquemia cerebral [119]. Los estudios clínicos en los que se ha evaluado el papel tóxico del hierro en el ictus isquémico han utilizado los valores séricos de ferritina como marcador de la magnitud de hierro corporal almacenado, aunque existe cierta controversia sobre la posibilidad de que las concentraciones de ferritina en este contexto sean un reactante de fase aguda

o bien sean un indicador de otras enfermedades cardiovasculares o factores de riesgo vascular responsables del ictus [121,122]. Sin embargo, determinaciones seriadas hasta 5 días después del inicio del ictus muestran que las concentraciones de ferritina sérica permanecen estables, o con cambios mínimos, durante las primeras 48 horas, y que éstas no se correlacionan con marcadores biológicos de la reacción de fase aguda como son las concentraciones de cortisol, proteína C-reactiva, fibrinógeno y el número de leucocitos [123]. Recientemente, en un estudio caso-control se han analizado las concentraciones en suero de ceruloplasmina, una enzima con capacidad oxidante, y de transferrina, la principal proteína transportadora de hierro desde el torrente sanguíneo al cerebro y a nivel intracerebral, en pacientes con ictus isquémico de menos de 48 horas de evolución desde el inicio de los síntomas [124]. Las concentraciones séricas de ceruloplasmina no mostraron diferencias entre casos y controles, mientras que las de transferrina fueron significativamente menores y el cociente ceruloplasmina/transferrina significativamente mayor en los pacientes respecto a los controles. Estos hallazgos pueden indicar que existe un aumento de la internalización celular cerebral del complejo transferrina-receptor de la transferrina ya que el receptor de transferrina se expresa en situación de hipoxia y, por tanto, una disminución de las concentraciones séricas de transferrina en los pacientes con ictus isquémico. Las concentraciones de transferrina y ceruloplasmina se relacionaron con la gravedad neurológica de los pacientes medida por la escala NIHSS, de forma que a mayor cociente ceruloplasmina/transferrina peor estado neurológico [124]. La transferrina también mostró una correlación negativa con

el volumen del infarto, por lo que los autores sugieren que podría ejercer un papel neuroprotector limitando el daño cerebral [124]. A diferencia de los estudios clínicos previamente mencionados [118-120], los valores de ferritina en suero no se asociaron a la gravedad neurológica en este estudio. Sin embargo, es interesante resaltar que ninguno de los parámetros determinados relacionados con la homeostasis del hierro (ferritina, hierro, ceruloplasmina y transferrina) mostró una correlación positiva con marcadores de estrés o inflamación [124]. La investigación clínica con fármacos quelantes de hierro o inhibidores de la peroxidación relacionada con el hierro en pacientes con ictus isquémico se limita a dos pequeños ensayos clínicos randomizados con tirilazad mesilato que fueron interrumpidos prematuramente por falta de eficacia del fármaco y por razones de seguridad [125,126]. Actualmente, nuestro grupo está llevando a cabo un estudio multicéntrico fase II, aleatorizado, doble ciego, de dosis escaladas de otro quelante del hierro, la deferoxamina, administrada por vía intravenosa en pacientes con ictus isquémico con afectación del territorio de la ACM tratados con r-tPA intravenoso (TANDEM-1; FIS 2007-006731-31) [127]. Aunque el objetivo principal del estudio en esta primera fase es evaluar la seguridad y tolerabilidad de la administración intravenosa de deferoxamina en pacientes con ictus isquémico agudo tratados con r-tPA IV, la obtención de un efecto biológico en relación a la reducción del volumen de infarto, transformación hemorrágica y mejoría del pronóstico funcional a corto y largo plazo, apoyarían el papel tóxico del hierro y su posible uso como diana terapéutica en la isquemia cerebral en humanos.

La ferritina sérica está considerada el mejor indicador de la magnitud de los depósitos celulares de hierro en ausencia de infecciones o enfermedades inflamatorias [128,129] y, por tanto, podría estar relacionada con la disponibilidad de hierro en el área infartada. Por el contrario, el hierro sérico y la saturación de la transferrina tienen una elevada variabilidad analítica debida a la hemólisis, a errores de medición y a amplias variaciones diarias [130,131]. Las concentraciones fisiológicas de ferritina en suero en la población adulta española oscilan generalmente en el hombre entre 20-300 ng/mL y en la mujer entre 15-200 ng/mL [130]. La determinación de la saturación de hierro de la ferritina sérica es una técnica mucho más compleja que podría aportar una mejor aproximación a la magnitud real de los depósitos celulares de hierro, ya que permite diferenciar estados de sobrecarga de hierro de hiperferritinemia reactiva a procesos infecciosos o inflamatorios [132-134]. Se ha demostrado que la concentración de hierro unido a ferritina y la saturación de ferritina es menor en situación de reacción de fase aguda que en muestras de pacientes con sobrecarga de hierro o de sujetos sanos [134]. En pacientes con sobrecarga de hierro los valores de saturación de ferritina sérica no se relacionan con la concentración hepática de hierro, sugiriendo que la saturación tisular de la ferritina puede ser aún mayor que la determinada en suero [135,136].

La sobrecarga de hierro puede ser el resultado de la presencia de mutaciones en el gen de la hemocromatosis (HFE). Los genotipos C282Y homocigoto y C282Y/H63D heterocigoto compuesto han sido asociados con la hemocromatosis hereditaria, pero en población sana española los portadores

heterocigotos H63D y especialmente C282Y pueden presentar valores de ferritina en suero mayores que los no portadores [137]. La prevalencia combinada de portadores heterocigotos para H63D y C282Y es del 43.7% en pacientes con ictus isquémico [138]. Aunque estas mutaciones del gen HFE no se han asociado con enfermedades cardiovasculares, en cohortes de base poblacional se ha observado que valores elevados de ferritina aumentan el riesgo de ictus isquémico [139]. Conjuntamente con los factores genéticos, el tipo de dieta puede modular las reservas de hierro del organismo. Varios estudios nutricionales han demostrado que los individuos que tienen una mayor ingesta de formas biodisponibles de hierro como los suplementos férricos, carne roja o fruta, o bien favorecedores de la absorción de hierro no hemo como la vitamina C, tienen un mayor riesgo de tener concentraciones de ferritina en suero superiores a los valores normales, indicando la presencia de depósitos de hierro corporales aumentados [140,141]. Teniendo en cuenta ambos factores, es factible la frecuente existencia de concentraciones elevadas de ferritina en suero en los pacientes que presentan un ictus isquémico, y una amplia variabilidad en sus concentraciones en la población general.

II. HIPÓTESIS

Los resultados de estudios en animales y humanos sugieren que la importancia de la neurotoxicidad por hierro puede ser proporcional a la magnitud de la carga de hierro corporal total, ya que durante la isquemia/reperfusión cerebral aumentaría la disponibilidad de hierro libre liberado desde la ferritina y la transferrina en la zona de infarto y penumbra isquémica. El incremento del daño isquémico mediado por la excitotoxicidad y la generación de radicales libres parecen ser las principales bases moleculares del daño relacionado con el hierro en la isquemia cerebral. Los mecanismos neurotóxicos del hierro sobre la unidad neurovascular son similares a los mecanismos neurotóxicos que se han demostrado para el r-tPA.

La sobrecarga de hierro no es infrecuente en nuestra población, bien por hábitos dietéticos, bien por la existencia de mutaciones en el gen de la hemocromatosis. Nuestra hipótesis general es que los pacientes con aumento de los depósitos corporales de hierro podrían tener una respuesta terapéutica limitada al tratamiento con r-tPA IV tras el ictus isquémico, mostrando una atenuación de la recuperación neurológica después de la reperfusión o un mayor daño cerebral si la recanalización arterial se produce tardíamente (*Fig 11*). La administración de r-tPA IV en un infarto cerebral agudo podría tener un efecto sinérgico sobre la toxicidad neurovascular e inducir un incremento del daño por reperfusión en pacientes con concentraciones elevadas de hierro corporal. Sin embargo, el sinergismo del r-tPA IV y la sobrecarga de hierro deben demostrarse en modelos animales.

Las hipótesis concretas a contrastar en cada una de las investigaciones son las siguientes:

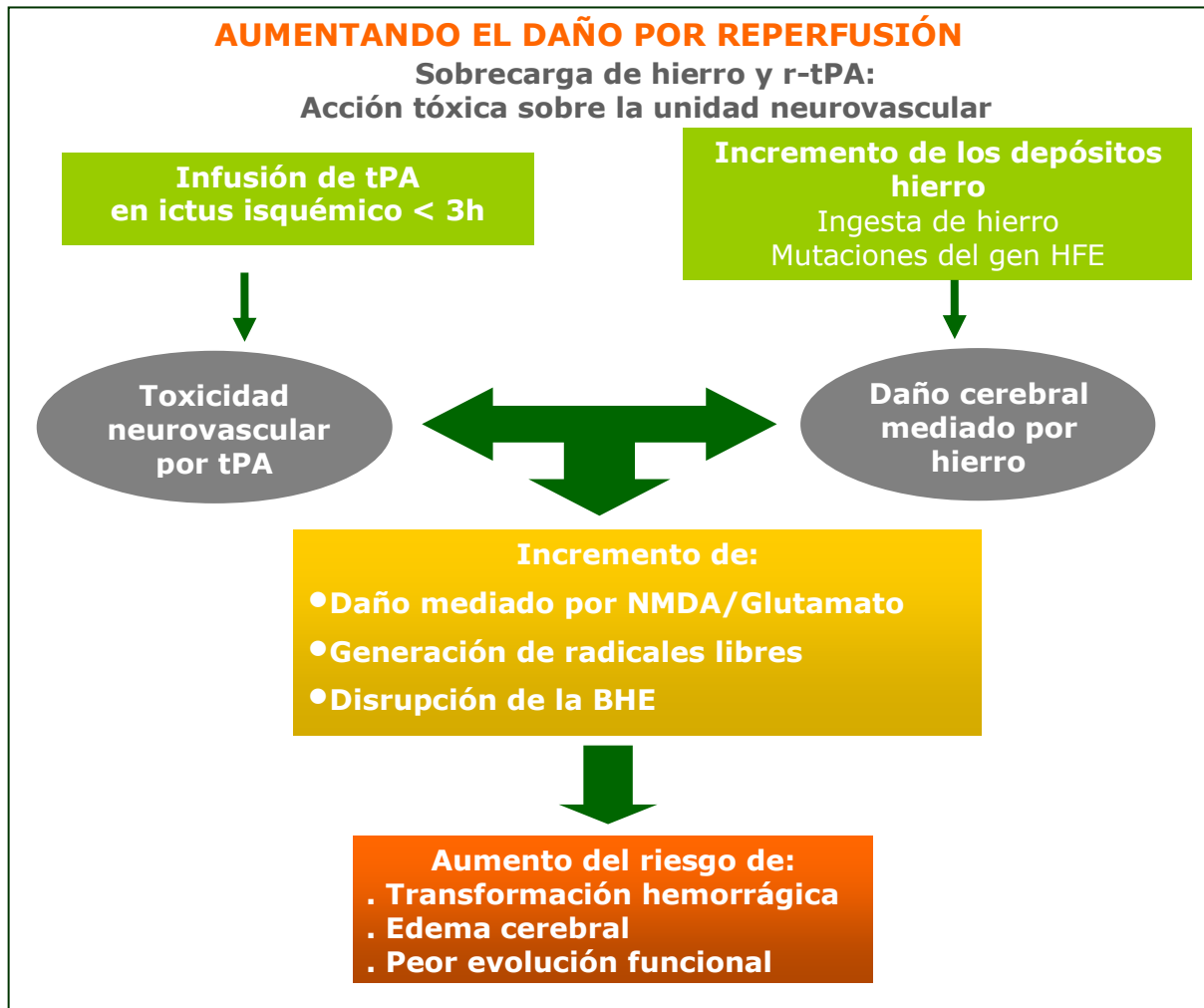
Investigación nº I. Neurotoxicidad asociada al hierro y tratamiento trombolítico con r-tPA en la isquemia cerebral aguda: Estudio clínico

1. Las concentraciones elevadas de ferritina en suero, como indicador de los depósitos corporales de hierro, se asocian a una peor evolución funcional a largo plazo y a un aumento del riesgo de transformación hemorrágica y edema cerebral en los pacientes con un infarto cerebral agudo tratado con r-tPA IV en comparación con aquellos pacientes con concentraciones más bajas de ferritina en suero.

Investigación nº II. Neurotoxicidad asociada al hierro y tratamiento trombolítico con r-tPA en la isquemia cerebral aguda: Estudio molecular

1. El efecto neurotóxico del aumento de los depósitos corporales de hierro (mediante la determinación de las concentraciones de ferritina en suero) en los pacientes con un infarto cerebral agudo tratado con r-tPA IV está asociado a un incremento del daño excitotóxico, de la inflamación, de la generación de radicales libres y de la disrupción de la barrera hematoencefálica.

Figura 11.- Toxicidad sobre la unidad neurovascular en pacientes con ictus isquémico agudo tratados con r-tPA IV e incremento de los depósitos corporales de hierro



Ver texto de páginas 50 y 51.

III. OBJETIVOS

Investigación nº I. Neurotoxicidad asociada al hierro y tratamiento trombolítico con r-tPA en la isquemia cerebral aguda: Estudio clínico

1. Analizar si las concentraciones elevadas de ferritina en suero previas al tratamiento intravenoso con r-tPA en pacientes con infarto cerebral aumentan el riesgo de peor evolución funcional a los 90 días.
2. Analizar si las concentraciones elevadas de ferritina en suero previas al tratamiento intravenoso con r-tPA en pacientes con infarto cerebral aumentan el riesgo de transformación hemorrágica y edema cerebral en la TC craneal realizada a las 24-36 horas después de la administración del r-tPA.
3. Establecer un punto de corte de concentración de ferritina en suero con capacidad predictiva de la evolución clínica de los pacientes con un infarto cerebral tratados con r-tPA IV.
4. Describir el perfil temporal de la ferritina en suero en los pacientes con un infarto cerebral agudo tratado con r-tPA IV durante las primeras 72 horas.

Investigación nº II. Neurotoxicidad asociada al hierro y tratamiento trombolítico con r-tPA en la isquemia cerebral aguda: Estudio molecular

1. Analizar los mecanismos moleculares potencialmente asociados al daño cerebral relacionado con el aumento de las concentraciones de ferritina en suero de pacientes con un ictus isquémico agudo tratados con r-tPA IV mediante la determinación de biomarcadores como el glutamato (marcador de excitotoxicidad), interleucina-6 (marcador de inflamación) y

metaloproteasa-9 y fibronectina celular (marcadores de disrupción de la barrera hematoencefálica).

2. Analizar si las concentraciones elevadas de glutamato, interleucina-6, metaloproteasa-9 y fibronectina celular aumentan el riesgo de peor evolución funcional a los 90 días, y de mayor riesgo de transformación hemorrágica y edema cerebral en la TC craneal realizada a las 24-36 horas después de la administración del r-tPA en este grupo de pacientes.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

La presente Tesis Doctoral tiene por objeto el estudio del papel deletéreo del aumento de los depósitos corporales de hierro en el pronóstico clínico de los pacientes con un infarto cerebral tratado con r-tPA IV y de los mecanismos moleculares potencialmente asociados al daño neurotóxico relacionado con el hierro. El trabajo se ha desarrollado en dos etapas; una primera basada en el estudio clínico de los pacientes, y una segunda centrada en la investigación de los mecanismos bioquímicos relacionados con la neurotoxicidad mediada por el hierro. No obstante, la población de estudio y la metodología utilizada ha sido común para las dos etapas de investigación.

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

Investigación nº I.

*Increased body iron stores are associated with poor outcome after thrombolytic treatment in acute stroke. **Stroke 2007; 38:90-95.***

Investigación nº II.

*Biological signatures of brain damage associated with high serum ferritin levels in patients with acute ischemic stroke and thrombolytic treatment. **Disease Markers 2008; 20:181-188.***

Población de estudio

Estudio multicéntrico con inclusión prospectiva de una cohorte hospitalaria de pacientes con un ictus isquémico agudo tratado con r-tPA IV dentro de las primeras 3 horas desde el inicio de los síntomas en 4 hospitales universitarios (Hospital Universitari Germans Trias i Pujol de Badalona, Hospital Dr. Josep Trueta de Girona, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela y Hospital de la Princesa de Madrid) desde marzo 2003 hasta noviembre 2005. La dosis estándar de r-tPA IV administrada fue de 0,9 mg/Kg, 10% de la dosis en un bolus inicial seguido del resto de dosis en bomba de infusión continua durante una hora. Todos los pacientes fueron tratados de acuerdo con los criterios SITS-MOST [2] y evaluados prospectivamente mediante un protocolo único y estandarizado con TC craneal, escalas neurológicas y escalas funcionales durante un período de seguimiento de 90 días. Los datos fueron incluidos en una base de datos única multicéntrica para el análisis. El protocolo fue aprobado por el Comité Ético de los centros participantes y el consentimiento informado para la participación en el mismo fue firmado por cada paciente o representante legal en el caso de imposibilidad del primero para otorgarlo o firmarlo.

De acuerdo con el registro SIST-MOST [2], fueron excluidos para tratamiento trombolítico los pacientes mayores de 80 años, con hipertensión arterial incontrolada, en tratamiento con anticoagulantes orales o heparina, plaquetopenia, alteración de las pruebas de coagulación, hemorragia sistémica reciente, cirugía o traumatismo mayor recientes, cualquier hemorragia cerebral, aneurisma arterial o malformación arteriovenosa previos, y enfermedades

médicas serias o avanzadas que pudieran interferir en el pronóstico funcional al final del seguimiento. Además, fueron criterios de exclusión adicionales relacionados con el propósito del estudio la existencia de una discapacidad previa (escala de Rankin modificada (mRS) >1), ingesta de alcohol ≥ 40 g al día, enfermedades infecciosas, inflamatorias o neoplásicas conocidas en el momento del tratamiento y tratamiento previo o concomitante con hierro. Algunos pacientes fueron co-tratados con NXY-059 o placebo dentro del ensayo clínico SAINT-I [142]. No se administraron otros fármacos en investigación.

Variables clínicas

Se recogieron en todos los pacientes las siguientes variables en el momento del ingreso: edad, sexo, factores de riesgo vascular, historia previa de cardiopatía isquémica, arteriopatía periférica e ictus isquémico, presencia de fibrilación auricular previa o al ingreso, toma de tratamiento antiagregante previo, tiempo desde el inicio de los síntomas a la infusión de r-tPA, tensión arterial sistólica, tensión arterial diastólica y temperatura corporal al ingreso, territorio vascular afecto (carotídeo o vertebrobasilar) y subtipo etiológico del ictus según los criterios TOAST (*Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*) (Anexo I). El ECG y la saturación de oxígeno se monitorizaron de forma continuada, mientras que la TA se determinó cada hora durante las primeras 24 horas en la unidad de ictus. La gravedad del ictus se cuantificó justo antes de la administración del r-tPA y a las 24 horas después del tratamiento mediante la escala NIHSS (*National Institute of Health Stroke Scale*) (Anexo II). El pronóstico funcional a los 3 meses se evaluó mediante la escala mRS (*modified*

Rankin Scale) (Anexo III). Se definió **deterioro neurológico precoz** como la presencia de un incremento de 4 o más puntos entre la NIHSS basal y la de las 24 horas. **Mala evolución funcional** se definió como una mRS >2 a los 90 días.

Variables de neuroimagen

El estudio incluyó la realización de una TC craneal en el momento del ingreso hospitalario, justo antes del tratamiento y una segunda TC que se llevó a cabo a las 24-36 horas después del tratamiento trombolítico. En la TC basal se evaluaron la presencia de **signos incipientes de isquemia cerebral** (borramiento de surcos, del núcleo lenticular o ribete insular y del contraste entre la sustancia blanca y gris), mientras que en la TC de 24-36 horas se valoró el volumen de la hipodensidad, la transformación hemorrágica y el edema cerebral. La **transformación hemorrágica** se clasificó en infarto hemorrágico tipo 1 (IH1) y 2 (IH2) y en hemorragia parenquimatosa tipo 1 (HP1), 2 (HP2) y remota (HPr), según los criterios ECASS II (*European Cooperative Acute Stroke Study II*) (Anexo IV). El diagnóstico de hemorragia cerebral sintomática se realizó ante la presencia de cualquier hemorragia asociada a deterioro neurológico precoz. Se definió **edema cerebral grave** ante la presencia de edema con desplazamiento de las estructuras de la línea media [20]. El **volumen de la hipodensidad** se calculó mediante la fórmula $0,5 \times a \times b \times c$, en la que "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. Este método ha sido utilizado en trabajos previos

[20]. Todas las TC craneales fueron evaluadas por investigadores ciegos a las determinaciones del laboratorio y pronóstico clínico.

Variables moleculares y determinaciones de laboratorio

La glucosa, recuento plaquetario, fibrinógeno y tests de coagulación fueron valorados en muestras sanguíneas en el momento del ingreso en cada hospital participante. A todos los pacientes se les realizaron extracciones sanguíneas para obtener suero (2 mL) y plasma (2mL, citrato sódico) en el momento del ingreso (antes del tratamiento trombolítico), a las 24 horas y 72 horas después del bolus de r-tPA. Las muestras se dejaron reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente para la formación del botón celular y posteriormente fueron centrifugadas a 3000 *g* durante 5 minutos, obteniéndose 4 alícuotas de suero y plasma que fueron congeladas y almacenadas a -80° hasta su traslado al laboratorio de investigación neurovascular del Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela para el análisis de los biomarcadores al final de la inclusión de la totalidad de pacientes. Se determinaron **ferritina** (*inmunodiagnosis ELECSYS 2010 system, Roche Diagnostics*) como marcador de los depósitos corporales de hierro, **glutamato** (*HPLC, Waters Pico Tag® Chemistry Package for HPLC amino acids analysis*) como marcador de excitotoxicidad, **interleucina-6** (*IMMULITE 1000 System, Diagnostic Products Corporation (DPC), USA*) como marcador de inflamación, **metaloproteasa-9** (*quantitative sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay kits de Biotrack, Amersham Pharmacia, UK*) y **fibronectina celular** (*quantitative sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay kits de Biohit*

Plc, Finland) como marcadores de disrupción de la barrera hematoencefálica. Las determinaciones fueron realizadas por investigadores ciegos a las variables de neuroimagen y de pronóstico clínico.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se ha realizado utilizando el programa estadístico *SPSS 11.5*. El análisis se inició realizando un análisis bivariado con el objetivo de determinar las variables relacionadas con la evolución funcional, transformación hemorrágica y edema cerebral grave. Las proporciones entre dos grupos fueron comparadas mediante el test χ^2 o test exacto de Fisher. Las variables continuas fueron expresadas en forma de media y desviación estándar, o mediana y cuartiles en el caso de que la distribución de la variable no fuera normal, y fueron comparadas mediante t-test Student, test de Mann-Withney o de Friedman, según lo apropiado. Los valores de la mediana de la ferritina en los diferentes hospitales se compararon mediante el test de Kruskal-Wallis. Se usó el coeficiente de Spearman para analizar la correlación de la ferritina con el NIHSS, volumen de la hipodensidad y con cada uno de los biomarcadores analizados. Se estudió el efecto lineal de la ferritina para cada una de las variables evolutivas. Para establecer el punto de corte de las concentraciones de ferritina que mejor predicen la mala evolución funcional se configuró una curva ROC (*Receiver operating characteristic*). La importancia de las concentraciones de ferritina para la mala evolución funcional, transformación hemorrágica y edema cerebral fueron valorados mediante modelos de regresión logística binaria. Los resultados se ajustaron por edad, gravedad del ictus y otras

variables relacionadas en el modelo bivariado con un valor de $p < 0,05$. Para valorar la influencia de las concentraciones basales de ferritina en la concentración sérica de los biomarcadores de daño cerebral se utilizaron modelos de regresión lineal generales para medidas repetidas ajustadas por las variables relacionadas con las concentraciones basales de ferritina con una $p < 0,05$. Se calculó la sensibilidad y especificidad del modelo predictivo, así como también se comprobaron potenciales interacciones entre variables de confusión y los valores de ferritina. Finalmente, se realizó un análisis de sensibilidad en los pacientes no randomizados dentro del ensayo clínico SAINT-I.

V. RESULTADOS

Investigación nº I

Increased body iron stores are associated with poor outcome after thrombolytic treatment in acute stroke. Stroke 2007; 38:90-95.

En este estudio se analizaron las concentraciones en suero de ferritina en 134 pacientes con ictus isquémico agudo tratado con r-tPA IV dentro de las primeras 3 horas desde el inicio de los síntomas con el objetivo de determinar la posible asociación entre las concentraciones de ferritina, la evolución funcional a largo plazo, el riesgo de transformación hemorrágica y de edema cerebral.

Los principales resultados de la investigación se resumen a continuación:

1. De los 134 pacientes incluidos en el estudio, 61 (46,5%) tuvieron buena evolución funcional y 73 (54,5%) mala evolución al tercer mes. Dieciocho (13,4%) pacientes murieron durante el período de estudio. La tabla 1 recoge las características basales en la muestra total de pacientes y en los diferentes grupos según la evolución clínica. En ella se puede observar que los pacientes de mayor edad, con mayor gravedad inicial (NIHSS), con ictus de territorio carotídeo y de etiología cardioembólica y aquellos con presencia de signos precoces de isquemia en la TC craneal de ingreso tenían peor evolución funcional. Las concentraciones de ferritina en suero basales previas a la administración del tratamiento trombolítico, fueron significativamente más altas en los pacientes con mala evolución (165,1

[98,4- 307,6] frente a 17,5 [11,9- 36,8] ng/mL, $p < 0,001$). Asimismo, las concentraciones de ferritina fueron significativamente mayores en los pacientes que presentaron un deterioro neurológico precoz (254 [86-375] frente a 59 [16-190] ng/mL) y menores en los pacientes que obtuvieron una mejoría neurológica significativa en las primeras 24 horas (21[13-86] frente a 132 [54-302] ng/mL). La Figura 1 muestra como, tras categorizar las concentraciones basales en suero de ferritina en cuartiles, se observó la existencia de una relación entre la distribución de la mRS y las concentraciones de ferritina, de forma que a mayor cuartil de ferritina basal peor puntuación en la mRS al tercer mes. Nótese que la mayoría de pacientes con concentraciones de ferritina situadas en el cuartil más alto eran dependientes o habían fallecido al tercer mes de evolución, mientras que la mayoría de pacientes con concentraciones dentro del cuartil menor eran independientes o estaban asintomáticos en el momento de la valoración neurológica y funcional.

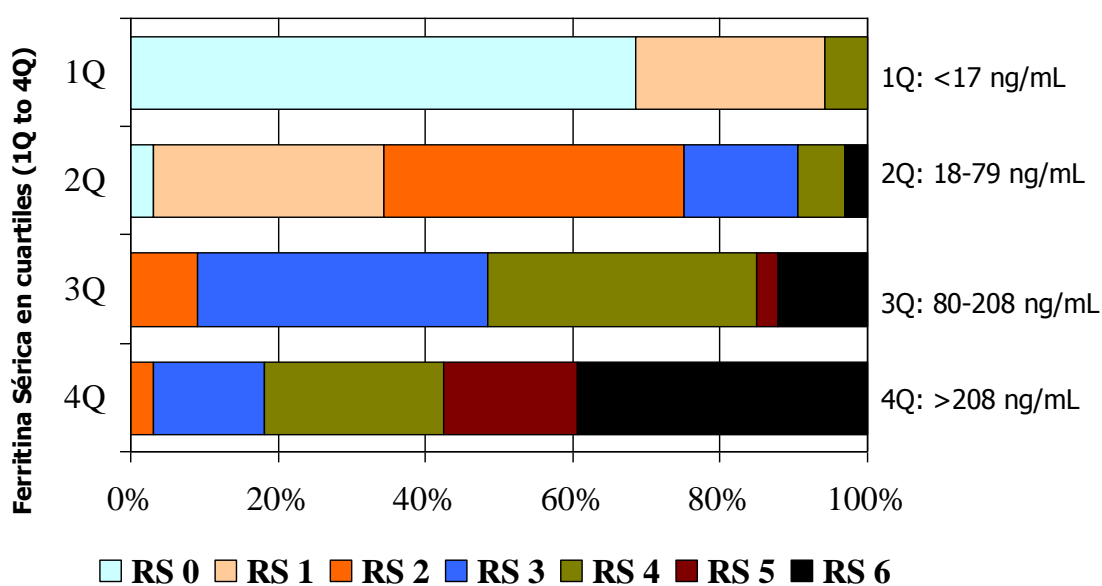
Tabla 1. Características basales en la muestra total de pacientes y por grupos según la evolución funcional a los 90 días

	Total (n=134)	Grupo Buena Evolución (n=61)	Grupo Mala Evolución (n=73)	p
Edad	67 (12)	64,7 (12,6)	69,3 (10,9)	0,017
Sexo, hombre	65,7	68,9	63,0	0,478
Factores de riesgo vascular previos				
Hipertensión	49,3	47,5	50,3	0,528
Diabetes	18,7	13,1	23,3	0,132
Tabaquismo	14,9	19,7	11	0,328
Dislipemia	32,1	32,8	31,5	0,874
Ictus	8,2	9,8	6,8	0,362
Antiagregantes previos, %	28,4	26,3	30,2	0,777
Signos vitales y parámetros laboratorio				
TA sistólica, mmHg	152 (23)	152,4 (21,5)	151,4 (23,6)	0,842
TA diastólica, mmHg	82 (13)	82,2 (13,1)	81,1 (12,3)	0,787
Temperatura, °C	36,2 (0,5)	36,2 (0,4)	36,2 (0,6)	0,910
Glucemia, mg/dL	137 (52)	136 (51)	137 (53)	0,666
Plaquetas (x1000)	241 (92)	241 (70)	242 (107)	0,689
TTPa, seg	28 (10)	28 (8)	29 (11)	0,930
Ferritina suero, ng/mL	78,8 [17,5-208,3]	17,5 [11,9-36,8]	165,1[98,4-307,6]	<0,001
Tiempo inicio -tratamiento, minutos	152 [125-170]	160 [125-174]	143 [122-165]	0,102
NIHSS basal	14 [9-19]	10 [7-15]	18 [12-20]	<0,001
Territorio arterial				
Carotídeo		84	95	0,038
Vertebrobasilar		16	5	
Clasificación TOAST				
Cardioembólico		32,8	52,1	0,001
Aterotrombótico		13,1	24,7	
Lacunar		13,1	1,4	
Indeterminado		41,0	21,9	
Signos precoces TC	33,6	16,4	47,9	<0,001
Hipoatenuación >33% ACM	6,0	1,7	9,6	0,056

Las variables se han expresado como proporciones, media (desviación estándar) o mediana[cuartiles]

Figura 1. Distribución de la mRS a los 90 días según las concentraciones de ferritina basal en suero categorizada en cuartiles.

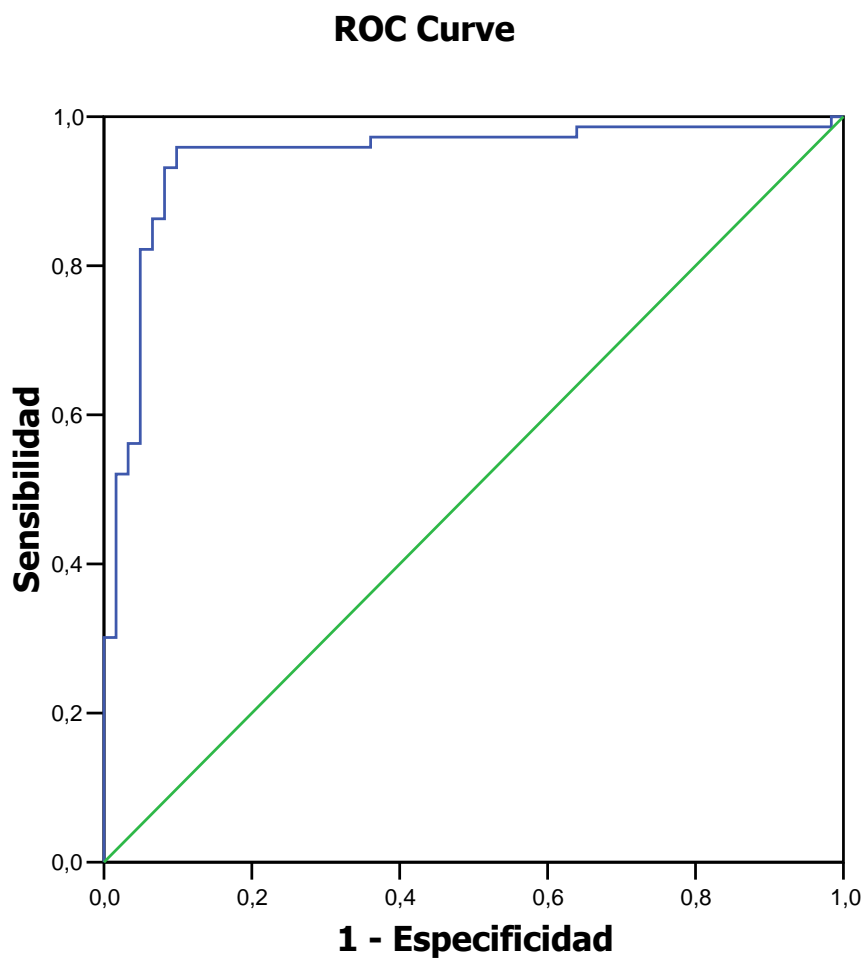
El tamaño de las barras de color indican la proporción de pacientes con una determinada puntuación en la mRS para cada cuartil de ferritina. Las concentraciones de ferritina sérica para cada cuartil son los siguientes: 1^{er} Q: <17 ng/mL; 2^o Q: 18-79 ng/mL; 3^{er} Q: 80- 208 ng/mL; 4^o Q: >208 ng/mL.



2. Las concentraciones de ferritina en suero >79 ng/mL predicen una evolución clínica a largo plazo de mal pronóstico con una sensibilidad del 86% y una especificidad del 93%, valor de corte obtenido mediante la configuración de una curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), con un área bajo la curva de 0,944 ($p < 0,001$) (Figura 2). El análisis de regresión logística demostró que las concentraciones de ferritina en suero basales >79 ng/mL se asocian de forma independiente a mala evolución funcional con una odds de 117 [95% CI, 25-557] tras ajustar por edad, territorio carotídeo, subtipo cardioembólico de ictus, tiempo desde el inicio de los

síntomas hasta la administración del r-tPA, NIHSS basal y presencia de signos precoces de infarto en la TC craneal (Tabla 2). La inclusión en el modelo de la variable hipoatenuación >33% en el territorio de la ACM en la TC basal o del volumen de la hipodensidad en la TC a las 24-36h, no modificó el efecto.

Figura 2. Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) de las concentraciones de ferritina en suero basales en relación a la evolución funcional a los 90 días.



Area bajo la curva 0,944; IC 95% 0,901-0,907; $p < 0,001$

Tabla 2.- Odds ratios para muerte o dependencia ajustados por las características basales

Variables independientes	OR	95% IC	p
Edad	1,07	1,01 – 1,14	0,014
Territorio carotídeo	1,03	0,14 – 7,40	0,972
Subtipo cardioembólico	1,00	0,27 – 3,65	0,999
Tiempo inicio-tratamiento	0,98	0,96 – 1,00	0,187
NIHSS basal	1,07	0,96 – 1,21	0,199
Signos precoces infarto cerebral	2,25	0,52 – 9,60	0,273
Ferritina suero basal >79 ng/mL	117,0	24,4 – 559,5	<0,0001

Categorías de referencia: concentraciones de ferritina en suero ≤ 79 ng/mL, no signos precoces de infarto cerebral e ictus de territorio vertebrobasilar. La edad, el tiempo desde el inicio al tratamiento y el NIHSS basal son variables continuas. No hubo pacientes con datos perdidos.

3. En un análisis secundario de sensibilidad, y con el objetivo de apoyar los resultados previos obtenidos, se exploró la presencia de interacciones entre diferentes variables basales y el efecto de la ferritina basal sobre la evolución funcional. Estos resultados se presentaron en la European Stroke Conference (Glasgow 2007) como comunicación oral [143]. Se estratificaron los subgrupos de pacientes según el sexo, historia previa de hipertensión arterial y diabetes mellitus, subtipo cardioembólico de ictus, presencia de signos precoces de infarto cerebral o por valores dicotomizados de las variables cuantitativas según el valor de la mediana en la edad, glicemia,

temperatura, tiempo hasta la administración del r-tPA desde el inicio de los síntomas, NIHSS, concentraciones séricas de interleucina-6 y recuento leucocitario al ingreso. Los resultados se muestran en la Tabla 3. Las odds ratios crudas individuales de mala evolución funcional para concentraciones de ferritina basal en suero >79 ng/mL variaron desde 31 a 262 (todas con un valor de $p < 0,001$) para todos los subgrupos explorados, por lo que el incremento de los depósitos corporales de hierro se asoció a una mala evolución funcional a largo plazo independientemente del subgrupo de pacientes tratados con r-tPA intravenoso.

Tabla 3.- Odds ratios crudas de mala evolución funcional para concentraciones basales de ferritina en suero >79 ng/mL en diferentes subgrupos de pacientes.

Subgrupo de pacientes	OR [95% IC]	<i>p-Interacción</i>
Edad		
≤70 años	157 [24,1010]	0,748
>70 años	99 [11, 846]	
Sexo		
Hombre	136 [28,648]	0,574
Mujer	63 [7,573]	
Hipertensión		
No	57 [12,264]	0,394
Sí	179 [19,1627]	
Diabetes Mellitus		
No	63 [18,221]	0,775
Sí	No evaluable*	
Signos precoces TC		

No	130 [24,688]	0,259
Sí	31 [5,200]	
Ictus CEMB		
No	61 [14,265]	0,481
Sí	161 [16, 1550]	
NIHSS		
≤14	105 [17,621]	0,594
>14	53 [9,295]	
Tiempo hasta r-tPA		
≤160 min	No evaluable*	0,762
>160 min	59 [9,358]	
Temperatura		
≤36,3 °C	70 [16,365]	0,626
>36,3 °C	130 [20,842]	
Glicemia		
≤122 mg/dL	72 [13,388]	0,709
>122 mg/dL	115 [19,678]	
IL-6		
≤6,4 pg/mL	No evaluable*	0,774
>6,4 pg/mL	42 [11,167]	
Leucocitos		
≤7.900	55 [9,312]	0,274
>7.900	262 [29,2359]	
Total pacientes	89 [26,302]	

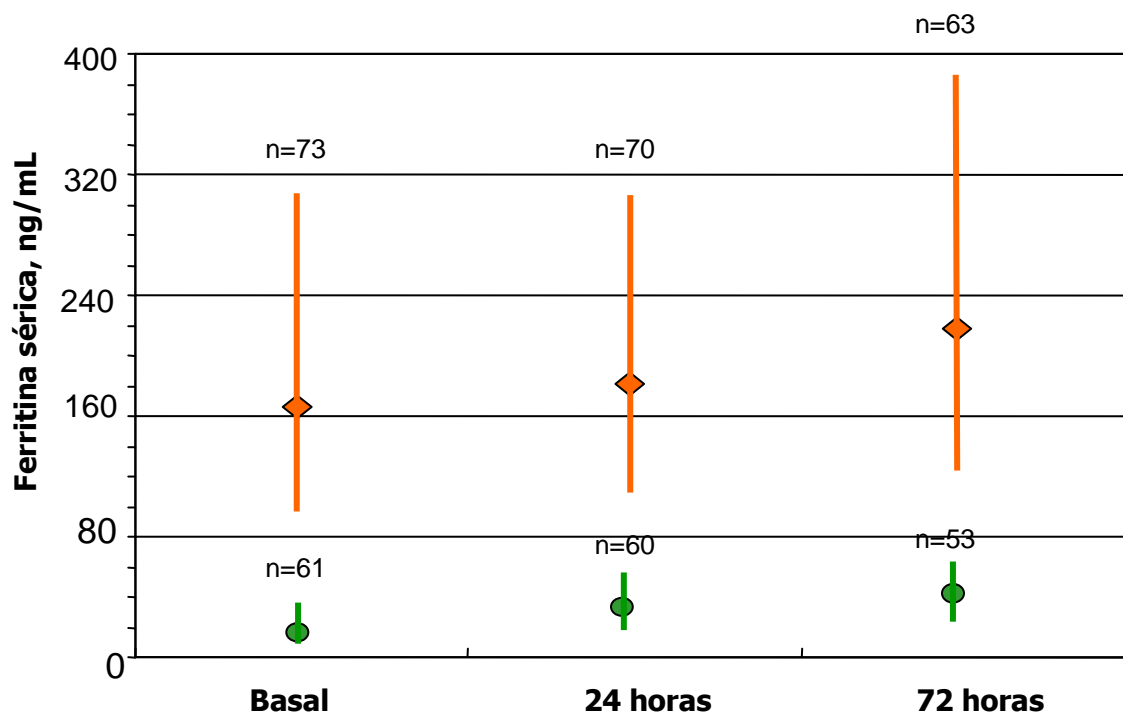
* No evaluable: todos los pacientes en el grupo de riesgo tuvieron mala evolución

4. El perfil temporal en suero de las concentraciones de ferritina en los pacientes con un ictus isquémico agudo tratado con r-tPA IV durante las primeras 72 horas mostró un ligero incremento paralelo en los dos grupos

de pacientes (buena y mala evolución funcional). Las diferencias en las concentraciones de ferritina entre los dos grupos fueron marcadas ya en la determinación basal, en menos de tres horas desde el inicio de los síntomas, manteniéndose la diferencia hasta las 72 horas de evolución como se puede observar en la Figura 3.

Figura 3. Perfil temporal de las concentraciones de ferritina en suero durante las primeras 72 horas.

Valores de la mediana y rango intercuartil (barras) de las concentraciones de ferritina en suero basales, a las 24 y 72 horas después de la administración de r-tPA IV según la evolución funcional de los pacientes al día 90 (♦ mala evolución; • buena evolución). Los números indican los pacientes estudiados en cada tiempo.

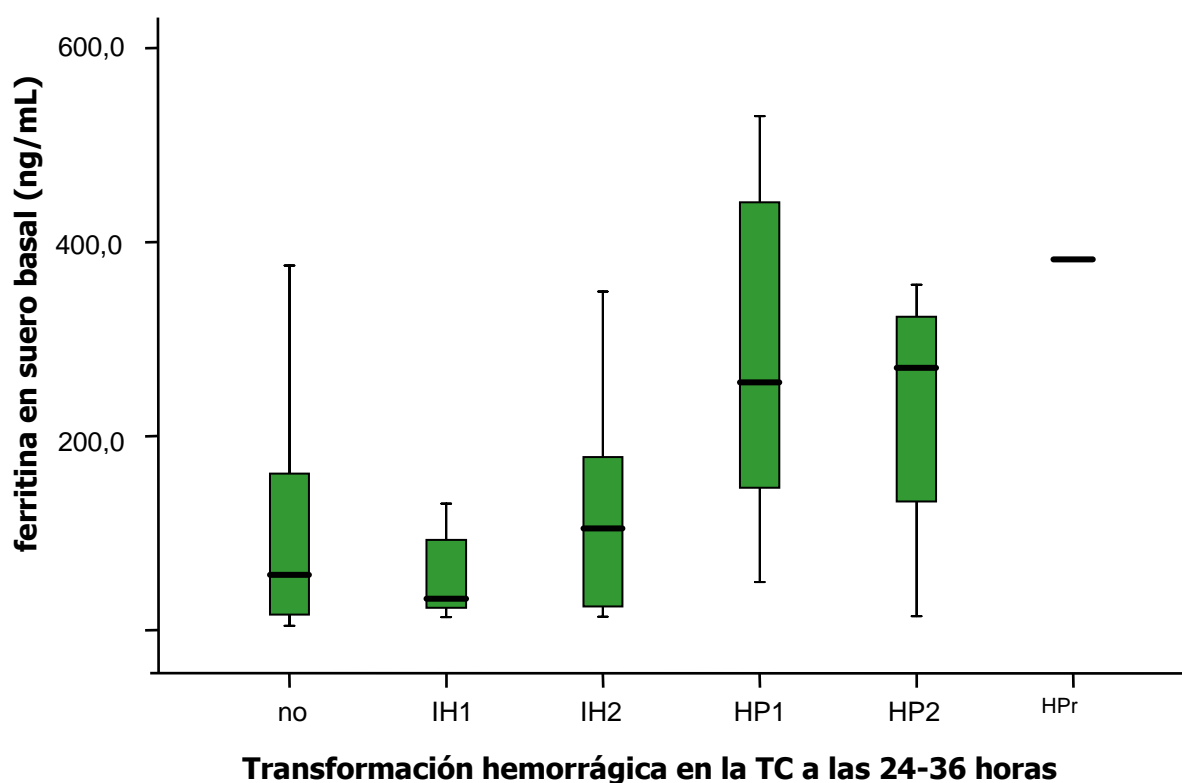


5. La presencia de transformación hemorrágica en la TC craneal a las 24-36 horas se detectó en 27 (20%) pacientes (7 IH1, 8 IH2, 7 HP1, 4 HP2, 1

HPr). Cuatro (2,9%) pacientes presentaron HP sintomática. Las concentraciones de ferritina en suero basales fueron significativamente más elevadas en los pacientes que presentaron transformación hemorrágica tipo HP ($p=0,041$) o hemorragia cerebral sintomática ($p=0,008$) (Figura 4). Las concentraciones basales de ferritina >79 ng/mL se asociaron a un incremento no significativo de 4,2 [0,8-22] en el riesgo de desarrollar un HP tras ajustar por la edad, NIHSS basal y el subtipo cardioembólico de ictus.

Figura 4. Transformación hemorrágica en la TC craneal a las 24-36 horas según la concentración basal de ferritina en suero

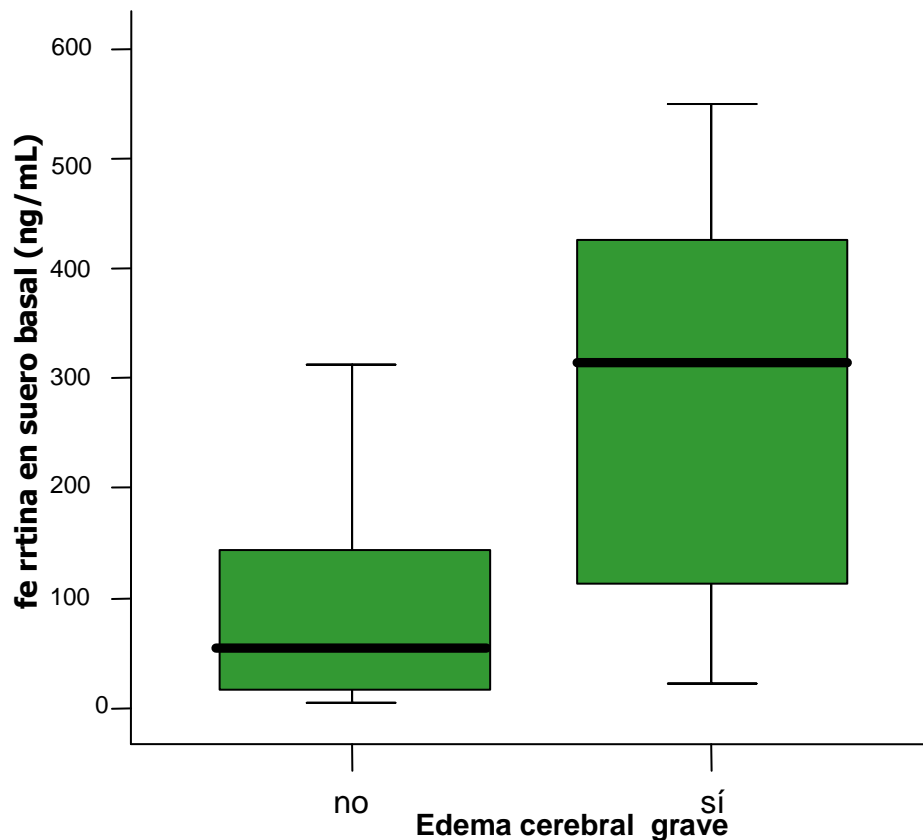
Los diagramas de caja muestran el valor de la mediana (línea horizontal), el rango intercuartil (caja verde), y los valores máximos y mínimos observados (líneas verticales) de ferritina en suero según el tipo de transformación hemorrágica.



6. Se detectó edema cerebral grave en la TC craneal a las 24-36 horas de evolución de los síntomas en 15 (11,2%) pacientes. Las concentraciones basales de ferritina en suero fueron significativamente mayores en los pacientes que desarrollaron edema cerebral grave ($p < 0,001$) (Figura 5). Las concentraciones basales de ferritina >79 ng/mL se asociaron a un incremento de 6,4 [1,3-32] veces en el riesgo de desarrollar edema cerebral grave tras ajustar por la edad, NIHSS basal e ictus cardioembólico.

Figura 5. Edema cerebral grave en la TC craneal a las 24-36 horas según la concentración basal de ferritina en suero basal

Los diagramas de caja muestran el valor de la mediana (línea horizontal), el rango intercuartil (caja verde), y los valores máximos y mínimos observados (líneas verticales) de ferritina en suero según la presencia de edema cerebral.



Investigación nº II

Biological signatures of brain damage associated with high serum ferritin levels in patients with acute ischemic stroke and thrombolytic treatment. Disease Markers 2008; 20:181-188.

Con el objetivo de determinar los potenciales mecanismos moleculares relacionados con la neurotoxicidad por el hierro en la isquemia cerebral aguda, se analizaron las concentraciones en suero de biomarcadores de excitotoxicidad (glutamato), inflamación (IL-6) y disrupción de barrera hematoencefálica (MMP-9 y c-FN) a diferentes tiempos de evolución de los síntomas y su correlación con las concentraciones basales de ferritina en suero en los 134 pacientes con ictus isquémico agudo tratado con r-tPA intravenoso incluidos en la investigación nº I.

Los principales resultados de la investigación se resumen a continuación:

1. Las muestras sanguíneas fueron recogidas en los 134 pacientes en el momento basal, en 130 pacientes a las 24 horas (1 paciente murió y en 3 la muestra no estaba disponible) y en 118 pacientes a las 72 horas (3 pacientes murieron, 6 fueron dados de alta antes de la extracción y en 9 la muestra no estaba disponible). La tabla 4 recoge las características basales y las concentraciones de los diferentes biomarcadores de daño cerebral en los subgrupos de pacientes clasificados según la evolución funcional al tercer mes y la presencia de HP y de edema cerebral grave en la TC craneal

a las 24-36 horas. Se puede observar que las concentraciones basales en suero de ferritina, glutamato, IL-6, c-Fn y MMP-9 fueron significativamente mayores en los pacientes con peor pronóstico, HP y edema cerebral grave. Como se ha descrito en la investigación nº I, la edad, la gravedad neurológica inicial y el subtipo cardioembólico de ictus se asociaron a un peor pronóstico al tercer mes. La presencia de signos precoces de isquemia cerebral se asoció a una peor evolución y al desarrollo de edema cerebral grave. No hubo diferencias entre el sexo, factores de riesgo vascular, signos vitales, parámetros de laboratorio al ingreso y tiempo hasta el tratamiento entre los diferentes subgrupos de pacientes para cada variable dependiente.

Tabla 4. Características basales y biomarcadores de daño cerebral según la evolución funcional, hematoma parenquimatoso y edema cerebral grave

Total (n=134)	Evolución funcional			Hematoma parenquimatoso			Edema cerebral grave		
	Buena (n=61)	Mala (n=73)	<i>p</i>	No (n=122)	Sí (n=12)	<i>p</i>	No (n=119)	Sí (n=15)	<i>p</i>
Edad	64,7 (12,6)	69,3 (10,9)	0,017	67,4 (11,5)	64,8 (15,4)	0,469	67,7 (12)	71,3 (9,9)	0,158
Sexo, hombre	68,9	63	0,478	65,6	66,7	0,939	63,9	80	0,215
Factores riesgo vascular									
Hipertensión	47,5	50,3	0,528	52,5	16,7	0,053	50,4	40	0,685
Diabetes	13,1	23,3	0,132	18	25	0,554	16,8	33,3	0,122
Tabaquismo	19,7	11	0,328	14,8	16,7	0,798	15,1	13,3	0,868
Dislipemia	32,8	31,5	0,874	33,6	16,7	0,230	34,5	13,3	0,099
Ictus previo	9,8	6,8	0,362	9	0	0,493	8,4	6,7	0,212
Biomarcadores daño cerebral, suero									
Ferritina, ng/mL	17,5 [11,9-36,8]	165,1 [98,4-307,6]	<0,001	57,8 [16,3-147,7]	272,6 [116,8-404,1]	0,030	55,4 [15,7-144,5]	313,4 [109-470,4]	<0,001
Glutamato, µM/L	70,9 [44-123,6]	195,9 [88,2-318,5]	<0,001	95,2 [52,2-217,4]	271,3 [94,8-344,6]	0,021	95,2 [50,7-216,8]	277,7 [83,2-350,1]	0,011
IL-6, pg/mL	4,8 [2,7-9,3]	24,3 [6,4-43,9]	<0,001	8,1 [3,4- 29,3]	30,3 [12,6-46,6]	<0,001	7,4 [3,4-25,4]	43,9 [23,7-63,2]	<0,001
c-Fn, mg/mL	3,2 [1,9-4,2]	3,7 [2,5-6,2]	0,010	3,2 [1,9-4,4]	7,9 [6,6-8,6]	<0,001	3,2 [1,9-4,4]	6,2 [5,4-7]	<0,001
MMP-9, ng/mL	92,8 [64,7-129]	129,3 [72,3-195,3]	0,021	102 [64,9-143,5]	204,7 [161,6-235,3]	<0,001	106,4 [69,4-166]	147,2 [54,4-214,1]	0,249
Tiempo hasta bolus tPA, minutos	160 [125-174]	143 [122-165]	0,102	149 [124-170]	155 [115-210]	0,507	150 [125-166]	160 [125-175]	0,450
NIHSS basal	10 [7-15]	18 [12-20]	<0,001	14 [8-19]	18 [13-20]	0,110	14 [8-19]	16 [14-18]	0,164
Signos precoces TC	16,4	47,9	<0,001	32	50	0,207	29,4	66,7	0,004
Clasificación TOAST									
Cardioembólico	32,8	52,1	0,001	20,5	8,3	0,326	39,5	73,3	0,098
Aterotrombótico	13,1	24,7		41,8	58,3		19,3	20	
Lacunar	13,1	1,4		7,4	0		7,6	0	
Indeterminado	41	21,9		28,7	25		31,1	6,7	

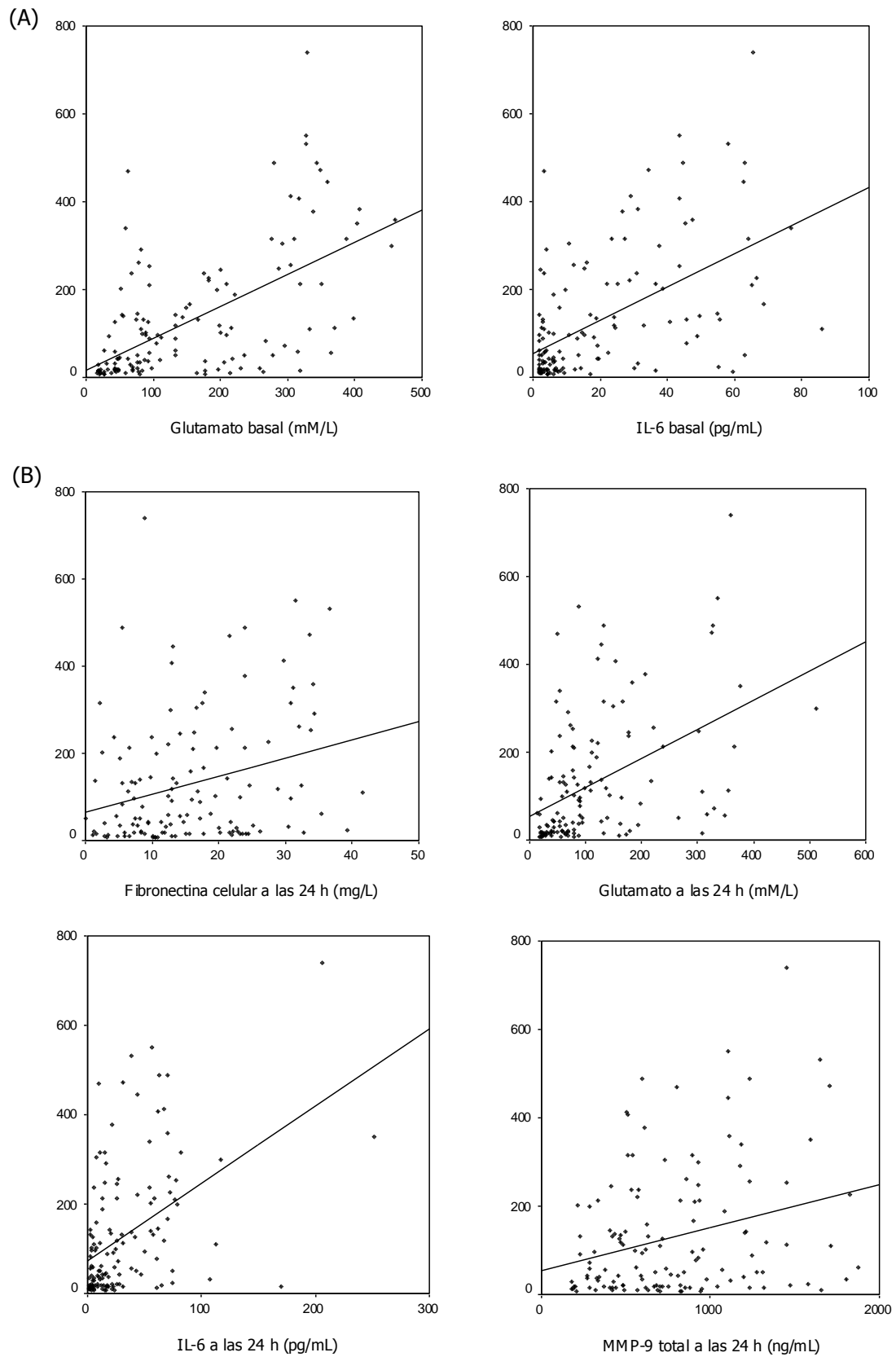
Los valores se presentan como proporciones, media (desviación estándar) o mediana [cuartiles].

2. Las concentraciones basales de ferritina en suero mostraron una correlación significativa con las concentraciones de glutamato e IL-6 al ingreso, a las 24 y a las 72 horas. Se observó una ligera correlación entre las concentraciones de ferritina basales con las de c-Fn y MMP-9 a las 24 horas y entre la ferritina basal y la MMP-9 a las 72 horas. En cambio, no hubo correlación entre las concentraciones basales de ferritina y las de c-Fn o MMP-9 al ingreso. Los valores de la correlación entre la ferritina basal y los distintos biomarcadores en los diferentes tiempos se muestran en la Tabla 5 y Figura 6. Las concentraciones basales de ferritina también mostraron una correlación positiva con el NIHSS basal ($r=0,489$; $p<0,001$) y a las 24 horas ($r=0,747$; $p<0,001$), así como con el volumen de infarto a las 24-36 h ($r=0,663$; $p<0,001$), y fueron significativamente mayores en los pacientes diabéticos ($p=0,004$), con presencia de signos precoces de infarto en la TC craneal ($p<0,001$) y con subtipo no lacunar de ictus ($p=0,005$). Las concentraciones de ferritina al ingreso no se asociaron al resto de variables basales.

Tabla 5. Coeficientes de correlación entre las concentraciones basales de ferritina y los biomarcadores de daño cerebral

Biomarcadores	Basal	24 horas	72 horas
Glutamato, $\mu\text{M/L}$	$r=0,589$; $p<0,001$	$r=0,507$; $p<0,001$	$r=0,415$; $p<0,001$
IL-6, pg/mL	$r=0,549$; $p<0,001$	$r=0,465$; $p<0,001$	$r=0,359$; $p<0,001$
c-Fn, mg/L	$r=0,154$; $p=0,075$	$r=0,268$; $p=0,002$	$r=0,096$; $p=0,301$
MMP-9, ng/mL	$r=0,114$; $p=0,190$	$r=0,234$; $p=0,007$	$r=0,261$; $p=0,004$

Figura 6. Correlaciones significativas entre las concentraciones de ferritina y biomarcadores en suero basal (A) y a las 24 horas (B)



3. Se configuraron modelos de regresión lineal para medidas repetidas para establecer la asociación entre las concentraciones basales de ferritina y las de los biomarcadores de daño cerebral en diferentes intervalos de tiempo. La Tabla 6 muestra la presencia de una asociación significativa entre las concentraciones de ferritina y glutamato hasta las 72 horas, mientras que IL-6, c-Fn y MMP-9 pierden su asociación con la ferritina tras ajustar por covariables, con la excepción de la MMP-9 a las 72 horas.

Tabla 6. Concentraciones basales de ferritina ajustadas por las concentraciones de biomarcadores de daño cerebral medidos a diferentes intervalos.

Modelos	β (95% CI)	p
Modelo 1: Glutamato en suero, $\mu\text{M/L}$		
Basal	0,42 (0,25-0,59)	<0,001
24 horas	0,26 (0,11-0,42)	0,001
72 horas	0,16 (0,02-0,30)	0,020
Modelo 2: IL-6 en suero, pg/mL		
Basal	0,014 (-0,011-0,039)	0,233
24 horas	0,014 (-0,032-0,060)	0,541
72 horas	-0,007 (-0,080-0,068)	0,861
Modelo 3: c-Fn en suero, mg/L		
Basal	0,001 (-0,003-0,004)	0,640
24 horas	0,003 (-0,001-0,006)	0,148
72 horas	0,001 (-0,003-0,004)	0,791
Modelo 4: MMP-9 en suero, ng/mL		
Basal	0,036 (-0,140-0,074)	0,521
24 horas	0,018 (-0,078-0,110)	0,710
72 horas	0,130 (0,028-0,230)	0,013

Modelos ajustados por diabetes mellitus, presencia de signos precoces de infarto en la TC craneal, NIHSS al ingreso y subtipo no lacunar de ictus.

VI. DISCUSIÓN

1. Comentario general

La investigación llevada a cabo demuestra el efecto deletéreo de la sobrecarga de hierro corporal en el daño neurológico tras la isquemia cerebral en pacientes tratados con r-tPA IV. Las concentraciones de ferritina en suero previas a la infusión del r-tPA pueden predecir la evolución funcional al tercer mes de los pacientes con un ictus isquémico, de forma que a mayor cuartil de ferritina basal, peor evolución funcional a largo plazo. Incluso dentro del valor inferior en las concentraciones de ferritina, el 2º cuartil (18-79 ng/ml) presentó un riesgo de discapacidad casi 3 veces mayor que el 1º cuartil (< 18 ng/ml). Las concentraciones de ferritina fueron también significativamente más altas en aquellos pacientes que presentaron transformación hemorrágica sintomática y edema cerebral grave. Además, el efecto perjudicial del incremento de los depósitos de hierro corporal sobre la evolución funcional de los pacientes fue manifiesto en cualquier subgrupo de pacientes, independientemente de la edad, sexo, factores de riesgo vascular, gravedad neurológica inicial, tiempo desde el inicio de los síntomas hasta la administración del tratamiento trombolítico intravenoso, situación hemodinámica o metabólica en el momento del ingreso y concentraciones basales de biomarcadores de inflamación o reactantes de fase aguda. Datos parecidos a los de la presente investigación habían sido observados en pacientes con ictus isquémico que no recibieron tratamiento trombolítico [118-120]. Sin embargo, la determinación de las concentraciones de ferritina basal en esos pacientes fue más tardía (dentro de las 24 horas de evolución de los síntomas) y las concentraciones basales de ferritina en suero fueron mayores en comparación a la población tratada con r-tPA IV (>100

ng/mL frente 17 ng/mL en los grupos con buena evolución; >300 ng/mL frente 165 ng/mL en los grupos con mala evolución). Asimismo, el punto de corte de las concentraciones de ferritina al ingreso que mostró un mayor poder predictivo de deterioro neurológico o mala evolución funcional fue notoriamente inferior en los pacientes tratados con r-TPA IV (>79 ng/ml) en comparación a los pacientes no tratados con terapia trombolítica (>275 ng/ml). Aunque estas diferencias pueden obedecer al estudio de poblaciones diferentes o a un aumento de las concentraciones de ferritina en las horas siguientes al ictus, sugieren también un efecto neurotóxico del hierro a concentraciones menores en los pacientes tratados con r-TPA IV respecto a aquellos pacientes que no recibieron terapia trombolítica. Estos resultados apoyan un efecto biológico deletéreo del aumento de los depósitos intracelulares de hierro sobre el tejido cerebral isquémico y daño endotelial en pacientes que reciben r-TPA IV. La magnitud del daño cerebral podría ser proporcional a la sobrecarga de hierro corporal y esta última podría contrarrestar el beneficio del tratamiento trombolítico con r-TPA IV que se obtiene en pacientes con valores bajos de ferritina.

Las concentraciones de ferritina en suero se consideran el mejor indicador de los depósitos intracelulares de hierro [128,130]. Aunque la determinación de la saturación de hierro de la ferritina sérica permite una mejor aproximación a la magnitud real de las reservas de hierro [132-134], es una técnica más compleja y menos utilizada en la práctica clínica diaria.

La determinación basal de ferritina en suero en nuestros pacientes se realizó precozmente, dentro de las primeras 3 horas desde el inicio de los

síntomas, mostrando ya en esta primera determinación diferencias marcadas entre los dos grupos pronósticos de pacientes que persistieron a lo largo de las siguientes 72 horas. Las concentraciones de ferritina se mantuvieron estables y entre los valores normales de nuestra población (de 20 a 300 ng/mL para los varones y de 15 a 200 ng/mL para las mujeres) [128], indicando que no existió un incremento brusco como respuesta al estrés y apoyando por tanto, la validez de los niveles séricos de ferritina como indicador de la carga corporal de hierro. En el análisis de subgrupos, el efecto deletéreo persistió independientemente de la gravedad del ictus y de las concentraciones de biomarcadores de inflamación como el recuento de leucocitos y las concentraciones de IL-6 en sangre en el momento de ingreso. Además, estudios previos han mostrado una estabilidad de las concentraciones de ferritina en suero durante las primeras 48 horas tras un ictus isquémico y una ausencia de correlación entre las concentraciones de ferritina y otros reactantes de fase aguda como el cortisol, proteína C reactiva, fibrinógeno o leucocitos [120,123].

En las células cerebrales, sobre todo células gliales y neuronas, aproximadamente un tercio del hierro está almacenado en forma de ferritina [97]. La homeostasis cerebral del hierro tiene bastantes similitudes a la del hierro sistémico, por lo que se considera que las concentraciones de ferritina en suero son un índice apropiado de la disponibilidad de hierro en el cerebro una vez permeabilizada la BHE [98]. La síntesis de ferritina en las células cerebrales puede ser inducida en situaciones de isquemia cerebral [104,144], acidosis hipóxica [145] o como respuesta al estrés oxidativo para reducir el acúmulo de

ROS [146]. Por tanto, el incremento de las concentraciones de ferritina celular observado en nuestros pacientes podría ser en parte el resultado de un mecanismo neuroprotector con la intención de secuestrar el hierro tóxico libre en el cerebro isquémico. Sin embargo, en modelos animales la expresión cerebral de ferritina se ha demostrado únicamente 24 horas después de la isquemia en las células cerebrales [104,116,144]; por otro lado, determinaciones seriadas de las concentraciones de ferritina en sangre periférica no han demostrado un incremento significativo a las 4 horas de la inducción de la isquemia cerebral, mientras que los resultados a las 24 horas fueron contradictorios ya que las concentraciones de ferritina sérica sólo aumentaron en el modelo de isquemia cerebral que ocasionó infarto cerebral de gran tamaño [116]. La situación de acidosis, incremento de catecolaminas y presencia de óxido nítrico que se produce durante la isquemia cerebral favorecen la liberación de hierro ferroso desde la ferritina y disminuyen la afinidad de la transferrina por el hierro, lo que aumenta la concentración cerebral de hierro libre [103,147]. Por tanto, la concentración cerebral de ferritina podría estar relacionada con la disponibilidad de hierro en el área infartada.

Estudios experimentales sugieren que las bases fisiopatológicas del mayor daño cerebral secundario a la sobrecarga de hierro en la isquemia cerebral son la generación de radicales libres sobre todo durante la reperusión, y en consecuencia, el aumento del daño excitotóxico y la disrupción de la BHE [105-113]. Estos mecanismos moleculares neurotóxicos son comunes a los que ocasiona el r-tPA en la unidad neurovascular, ya que el r-tPA incrementa la

excitotoxicidad y la sobreexpresión de MMP-9 [27,28,38,39]. Asimismo, la co-administración de r-tPA con un agente quelante de radicales libres o un antioxidante reduce la disrupción de la BHE en comparación con la administración aislada de r-tPA [70,73,75], lo que sugiere una mayor generación de radicales libres después de la reperfusión inducida por el r-tPA. Por tanto, las evidencias experimentales existentes apuntan un potencial efecto tóxico sinérgico del hierro y el r-tPA en la unidad neurovascular, que debe ser estudiado con un diseño específico en modelos animales. Nuestro grupo de investigación básica está actualmente desarrollando un estudio experimental en un modelo tromboembólico de isquemia/reperfusión con trombina en ratones sobrealimentados o no con hierro y tratados o no con r-tPA, en el que se evalúa el potencial sinergismo del hierro y del r-tPA en la neurotoxicidad sobre la unidad neurovascular mediante el análisis del volumen de infarto, la transformación hemorrágica y el edema cerebral en cada grupo de ratones [148]. Asimismo, se estudia el efecto de la administración previa de un quelante de hierro (deferoxamina) y una sustancia antioxidante (MnTBAP) por vía intraperitoneal en los diferentes grupos de animales y la cinética de expresión de la ferritina en suero tras la isquemia cerebral en diferentes tiempos de evolución (FIS PI060788).

Nuestro segundo trabajo se llevó a cabo con el objetivo de investigar a nivel clínico si la excitotoxicidad, la inflamación y la lesión endotelial podían ser mecanismos biológicos subrogados de la importancia del daño cerebral mediado por el hierro en los pacientes con ictus isquémico que reciben tratamiento con

r-tPA IV. Para ello se determinaron biomarcadores en suero de lesión excitotóxica (glutamato), inflamación (IL-6) y disrupción de BHE (MMP-9 y c-Fn) que han sido validados previamente en otros estudios clínicos como buenos predictores del daño cerebral y endotelial [52-55,149-153]. Las concentraciones basales de glutamato, IL-6, MMP-9 y c-FN en suero fueron significativamente más altas en los pacientes con mala evolución funcional y en aquellos que desarrollaron hemorragia parenquimatosa o edema cerebral grave tras la administración del tratamiento trombolítico. Las concentraciones basales de ferritina mostraron una correlación moderada con las concentraciones de glutamato e IL-6 y una ligera correlación con las concentraciones de MMP-9 y c-Fn. La asociación entre las concentraciones de ferritina y las de glutamato perduró hasta las 72 horas de evolución tras ajustar por otras variables clínicas relacionadas con los valores basales de ferritina. Sin embargo, no se encontró una asociación independiente con el resto de biomarcadores, con la excepción de la MMP-9 a las 72 horas.

Los resultados de esta investigación apoyan el papel del daño excitotóxico como mediador del mayor daño cerebral de los pacientes con ictus isquémico y concentraciones altas de ferritina que son tratados con r-tPA IV. Las concentraciones elevadas de glutamato en sangre se han asociado a la gravedad neurológica inicial, al tamaño del infarto, al deterioro neurológico precoz y al crecimiento de la lesión isquémica en la secuencia de DWI en pacientes con ictus isquémico [149,150,153]. El incremento de la excitotoxicidad mediada por el glutamato en la isquemia cerebral en relación al

aumento de los depósitos corporales de hierro se sustenta tanto por estudios experimentales como clínicos. En sinaptosomas de cerebro de rata se ha demostrado por fluorescencia que la ferritina induce la formación de ROS y reduce la recaptación del glutamato [154]; en cultivos neuronales, la liberación de glutamato está claramente aumentada a través de sistemas que favorecen la formación de radicales libres [155,60]; en modelos animales de isquemia cerebral, la ingesta de hierro comporta mayores concentraciones de glutamato en suero que la dieta normal [105], mientras que la administración de antioxidantes ejerce un efecto neuroprotector mediante la disminución de la liberación de glutamato [61]; y finalmente, en pacientes con ictus isquémico se ha demostrado una asociación entre las concentraciones elevadas de ferritina y glutamato en suero y LCR y el deterioro neurológico [119].

En modelos animales de isquemia/reperfusión cerebral se ha demostrado un acúmulo de hierro en determinadas zonas del cerebro como el tálamo o el hipotálamo [156,157], así como también un acúmulo de ROS o productos de la peroxidación lipídica [111,112], principalmente en aquellas regiones cerebrales en las que se había acumulado previamente el hierro [115]. El estrés oxidativo como mecanismo de daño cerebral es especialmente intenso en animales con sobrecarga de hierro corporal [105,111]. Asimismo, existe una estrecha relación entre el estrés oxidativo y la sobreexpresión de MMP-9, ya que en ratones *knockout* que no expresan SOD, la disrupción de la BHE después de la isquemia/reperfusión cerebral está íntimamente ligada al incremento en la expresión de MMP-9 en la pared vascular, un efecto que se revierte en ratones

transgénicos que sobreexpresan la SOD [64], mientras que la formación de radicales libres inducidos por la reperfusión es particularmente intensa en los microvasos y en los pericitos que los rodean, donde colocalizan con la expresión de marcadores de disrupción de la BHE como las MMP-9 [65]. En nuestro estudio, las concentraciones de ferritina al ingreso mostraron una asociación independiente con las concentraciones de MMP-9 a las 72 horas, resultado que podría indicar un posible efecto biológico del aumento de los depósitos intracelulares de hierro sobre la expresión tardía de MMP-9 en los pacientes con ictus isquémico tratados con r-tPA IV. Sin embargo, la asociación entre las concentraciones de ferritina y las concentraciones de IL-6, c-Fn y MMP-9 al ingreso y a las 24 horas, precisa ser confirmada en nuevos estudios para dar soporte al papel tóxico precoz del hierro sobre la BHE.

En conclusión, la concentración elevada de ferritina en suero, como indicador del aumento de los depósitos corporales de hierro, se asocia a una mala evolución funcional y al desarrollo de transformación hemorrágica y edema cerebral grave en pacientes con ictus isquémico a los que se administra tratamiento trombolítico con r-tPA IV. El daño cerebral asociado a la sobrecarga de hierro en estos pacientes puede estar mediado por mecanismos relacionados con la lesión excitotóxica, mientras que el papel de la inflamación, disrupción de la BHE y del estrés oxidativo debe continuar investigándose.

2. Limitaciones de los estudios realizados

Investigación nº1:

1. No es posible conocer con exactitud si el aumento de las concentraciones séricas de ferritina en los pacientes con peor pronóstico es la causa de lo que acontece a nivel cerebral o es simplemente el resultado de una reacción de fase aguda secundaria a la propia isquemia, aunque el análisis de regresión logística ha sido ajustado por variables basales que influyen en el pronóstico del paciente como la gravedad neurológica inicial o el volumen del infarto cerebral. Además, el perfil temporal de la ferritina en nuestro estudio y la marcada diferencia de las concentraciones entre los dos grupos de pacientes de forma precoz, no apoyan un rápido incremento dentro de las primeras 3 horas de isquemia cerebral debida a una reacción de fase aguda.
2. Aunque se excluyeron del estudio aquellos pacientes con discapacidad previa, consumo significativo de alcohol y enfermedades infecciosas, inflamatorias o neoplásicas conocidas en el momento de la inclusión, no se puede descartar la presencia de factores de confusión desconocidos que puedan haber influido en las concentraciones de ferritina de cada paciente.
3. No se ha podido estudiar la posible interacción entre las concentraciones de ferritina y el momento de la recanalización con el pronóstico del ictus, ya que no se monitorizó de forma sistemática el estado de la arteria cerebral sintomática mediante DTC.

4. Se aleatorizaron 23 pacientes en el ensayo clínico de neuroprotección SAINT I (NXY-059 frente a placebo), por lo que la administración del fármaco podría haber influido en el resultado del estudio. Sin embargo, no se ha demostrado finalmente eficacia del fármaco en el resultado final del ensayo SAINT-2 [158] y la asociación entre los valores altos de ferritina y el mal pronóstico permaneció significativa en un análisis de sensibilidad excluyendo los pacientes que se incluyeron en el ensayo clínico.

Investigación nº 2:

1. Los valores de los biomarcadores en suero no reflejan necesariamente la importancia de los procesos moleculares en el cerebro isquémico y no se puede descartar que estén influidos por una reacción de fase aguda secundaria a la isquemia cerebral. Sin embargo, la asociación entre las concentraciones de ferritina y el resto de biomarcadores fue independiente de la gravedad del ictus y otras variables pronósticas.
2. Aunque la base molecular del daño cerebral mediado por la sobrecarga de hierro en los pacientes con ictus isquémico parece ser la mayor generación de radicales libres, no se han determinado en este estudio marcadores de estrés oxidativo ya que no están ampliamente validados en estudios clínicos y, por tanto, no se ha podido demostrar un aumento de la generación de ROS en los pacientes con incremento de los depósitos intracelulares de hierro.
3. El diseño clínico de este estudio no permite la investigación de un posible efecto neurotóxico sinérgico sobre la unidad neurovascular del aumento de

los depósitos de hierro y el r-tPA en el ictus isquémico, hipótesis que estamos investigando en modelos experimentales.

3. Contribución de las publicaciones originadas por esta tesis

1. El estudio presentado confirma la participación de las concentraciones de ferritina en suero como indicador de los depósitos de hierro corporal en el pronóstico clínico de los pacientes que sufren un ictus isquémico y reciben tratamiento trombolítico con r-tPA intravenoso.
2. Se ha establecido un punto de corte en las concentraciones basales de ferritina en suero que predicen la mala evolución clínica a largo plazo, el desarrollo de transformación hemorrágica y edema cerebral tras la administración de la terapia trombolítica sistémica.
3. Se ha descrito el perfil temporal de expresión sérica de la ferritina tras la isquemia cerebral en dichos pacientes con un ligero incremento no significativo durante los primeros 3 días de evolución, lo que apoya la estabilidad en las concentraciones sanguíneas de ferritina que habían mostrado trabajos publicados previamente.
4. Se ha demostrado que el daño cerebral asociado al incremento de los depósitos intracelulares de hierro en los pacientes con ictus isquémico tratados con r-tPA IV puede estar causado por mecanismos relacionados con el daño excitotóxico mediado por el glutamato. El papel del estrés oxidativo, inflamación y disrupción de la BHE debe seguir investigándose.
5. Estas observaciones, que deben ser probadas en investigación básica y clínica, pueden conducir a nuevas estrategias terapéuticas, tanto en el

campo del tratamiento agudo del ictus isquémico, como en el de prevención del ictus. La administración precoz de quelantes del hierro, agentes antioxidantes o apresadores de radicales libres tras el inicio de la isquemia cerebral podría ayudar a las neuronas y a la microvasculatura a sobrevivir a la isquemia cerebral. Por otro lado, la prevención mediante recomendaciones dietéticas o donaciones periódicas de sangre en individuos con riesgo cardiovascular elevado y sobrecarga de hierro podría contribuir a la reducción y mejor control de los factores de riesgo vascular y a reducir la incidencia del ictus isquémico.

Los resultados prometedores obtenidos en el presente estudio representan el punto de partida de nuevos proyectos de investigación que se están desarrollando en nuestro departamento tanto a nivel experimental como clínico. El proyecto FIS PI060788 titulado "Sobrecarga de hierro y toxicidad neurovascular: estudio clínico y experimental en la isquemia y reperfusión cerebral" tiene por objetivo: 1) confirmar la acción neurotóxica del incremento de los depósitos intracelulares de hierro en pacientes con ictus isquémico tratados con r-TPA IV y estudiar la relación entre el aumento de las concentraciones de ferritina y la generación de radicales libres en el ictus isquémico y la reperfusión cerebral mediante la monitorización de la recanalización arterial precoz y la determinación de biomarcadores de estrés oxidativo, y 2) evaluar en un modelo tromboembólico de isquemia/reperfusión en ratones el potencial sinergismo en la neurotoxicidad sobre la unidad neurovascular de la sobrecarga de hierro y el r-TPA IV. El proyecto FIS EC/2007-006731-31

titulado "Estudio doble ciego, aleatorizado, controlado con placebo de escalada de dosis de deferoxamina intravenosa en pacientes con ictus isquémico agudo tratado con activador tisular del plasminógeno" es un ensayo clínico multicéntrico fase IIa en el que se evalúa como objetivo principal la seguridad y tolerabilidad de la administración de deferoxamina IV en pacientes con ictus isquémico agudo tratado con r-tPA IV dentro de las primeras 3 horas desde el inicio de los síntomas, y como objetivo secundario el beneficio clínico de la administración de deferoxamina IV en estos pacientes en relación al volumen del infarto, transformación hemorrágica y evolución funcional. Finalmente, en cultivos neuronales y en modelos animales en ratas se está estudiando el papel de la holotransferrina y de diversas proteínas implicadas en el metabolismo del hierro en el daño por reperfusión post-isquémica. Los resultados de estos proyectos de investigación permitirán ampliar el conocimiento fisiopatológico del daño isquémico y post-reperfusión cerebral y pueden ofrecer datos relevantes para la investigación de nuevos fármacos para el tratamiento del ictus isquémico, especialmente en combinación con el tratamiento trombolítico con r-tPA intravenoso.

VII. CONCLUSIONES

Investigación nº 1:

1. Los pacientes con un ictus isquémico agudo y con concentraciones séricas elevadas de ferritina previas a la administración de tratamiento trombolítico con r-tPA intravenoso presentan una peor evolución funcional a corto y largo plazo que los pacientes con concentraciones más bajas de ferritina.
2. Los pacientes con un ictus isquémico agudo y con concentraciones séricas de ferritina elevadas previas a la administración de tratamiento trombolítico con r-tPA intravenoso presentan un mayor riesgo de transformación hemorrágica y edema cerebral grave en la TC craneal a las 24-36 horas tras la administración del fármaco.
3. Las concentraciones de ferritina en suero ≥ 79 ng/ml dentro de las primeras 3 horas de evolución de los síntomas y previas a la administración de tratamiento trombolítico con r-tPA intravenoso en los pacientes con un ictus isquémico agudo constituyen un factor de riesgo independiente de mala evolución funcional con una OR de 117 (95% IC; 24,4-559,4), de hematoma parenquimatoso con una OR de 4,2 (95% IC; 0,8-22) y de edema cerebral grave con una OR de 6,4 (95% IC; 1,3-32).
4. Las concentraciones de ferritina en suero en los pacientes con un ictus isquémico agudo tratado con r-tPA intravenoso presentan un ligero incremento no significativo durante las primeras 72 horas de isquemia cerebral, por lo que los valores elevados en los pacientes con peor evolución clínica no parecen estar relacionados con una reacción de fase aguda.

Investigación nº 2:

1. Las concentraciones basales en suero de ferritina, glutamato, IL-6, MMP-9 y c-Fn son significativamente más altas en los pacientes con peor evolución funcional y con presencia de hemorragia parenquimatosa y edema cerebral grave.
2. Las concentraciones basales de ferritina sérica en los pacientes con un ictus isquémico agudo tratado con r-tPA intravenoso presentan una correlación moderada con las concentraciones de glutamato e IL-6 y una ligera correlación con la MMP-9 y c-Fn.
3. Las concentraciones de ferritina en suero previas a la administración de r-tPA intravenoso en los pacientes con un ictus isquémico agudo se asocian de forma independiente con las concentraciones de glutamato a lo largo de las 72 horas desde el inicio de los síntomas. Esto sugiere que la neurotoxicidad por hierro puede estar mediada por el daño excitotóxico.
4. Las concentraciones de ferritina en suero previas a la administración de r-tPA intravenoso en los pacientes con un ictus isquémico agudo se asocian a los valores de MMP-9 a las 72 horas, pero no se asocian a las concentraciones de IL-6, c-Fn y MMP-9 basal y a las 24 horas tras ajustar por variables relacionadas en el análisis bivariado. Estos resultados indican una posible acción tóxica del hierro sobre la disrupción de la barrera hematoencefálica, aunque el papel de la inflamación y de la disrupción de la barrera hematoencefálica en la neurotoxicidad por el hierro precisa confirmarse en nuevos estudios.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Meairs S, Wahlgren N, Dirnagl U, Lindvall O, Rothwell P, Baron JC, Hossmann K, Engelhardt B, Ferro J, McCulloch J, Kaste M, Endres M, Koistinaho J, Planas A, Vivien D, Dijkhuizen R, Czlonkowska A, Hagen A, Evans A, De Libero G, Nagy Z, Rastenyte D, Reess J, Dávalos A, Lenzi GL, Amarenco P, Hennerici M. Stroke research priorities for the next decade - a representative view of the European scientific community. Summary of stroke research workshop, Brussels, October 25, 2005. *Cerebrovasc Dis* 2006 May 19; 22(2-3):75-82.
2. Zhan ZG, Choop M. Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic. *Lancet Neurol* 2009; 8:491-500.
3. Saver JL. Citicoline: update on a promising and widely available agent for neuroprotection and neurorepair. *Rev Neurol Dis* 2008; 5:167-177.
4. Hacke W, Donan G, Fieschi C, Kaste M, von Kummer R, Broderick JP, Brott T, Frankel M, Grotta JC, Haley EC Jr, Kwiatkowski T, Levine SR, Lewandowski C, Lu M, Lyden P, Marler JR, Patel S, Tilley BC, Albers G, Bluhmki E, Wilhelm M, Hamilton S; ATLANTIS Trials Investigators; ECASS Trials Investigators ; NINDS alteplase Study Group Investigators. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS alteplase stroke trials. *Lancet* 2004; 363:768-74.
5. Wahlgren N, Ahmed N, Dávalos A, Ford GA, Grond M, Hacke W, Hennerici MG, Kaste M, Kuelkens S, Larrue V, Lees KR, Roine RO, Soine L, Toni D, Vanhooren G; SITS-MOST investigators. Thrombolysis with alteplase for acute ischemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in the Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study. *Lancet* 2007; 369:275-82.
6. Wahlgren N, Ahmed N, Dávalos A, Hacke W, Millán M, Muir K, Roine RO, Toni D, Lees KR; SITS investigators. Thrombolysis with alteplase 3-4.5 h after acute ischaemic stroke (SITS-ISTR): an observational study. *Lancet* 2008; 372:1303-9

7. Hacke W, Kasta M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D, for the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS) investigators. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2008; 359: 1317-1329.
8. Shaller B, Graf R. Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24:351-371.
9. Pan J, Konstas AA, Bateman B, Ortolano GA, Pile-Spellman J. Reperfusion injury following cerebral ischemia: pathophysiology, MR imaging, and potential therapies. *Neuroradiology* 2007; 49:93-102.
10. Dávalos A. Thrombolysis in acute ischemic stroke: successes, failures, and new hopes. *Cerebrovasc Dis* 2005; 20(suppl 2):135-139
11. Rha JH, Saber JL. The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis. *Stroke* 2007; 38: 967-73.
12. Kim SY, Garami Z, Mikulik R, Molina CA, Alexandroff A, for the CLOT-BUST Collaborators. Early recanalization and clinical outcomes in patients with tandem internal carotid artery/middle cerebral artery occlusion and isolated middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 2005; 36:869-871
13. Saqqur M, Uchino K, Demchuk AM, Molina CA, Garani Z, Callejas S, Akhtar N, Orouk FO, Salam A, Shuaib A, Alexandrov AV; CLOTBUST Investigators. Site of arterial occlusion identified by transcranial Doppler predicts the response to IV thrombolysis for stroke. *Stroke* 2007; 38:948-54.
14. Alexandrov AV, Grotta JC. Arterial reocclusion in stroke patients treated with intravenous tissue plasminogen activator. *Neurology* 2002; 59:862-7.
15. Rubiera M, Álvarez-Sabín J, Ribo M, Montaner J, Santamarina E, Arenillas JF, Huertas R, Delgado P, Purroy F, Molina CA. Predictors of early arterial reocclusion after tissue plasminogen activator-induced recanalization in acute ischemic stroke. *Stroke* 2005; 36:1452-1456.

16. Saqqur M, Tsivgoulis G, Molina CA, Demchuk AM, Siddiqui M, Alvarez-Sabin J, Uchino K, Callejas S, Alexandrov AV; CLOTBUST Investigators. Symptomatic intracerebral hemorrhage and recanalization after iv rt-PA: a multicenter study. *Neurology* 2008; 71: 1304-12.
17. Alexandrov AV, Hall CE, Labiche LA, Wojner AW, Grotta JC. Ischemic stunning of the brain. Early recanalization without immediate clinical improvement in acute ischemic stroke. *Stroke* 2004; 35:449-452.
18. Grotta JC, Welch KM, Fagan SC, Lu M, Frankel MR, Brott T, Levine SR, Lyden PD. Clinical deterioration following improvement in the NINDS rt-PA stroke trial. *Stroke* 2001; 32:661-668.
19. Kidwell CS, Saver JL, Starkman S, Duckwiler G, Jahan R, Vespa P, Villablanca JP, Liebeskind DS, Gobin YP, Vinuela F, Alger JR. Late secondary ischemic injury in patients receiving intraarterial thrombolysis. *Ann Neurol* 2002; 52:698-703.
20. Bang OY, Liebeskind DS, Buck BH, Yoon SR, Alger JR, Ovbiagele B, Saver JL, UCLA MRI Investigators. Impact of reperfusion after 3 hours of symptom onset on tissue fate in acute cerebral ischemia. *J Neuroimaging* 2009; 19:317-322.
21. Kent TA, Soukup VM, Fabian RH. Heterogeneity affecting outcome from acute stroke therapy. Making reperfusion worse. *Stroke* 2001; 32:2318-2327.
22. Ahmed N, Dávalos A, Ford GA, Hennerici M, Kaste M, Lees KR, Lindsberg P, Toni D, for the SITS-MOST Investigators. Association of admission blood glucose and outcome in patients treated with intravenous thrombolysis. *Sometido a Arch Neurol*.
23. De Silva DA, Ebinger M, Christensen S, Parsons MW, Levi C, Butcher K, Barber PA, Bladin C, Donnan GA, Davis SM, for the EPITHET Investigators. Baseline diabetic status and admission blood glucose were poor prognostic factors in the EPITHET trial. *Cerebrovasc Dis* 2010; 29:14-21.

24. Alvarez-Sabin J, Molina CA, Montaner J, Arenillas JF, Huertas R, Ribo M, Codina A, Quintana M. Effects of admission hyperglycemia on stroke outcome in reperfused tissue plasminogen activator-treated patients. *Stroke* 2003; 34:1235-1241.
25. Ernon L, Schrooten M, Thijs V. Body temperature and outcome after thrombolysis. *Acta Neurol Scand* 2006; 114:23-8.
26. Millán M, Grau L, Castellanos M, Rodríguez-Yáñez M, Arenillas JF, Nombela F, Pérez de la Ossa N, López-Manzanares L, Serena J, Castillo J, Dávalos A. Body temperature and response to thrombolytic therapy in acute ischemic stroke. *Eur J Neurol* 2008; 15: 1384-9.
27. Lo EH, Broderick JP, Moskowitz MA. tPA and proteolysis in the neurovascular unit. *Stroke* 2004; 35:354-356.
28. Kaur J, Zhao Z, Klein GM, Lo EH, Bucham AM. The neurotoxicity of tissue plasminogen activator. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004; 24:945-963
29. del Zoppo GJ. Stroke and neurovascular protection. *New Engl J Med* 2006; 354:553-555
30. del Zoppo GJ. The neurovascular unit in the setting of stroke. *J Int Med* 2010; 267: 156-171.
31. Arai K, Lo EH. An oligovascular niche: cerebral endothelial cells promote the survival and proliferation of oligodendrocyte precursor cells. *J Neurosci* 2009; 29:4351-5355.
32. Lizasoain I, Cardenas A, Hurtado O, Romera C, Mallolas J, Lorenzo P, Castillo J, Moro MA. Targets of cytoprotection in acute ischemic stroke: present and future. *Cerebrovasc Dis* 2006; 21(Suppl 2):1-8.
33. Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, Stieg PE, Soriano SG, Lipton SA. Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and t-PA deficient mice. *Nat Med* 1998; 4:228-231.

34. Tabrizi P, Wang L, Seeds N, McComb JG, Yamada S, Griffin JH, Carmeliet P, Weis MH, Zlokovic BV. Tissue plasminogen activator (tPA) deficiency exacerbates cerebrovascular fibrin deposition and brain injury in a murine stroke model: studies in tPA-deficient mice and wild-type mice on a matched genetic background. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:2801-2806.
35. Klein GM, Li H, Sun P, Buchan AM. Tissue plasminogen activator does not increase neuronal damage in rat models of global and focal ischemia. *Neurology* 1999; 52:1381-1384.
36. Nagai N, De Mol M, Lijnen HR, Carmeliet P, Collen D. Role of plasminogen system components in focal cerebral ischemic infarction. *Circulation* 1999; 99:2440-2444.
37. Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, MacKenzie ET, Vivien D, Buisson A. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signalling. *Nat Med* 2001; 7:59-64.
38. Tsuji K, Aoki T, Tejima E, Arai K, Lee SR, Atochin DN, Huang PL, Wang X, Montaner J, Lo E. Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia. *Stroke* 2005; 36:1954-1959.
39. Pfefferkorn T, Rosenberg GA. Closure of the blood-brain barrier by matrix metalloproteinase inhibition reduces rtPA-mediated mortality in cerebral ischemia with delayed reperfusion. *Stroke* 2003; 34:2025-2030
40. 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.
41. Lo EH, Wang X, Cuzner ML. Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J Neurosci Res* 2000; 69:1-9.

42. 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.
43. Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabín J, Fernandez-Cadenas I, Ribó M, Molina CA, Lo EH, Montaner J. Increased brain expression of matrix metalloproteinase -9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke* 2006; 37:1399-1406.
44. Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernández-Guillamon M, Lo EH, Montaner J. MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke* 2008; 39: 1121-6.
45. Montaner J, Alvarez-Sabín J, Molina C, Anglés A, Abilleira S, Arenillas JF. Matrix metalloproteinase expression after human cardioembolic stroke: temporal profile and relation to neurological impairment. *Stroke* 2001; 32: 1759-66.
46. Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain N, Castillo J, Dávalos A. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke* 2003; 35:40-6.
47. Barr TL, Latour LL, Lee KY, Schaewe TJ, Chang GS, El-Zammar Z, Alam S, Hallenbeck JM, Kidwell CS, Warach S. Blood-brain barrier disruption in humans is independently associated with increased matrix metalloproteinase-9. *Stroke* 2010; 41:e123-e128.
48. Park KP, Rosell A, Foerch C, Xing C, Kim WJ, Lee S, Opdenakker G, Furie KL, Lo EH. Plasma and brain metalloproteinase-9 after acute focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 2009; 40:2836-2842.
49. Sumii T, Lo EH. Involvement of matrix metalloproteinases in thrombolysis-associated hemorrhagic transformation after embolic focal ischemia in rats. *Stroke* 2002; 33:831-836.

50. Aoki T, Sumii T, Mori T, Wang X, Lo EH. Blood-brain barrier disruption and matrix metalloproteinases-9 expression during reperfusion injury. Mechanical versus embolic focal ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 2002; 33:2711-2717.
51. Ning M, Furie KL, Koroshetz WJ, Lee H, Barron M, Lederer M, Wang X, Zhu M, Sorensen AG, Lo EH, Kelly PJ. Association between t-pa therapy and raised early matrix metalloproteinase-9 in acute stroke. *Neurology* 2006; 66:1550-1555.
52. Montaner J, Molina CA, Monasterio J, Abilleira S, Arenillas JF, Ribé M, Quintana M, Álvarez-Sabín J. Matrix metalloproteinases-9 pre-treatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke. *Circulation* 2003; 107:598-603.
53. Castellanos M, Leira R, Serena J, Blanco M, Pedraza S, Castillo J, Dávalos A. Plasma cellular-fibronectin concentration predicts hemorrhagic transformation after thrombolysis therapy in acute ischemic stroke. *Stroke* 2004; 35:1671-1676.
54. Serena J, Blanco M, Castellanos M, Silva Y, Vivancos J, Moro MA, Leira R, Lizasoain I, Castillo J, Dávalos A. The prediction of malignant cerebral infarction by molecular brain barrier disruption markers. *Stroke* 2005; 36:1921-1926.
55. Castellanos M, Sobrino T, Millán M, García M, Arenillas JF, Nombela F, Brea D, Pérez de la Ossa N, Serena J, Vivancos J, Castillo J, Dávalos A. Serum cellular fibronectin and matrix metalloproteinase-9 as screening biomarkers for the prediction of parenchymal hematoma after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke: a multicenter confirmatory study. *Stroke* 2007; 38; 1855-1859.
56. Cuadrado E, Ortega L, Hernández-Guillamon M, Penalba A, Fernández-Cadenas I, Rosell A, Montaner J. Tissue plasminogen activator (t-PA) promotes neutrophil degranulation and MMP-9 release. *J Leukoc Biol* 2008; 84:207-214.

57. Allen CL, Bayraktutan U. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischemic stroke. *Int J Stroke* 2009; 4:461-70.
58. Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral ischemia. *Stroke* 2001; 32:2712-2716
59. Crack PJ, Taylor JM. Reactive oxygen species and the modulation of stroke. *Free Radical Biol and Med* 2005; 38:1433-1444.
60. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Caria V, Moroni F. Excitatory aminoacids release and free radicals formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosc* 1990; 10:1035-1041.
61. Hurtado O, De Cristobal J, Sanchez V, Lizasoain I, Cardenas A, Pereira MP, Colado MI, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA, Inhibition of glutamate release by delaying ATP fall accounts for neuroprotective effects of antioxidants in experimental stroke. *FASEB J* 2003; 17: 082-4.
62. Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leuko Biol* 2010; 87:779-89.
63. Jian Liu K, Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases and free radicals in cerebral ischemia. *Free Radical Biology & Medicine* 2005; 39:71-80.
64. Maier CM, Hsieh L, Crandall T, Narasimhan P, Chan PH. Evaluating therapeutic targets for reperfusion-related brain hemorrhage. *Ann Neurol* 2006; 59:929-938.
65. Gürsoy-Özdemir Y, Can A, Dalkara T. Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. *Stroke* 2004; 35:1449-1453.
66. Crack PJ, Taylor JM, Haan JB, Kola I, Hertzog P, Ianello RC. Glutathione peroxidase-1 contributes to the neuroprotection seen in the superoxide dismutase-a transgenic mouse in response to ischemia/reperfusion injury. *Cereb Blood Flow Metab* 2003; 23:19-22.

67. Kil HY, Zhang J, Piantadosi CA. Brain temperature alters hydroxyl radical production during cerebral ischemia/reperfusion in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16:100-106
68. Tsuruta R, Fujita M, Ono T, Koda Y, Koga Y, Yamamoto T, Nanba M, Shitara M, Kasaoka S, Maruyama I, Yuasa M, Maekawa T. Hyperglycemia enhances excessive superoxide anion radical generation, oxidative stress, early inflammation, and endothelial injury in forebrain ischemia/reperfusion rats. *Brain Res* 2010; 1309:155-63.
69. Sereghy T, Overgaard K, Boysen G. Neuroprotection by excitatory aminoacids antagonist augments the benefit of thrombolysis in embolic stroke in rats. *Stroke* 1993; 24:1702-8.
70. Asahi M, Asahi K, Wang X, Lo EH. Reduction of tissue plasminogen activator-induced hemorrhage and brain injury by free radical spin trapping after embolic focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20:452-457
71. Lapchak PA. Coadministration of NXY-059 and tenecteplase six hours following embolic strokes in rabbits improves clinical rating scores. *Exp Neurol* 2004; 188:195-199
72. Lapchak PA, Araujo DM, Song D, Wei J, Zivin JA. Neuroprotective effects of the spin trap agent NXY-059 in a rabbit small clot embolic stroke model. Combination studies with the thrombolytic tissue plasminogen activator. *Stroke* 2002; 33:1411-1415
73. Lapchak PA, Zivin JA. Ebselen, a seleno-organic antioxidant, is neuroprotective after embolic strokes in rabbits. Synergism with low-dose tissue plasminogen activator. *Stroke* 2003; 34:2013-2018
74. Romanos E, Planas AM, Amaro S, Chamorro A. Uric acid reduces brain damage and improves the benefits of rt-PA in a rat model of thromboembolic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007; 27:14-20.

75. Yagi K, Kitazato KT, Uno M, Tada Y, Kinouchi T, Shimada K, Nagashiro S. Edavarone, a free radical scavenger, inhibits MMP-9-related brain hemorrhage in rats treated with tissue plasminogen activator. *Stroke* 2009; 40:626-31.
76. El Kossi MMH, Zakhary MM. Oxidative stress in the context of acute cerebrovascular stroke. *Stroke* 2000; 31:1889-1892.
77. Nanetti L, Taffi R, Vignini A, Moroni C, Raffaelli F, Bacchetti T, Silvestrini M, Provinciali L, Mazzanti L. Reactive oxygen species plasmatic levels in ischemic stroke. *Mol Cell Biochem* 2007; 303:19-25.
78. Cherubini A, Poldori MC, Bregnocchi M, Pezzuto S, Cecchetti R, Ingegneri T, di Iorio A, Senin U, Mecocci P. Antioxidant profile and early outcome in stroke patients. *Stroke* 2000; 31:2295-2300.
79. Chamorro A, Obach V, Cervera A, Revilla M, Deulofeu R, Aponte JH. Prognostic significance of uric acid serum concentration in patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 2002; 33:1048-1052.
80. Leinonen JS, Ahonen JP, Lönrot K, Jehkonen M, Dastidar P, Molnár G, Alho H. Low plasma antioxidant activity is associated with high lesion volume and neurological impairment in stroke. *Stroke* 2000; 31:33-39.
81. Alexandrova M, Bochev P, Markova V, Bechev B, Popova M, Danovska M, Simeonova V. Dynamics of free radical processes in acute ischemic stroke: influence on neurological status and outcome. *J Clin Neurosc* 2004; 11:501-506.
82. Zimmermann C, Winnefeld K, Streck S, Roskos M, Haberl RL. Antioxidant status in acute stroke patients and patients at stroke risk. *Eur Neurol* 2004; 51:157-161.
83. Sánchez-Moreno C, Dashe JF, Scott T, Thaler D, Folstein MF, Martin A. Decreased levels of plasma vitamin C and increased concentrations of inflammatory and oxidative stress markers after stroke. *Stroke* 2004; 35:163-168.

84. Ozkul A, Akyol Ali, Yenisei C, Arpaci E, Kiylioglu N, Tataroglu C. Oxidative stress in acute ischemic stroke. *J Clin Neurosc* 2007; 14:1062-1066.
85. Taffi R, Nanetti L, Mazzanti L, Bartolini M, Virgini A, Raffaelli F, Pasqualetti P, Vernieri F, Provinciali L, Silvestrini M. Plasma levels of nitric oxide and stroke outcome. *J Neurol* 2008; 255:94-98.
86. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci P. Potential markers of oxidative stress in stroke. *Free Radical Biology&Medicine* 2005; 39:841-852.
87. Peter JK, Morow JD, Ning M, Koroshetz W, Lo EH, Terry E, Milne GL, Hubbard J, Lee H, Stevenson E, Lederer M, Furie KL. Oxidative stress and matrix metalloproteinase-9 in acute ischemic stroke. The biomarker evaluation for antioxidant therapies in stroke (BEAT-Stroke) Study. *Stroke* 2008; 39:100-104.
88. Amaro S, Obach V, Cervera A, Urra X, Gómez-Choco M, Planas AM, Chamorro A. Course of matrix metalloproteinase-9 isoforms after the administration of uric acid in patients with acute stroke. A proof-of-concept study. *J Neurol* 2009; 256:651-656.
89. Hong JM, Bang OY, Chung CS, Joo IS, Gwag BJ, Ovbiagele B. Influence of recanalization on uric acid patterns in acute ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2010; 29:431-439.
90. Domínguez C, Delgado P, Vilches A, Martín-Gallán P, Ribó M, Santamarina E, Molina C, Corbeto N, Rodríguez-Sureda V, Rosell A, Alvarez-Sabín J, Montaner J. Oxidative stress after thrombolysis-induced reperfusion in human stroke. *Stroke* 2010; 41:653-660.
91. Yemisci M, GURSOY-OZDEMIR Y, VURAL A, CAN A, TOPALKARA K, DALKARA T. Pericyte contraction induced by oxidative-nitrate stress impairs capillary reflow despite successful opening of and occluded artery. *Nat Med* 2009; 15:1031-1037.

92. Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition* 2002; 18: 872-879.
93. Dunn LL, Rahmanto S, Richardson Dr. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends in Cell Biology* 2006; 17:93-100.
94. Rouault TA. Systemic iron metabolism: a review and implications for brain iron metabolism. *Pediatric Neurology* 2001, 25:130-137.
95. Atanasiu V, Manolescu B, Stoian I. Heparin, central regulator of iron metabolism. *Eur J Hematol* 2006; 76:1-10
96. Benarroch EE. Brain iron homeostasis and neurodegenerative disease. *Neurology* 2009; 72:1436-40.
97. Mackenzie EH, Iwasaki K, Tsuji Y. Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *AntiOxid & Redox Sig* 2008; 10:997-1030.
98. Moos Torben, Rosengren T, Skjorringe T, Morgan EH. Iron trafficking inside the brain. *J Neurochem* 2007; 103:1730-1740.
99. Fisher J, Devarj K, Ingram J, Slagel-Webb B, Madhankumar AB, Liu X, Klinger M, Simpson IA, Connor JR. Ferritin, a novel mechanism for delivery of iron to the brain and the other organs. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: C641-C649.
100. Nelson CW, Wei EP, Povlishock JT, Kontos HA, Moskowitz MA. Oxygen radicals in cerebral ischemia. *Am J Physiol* 1992; 263:H1356–H1352
101. Sorond FA, Ratan RR. Ironing-out mechanisms of neuronal injury under hypoxic-ischemic conditions and potential role of iron chelators as neuroprotective agents. *AntiOxid & Redox Sig* 2000; 3: 421-37.
102. Gaasch JA, Lockman PR, Geldenhuys WJ, Allen DD, Van der Schyf CJ. Brain iron toxicity: differential responses of astrocytes, neurons, and endothelial cells. *Neurochem Res* 2007; 32:1196-208.

103. Selim MH, Ratan RR. The role of iron neurotoxicity in ischemic stroke. *Ageing Research Reviews* 2004; 3:345-353
104. Millerot-Serrurot E, Bertrand N, Mossiat C, Faure P, Prigent-Tessier A, Garnier P, Bejot Y, Giroud M, Beley A, Marie C. Temporal changes in free iron levels after brain ischemia. Relevance to the timing of iron chelation therapy in stroke. *Neurochemistry International* 2008; 52:1442-1448.
105. Castellanos M, Puig N, Carbonell T, Castillo J, Martínez JM, Rama R, Dávalos A. Iron intake increases infarct volume after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res* 2002; 952:1-6
106. Patt A, Horesh IR, Berger EM, Harken AH, Repine JE. Iron depletion or chelation reduces ischemia/reperfusion-induced edema in gerbil brains. *J Pediatr Surg* 1990; 25:224-228.
107. Soloniuk D, Perkins E, Wilson JR. Use of allopurinol and deferoxamine in cellular protection during ischemia. *Surg Neurol* 1992; 38:110-113
108. Hurn PD, Koehler RC, Blizzard KK, Traystman RJ. Deferoxamine reduces early metabolic failure associated with severe cerebral ischemic acidosis in dogs. *Stroke* 1995; 26:688-695.
109. Freret T, Valable S, Chazalviel L, Saulnier R, Mackenzie ET, Petit E, Bernaudin M, Boulouard M, Schumann-Bard P. Delayed administration of deferoxamine reduces brain damage and promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in the rat. *Eur J Neurosci* 2006; 23:1757-1765.
110. Hanson LR, Roeytenberg A, Martínez PM, Coppes VG, Sweet DC, Rao RJ, Marti DL, Hoekman JD, Matthews RB, Frey WH, Panter SS. Intranasal deferoxamine provides increased brain exposure and significant protection in rat ischemic stroke. *J Pharmacol Exp Ther* 2009; 330:679-86.
111. Mehta SH, Webb C, Ergul A, Tawak A, Dorrance AM. Neuroprotection by tempol in a model of iron-induced oxidative stress in acute ischemic stroke. *Am J Physiol* 2004; 286:283-288.

112. Hassan W, Ibrahim M, Nogueira CW, Braga AL, Mohammadzai IU, Taube PS, Texeira JA. Enhancement of iron-catalyzed lipid peroxidation by acidosis in brain homogenate: comparative effect of diphenyl diselenide and ebselen. *Brain Res* 2009; 1258:71-77.
113. Davis S, Helfaer MA, Traystman RJ, Hum PD. Parallel antioxidant and antiexcitotoxic therapy improves outcome after incomplete global cerebral ischemia in dogs. *Stroke* 1997; 28:198–205.
114. Bishop G, Robinson S. Quantitative analysis of cell death and ferritin expression in response to cortical iron, implications for hypoxia-ischemia and stroke. *Brain Res* 2001; 907:175-187
115. Kondo Y, Asanuma M, Nishibayashi S, Iwata E, Ogawa N. Late-onset lipid peroxidation and neuronal cell death following transient forebrain ischemia in rat brain. *Brain Res* 1997; 772:37-44.
116. Millerot E, Prigent-Tressier AS, Bertrand NM, Faure PJC, Mossiat CM, Giroud ME, Beley AG, Marie C. Serum ferritin in stroke: a marker of increased body iron stores or stroke severity? *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25:1386-1393.
117. Gasull T, Degregorio-Rocasolano N, Guardia S, Ponce J, Guirao V, Martí-Sistac O, Gibert J, Dávalos A. Iron-bound transferrin reaching brain parenchyma can induce reperfusion damage in neurons rescued from ischaemia. Oral communication. European Stroke Conference, Barcelona, 2010.
118. Davalos A, Fernandez-Real JM, Ricart W, Soler S, Molins A, Planas E, Genis D. Iron-related brain damage in acute ischemic stroke. *Stroke* 1994; 25:1543–1546.
119. Davalos A, Castillo J, Marrugat J, Fernández-Real JM, Armengou A, Cacabelos P, Rama R. Body iron stores and early neurological deterioration in acute cerebral infarction. *Neurology* 2000; 54:1568-1574.

120. Erdemoglu AK, Ozbakir S. Serum ferritin levels and early prognosis of stroke. *Eur J Neurol* 2002; 9:633-637.
121. Fernández Real JM. El hierro como factor de riesgo cardiovascular. Interacción con los factores de riesgo clásicos. *Med Clin* 1995; 105:617-619.
122. Wolff B, Völzke H, Lüdemann J, Robinson D, Vogelgesang D, Staudt A, Kessler C, Dahm JB, John U, Felix SB. Association between high serum ferritin levels and carotid atherosclerosis in the study of health in Pomerania (SHIP). *Stroke* 2004; 35:453-457.
123. Armengou A, Dávalos A. Serum ferritin concentrations are not modified in the acute phase of ischemic stroke. *Stroke* 1998; 29:258–260.
124. Altamura C, Squitti R, Pasqualetti P, Gaudino C, Palazzo P, Tibuzzi F, Lupoi D, Cortesi M, Rossini PM, Vernieri F. Ceruloplasmin/Transferrin system is related to clinical status in acute stroke. *Stroke* 2009; 40:1282-1288.
125. RANTTAS Investigators. A randomized trial of tirilazad mesylate in patients with acute stroke (RANTTAS). *Stroke* 1996; 27:1453-1458.
126. Haley E. High-dose tirilazad for acute stroke (RANTTAS II). *Stroke* 1998; 29:1256-1257.
127. <http://clinicaltrials.gov/ct2/TANDEM-1>. Identifier: NCT00777140
128. Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, Torti SV. Ferritin for the clinician. *Blood Rev* 2009; 23:95-104.
129. Beard JL, Murray-Kolb LE, Rosales FJ, Solomon NW, Angelilli ML. Interpretation of serum ferritin concentrations as indicator of total-body iron stores in survey population: the role of biomarkers for the acute phase response. *Am J Clin Nutr* 2006; 84:1498-1505.
130. Connor JR, Menzies SL, St Martin SM, Mufson EJ. Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains. *J Neurosci Res* 1990, 27:595-611.

131. Unger EL, Early CJ, Beard JL. Diurnal cycle influences peripheral and brain iron levels in mice. *J Appl Physiol* 2009; 106:187-193.
132. Ten Kate J, Wolthuis A, Westerhuis B, van Deursen C. The iron content of serum ferritin: physiological importance and diagnostic value. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35:53-56.
133. Smith S, Zwart S, Block G, Rice BL, Davis-Street JE. The nutritional status of astronauts is altered after long-term space flight aboard the International Space Station. *J Nutr* 2005; 135:437-443.
134. Herbert V, Jayatilleke E, Shaw S, Rosman AS, Giardina P, Grady RW, Bowman B, Gunter EW. Serum ferritin iron, a new test, measures human body iron stores unconfounded by inflammation. *Stem Cells* 1997; 15:291-296.
135. Nielsen P, Günter U, Dürken M, Fisher R, Düllmann J. Serum ferritin iron in iron overload and liver damage: correlation to body iron stores and diagnostic relevance. *J Lab Clin Med* 2000; 135:413-418.
136. Yamanishi H, Iyama S, Yamaguchi Y, Kanakura Y, Iwatani Y. Relation between iron content of serum ferritin and clinical status factors extracted by factor analysis in patients with hyperferritinemia. *Clin Biochem* 2002; 35:523-529.
137. Sánchez M, Villa M, Ingelmo M, Sanz C, Bruguera M, Ascaso C, Oliva R. Population screening for hemochromatosis: a study in 5370 Spanish blood donors. *J Hepatol* 2003; 38:745-750.
138. Njajou OT, Houwing-Duistermaat JJ, Osborne RH, Vaessen N, Vergeer J, Heeringa J, Pols HA, Hofman H, van Duijn CM. Mutations in the hemochromatosis gene (HFE) and stroke. *Stroke* 2002; 33:2363-2366.
139. van der A DL, Grobbee DE, Roest M, Marx JJM, Voorbij HA, van der Schouw YT. Serum ferritin is a risk factor for stroke in postmenopausal women. *Stroke* 2005; 36:1637-1641.

140. Fleming DJ, Tucker KL, Jaques PF, Dallal GE, Wilson P, Wood RJ. Dietary factors associated with the risk of high iron stores in the elderly Framingham Heart Study Cohort. *Am J Clin Nutr* 2002; 76:1375-84.
141. Cade JE, Moreton JA, O'Hara B, Greenwood DC, Moor J, Burley VJ, Kukulizch K, Bishop DT, Worwood M. Diet and genetic factors associated with iron status in middle-aged women. *Am J Clin Nutr* 2005; 82:813-20.
142. Less KR, Zivin JA, Ashwood T, Dávalos A, Davis SM, Diener HC, Grotta J, Lyden P, Shuaib A, Hardermark HG, Waisiewski WW; Stroke-Acute Ischemic NXY Treatment (SAINT I) Trial Investigators. NXY-059 for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2006; 354:588-600.
143. M. Millán, M. Blanco, M. Castellanos, F. Nombela, M. García, JF. Arenillas, T. Sobrino, N. Pérez de la Ossa, J. Serena, A. Dávalos. Subgroup analysis in iron overload-related brain damage in patients with acute ischemic stroke and thrombolytic treatment. 16th European Stroke Conference. Glasgow, UK, maig 2007. *Cerebrovascular Dis* 2007; 23(suppl 2): 24.
144. Chi SI, Wang CK, Chen JJ, Chau LY, Lin TN. Differential regulation of H and L ferritin messenger RNA subunits, ferritin protein and iron following focal cerebral ischemia-reperfusion. *Neuroscience* 2000; 100:475-484.
145. Qi Y, Jamindar M, Dawson G. Hypoxia alters iron homeostasis and induces ferritin synthesis in oligodendrocytes. *J Neurochem* 1995; 64:2458-2464.
146. Orino K, Lehman L, Tsuji Y, Ayaki H, Torti SV, Torti FM. Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J* 2001; 357:241-247.
147. Carbonell T, Rama R. Iron, oxidative stress and early neurological deterioration in ischemic stroke. *Current Medical Chemistry* 2007; 14:857-874.
148. García de Yébenes I, Sobrado M, Zarruk JG, Castellanos M, Pérez de la Ossa N, Dávalos J, Serena J, Lizasoain I, Moro MA. A mouse model of hemorrhagic transformation by delayed t-PA administration after in situ thromboembolic stroke. *Stroke* 2010 (in press).

149. Castillo J, Dávalos A, Naveiro J, Noya M. Neuroexcitatory amino acids and their relation to infarct size and neurological deficit in ischemic stroke. *Stroke* 1996; 27:1060-1065.
150. Castillo J, Dávalos A, Noya M. Progression of ischemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet* 1997; 349:79-83.
151. 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.
152. Vila E, Castillo J, Dávalos A, Chamorro A. Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke. *Stroke* 2000; 31:2325-2329.
153. Castellanos M, Sobrino T, Pedraza S, Moldes O, Pumar JM, Silva Y, Serena J, García-Gil M, Castillo J, Dávalos A. High plasma glutamate concentrations are associated with infarct growth in acute ischemic stroke. *Neurology* 2008; 71:1862-8.
154. Alekseenko AV, Waseem TV, Fedorovich SV. Ferritin, a protein containing iron nanoparticles, induces reactive oxygen species formation and inhibits glutamate intake in rat brain synaptosomes. *Brain Res* 2008; 1241:193-200.
155. Monyer H, Hartley DM, Choi DW, 21-Aminosteroids attenuate excitotoxic neuronal injury in cortical cell cultures. *Neuron* 1990; 5:121-126.
156. Helal GK. Systemic administration of Zn²⁺ during the reperfusion phase of transient cerebral ischaemia protects rat hippocampus against iron-catalysed postischaemic injury. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2008; 35:775-81.
157. Justicia C, Ramos-Cabrer P, Hoehn M. MRI detection of secondary damage after stroke. Chronic iron accumulation in the thalamus of the rat brain. *Stroke* 2008; 39: 1541-1547.

158. Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Diener HC, Ashwood T, Wasiewski WW, Emeribe U; SAINT II Trial Investigators. NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 2007; 357:562-71.

IX. ANEXOS

ANEXO I. 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 cardiaco.
- 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 cardiaco 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 cardiaco 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 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 II. ESCALA NIHSS

1.a	Nivel de conciencia		
		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
1.b	Nivel de conciencia. Preguntas orales		
	Preguntar: ¿En qué mes estamos? ¿Qué edad tiene? Puntuar sólo la primera respuesta. Aproximaciones o rectificaciones puntuarlas como incorrectas. No ayudar ni dar pistas. Si no puede emitir sonidos y no está afásico (intubado, mudo, muy disártrico-anártrico, barrera idiomática), puntuar 1 Si el paciente está afásico o estuporoso, puntuar 2	0	Ambas respuestas son correctas
		1	Una respuesta correcta
		2	Ninguna respuesta correcta
1.c	Nivel de conciencia. Órdenes motoras		
	Ordenar: "Cierre los ojos", "Ahora abra los ojos" y con el lado no parético "Cierre la mano haciendo un puño y luego abra la mano" Si no hay respuesta hacer el gesto para que el paciente imite y posteriormente puntuar. Sólo puntuar la primera acción. Si existe impedimento para realizar estas órdenes, escoger otra orden motora simple.	0	Ambas órdenes son correctas
		1	Una orden correcta
		2	Ninguna orden correcta
2	Mirada conjugada		
	Sólo valorar la mirada horizontal de manera voluntaria o con reflejos oculocefálicos (no permitidos test calóricos) Si el paciente tiene la mirada desviada pero se corrige de manera voluntaria, por contacto visual o de manera refleja, puntuar 1 . Si tiene una paresia periférica de un oculomotor puntuar 1	0	Normal
		1	Paresia parcial de la mirada. Ausencia de paresia total o de desviación forzada
		2	Paresia total o desviación forzada de la mirada conjugada
3	Visual		
	Explorar los campos visuales por confrontación y por cuadrantes. Si ceguera unilateral explorar sólo el ojo no ciego.	0	No alteración visual
		1	Hemianopsia parcial
		2	Hemianopsia completa

	Si sólo existe extinción visual puntuar 1 . Si ceguera bilateral de cualquier causa, puntuar 3 .	3	Ceguera total
4	Paresia facial		
	Ordenar enseñar los dientes, sonreír o hacer mímica para que el paciente lo imite. Si está afásico o poco reactivo dar un estímulo doloroso para observar la mueca.	0	Movimiento normal o simétrico
		1	Borramiento 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 de brazo		Derecho / Izquierdo
	Explorar el lado no parético en primer lugar. Ordenar levantar y extender el brazo. No valorar la fuerza de la mano. En decúbito, la posición del brazo extendido es a 45°, en sedestación es a 90°.	0	Mantiene la posición durante 10 segundos
		1	Claudicación en menos de 10 segundos, pero la extremidad no llega a tocar la cama.
		2	Levanta la extremidad pero ésta contacta con la cama en menos de 10 segundos.
		3	Mueve la extremidad, pero no la levanta contra gravedad o cae inmediatamente.
		4	Ausencia total de movimiento
		9	Extremidad amputada a nivel proximal o inmovilizada (No sumar en la puntuación global)
6	Paresia de la pierna		Derecho / Izquierdo
	Explorar la pierna no parética en primer lugar. Ordenar levantar la pierna extendida y mantenerla a 30°.	0	Mantiene la posición durante 5 segundos
		1	Claudicación en menos de 5 segundos, sin llegar a contactar con la cama
		2	Levanta la extremidad, pero contacta con la cama en menos de 5 segundos
		3	Mueve la extremidad, pero no la levanta contra gravedad o cae inmediatamente.
		4	Ausencia total de movimiento
		9	Extremidad amputada a nivel proximal o inmovilizada (No sumar en la puntuación global)
7	Dismetría		
	Explorar dedo-nariz y talón-rodilla con los ojos abiertos. En caso de existir un déficit motor que impida valorar la dismetría, puntuar 0 . Si hay dismetría detallar las extremidades, pero sin sumar en la puntuación global.	0	Ausente
		1	Presente en una extremidad
		2	Presente en dos extremidades

8	Sensibilidad		
	Con aguja, u observar la retirada ante estímulo doloroso en el paciente obnubilado. Explorar cara, brazos, tórax, abdomen y piernas (no tener en cuenta manos o pies). Sólo valorar hipoestesia relacionada con el ictus (no hipoestesia por neuropatía, etc.). Si alteración bilateral o en coma, puntuar 2 .	0	Normal
		1	Leve o moderada hipoestesia (posible anestesia algésica, pero nota que se le toca)
		2	Anestesia grave o total (no nota que se le toca)
9	Lenguaje		
	Tener en cuenta la respuesta a los items previos (grado de comprensión y expresión). Pedir que describa lo que sucede en el dibujo, denominar las figuras dibujadas, leer la lista de palabras y frases Si intubación traqueal o mudo, hacer escribir. Si en coma, puntuar 3 .	0	Normal, no afasia.
		1	Afasia leve o moderada
		2	Afasia grave (imposible entenderse con el interlocutor)
3		Mudo con comprensión nula.	
10	Disartria		
	A pesar de la afasia, valorar sólo la articulación. Si afasia = 3 (mudo), Disartria puntuar 0 .	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		
	Ya explorada la extinción visual y sensitiva. Valorar la anosognosia o negligencia visoespacial (con la lectura de palabras largas o durante la descripción del dibujo). En pacientes en coma, puntuar 2 .	0	Sin alteraciones
		1	Inatención o extinción en una de las modalidades (visual, táctil, espacial o corporal)
2	Hemi-inatención o negligencia grave, o a más de una modalidad. No reconoce su propia mano (asomatognosia) o sólo reconoce una parte del espacio.		
T O T A L			

ANEXO III. ESCALA MODIFICADA DE RANKIN (mRS)

0	Asintomático.
1	Incapacidad no significativa pese a la existencia de síntomas: capaz de realizar su trabajo y actividades habituales.
2	Incapacidad ligera: incapaz de realizar todas sus actividades previas (conducir, trabajar, leer...), pero capaz de atender sus necesidades personales sin ayuda.
3	Incapacidad moderada: capaz de caminar sin ayuda de otra persona pero requiere alguna ayuda para actividades más complejas (comprar, cocina, limpieza de la casa) por lo que precisa ser visitado por un cuidador al menos 2 veces a la semana.
4	Incapacidad moderadamente grave: incapaz de caminar sin ayuda, incapaz de atender sus necesidades básicas sin ayuda (aseo, vestirse, comer...) por lo que precisa ser visitado al menos una vez al día por un cuidador.
5	Incapacidad grave: encamado, incontinencia, requiere atención constante y cuidados de enfermería.
6	Muerte.

**ANEXO IV. CLASIFICACIÓN DE LA TRANSFORMACIÓN HEMORRÁGICA
SEGÚN LOS CRITERIOS ECASS II**

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

Hemorragia parenquimatosa tipo 2 (HP-2): hematoma que ocupa un tamaño $>$ 30% del área infartada y se acompaña de efecto de masa importante.

Hemorragia parenquimatosa remota (HPr): cualquier lesión hemorrágica que aparece fuera del territorio infartado.

X. PUBLICACIONES ORIGINALES

Stroke

American Stroke
AssociationSM

JOURNAL OF THE AMERICAN HEART ASSOCIATION

A Division of American
Heart Association



Increased Body Iron Stores Are Associated With Poor Outcome After Thrombolytic Treatment in Acute Stroke

Mónica Millan, Tomás Sobrino, Mar Castellanos, Florentino Nombela, Juan F. Arenillas, Elena Riva, Iván Cristobo, María M. García, José Vivancos, Joaquín Serena, María A. Moro, José Castillo and Antonio Dávalos

Stroke 2007;38;90-95; originally published online Nov 30, 2006;

DOI: 10.1161/01.STR.0000251798.25803.e0

Stroke is published by the American Heart Association, 7272 Greenville Avenue, Dallas, TX 75214
Copyright © 2007 American Heart Association. All rights reserved. Print ISSN: 0039-2499. Online
ISSN: 1524-4628

The online version of this article, along with updated information and services, is
located on the World Wide Web at:

<http://stroke.ahajournals.org/cgi/content/full/38/1/90>

Subscriptions: Information about subscribing to Stroke is online at
<http://stroke.ahajournals.org/subscriptions/>

Permissions: Permissions & Rights Desk, Lippincott Williams & Wilkins, a division of Wolters
Kluwer Health, 351 West Camden Street, Baltimore, MD 21202-2436. Phone: 410-528-4050. Fax:
410-528-8550. E-mail:
journalpermissions@lww.com

Reprints: Information about reprints can be found online at
<http://www.lww.com/reprints>

Increased Body Iron Stores Are Associated With Poor Outcome After Thrombolytic Treatment in Acute Stroke

Mónica Millan, MD; Tomás Sobrino, BSc; Mar Castellanos, MD, PhD;
Florentino Nombela, MD; Juan F. Arenillas, MD, PhD; Elena Riva, MD;
Iván Cristobo, BSc; María M. García, MD, PhD; José Vivancos, MD, PhD;
Joaquín Serena, MD, PhD; María A. Moro, PhD; José Castillo, MD; Antonio Dávalos, MD, PhD

Background and Purpose—Iron overload has been associated with greater oxidative stress and brain injury in experimental cerebral ischemia and reperfusion. This study investigates whether high serum ferritin levels, as an index of increased cellular iron stores, are associated with poor outcome, hemorrhagic transformation, and brain edema after treatment with tissue plasminogen activator in patients with acute ischemic stroke.

Methods—A total of 134 consecutive patients treated with intravenous tissue plasminogen activator were prospectively studied in four centers. Serum ferritin levels were determined at baseline, 24 and 72 hours after treatment. Cranial computed tomography was performed on admission and at 24 to 36 hours after tissue plasminogen activator infusion. Stroke severity and outcome were evaluated by using the National Institute of Health Stroke Scale and the modified Rankin Scale.

Results—Computed tomography showed hemorrhagic transformation in 27 patients (hemorrhagic infarction in 15 and parenchymal hematoma in 12; symptomatic in four) and brain swelling with midline shift in 15. Poor outcome (modified Rankin Scale >2) at 90 days was observed in 54.5% of patients. Ferritin levels at baseline were higher in patients with poor outcome at 90 days (median [quartiles], 165 [98,307] versus 17 [12,37] ng/mL; $P<0.001$) and in those who developed parenchymal hematoma ($P=0.006$), symptomatic hemorrhagic transformation ($P=0.008$), and severe brain edema ($P<0.001$). Serum ferritin levels higher than 79 ng/mL before tissue plasminogen activator treatment were independently associated with poor outcome (OR, 117 [95% CI, 25 to 557]).

Conclusions—Increased body iron stores are associated with poor outcome, symptomatic hemorrhagic transformation, and severe edema in patients treated with tissue plasminogen activator after ischemic stroke. These findings suggest that iron overload may offset the beneficial effect of thrombolytic therapies. (*Stroke*. 2007;38:90-95.)

Key Words: ferritin ■ iron overload ■ ischemic stroke ■ outcome ■ oxidative stress ■ thrombolysis

Thrombolysis with tissue plasminogen activator (t-PA) is an effective therapy for acute ischemic stroke. Partial or complete early recanalization of the middle cerebral artery occurs in more than 50% of patients who receive intravenous t-PA treatment; however, early reperfusion does not avoid ischemic stunning, neurologic worsening, or delayed injury in over one-third of these patients.¹⁻³ One of the reasons for deleterious outcomes after t-PA administration may be linked to the neurotoxicity of the drug on the neurovascular unit.⁴ In animal models, t-PA promotes the disruption of the blood-brain barrier that results in edema and cerebral hemorrhage.^{5,6} Furthermore, t-PA-induced reperfusion after cerebral ischemia may enhance the generation of reactive oxygen species, which may aggravate the disruption of microvascular integrity and the cellular functions on the neurovascular unit.⁷

An important source of reactive oxygen species is linked to disturbances in brain iron homeostasis. During cerebral ischemia, free iron released from intracellular stores such as ferritin catalyzes the conversion of superoxide and hydrogen peroxide into the highly reactive toxic hydroxyl radical.^{8,9} Experimental data support a causal role of iron overload in ischemic brain and endothelial damage. Iron intake has been associated with larger infarct volumes, higher oxidative stress, glutamate release, and inflammatory response after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat,¹⁰ whereas iron depletion or chelation reduces infarct size, brain edema, and metabolic failure in ischemia/reperfusion experimental stroke models.^{11,12} In patients with acute ischemic stroke not treated with thrombolytic drugs, high serum ferritin values and high cerebrospinal fluid ferritin concentrations deter-

Received June 6, 2006; final revision received July 27, 2006; accepted August 22, 2006.

From the Department of Neurosciences (M.M., J.A., A.D.), Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona; Barcelona, Spain; the Department of Neurology (T.S., I.C., J.C.), Hospital Clínico Universitario, Universidad de Santiago de Compostela; the Department of Neurology and Unit of Biostatistics (M.C., E.R., M.M.G., J.S.), Hospital Doctor Josep Trueta, Girona; the Department of Neurology (F.N., J.V.), Hospital de la Princesa, Madrid, Spain; and the Department of Pharmacology (M.A.M.), School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain.

Correspondence to Mónica Millán, MD, Stroke Unit, Department of Neurosciences, Hospital Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona, 08916 Badalona, Barcelona, Spain. E-mail mmillan.germanstrias@gencat.net

© 2006 American Heart Association, Inc.

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

DOI: 10.1161/01.STR.0000251798.25803.e0

mined early after symptom onset have been associated with subsequent neurologic worsening, poor neurologic outcome, large infarct volume, and elevated concentrations of glutamate in blood.^{13–15} Serum ferritin levels are thought to be directly proportional to cellular iron stores and can be used to assess iron overload in the absence of inflammation, cancer, and infectious diseases.^{16,17}

Taken together, these findings suggest that iron overload might offset the beneficial effect of t-PA, although this hypothesis has never been tested. The aim of this study was to investigate whether high serum ferritin concentrations before treatment, as an index of increased cellular iron stores, are associated with poor outcome, hemorrhagic transformation (HT), and brain edema in patients with ischemic stroke treated with intravenous t-PA.

Patients and Methods

We studied consecutive patients with acute ischemic stroke treated with intravenous t-PA within 3 hours from symptom onset in four university hospitals. All patients were treated according to the SITS-MOST registry (<http://acutestroke.org>) and were prospectively evaluated by using cranial computed tomography, neurologic and functional scales during a follow up of 90 days. For the purpose of this investigation, patients with prior disability (modified Rankin score [mRS] >1), alcohol consumption ≥ 40 g/day, current treatment with iron, and known infectious, inflammatory, or cancer diseases at the time of treatment were excluded. Cotreatment with NXY-059 or placebo into the SAINT I trial was allowed,¹⁸ but the present investigation was not a substudy of SAINT I. No other investigational drugs were used. The protocol was approved by the ethics committees of the participating centers and informed consent was signed by patients or their relatives.

Clinical Variables

Baseline characteristics and stroke subtype were recorded. Patients were continuously monitored in an acute stroke unit. Stroke severity was quantified just before t-PA administration and at 24 hours by using the National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS). Early neurologic deterioration or improvement was diagnosed when the NIHSS worsened or improved ≥ 4 points between baseline and 24 hours. Patients were classified into two outcome groups according to the mRS evaluated at 90 days: Poor outcome (mRS score >2) and good outcome (mRS score ≤ 2).

Neuroimaging Variables

Computed tomography scans were carried out immediately before treatment and at 24 to 36 hours after thrombolytic therapy. Early computed tomography signs of infarction were evaluated on admission and infarct volume, hemorrhagic transformation, and brain edema were assessed at 24 to 36 hours. HT was classified in hemorrhagic infarction type 1 (HI1) and 2 (HI2) and parenchymal hematoma type 1 (PH1), type 2 (PH2), and remote (rPH). HT was defined as symptomatic when it was associated with early neurologic deterioration. Severe brain edema was diagnosed if extensive swelling caused any shifting of the structures of the midline. Infarct volume was calculated by using the formula $0.5 \times a \times b \times c$, where a and b are the largest perpendicular diameters and c is the slice thickness. Computed tomography scans were evaluated by investigators who were blind to the laboratory determinations and clinical outcome.

Laboratory Determinations

Serum samples were taken immediately after admission (within 3 hours from stroke onset and before the t-PA treatment), at 24 hours, and at 72 hours after the t-PA bolus, and stored at -80°C . Ferritin was determined by electrochemiluminescence immunoassay by using an analyzer ELECSYS 2010 (Roche Diagnostics GmbH). Clin-

ical investigators were unaware of the laboratory results until the end of the study, once the database was closed.

Statistical Analyses

Proportions between two groups were compared by using the χ^2 test or Fisher exact test. Continuous variables have been expressed as the mean and SD, or median and quartiles in the case of distribution that was not normal, and compared by the Student *t* test or the Mann-Whitney test as appropriate. Median ferritin values in different hospital populations were compared by the Kruskal-Wallis test. Spearman coefficient was used to analyze the correlation between ferritin concentrations and infarct volume. The linearity of ferritin for outcome was assessed. Receiver operating characteristic curves were configured to establish cutoff points of ferritin level that optimally predicted the occurrence of poor outcome. Accordingly, the impact of serum ferritin levels on outcome (primary objective), HT, and brain edema formation (secondary objectives) was assessed by logistic regression analysis. Results were adjusted for age, stroke severity, and other baseline variables related to outcome in the bivariate analysis with a probability value < 0.1 . The sensitivity and specificity of the predictive model were calculated and potential interactions between confounders and ferritin levels were checked. A sensitivity analysis was performed in patients not randomized in the SAINT I trial.

Results

Of 151 patients treated with intravenous t-PA during the study period (the length of the inclusion period ranged from 5 to 26 months in the four centers), 134 were included in this study. Reasons for exclusion were unavailability of blood samples at baseline in 11 patients and infectious, cancer, or inflammatory diseases in six patients. No differences were found between the included population and the total patients treated with t-PA regarding age, NIHSS at baseline, time from onset to treatment, and stroke subtype (data not shown).

Clinical Outcome

At 24 hours, neurologic deterioration was found in 6% of patients, stable course in 51%, and neurologic improvement in 43%. Poor outcome at 90 days was recorded in 73 (54.5%) patients. Eighteen patients (13.4%) died during the study period and none was lost of follow up. Causes of mortality were HT in two patients, malignant brain edema in five, other stroke related causes in two, and nonvascular causes in nine patients.

Table 1 shows the baseline characteristics in the total patients and by outcome groups. Carotid territory involvement, cardioembolic subtype, and early computed tomography signs of infarction were more frequent and stroke severity was greater in the poor outcome group. Twenty-three patients were cotreated with NXY-059 or placebo into the SAINT I study,¹⁸ eight patients with good outcome and 15 patients with poor outcome ($P=0.256$).

At baseline, ferritin concentrations in blood were significantly higher in patients with poor outcome than in those with good outcome (Table 1). There was a lack of linearity of serum ferritin for outcome. The receiver operating characteristic curve showed that ferritin levels over 79 ng/mL had the highest sensitivity (86%) retaining good specificity (93%) to predict poor outcome; this value corresponded to the median value. The area under the curve was 0.944 ($P<0.001$). There was a relationship between the distribution of the Rankin scores and baseline levels of ferritin categorized in quartiles:

TABLE 1. Baseline Characteristics in the Total Series and by Outcome Groups

	Total Patients (n=134)	Good Outcome Group (n=61)	Poor Outcome Group (n=73)	<i>P</i>
Age	67 (12)	64.7 (12.6)	69.3 (10.9)	0.017
Sex, male	65.7	68.9	63.0	0.478
History of vascular risk factors				
Hypertension	49.3	47.5	50.3	0.528
Diabetes	18.7	13.1	23.3	0.132
Smoking habit (current)	14.9	19.7	11	0.328
Dyslipidemia	32.1	32.8	31.5	0.874
Stroke	8.2	9.8	6.8	0.362
Prior antiplatelet therapy, %	28.4	26.3	30.2	0.777
Vital signs and laboratory parameters				
Systolic blood pressure, mm Hg	152 (23)	152.4 (21.5)	151.4 (23.6)	0.842
Diastolic blood pressure, mm Hg	82 (13)	82.2 (13.1)	81.1 (12.3)	0.787
Body temperature, °C	36.2 (0.5)	36.2 (0.4)	36.2 (0.6)	0.910
Serum glucose, mg/dL	137 (52)	136 (51)	137 (53)	0.666
Platelet count (×1000)	241 (92)	241 (70)	242 (107)	0.689
Activated partial thromboplastin time, s	28 (10)	28 (8)	29 (11)	0.930
Serum ferritin, ng/mL	78.8 [17.5, 208.3]	17.5 [11.9, 36.8]	165.1 [98.4, 307.6]	<0.001
Time from onset to treatment, minutes	152 [125, 170]	160 [125, 174]	143 [122, 165]	0.102
NIHSS at baseline	14 [9, 19]	10 [7, 15]	18 [12, 20]	<0.001
Arterial territory				0.038
Carotid		84	95	
Vertebrobasilar		16	5	
TOAST classification				0.001
Cardioembolic		32.8	52.1	
Atherothrombotic		13.1	24.7	
Lacunar		13.1	1.4	
Undetermined		41.0	21.9	
Early computed tomography signs	33.6	16.4	47.9	<0.001
Hypoattenuation >33% middle cerebral artery	6.0	1.7	9.6	0.056

Note: Values are presented as proportions, mean (standard deviation), or median [quartiles].

the higher the ferritin quartile, the worse the distribution of mRS scores (Figure 1). Regarding the early clinical course, serum concentrations of ferritin before treatment were significantly higher in patients with subsequent neurologic worsening (254 [86,375] versus 59 [16,190] ng/mL), whereas they were significantly lower in patients who improved 4 or more points in the NIHSS at 24 hours (21 [13,86] versus 132 [54,302] ng/mL).

Figure 2 shows the serum ferritin profile during the first 72 hours after treatment. Ferritin levels showed a parallel slight increase in both outcome groups. No differences were found in ferritin levels between sexes and between hospital populations.

Logistic regression analysis showed that serum ferritin levels at baseline higher than 79 ng/mL had an odds of 117 [95% CI, 25 to 557] of poor outcome after adjusting for age, carotid territory, cardioembolic subtype, time from onset to treatment, NIHSS score, and early signs of infarction on computed tomography (Table 2). The model provided good sensitivity (95.1%) and specificity (89.0%). The inclusion of

hypoattenuation >33% of middle cerebral artery territory, or of hypodensity volume at 24 to 36 hours, in the model did not change the effect. After exclusion of the 23 patients randomized in the SAINT I, the adjusted OR of poor outcome was 226 [95% CI, 30 to 1700]. No biologic and plausible interactions were found between ferritin levels and the other confounding factors.

Cranial Computed Tomography Findings

Computed tomography at 24 to 36 hours showed no signs of infarction in 10% of patients. Median hypodensity volume was 19 [3,80] cc. In 91% of patients, it was located in the middle cerebral artery territory. HT was observed in 27 (20%) patients (HI1 in 7, HI2 in 8; PH1 in 7, PH2 in 4, and rPH in 1; symptomatic in 4, all PH), whereas severe cerebral edema was found in 15 (11.2%) patients.

There was a significant correlation between serum ferritin level and infarct volume ($r=0.663$; $P<0.001$). Ferritin concentrations at baseline were significantly higher in patients with PH (Figure 3) and in the four patients with symptomatic

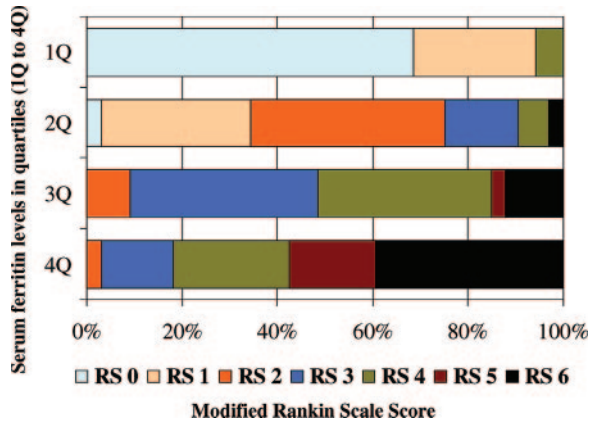


Figure 1. Distribution of mRS scores at day 90 by serum ferritin levels categorized in quartiles. The size of the color bars indicates the proportion of patients with a particular score for each ferritin quartile (Q). Ferritin levels for the first Q, <17 ng/mL; second Q, 18 to 79 ng/mL; third Q, 80 to 208 ng/mL, fourth Q >208 ng/mL.

HT ($P=0.008$). Ferritin levels were also higher in patients who developed severe brain edema at 24 to 36 hours (313 [109,470] versus 55 [16,144] ng/mL; $P<0.001$). Values higher than 79 ng/mL were associated with a 6.4 [1.3 to 32] -fold increase in the risk of severe brain edema and with a nonsignificant 4.2 [0.8 to 22] -fold increase in the risk of PH after adjustment for age, baseline NIHSS score, and cardioembolic subtype.

Discussion

The present study shows that high serum ferritin concentration before t-PA infusion predicts poor outcome at 90 days in patients with acute ischemic stroke. Importantly, the higher the ferritin level quartile, the worse the distribution of mRS scores. Furthermore, ferritin levels on admission were higher in patients who developed early neurologic worsening, greater infarct volume, symptomatic hemorrhagic transformation, and severe brain edema after t-PA treatment. These results replicate previous findings in stroke patients not treated with reperfusion therapies,¹³⁻¹⁵ and suggest a biologic

TABLE 2. Adjusted Odds Ratios of Poor Outcome for Baseline Characteristics

Independent Variables	OR	95% CI	P
Age	1.07	1.01 to 1.14	0.014
Carotid territory	1.03	0.14 to 7.40	0.972
Cardioembolic subtype	1.00	0.27 to 3.65	0.999
Time from onset of treatment	0.98	0.96 to 1.00	0.187
Baseline NIHSS	1.07	0.96 to 1.21	0.199
Early signs of brain infarction	2.25	0.52 to 9.60	0.273
Baseline serum ferritin >79 ng/mL	117.0	24.4 to 559.5	<0.0001

Reference categories are: serum ferritin levels ≤ 79 ng/mL, no early signs of brain infarction, and vertebrobasilar arterial territory. Age, time from onset of treatment, and baseline NIHSS are continuous. There were no patients with missing data.

deleterious effect of iron overload on ischemic brain and endothelial injury in patients who receive intravenous t-PA.

Serum ferritin is a suitable index of the amount of cellular iron stores and, consequently, might be related to the availability of iron in the infarcted area.^{16,17} In brain tissue, most of the nonheme iron is in the form of ferritin, which is localized in astrocytes and microglia.¹⁹ Ferritin synthesis in brain cells may be induced in hypoxic acidosis²⁰ or in response to oxidative stress to reduce the accumulation of reactive oxygen species.²¹ Therefore, increased ferritin could be in part the result of a neuroprotective mechanism with the aim of sequestering toxic-free iron in the ischemic brain. However, this effect has only been demonstrated several hours after the insult in brain cells, but not in the peripheral blood and within 3 hours after the onset of ischemia as shown in our patients. Serum ferritin levels remained substantially within normal values in our country (20 to 300 ng/mL for men and 15 to 200 ng/mL for women),²² thus indicating that there was not a sudden increase like in other stress response phenomena. In addition, previous studies have shown stability of serum ferritin levels during the first 48 hours after stroke onset and a lack of correlation between ferritin and acute-phase reactants in blood such as cortisol and C-reactive protein.^{15,23} Iron

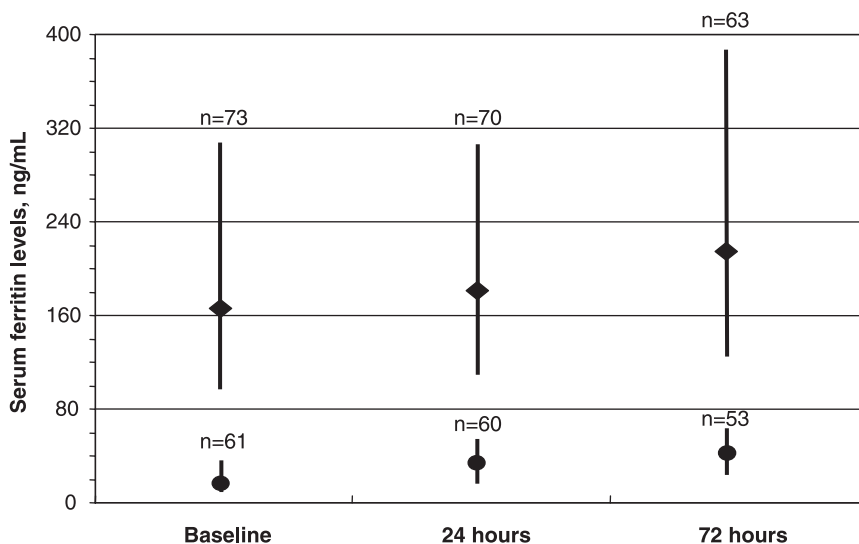


Figure 2. Median values and interquartile range (bars) of serum ferritin concentrations at baseline and at 24 and 72 hours after intravenous t-PA bolus by outcome groups at day 90 (♦ poor outcome; ● good outcome). Numbers indicate patients studied at each time.

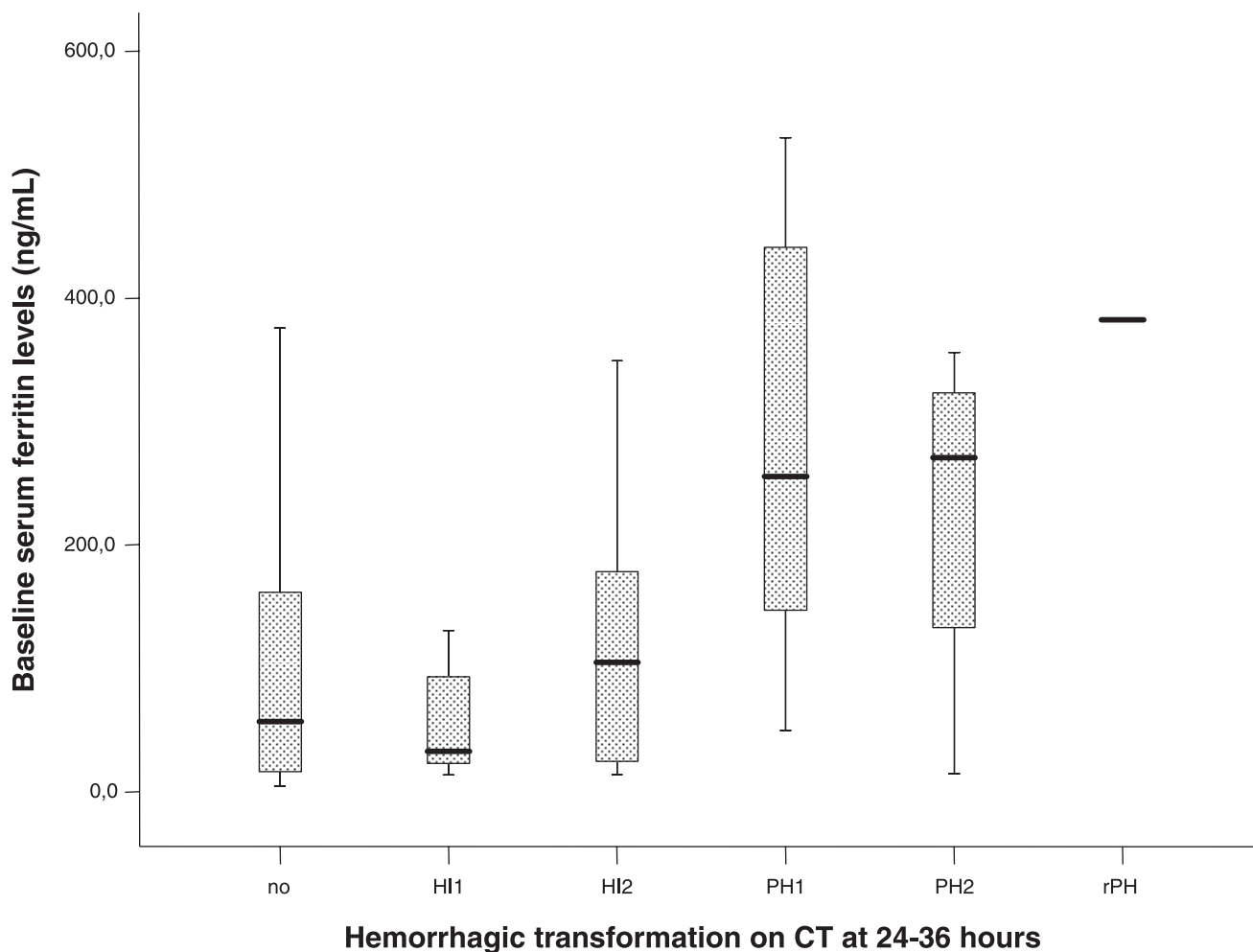


Figure 3. Box plots show median values (horizontal line), interquartile range (box boundaries), and the maximum and minimum observed values (vertical lines) of serum ferritin by HT subtype. Kruskal-Wallis test for comparison of ferritin levels between no HT, HI, and PH groups ($P=0.041$).

overload can be the result of mutations in the hemochromatosis gene. These mutations are frequent in the general population and H63D and C282Y heterozygous carriers can show higher serum ferritin values than noncarriers.²²

The molecular bases for a greater brain injury secondary to iron overload are the generation of radical hydroxyl from oxygen during reperfusion, increased excitotoxic damage, and blood-brain barrier disruption.^{8,10-12} Cellular biology in animal models of cerebral ischemia, and reperfusion has shown a close link between reactive oxygen species generation in microvessels and astrocytic end feet, increase of blood-brain barrier permeability, and matrix metalloproteinase-9 expression.⁷ A hypothesis that arises from these experimental data are whether intravenous t-PA and iron may have a synergistic neurotoxic effect on the neurovascular unit. Free radical-mediated damage in iron overload might be enhanced by the toxic effects of t-PA, because t-PA may increase excitotoxicity and matrix metalloproteinase-9 overexpression.⁶ In this context, blood-brain barrier disruption is substantially reduced by using PBN, a radical scavenger, in combination with t-PA in a rat thromboembolic model of stroke,²⁴ and NXY-059, a free radical trapping agent, given intravenously within 6 hours of acute ischemic stroke, reduced the risk of intracerebral hemorrhage in patients cotreated with

t-PA, and improved outcome in one randomized controlled trial. These novel findings support a role of reactive oxygen species-mediated injury on the neurovascular unit in patients with ischemic stroke treated with intravenous t-PA.

The main strengths of this study are the central and repeated measurement of serum ferritin levels, the use of prespecified imaging definitions on computed tomography and neurologic scales, and the prospective 3-month follow up by using a broadly accepted protocol, the SITS-MOST register. Furthermore, the characteristics of the patients were similar to those of other populations treated with t-PA, the main factors that may influence t-PA response were recorded, and the analysis was adjusted for them. However, this study has a number of limitations that must be acknowledged. First, the adjustment of logistic analysis for baseline characteristics that influenced outcome after stroke does not completely rule out an association of poor outcome and increased ferritin as a result of unknown confounders or as a biomarker of greater stroke severity and infarct volume. However, the serum profile of ferritin in this study does not support a sharp increase within the first 3 hours from symptoms onset in the poor outcome group. Second, there is a lack of information about the time of arterial recanalization, because we did not

prospectively monitor the arterial patency at fixed intervals. Transcranial Doppler monitoring of timing of arterial recanalization will permit the study of the interaction between increased ferritin levels and time to recanalization on stroke outcome. Finally, NXY-059 cotreatment could influence the results because 23 patients were randomized in SAINT I; however, the association of high ferritin levels with poor outcome remained robust after the exclusion of these patients.

In summary, patients with stroke with increased serum ferritin concentrations before treatment with intravenous t-PA have a higher risk of poor clinical outcome, hemorrhagic transformation, and brain edema than patients with low ferritin values. These findings suggest that iron overload may counterbalance the benefits of thrombolytic therapy observed in patients with low ferritin levels. If these results are confirmed in future studies, iron chelators or free radical trapping agents should be used to reduce the neurotoxic effects of iron in patients with acute ischemic stroke who are treated with intravenous t-PA.

Disclosures

None.

References

1. Alexandrov AV, Hall CE, Labiche LA, Wojner AW, Grotta JC. Ischemic stunning of the brain. Early recanalization without immediate clinical improvement in acute ischemic stroke. *Stroke*. 2004;35:449–452.
2. Grotta JC, Welch KM, Fagan SC, Lu M, Frankel MR, Brott T, Levine SR, Lyden PD. Clinical deterioration following improvement in the NINDS rt-PA stroke trial. *Stroke*. 2001;32:661–668.
3. Kidwell CS, Saver JL, Starkman S, Duckwiler G, Jahan R, Vespa P, Villablanca JP, Liebeskind DS, Gobin YP, Vinuela F, Alger JR. Late secondary ischemic injury in patients receiving intraarterial thrombolysis. *Ann Neurol*. 2002;52:698–703.
4. Lo EH, Broderick JP, Moskowitz MA. tPA and proteolysis in the neurovascular unit. *Stroke*. 2004;35:354–356.
5. Tsuji K, Aoki T, Tejima E, Arai K, Lee SR, Atochin DN, Huang PL, Wang X, Montaner J, Lo E. Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2005;36:1954–1959.
6. Aoki T, Sumii T, Mori T, Wang X, Lo EH. Blood–brain barrier disruption and matrix metalloproteinase-9 expression during reperfusion injury. Mechanical versus embolic focal ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke*. 2002;33:2711–2717.

7. Gürsoy-Özdemir Y, Can A, Dalkara T. Reperfusion-induced oxidative/nitrative injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2004;35:1449–1453.
8. Selim MH, Ratan RR. The role of iron neurotoxicity in ischemic stroke. *Ageing Research Reviews*. 2004;3:345–353.
9. Reif DW. Ferritin as a source of iron for oxidative damage. *Free Radic Biol Med*. 1992;12:417–427.
10. Castellanos M, Puig N, Carbonell T, Castillo J, Martínez JM, Rama R, Dávalos A. Iron intake increases infarct volume after permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res*. 2002;952:1–6.
11. Patt A, Horesh IR, Berger EM, Harken AH, Repine JE. Iron depletion or chelation reduces ischemia/reperfusion-induced edema in gerbil brains. *J Pediatr Surg*. 1990;25:224–228.
12. Davis S, Helfaer MA, Traystman RJ, Hum PD. Parallel antioxidant and antiexcitotoxic therapy improves outcome after incomplete global cerebral ischemia in dogs. *Stroke*. 1997;28:198–205.
13. Dávalos A, Fernández-Real JM, Ricart W, Soler S, Molins A, Planas E, Genis D. Iron-related brain damage in acute ischemic stroke. *Stroke*. 1994;25:1543–1546.
14. Dávalos A, Castillo J, Marrugat J, Fernández-Real JM, Armengou A, Cabellos P, Rama R. Body iron stores and early neurological deterioration in acute cerebral infarction. *Neurology*. 2000;54:1568–1574.
15. Erdemoglu AK, Ozbakir S. Serum ferritin levels and early prognosis of stroke. *Eur J Neurol*. 2002;9:633–637.
16. Herbert V, Jayatilleke E, Shaw S, Rosman AS, Giardina P, Grady RW, Bowman B, Gunter EW. Serum ferritin iron, a new test, measures human body iron stores unconfounded by inflammation. *Stem Cells*. 1997;15:291–296.
17. Walters GO, Miller FM, Worwood M. Serum ferritin concentrations and iron stores in normal subjects. *J Clin Pathol*. 1973;26:770–772.
18. Lees KR, Zivin JA, Ashwood T, Dávalos A, Davis SM, Diener HC, Grotta J, Lyden P, Shuaib A, Hardemark HG, Wasiewski WW; for the Stroke-Acute Ischemic NXY Treatment (SAINT I) Trial Investigators. NXY-059 for Acute Ischemic Stroke. *N Engl J Med*. 2005;354:588–600.
19. Connor JR, Menzies SL, St. Martin SM, Mufson EJ. Cellular distribution of transferrin, ferritin, and iron in normal and aged human brains. *J Neurosci Res*. 1990;27:595–611.
20. Qi Y, Jamindar M, Dawson G. Hypoxia alters iron homeostasis and induces ferritin synthesis in oligodendrocytes. *J Neurochem*. 1995;64:2458–2464.
21. Orino K, Lehman L, Tsuji Y, Ayaki H, Torti SV, Torti FM. Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J*. 2001;357:241–247.
22. Sánchez M, Villa M, Ingelmo M, Sanz C, Bruguera M, Ascaso C, Oliva R. Population screening for hemochromatosis: a study in 5370 Spanish blood donors. *J Hepatol*. 2003;38:745–750.
23. Armengou A, Dávalos A. Serum ferritin concentrations are not modified in the acute phase of ischemic stroke. *Stroke*. 1998;29:258–260.
24. Asahi M, Asahi K, Wang X, Lo EH. Reduction of tissue plasminogen activator-induced hemorrhage and brain injury by free radical spin trapping after embolic focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20:452–457.

Biological signatures of brain damage associated with high serum ferritin levels in patients with acute ischemic stroke and thrombolytic treatment

Mónica Millán^{a,*}, Tomás Sobrino^b, Juan Francisco Arenillas^a, Manuel Rodríguez-Yáñez^b, María García^c, Florentino Nombela^d, Mar Castellanos^e, Natalia Pérez de la Ossa^a, Patricia Cuadras^f, Joaquín Serena^e, José Castillo^b and Antoni Dávalos^a

^aDepartment of Neurosciences, Hospital Germans Trias i Pujol, Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

^bDepartment of Neurology, Clinical Neuroscience Research Laboratory, Hospital Clínico Universitario, Universidad de Santiago de Compostela, Spain

^cUnit of Bioestistics, Hospital Doctor Josep Trueta, Girona, Spain

^dDepartment of Neurology, Hospital de la Princesa, Madrid, Spain

^eDepartment of Neurology, Hospital Doctor Josep Trueta, Girona, Spain

^f Department of Radiology, Hospital Germans Trias i Pujol, Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

Abstract. *Background and purpose:* Increased body iron stores have been related to greater oxidative stress and brain injury in clinical and experimental cerebral ischemia and reperfusion. We aimed to investigate the biological signatures of excitotoxicity, inflammation and blood brain barrier disruption potentially associated with high serum ferritin levels-related damage in acute stroke patients treated with i.v. t-PA.

Methods: Serum levels of ferritin (as index of increased cellular iron stores), glutamate, interleukin-6, matrix metalloproteinase-9 and cellular fibronectin were determined in 134 patients treated with i.v. t-PA within 3 hours from stroke onset in blood samples obtained before t-PA treatment, at 24 and 72 hours.

Results: Serum ferritin levels before t-PA infusion correlated to glutamate ($r = 0.59$, $p < 0.001$) and interleukin-6 ($r = 0.55$, $p < 0.001$) levels at baseline, and with glutamate ($r = 0.57$, $p < 0.001$), interleukin-6 ($r = 0.49$, $p < 0.001$), metalloproteinase-9 ($r = 0.23$, $p = 0.007$) and cellular fibronectin ($r = 0.27$, $p = 0.002$) levels measured at 24 hours and glutamate ($r = 0.415$, $p < 0.001$), interleukin-6 ($r = 0.359$, $p < 0.001$) and metalloproteinase-9 ($r = 0.261$, $p = 0.004$) at 72 hours. The association between ferritin and glutamate levels remained after adjustment for confounding factors in generalized linear models.

Conclusions: Brain damage associated with increased iron stores in acute ischemic stroke patients treated with iv. tPA may be mediated by mechanisms linked to excitotoxic damage. The role of inflammation, blood brain barrier disruption and oxidative stress in this condition needs further research.

Keywords: Iron stores, thrombolysis, ferritin, biomarkers, excitotoxicity, blood-brain-barrier disruption, inflammation

*Corresponding author: Mónica Millán, MD, Stroke Unit. Department of Neurosciences, Hospital Germans Trias i Pujol, Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08916

Badalona, Barcelona, Spain. Fax: +34 93 497 8742; E-mail: mmillan.germanstrias@gencat.net.

1. Background

The knowledge of new factors associated with a poor response to thrombolysis in stroke patients may help to conceive new strategies to improve the benefit of this treatment. It has recently been shown that high serum ferritin levels are associated with poor functional outcome, hemorrhagic transformation and severe brain edema in patients treated with i.v. tissue plasminogen activator (t-PA) after ischemic stroke. These findings indicate that increased body iron stores may offset the beneficial effect of thrombolytic therapy [19].

The release of free iron from intracellular stores such as ferritin as a result of cerebral ischemia, particularly during reperfusion, catalyses the generation of the toxic free radical hydroxyl which destroys cellular and microvascular integrity [16,27]. Experimental data supports the key role played by iron in brain and endothelial injury in cerebral ischemia and reperfusion. Iron intake has been associated with larger infarct volume, greater reactive oxygen species (ROS) generation in brain and peripheral vasculature, glutamate release and inflammatory response after middle cerebral artery occlusion in the rat [2,18], whereas iron chelators, antioxidants or ROS scavengers have shown neuroprotective effects reducing infarct size, brain edema, ROS production and metabolic failure in ischemia/reperfusion experimental stroke models [9,11,24,26]. In addition, cellular biological studies in animal models have found a close link between ROS generation in microvessels and astrocytic end-feet, increased matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) expression and blood brain barrier (BBB) disruption [12].

Taking together, these findings suggest that generation of ROS during reperfusion, increased excitotoxic damage, inflammation and BBB disruption might be potential mechanisms of greater brain and endothelial injury in ischemic stroke patients with iron overload who are treated with i.v. t-PA. However, the underlying pathophysiological basis of brain damage in these patients is unknown. The aim of this study was to investigate the biological signatures potentially associated with high serum ferritin levels-related damage in acute stroke patients treated with i.v. t-PA by measuring a series of biomarkers of excitotoxicity, inflammation and endothelial injury that have been validated in previous clinical studies.

2. Patients and methods

We studied acute ischemic stroke patients treated with i.v. t-PA within 3 hours from symptom onset in

four university hospitals who accomplished the SITS-MOST criteria [32]. Patients were continuously monitored during the first 24 hours in the acute stroke unit and were prospectively evaluated using brain CT, and neurological and functional scales according to the SITS-MOST registry during a follow-up period of 90 days. The protocol was approved by the Ethics Committees of the participating centers and informed consent was signed by patients or their relatives. For the purpose of this investigation, additional exclusion criteria were prior disability (modified Rankin Scale (mRS) >1), alcohol consumption \geq 40g/day, current treatment with iron, and known infectious, inflammatory or cancer diseases at the time of treatment.

2.1. Clinical variables

Stroke severity was quantified before t-PA administration and at 24 hours by using the National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS). Early neurological deterioration was diagnosed when the NIHSS worsened \geq 4 points between baseline and 24h. Poor outcome was defined as mRS score > 2 at 90 days.

2.2. Neuroimaging variables

CT scans were carried out on admission, and at 24–36 hours after thrombolytic therapy. Early CT signs of infarction were evaluated on admission, and infarct volume, hemorrhagic transformation (HT) and brain edema were assessed at 24–36 hours. HT was classified as hemorrhagic infarction, and parenchymal hematoma (PH) according to the ECASS-2 criteria [17]. PH was considered as being symptomatic when it was associated with early neurological deterioration. Severe brain edema was diagnosed if there was extensive swelling causing any shifting of the midline structures. Hypodensity volume was calculated using the formula $0.5 \times a \times b \times c$, where a and b are the largest perpendicular diameters, and c is the slice thickness. CT scans were evaluated by investigators blinded to the laboratory determinations and clinical outcome.

2.3. Laboratory determinations

Serum samples were taken immediately after admission (within 3 hours of stroke onset and before the t-PA treatment), at 24 hours and at 72 hours after the t-PA bolus infusion, and they were stored at -80°C . Serum ferritin levels, as an index of body iron stores, were determined by electrochemiluminescence immunoassay

using an analyzer ELECSYS 2010 (Roche Diagnostics GmbH); glutamate levels, as a biomarker of excitotoxicity, were determined by HPLC, using the Waters Pico Tag[®] Chemistry Package for HPLC amino acids analysis; interleukin-6 (IL-6), as an index of inflammatory response, were determined by IMMULITE 1000 System, Diagnostic Products Corporation (DPC), USA; and finally, c-Fn and MMP-9 levels, as BBB disruption biomarkers, were determined with commercially available quantitative sandwich enzyme-linked immunoabsorbent assay kits obtained from Biohit Plc, Finland, and Biotrack, Amersham Pharmacia, UK, respectively. Biomarker concentrations were measured in a central laboratory by investigators blind to the clinical outcome and neuroimaging findings. Clinical investigators were unaware of the laboratory results until the end of the study, once the data base was closed.

2.4. Statistical analyses

Categorical variables were expressed as proportions and compared by using the χ^2 test. Continuous variables were expressed as the mean and SD when the variable distribution was normal or median and quartiles when it was not normal, and compared by the Student's t-test or the Mann-Whitney test, respectively. Spearman's coefficient was used to analyze the correlation between serum ferritin levels, biomarker concentrations and other continuous variables. Receiver operating characteristic (ROC) curves were configured to establish cut-off points of ferritin level that optimally predicted the occurrence of poor outcome. Accordingly, the impact of serum ferritin levels on outcome, HT and brain edema formation was assessed by logistic regression analysis adjusting for age, stroke severity and other baseline variables related in the univariate analysis (p value < 0.1). To assess the influence of baseline ferritin levels on the serum concentrations of brain injury biomarkers, general linear models for repeated measurements were used and they were adjusted for variables related to baseline ferritin concentrations with a p value < 0.05.

3. Results

A total of 134 patients treated with t-PA were included in this study. Reasons for exclusion and baseline characteristics of included patients have been recently reported [19]. Blood samples were obtained in all patients at baseline, in 130 patients at 24 hours (one

patient died before, and samples from 3 patients were unavailable) and in 118 patients at 72 hours (3 patients died, 6 were discharged before the third day, and samples from 9 patients were unavailable). No patients were lost of follow-up.

3.1. Clinical outcome, neuroimaging findings and biomarkers of brain injury

At 3 months, poor outcome was recorded in 73 patients (54.5%), and mortality in 18 patients (13.4%). CT at 24–36 hours showed no signs of infarction in 10% of patients. Median hypodensity volume was 19 cc [3,80]. HT was observed in 27 (20%) patients, hemorrhagic infarction in 15 and PH in 12 patients (symptomatic in 4), and severe cerebral edema was found in 15 (11.2%) patients.

Table 1 shows the baseline characteristics, laboratory parameters, and brain injury biomarkers in subgroups classified by clinical outcome at 90 days, presence of PH, and severe brain edema at 24–36 hours after treatment. Baseline serum ferritin, glutamate, IL-6, c-Fn and MMP-9 levels were significantly higher in patients with poor outcome, PH and severe brain edema in univariate analyses (Table 1).

As previously reported the adjusted odds ratios of poor outcome, PH and severe brain edema for ferritin levels > 79 ng/mL were 117 [95% CI, 24.4–559.5], 4.2 [95% CI, 0.8–22], and 6.4 [95% CI, 1.3–32], respectively [19].

3.2. Serum ferritin and biomarkers of brain injury

Serum ferritin profile during the first 72 hours showed a parallel slight increase in both outcome groups (data showed in ref. 19). Baseline serum ferritin concentrations were significantly higher in patients with diabetes mellitus ($p = 0.041$), early CT signs of infarction ($p < 0.001$), and in non-lacunar stroke subtype ($p = 0.005$), but no differences were found for sex and other vascular risk factors. Baseline ferritin values correlated with NIHSS at admission ($r = 0.489$, $p < 0.001$) and at 24 hours ($r = 0.747$, $p < 0.001$), and with infarct volume ($r = 0.663$, $p < 0.001$). No correlations were found with age, systolic and diastolic blood pressure, body temperature, serum glucose, platelet count, leukocytes, aPTT and time from symptoms onset to t-PA bolus.

Table 2 shows the correlations between ferritin levels at baseline and the biomarkers of brain injury measured at different intervals. A significant correlation was

Table 1
Baseline characteristics and brain injury biomarkers by clinical outcome, parenchymal hematoma and severe brain edema groups

	Outcome		p	Parenchymal hematoma		p	Severe brain edema		p
	Good (n = 61)	Poor (n = 73)		No (n = 122)	Yes (n = 12)		No (n = 119)	Yes (n = 15)	
Total (n = 134)	64.7 (12.6)	69.3 (10.9)	0.017	67.4 (11.5)	64.8 (15.4)	0.469	67.7 (12)	71.3 (9.9)	0.158
Sex, male	68.9	63	0.478	65.6	66.7	0.939	63.9	80	0.215
Vascular risk factors									
Hypertension	47.5	50.3	0.528	52.5	16.7	0.053	50.4	40	0.685
Diabetes	13.1	23.3	0.132	18	25	0.554	16.8	33.3	0.122
Smoking habit (current)	19.7	11	0.328	14.8	16.7	0.798	15.1	13.3	0.868
Dislipemia	32.8	31.5	0.874	33.6	16.7	0.230	34.5	13.3	0.099
Previous stroke	9.8	6.8	0.362	9	0	0.493	8.4	6.7	0.212
Serum brain injury biomarkers									
Ferritin, ng/mL	17.5 [11.9,36.8]	165.1 [98.4,307.6]	< 0.001	57.8 [16.3,147.7]	272.6 [116.8,404.1]	0.030	55.4 [15.7,144.5]	313.4 [109,470.4]	< 0.001
Glutamate, μ M/L	70.9 [44,123.6]	195.9 [88.2,318.5]	< 0.001	95.2 [52.2,217.4]	271.3 [94.8,344.6]	0.021	95.2 [50.7,216.8]	277.7 [83.2,350.1]	0.011
IL-6, pg/mL	4.8 [2.7,9.3]	24.3 [6.4,43.9]	< 0.001	8.1 [3.4, 29.3]	30.3 [12.6,46.6]	< 0.001	7.4 [3.4,25.4]	43.9 [23.7,63.2]	< 0.001
c-Fn, ng/mL	3.2 [1.9,4.2]	3.7 [2.5,6.2]	0.010	3.2 [1.9,4.4]	7.9 [6.6,8.6]	< 0.001	3.2 [1.9,4.4]	6.2 [5.4,7]	< 0.001
MMP-9, ng/mL	92.8 [64.7,129]	129.3 [72.3,195.3]	0.021	102 [64.9,143.5]	204.7 [161.6,235.3]	< 0.001	106.4 [69.4,166]	147.2 [54.4,214.1]	0.249
Time to rPA bolus, minutes	160 [125,174]	143 [122,165]	0.102	149 [124,170]	155 [115,210]	0.507	150 [125,166]	160 [125,175]	0.450
NIHSS at baseline	10 [7,15]	18 [12,20]	< 0.001	14 [8,19]	18 [13,20]	0.110	14 [8,19]	16 [14,18]	0.164
Early CT signs	16.4	47.9	< 0.001	32	50	0.207	29.4	66.7	0.004
TOAST classification									
Cardioembolic	32.8	52.1	0.001	20.5	8.3	0.326	39.5	73.3	0.098
Atherothrombotic	13.1	24.7		41.8	58.3		19.3	20	
Lacunar	13.1	1.4		7.4	0		7.6	0	
Undetermined	41	21.9		28.7	25		31.1	6.7	

Values are presented as mean (SD), proportions, and median [quartiles].

Table 2
Correlation coefficients between baseline ferritin levels and the biomarkers of brain injury

Biomarkers	Baseline	24 hours	72 hours
Glutamate, $\mu\text{M/L}$	$r = 0.589, p < 0.001$	$r = 0.507, p < 0.001$	$r = 0.415, p < 0.001$
IL-6, pg/mL	$r = 0.549, p < 0.001$	$r = 0.465, p < 0.001$	$r = 0.359, p < 0.001$
c-Fn, mg/L	$r = 0.154, p = 0.075$	$r = 0.268, p = 0.002$	$r = 0.096, p = 0.301$
MMP-9, ng/mL	$r = 0.114, p = 0.190$	$r = 0.234, p = 0.007$	$r = 0.261, p = 0.004$

Table 3

Adjusted baseline ferritin concentrations for serum biomarker levels at repeated measurements

Models	β (95% CI)	p
Model 1		
Serum glutamate, $\mu\text{M/L}$		
At baseline	0.42 (0.25, 0.59)	< 0.001
At 24 hours	0.26 (0.11, 0.42)	0.001
At 72 hours	0.16 (0.02, 0.30)	0.020
Model 2		
Serum IL-6, pg/mL		
At baseline	0.014 (−0.011, 0.03.9)	0.233
At 24 hours	0.014 (−0.032, 0.060)	0.541
At 72 hours	−0.007 (−0.080, 0.068)	0.861
Model 3		
Serum c-Fn, mg/L		
At baseline	0.001 (−0.003, 0.004)	0.640
At 24 hours	0.003 (−0.001, 0.006)	0.148
At 72 hours	0.001 (−0.003, 0.004)	0.791
Model 4		
Serum MMP-9, ng/mL		
At baseline	0.036 (−0.140, 0.074)	0.521
At 24 hours	0.018 (−0.078, 0.110)	0.710
At 72 hours	0.130 (0.028, 0.230)	0.013

The models were adjusted for history of diabetes mellitus, early CT signs, stroke severity and non-lacunar stroke subtype.

found between baseline ferritin levels and the concentrations of glutamate and IL-6 on admission, at 24 and at 72 hours. Baseline serum ferritin levels did not correlate with either c-Fn or MMP-9 on admission, whereas a slight correlation was found between baseline ferritin and c-Fn and MMP-9 levels at 24 hours (Fig. 1), and between baseline ferritin and MMP-9 levels at 72 hours.

The association between ferritin and glutamate levels remained significant after adjustment for diabetes mellitus, early CT signs, stroke severity, and non-lacunar stroke subtype in generalized linear models for repeated measurements. However, IL-6, cFN and MMP-9 levels at repeated samples lost their association with baseline ferritin after adjustment for covariates (Table 3).

4. Discussion

High serum ferritin concentrations, used as an index of increased body iron stores, have been previously reported to be associated with poor outcome,

parenchymal hematoma and severe brain edema in this same sample of patients [19]. In this secondary study, we have investigated the biological signatures of brain damage associated with increased body iron stores by analyzing a series of accepted biomarkers of brain injury. Baseline ferritin levels showed a moderate correlation with glutamate and IL-6 and a slight correlation with the biomarkers of BBB injury. Importantly, the association with high glutamate levels over the first 72 hours after admission remained independent of other related clinical variables. These findings support that excitotoxic damage might mediate the greater brain injury found in ischemic stroke patients with increased ferritin levels that are treated with t-PA.

The tested biomarkers have widely been assessed in previous studies and validated as early and good biological predictors of brain and BBB injury [3,4,6,7, 21,28,29,31]. Furthermore, we have recently demonstrated that high levels of glutamate in the peripheral blood are associated with ischemic lesion growth on diffusion-weighted MRI in the acute phase of ischemic stroke [5]. In fact, the present study confirms that elevated serum concentrations of glutamate, IL-6, c-Fn and MMP-9 on admission are associated with poor functional outcome, PH and severe brain edema in patients with ischemic stroke treated with iv. t-PA. The association between high ferritin levels and glutamate release in serum and cerebrospinal fluid was also found in a series of patients with acute stroke not treated with thrombolysis [10]. Enhanced glutamate-mediated excitotoxicity was proposed as one of the mechanism of increased body iron stores related injury in cerebral ischemia since, in neuronal cultures, glutamate release is significantly increased by systems leading to free radical formation [22,25], whereas antioxidants have shown a neuroprotective effect by decreasing glutamate release and subsequent excitotoxicity in experimental stroke models [14].

The present findings are in line with experimental data in a rat model of permanent MCA occlusion after high iron intake which showed 66% greater infarct volume, and higher serum levels of glutamate, IL-6, tumour necrosis factor- α and thiobarbituric acid reaction substances (TBARS) in comparison with those of ani-

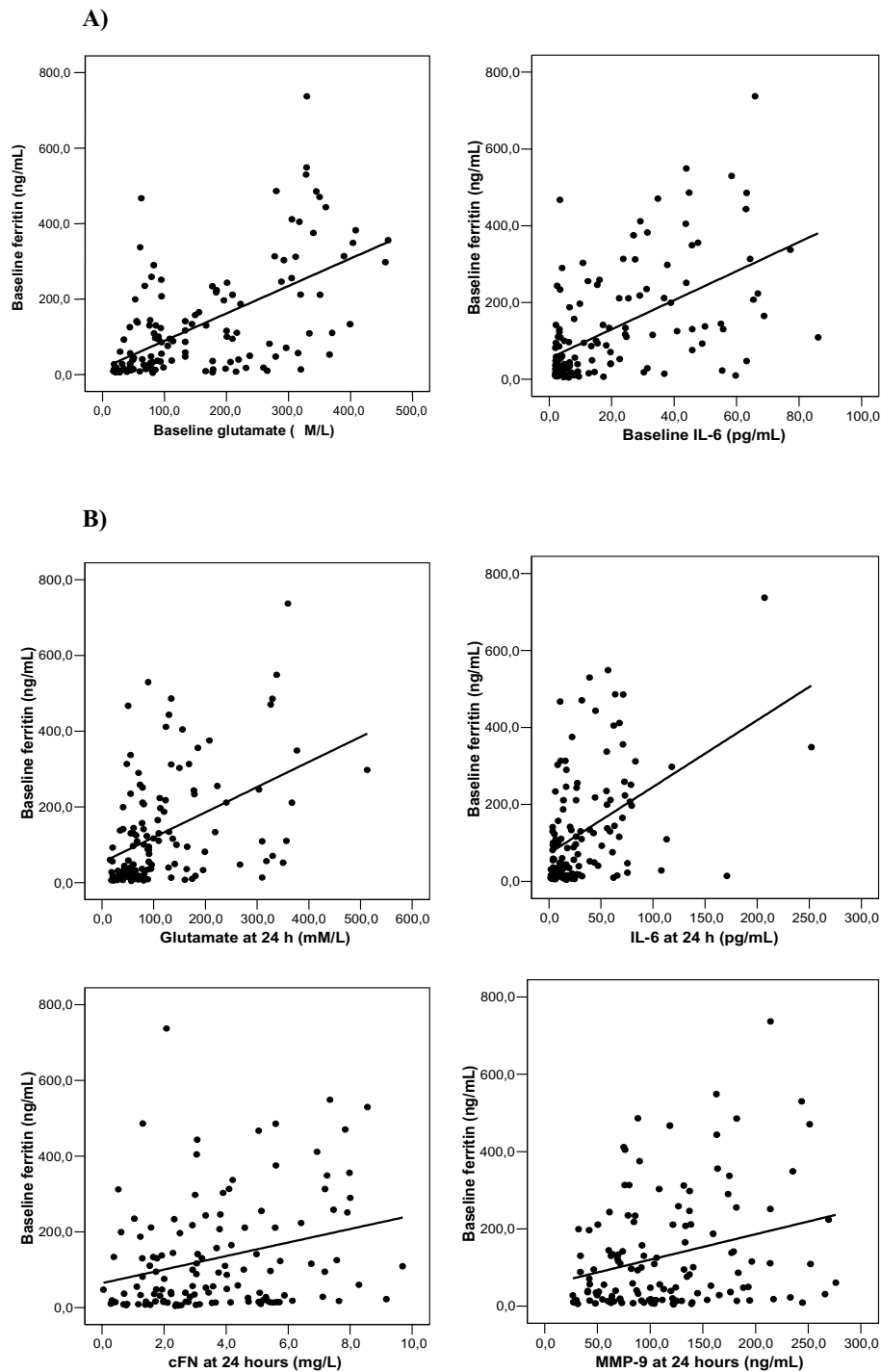


Fig. 1. Significant correlations between serum ferritin and serum biomarkers concentrations at baseline (A) and at 24 hours (B). Correlation coefficients are shown in Table 2.

mals receiving a normal diet [2]. Therefore, biomarkers of oxidative stress, excitotoxicity and inflammation could be surrogates of the importance of iron-related

brain damage after cerebral ischemia. These biomarkers are likely reflecting distinct mechanisms of injury which are interconnected, so it is difficult to delineate

the role of each of them.

The deleterious effects of iron in the neurovascular unit might be aggravated by the t-PA-induced excitotoxicity and MMP-9 overexpression [15,23,30], and by a higher free radicals generation from oxygen after t-PA-induced reperfusion [1], leading to HT and edema. In fact, although iron overload in animals has not been associated with changes in cerebral total iron levels [2], iron accumulates in the endothelial cells [18] and, in ischemia-reperfusion stroke models, it is significantly increased in some brain areas such as the hippocampus along with BBB disruption, lipid peroxidation and apoptosis [13]. The lack of an independent association of serum ferritin values with the markers of inflammatory response and BBB disruption is not in favor of an enhancing effect of iron overload on the mechanisms underlying the microvascular disruption after cerebral ischemia in patients treated with thrombolytic drugs. However this hypothesis needs to be tested in experimental studies.

This study has a number of limitations. First, serum biomarkers do not necessarily reflect the importance of the molecular processes in the ischemic brain, and may be influenced by the acute phase reaction associated with cerebral ischemia. However, serial determinations have not shown a significant increase of serum ferritin levels 4h after experimental stroke, and inconsistent results at 24 hours [20]. Moreover, in the present study, like in previous reports, the association between high ferritin levels, outcome variables and some brain injury biomarkers was independent of stroke severity and other prognostic variables. Second, we did not measure molecular markers of oxidative stress, which have not been widely validated in clinical studies [8], so the potential effect of increased iron stores on ROS generation is unknown in patients with acute ischemic stroke. Third, the influence of arterial recanalization on the biological response has not been evaluated, since we did not perform systematic transcranial Doppler ultrasound. Finally, the clinical design of this study does not allow the investigation of the possible synergistic neurotoxic effect of high iron stores and t-PA in acute stroke, which should be investigated in experimental models.

In conclusion, the present findings indicate that brain damage associated with high serum ferritin levels in acute ischemic stroke patients treated with iv. tPA may be mediated by mechanisms linked to excitotoxic damage. The role of inflammation, BBB disruption and oxidative stress in iron-related brain damage needs further research.

Acknowledgements

Partial results of this investigation were presented at the International Stroke Conference 2007 in San Francisco (CA). This project has been partially supported by grants from the Spanish Ministry of Health (Instituto de Salud Carlos III) FIS PI060788 and RETICS-RD06/0026.

References

- [1] T. Aoki, T. Sumii, T. Mori, X. Wang and E.H. Lo, Blood-brain barrier disruption and matrix metalloproteinase-9 expression during reperfusion injury. Mechanical versus embolic focal ischemia in spontaneously hypertensive rats, *Stroke* **33** (2002), 2711-2771.
- [2] M. Castellanos, N. Puig, T. Carbonell, J. Castillo, J.M. Martínez, R. Rama and A. Dávalos, Iron intake increases infarct volume after permanent middle cerebral artery occlusion in rats, *Brain Res* **952** (2002), 1-6.
- [3] M. Castellanos, R. Leira, J. Serena, M. Blanco, S. Pedraza, J. Castillo and A. Dávalos, Plasma cellular-fibronectin concentration predicts hemorrhagic transformation after thrombolysis therapy in acute ischemic stroke, *Stroke* **35** (2004), 1671-1676.
- [4] M. Castellanos, T. Sobrino, M. Millán, M. García, J. Arenillas, F. Nombela, D. Brea, N. Pérez de la Ossa, J. Serena, J. Vivancos, J. Castillo and A. Dávalos, Serum cellular fibronectin and matrix metalloproteinase-9 predict parenchymal hematoma after thrombolytic therapy in acute ischemic stroke: a multicenter confirmatory study, *Stroke* **38** (2007), 1855-1859.
- [5] M. Castellanos, T. Sobrino, S. Pedraza, O. Moldes, J.M. Pumar, Y. Silva, J. Serena, M. García-Gil, J. Castillo and A. Dávalos, High plasma glutamate concentrations are associated with infarct growth in acute ischemic stroke, *Neurology* (2008), (in press).
- [6] J. Castillo, A. Dávalos, J. Naveiro and M. Noya, Neuroexcitatory amino acids and their relation to infarct size and neurological deficit in ischemic stroke, *Stroke* **27** (1996), 1060-1065.
- [7] J. Castillo, A. Dávalos and M. Noya, Progression of ischemic stroke and excitotoxic aminoacids, *Lancet* **349** (1997), 79-83.
- [8] A. Cherubini, C. Ruggiero, M.C. Polidori and P. Mecocci, Potential markers of oxidative stress in stroke, *Free Radical Biology & Medicine* **39** (2005), 841-852.
- [9] S. Davis, M.A. Helfaer, R.J. Traystman and P.D. Hum, Parallel antioxidant and antiexcitotoxic therapy improves outcome after incomplete global cerebral ischemia in dogs, *Stroke* **28** (1997), 198-205.
- [10] A. Dávalos, J. Castillo, J. Marrugat, J.M. Fernández-Real, A. Armengou, P. Cacabelos and R. Rama, Body iron stores and early neurological deterioration in acute cerebral infarction, *Neurology* **54** (2000), 1568-1574.
- [11] T. Freret, S. Valable, L. Chazalviel, R. Saulnier, E.T. Mackenzie, E. Petit, M. Bernaudin, M. Boulouard and P. Schumann-Bard, Delayed administration of deferoxamine reduces brain damage and promotes functional recovery after transient focal cerebral ischemia in the rat, *Eur J Neurosci* **23** (2006), 1757-1765.

- [12] Y. Gürsoy-Özdemir, A. Can and T. Dalkara, Reperfusion-induced oxidative/nitrate injury to neurovascular unit after focal cerebral ischemia, *Stroke* **35** (2004), 1449–1453.
- [13] G.K. Helal, Systemic administration of Zn²⁺ during the reperfusion phase of transient cerebral ischaemia protects rat hippocampus against iron-catalysed postschaemic injury, *Clin Exp Pharmacol Physiol*, [Epub ahead of print], 2008.
- [14] O. Hurtado, J. De Cristobal, V. Sanchez, I. Lizasoain, A. Cardenas, M.P. Pereira, M.I. Colado, J.C. Leza, P. Lorenzo and M.A. Moro, Inhibition of glutamate release by delaying ATP fall accounts for neuroprotective effects of antioxidants in experimental stroke, *FASEB J* **17** (2003), 2082–2084.
- [15] Kaur J, Zhao Z, Klein GM, Lo EH, Buchan AM, The neurotoxicity of tissue plasminogen activator, *J Cereb Blood Flow Metab* **24** (2004), 945–963.
- [16] H.A. Kontos, Oxygen radicals in cerebral ischemia, *Stroke* **32** (2001), 2712–2716.
- [17] V. Larrue, R.R. von Kummer, A. Muller and E. Bluhmki, Risk factors for severe hemorrhagic transformation in ischemic stroke patients treated with recombinant tissue plasminogen activator: a secondary analysis of the European-Australasian Acute Stroke Study (ECASS II), *Stroke* **32** (2001), 438–441.
- [18] S.H. Mehta, R. Clinton, A. Ergul, A. Tawak and A.M. Dorrance, Neurprotection by tempol in a model of iron-induced oxidative stress in acute ischemic stroke, *Am J Physiol* **286** (2004), 283–288.
- [19] M. Millán, T. Sobrino, M. Castellanos, F. Nombela, J.F. Arenillas, E. Riva, I. Cristobo, M. García, J. Vivancos, J. Serena, M.A. Moro, J. Castillo and A. Dávalos, Increased body iron stores are associated with poor outcome after thrombolytic treatment in acute stroke, *Stroke* **38** (2007), 90–95.
- [20] E. Millerot, A.S. Prigent-Tressier, N.M. Bertrand, P.J.C. Faure, C.M. Mossiat, M.E. Giroud, A.G. Beley and C. Marie, Serum ferritin in stroke: a marker of increased body iron stores or stroke severity? *J Cereb Blood Flow Metab* **25** (2005), 1386–1393.
- [21] J. Montaner, C.A. Molina, J. Monasterio, S. Abilleira, J.F. Arenillas, M. Ribé, M. Quintana and J. Alvarez-Sabín, Matrix metalloproteinases-9 pre-treatment level predicts intracranial hemorrhagic complications after thrombolysis in human stroke, *Circulation* **107** (2003), 598–603.
- [22] H. Monyer, D.M. Hartley and D.W. Choi, 21-Aminosteroids attenuate excitotoxic neuronal injury in cortical cell cultures, *Neuron* **5** (1990), 121–126.
- [23] M. Ning, K.L. Furie, W.J. Koroshetz, H. Lee, M. Barron, M. Lederer, X. Wang, M. Zhu, A.G. Sorensen, E.H. Lo and P.J. Kelly, Association between t-pa therapy and raised early matrix metalloproteinase-9 in acute stroke, *Neurology* **66** (2006), 1550–1555.
- [24] A. Patt, I.R. Horesh, E.M. Berger, A.H. Harken and J.E. Repine, Iron depletion or chelation reduces ischemia/reperfusion-induced edema in gerbil brains, *J Pediatr Surg* **25** (1990), 224–228.
- [25] D.E. Pellegrini-Giampietro, G. Cherici, M. Alesiani, V. Carla and F. Moroni, Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage, *J Neurosci* **10** (1990), 1035–1041.
- [26] E. Romanos, A.M. Planas, S. Amaro and A. Chamorro, Uric acid reduces brain damage and improves the benefits of rt-pa in a rat model of thromboembolic stroke, *J Cereb Blood Flow Metab* (2006), 1–7.
- [27] M.H. Selim and R.R. Ratan, The role of iron neurotoxicity in ischemic stroke, *Ageing Research Reviews* **3** (2004), 345–353.
- [28] J. Serena, M. Blanco, M. Castellanos, Y. Silva, J. Vivancos, M.A. Moro, R. Leira, I. Lizasoain, J. Castillo and A. Dávalos, The prediction of malignant cerebral infarction by molecular brain barrier disruption markers, *Stroke* **36** (2005), 1921–1926.
- [29] E. Tarkowski, L. Rosengren, C. Blomstrand, C. Wikkelso, C. Jensen, S. Ekholm and A. Tarkowski, Intrathecal release of pro- and anti-inflammatory cytokines during stroke, *Clin Exp Immunol* **110** (1997), 492–499.
- [30] K. Tsuji, T. Aoki, E. Tejima, K. Arai, S.R. Lee, D.N. Atochin, P.L. Huang, X. Wang, J. Montaner and E. Lo, Tissue plasminogen activator promotes matrix metalloproteinase-9 upregulation after focal cerebral ischemia, *Stroke* **36** (2005), 1954–1959.
- [31] E. Vila, J. Castillo, A. Dávalos and A. Chamorro, Proinflammatory cytokines and early neurological worsening in ischemic stroke, *Stroke* **31** (2000), 2325–2329.
- [32] N. Walhgren, N. Ahmed, A. Dávalos, G.A. Ford, M. Grond, W. Hacke, M.G. Henerici, M. Kaste, S. Kuelkens, V. Larrue, K.R. Less, R.O. Roine, L. Soenne, D. Toni and G. Vanhooren, for the SITS-MOST investigators, Thrombolysis with alteplase for acute ischemic stroke in the Safe Implementation of Thrombolysis in Stroke-Monitoring Study (SITS-MOST): an observational study, *The Lancet* **369** (2007), 275–282.

